

ISSN 0006-3029

Том 69, Номер 1

Январь - Февраль 2024



БИОФИЗИКА



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 69, номер 1, 2024

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Хлорофиллин ингибирует липидную пероксидацию, запускаемую реакцией Фентона <i>Л.А. Ромодин</i>	5
Вторичные метаболиты и аминокислоты в неокортексе длиннохвостого суслика <i>Urocitellus undulatus</i> на разных стадиях гибернации <i>М.В. Каранова, Н.М. Захарова</i>	10
Супероксидгенерирующая активность никотинамидных коферментов <i>Т.В. Сирота</i>	24
Аннотация нового низкопорогового потенциал-зависимого кальциевого канала трихоплакса <i>Trichoplax adhaerens</i> (тип Placozoa) <i>А.В. Кузнецов, Л.Е. Карташов</i>	32
Пространственная структура молекулы казоксина С <i>Н.А. Ахмедов, Л.Н. Агаева, Р.М. Аббаслы, Л.И. Исмаилова</i>	53
Дифференциальная сканирующая калориметрия пищевого растительного белка в смеси с глицерином <i>А.М. Лукин, М.М. Дотлов, Н.В. Поздняков, С.В. Шилов, Р.Х. Садреева, Д.С. Белоклоков, А.А. Залятдинов, В.В. Кононенко, Е.А. Согорин</i>	62
Идентификация двух QTL, контролирующих устойчивость льна к фузариозному увяданию <i>Т.А. Рожмина, А.А. Кананин, М.П. Банкин, М.Г. Самсонова</i>	69

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Морфометрический анализ серотонинергических структур нервной системы планарий <i>Schmidtea mediterranea</i> <i>Г.В. Кузнецов, Д.Е. Митьковский, Н.Д. Крещенко</i>	77
Астаксантин предотвращает дисрегуляцию митохондриальной динамики в митохондриях мозга крыс, индуцированную изопротеренолом <i>Р.Р. Крестинин, Ю.Л. Бабурина, И.В. Одиноква, Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина</i>	90
Противоопухолевый и цитотоксический эффекты полиакрилата серебра <i>Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, А.К. Чигасова, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина, Ю.А. Хоченкова, К.А. Абзаева</i>	103

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Электрогенез в корнеобитаемой среде различных сортов салата <i>Т.Э. Кулешова, З.А. Гасиева, Д.В. Русаков, А.С. Галушко, Г.Г. Панова</i>	116
Низкочастотные колебания функциональных показателей организма <i>О.В. Гришин, В.Г. Гришин</i>	130

Особенности пуринергической модуляции мионевральной передачи на фоне капсаицина	
<i>А.Е. Хайруллин, М.А. Мухамедьяров, Р.Д. Мухамедзянов, Н.М. Кашианова, Е.Н. Животова, Г.Г. Сучкова, А.Р. Шайхутдинова, А.А. Еремеев, С.Н. Гришин</i>	146
Содержание монооксида азота и меди в гиппокампе крыс при моделировании кратковременной ишемии головного мозга с последующей реперфузией	
<i>Х.Л. Гайнутдинов, В.В. Андрианов, Г.Г. Яфарова, Л.В. Базан, Т.Х. Богодвид, В.С. Июдин, Т.А. Филипович, Ю.Г. Шанько, Ю.П. Токальчик, В.А. Кульчицкий</i>	152
Физические параметры артериального тромба как пористой среды	
<i>Е.С. Бершадский, Д.Ю. Нечипуренко</i>	161
Комплексы гафния как дозоповышающие агенты для фотонозахватной терапии и контрастные агенты для радиологии	
<i>А.А. Липенгольц, В.А. Скрибицкий, Ю.А. Финогенова, А.Т. Шуляк, М.А. Абакумов, А.Ю. Быков, Е.Ю. Григорьева, А.В. Смирнова, К.Е. Шпакова, К.Ю. Жижин</i>	173
Закономерности индукции и роста опухолей у мышей при облучении тонким сканирующим пучком протонов клеток карциномы эрлиха <i>ex vivo</i> и <i>in vivo</i>	
<i>О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, Т.А. Белякова, Н.С. Стрельникова, А.В. Смирнов</i>	183

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Флуктуационный диэлектрический Фурье-спектрометр и экспресс-оценка характеристик форменных элементов крови	
<i>А.В. Ковалев, Ю.И. Гринштейн, А.Н. Мальцева, О.В. Крюкова, В.Г. Суховольский</i>	193
Влияние пульсирующего характера движения ликвора на патологии позвоночника	
<i>А.Г. Зверев, Ю.Н. Токарев</i>	202

Contents

Vol. 69, No. 1, 2024

Molecular Biophysics

Chlorophyllin Inhibits Lipid Peroxidation Triggered by the Fenton Reaction

L.A. Romodin 5

Secondary Metabolites and Amino Acids in the Neocortex of the Long-Tailed Ground Squirrel *Urocitellus undulatus* at Different Stages of Hibernation

M.V. Karanova and N.M. Zakharova 10

Superoxide Generating Activity of Nicotinamide Coenzymes

T.V. Sirota 24

Annotation of a New Low Voltage Activated Calcium Channel of *Trichoplax adhaerens* (Phylum Placozoa)

A.V. Kuznetsov and L.E. Kartashov 32

Spatial Structure of the Casoxin C Molecule

N.A. Akhmedov, L.N. Agaeva, R.M. Abbasli, and L.I. Ismailova 53

Differential Scanning Calorimetry of Edible Plant-based Protein Using Glycerol as a Medium

A.M. Lukin, M.M. Dotlov, N.V. Pozdnyakov, S.V. Shilov, R.Kh. Sadreeva, D.S. Beloklov, A.A. Zalyatdinov, V.V. Kononenko, and E.A. Sogorin 62

Identification of Two QTLs Controlling Flax Resistance to Fusarium Wilt

T.A. Rozhmina, A.A. Kanapin, M.P. Bankin, and M.G. Samsonova 69

Cell Biophysics

Morphometric Analysis of Serotonergic Structures in the Nervous System of Planarian *Schmidtea mediterranea*

G.V. Kuznetsov, D.E. Mitkovskii, and N.D. Kreshchenko 77

Astaxanthin Prevents Dysregulation of Mitochondrial Dynamics in Rat Brain Mitochondria Induced under Isoproterenol-Induced Injury

R.R. Krestinin, Yu.L. Baburina, I.V. Odinokova, L.D. Sotnikova, and O.V. Krestinina 90

Antitumor and Cytotoxic Effects of Silver Polyacrylate

L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, E.I. Nekrasova, A.K. Chigasova, N.V. Bluhterova, V.A. Rikova, M.M. Fomina, Yu.A. Khochenkova, and K.A. Abzaeva 103

Complex Systems Biophysics

Electrogenesis in the Root Environment of Various Lettuce Varieties

T.E. Kuleshova, Z.A. Gasieva, D.V. Rusakov, A.S. Galushko, and G.G. Panova 116

Low-frequency Oscillations of Functional Indicators of the Body	
<i>O.V. Grishin and V.G. Grishin</i>	130
Peculiarities of Purinergic Modulation of Myoneural Transmission in Presence of Capsaicin	
<i>A.E. Khairullin, M.A. Mukhamedyarov, R.D. Mukhamedzyanov, N.M. Kashtanova, E.N. Zhivotova, G.G. Suchkova, A.R. Shaikhutdinova, A.A. Ereemeev, and S.N. Grishin</i>	146
Content of Nitrogen Monoxide and Copper in the Hippocampus of a Rat Model of Short-Term Cerebral Ischemia Followed by Reperfusion	
<i>Kh.L. Gainutdinov, V.V. Andrianov, G.G. Yafarova, L.V. Bazan, T.K. Bogodvid, V.S. Iyudin, T.A. Filipovich, Yu.G. Shanko, Yu.P. Tokalchik, and V.A. Kulchitsky</i>	152
Physical Parameters of Arterial Thrombus as a Porous Medium	
<i>E.S. Bershadsky and D.Yu. Nechipurenko</i>	161
Hafnium Complexes as Dose Enhancement Agents for Photon Capture Therapy and as Contrast Agents for Radiotherapy	
<i>A.A. Lipengolts, V.A. Skribitsky, Yu.A. Finogenova, A.T. Shulyak, M.A. Abakumov, A.Yu. Bykov, E.Yu. Grigorieva, A.V. Smirnova, K.E. Shpakova, and K.Yu. Zhizhin</i>	173
Regularities of Induction and Growth of Tumors in Mice upon Irradiation of Ehrlich Carcinoma Cells <i>ex vivo</i> and <i>in vivo</i> with a Pencil Scanning Beam of Protons	
<i>O.M. Rozanova, E.N. Smirnova, T.A. Belyakova, and N.S. Strelnikova, and A.V. Smirnov</i>	183

Medical Biophysics

Fluctuation Dielectric Fourier Spectrometer and Rapid Evaluation of Blood Cell Characteristics	
<i>A.V. Kovalev, Yu.I. Grinstein, A.N. Maltseva, O.V. Krukova, and V.G. Soukhovolsky</i>	193
Effects of the Pulsating Flow of Cerebrospinal Fluid on Spinal Pathologies	
<i>A.G. Zverev and Yu.N. Tokarev</i>	202

УДК 577.3

ХЛОРОФИЛЛИН ИНГИБИРУЕТ ЛИПИДНУЮ ПЕРОКСИДАЦИЮ, ЗАПУСКАЕМУЮ РЕАКЦИЕЙ ФЕНТОНА

© 2024 г. Л.А. Ромодин*.*#

*Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, ул. Живописная, 46, Москва, 123098, Россия

#E-mail: fmbc-fmba@bk.ru

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 10.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

При помощи реакции Фентона смоделирована система, в которой образуются частицы, аналогичные таковым при радиоллизе воды. Методом регистрации хемилюминесценции оценена супрессия под действием хлорофиллина реакций, вызванных образующимися в системе гидроксильными радикалами. Показано, что натрий-медный хлорофиллин дозозависимо угнетает хемилюминесценцию, сопровождающую индуцированное реакцией Фентона перекисное окисление фосфатидной кислоты. На основании этого можно сделать вывод, что медный хлорофиллин может угнетать метаболизм липидных радиотоксинов — липидную перекисную окисление, вызванную атакой продуктов радиолиза воды на липидные молекулы.

Ключевые слова: реакция Фентона, гидроксильный радикал, гидропероксильный радикал, хлорофилл, хлорофиллин, антиоксидант, перекисное окисление липидов, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302924010013, EDN: RLUA AO

Радиозащитные свойства препаратов на основе хлорофилла были независимо обнаружены несколькими научными коллективами на абсолютно различных экспериментальных моделях. В статье [1] обобщен и обсужден экспериментальный материал, представленный в работах данных исследователей. Среди них можно отметить работу [2], авторы которой подробно изучили антиоксидантное действие хлорофиллина (водорастворимого продукта омыления хлорофилла) при воздействии γ -излучения, и работы [3, 4], выполненные на базе Московской академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина под руководством профессора Н.П. Лысенко. Для различных доз γ -излучения был определен фактор изменения дозы (отношение дозы излучения, вызывающей гибель половины получивших препарат хлорофилла животных, к дозе, смертельной для половины особей, не получивших его), находящийся в диапазоне 2–4 для различных доз излучения [3].

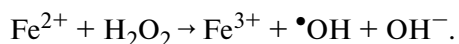
На основании данных о снижении содержания малонового диальдегида у облученных животных под действием препарата на основе хлорофилла

[2, 3] и данных хемилюминесцентного исследования с моделированием метаболизма липидных радиотоксинов [4] можно предполагать, что подавление перекисного окисления липидов (ПОЛ) является компонентом радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла.

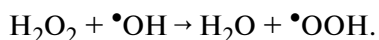
Однако в работе [4] ПОЛ запускалось ферментативно, с использованием комплекса цитохрома с с кардиолипином, катализировавшего квазилипоксигеназную реакцию. В процессе этого в системе образовывалось большое количество липоксильных и липидных (условно алкильных) радикалов [5], имеющих в кислородной среде тенденцию к превращению в липопероксильные радикалы [6]. Непосредственно развитие каскада ПОЛ в данном случае не отличается от имеющего место при действии радиации [7, 8], однако сам процесс индукции данного каскада имеет отличия: в модельной системе из работы [4] липидную молекулу окислял цитохром с, а при действии радиации, кроме случаев прямого радиолиза биомолекул, липиды окисляются продуктами радиолиза воды — гидроксильными и пероксильными радикалами [7, 8].

Смоделировать данный процесс возможно в системе, в которой протекает реакция Фентона. Ее уравнение можно представить следующим образом [9]:

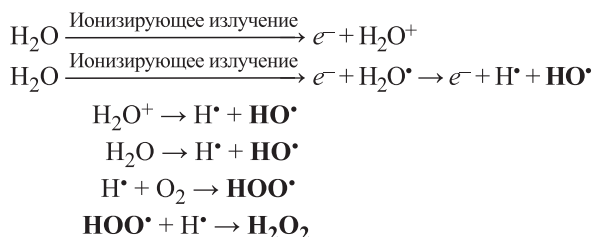
Сокращения: ПОЛ — перекисное окисление липидов, ХЛ — хемилюминесценция, Cu-Ch — натрий-медный хлорофиллин.



Образование гидропероксильного радикала возможно по реакции:



Данную систему вполне можно считать модельной для процессов радиолитического распада воды, так как в ней присутствуют те же активные формы кислорода, что и при нем [8]:



В приведенных выше реакциях, имеющих место при радиолитическом распада воды, жирным шрифтом выделены формулы веществ, присутствующих в системе, в которой протекает реакция Фентона. Таким образом, данную систему с определенными допущениями можно использовать для моделирования процессов, имеющих место при действии ионизирующего излучения.

Активные формы кислорода, образовавшиеся в процессе радиолитического распада воды, атакуют в живых клетках молекулы биополимеров и липидов, обуславливая тем самым развитие лучевого поражения на уровне клетки [7]. Окисление молекулы липида является триггером для запуска каскада

реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ), проиллюстрированного на рис. 1.

Ввиду того что в эукариотических клетках практически повсеместно присутствуют мембранные структуры, крайне важной составляющей данного поражения является развивающаяся липидная перекисная окислительная реакция [10], поэтому фактор, влияющий на течение данного процесса, может аналогичным образом повлиять и на тяжесть лучевого поражения.

На основании вышесказанного было спланировано исследование способности хлорофиллина ингибировать ПОЛ, индуцированное протекающей в растворе реакцией Фентона как источника активных форм кислорода, аналогичных продуктам радиолитического распада воды.

Течение свободнорадикальных реакций можно анализировать методом регистрации хемилюминесценции (ХЛ), позволяющим оценить их скорость [11].

Реакция Фентона в водном растворе сопровождается свечением, обусловленным реакциями с образованием и участием синглетного кислорода [9, 12]. Однако наибольший вклад в свечение, испускаемое используемой нами экспериментальной модельной системой, вносит хемилюминесценция, сопровождающая ПОЛ. Свечение возникает при переходе возбужденных продуктов ПОЛ в основное состояние. Механизм его возникновения показан на рис. 2 [13].

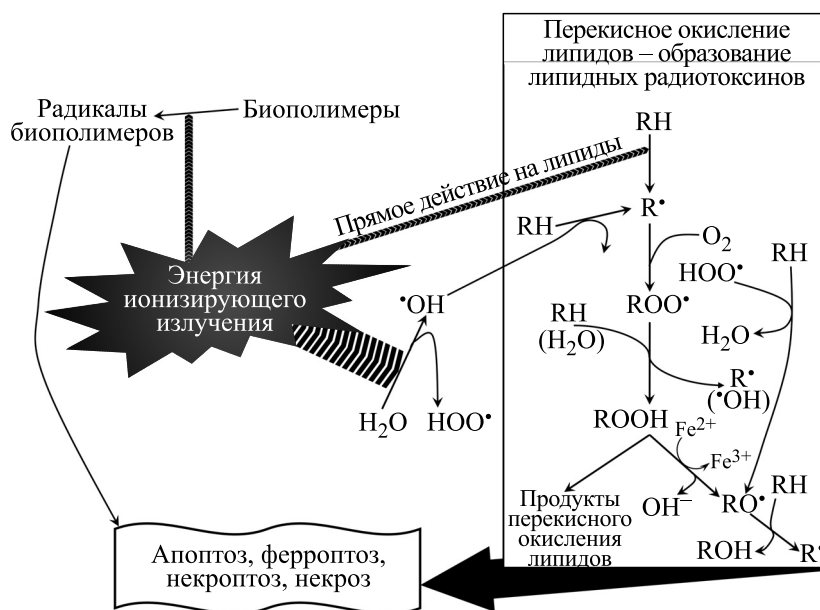


Рис. 1. Механизм биологического действия ионизирующего излучения, обуславливающий развитие каскада реакций липидной перекисной окислительной реакции.

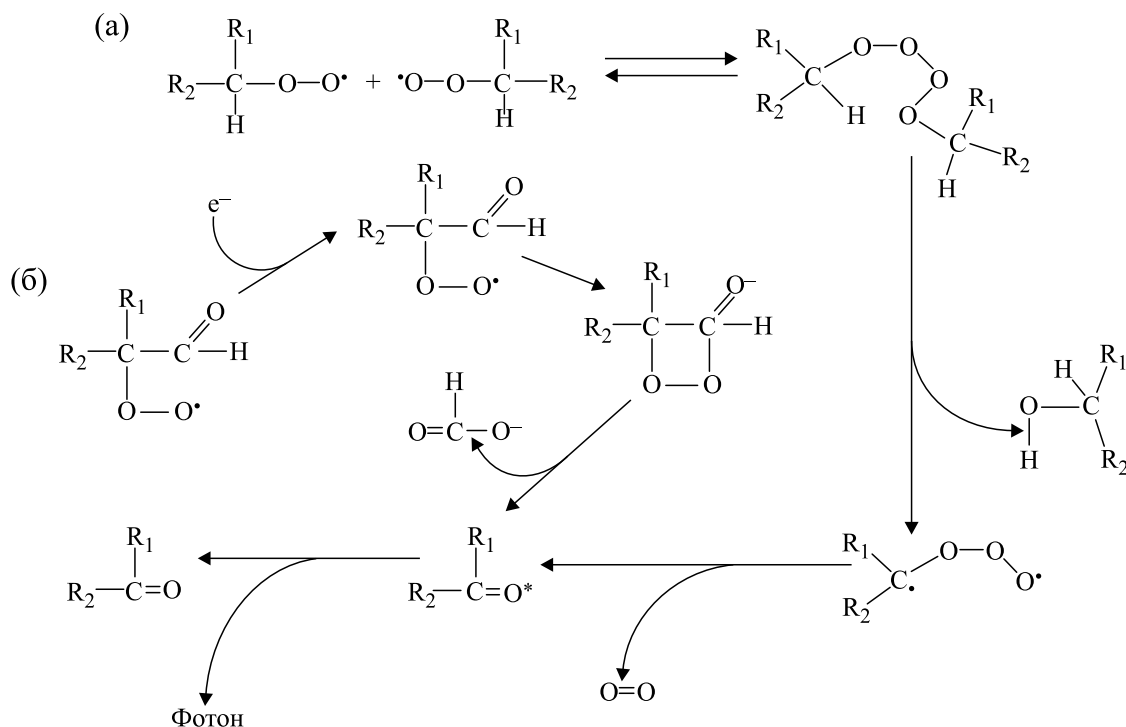


Рис. 2. Основные механизмы высвечивания фотонов в результате окисления липидов: (а) — реакция диспропорционирования пероксильных радикалов, (б) — образование и распад диоксетановой группировки (на схеме — диоксетанон) [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрация хемилюминесценции была проведена на установке для регистрации сверхслабых свечений, разработанной профессором А.И. Журавлёвым при участии сотрудников МГАВМиБ — МВА имени К.И. Скрябина (Москва) [14]. Перед измерениями проводили ее калибровку относительно эталона ЖС-19 № 35, который, согласно паспорту, испускает 859 тысяч квантов в секунду.

В кювету хемилюминометра вносили 200 мкл 5 мМ раствора $FeSO_4$ (АО «РЕАХИМ», Россия), 400 мкл спиртового раствора натриевой соли дилинолеилфосфатидной кислоты (Merck, США), 400 мкл раствора натрий-медного хлорофиллина (сокр. Cu-Ch, Macklin, Китай) в различных концентрациях (в контрольном опыте вместо него вносили дистиллированную воду), 2600 мкл дистиллированной воды. Далее проводили регистрацию хемилюминесцентного сигнала в течение 30 с, после чего в кювету добавляли 400 мкл 2.5 мМ раствора H_2O_2 («Белмедпрепараты», Беларусь). После этого проводили регистрацию ХЛ-сигнала в течение 300 с. Измерение для каждой пробы было проведено по 8 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Присутствие хлорофиллина вызывало снижение интенсивности ХЛ, сопровождающей ПОЛ, индуцированное протеканием в системе реакции Фентона. Данный результат проиллюстрирован на рис. 1: указанное снижение интенсивности свечения видно как по непосредственным ХЛ-кривым (рис. 1а), так и по значениям светосуммы — площади между ХЛ-кривой и осью абсцисс (рис. 1б).

Достоверное снижение интенсивности ХЛ наблюдается уже при концентрациях хлорофиллина менее 1 мкМ. Этот результат в целом согласуется с данными, полученными на модели ферментативного ПОЛ, где достоверное угнетение ХЛ вызывал хлорофиллин в концентрациях выше 1.5 мкмоль/л [4].

Проиллюстрированное на рис. 3 угнетение под действием Cu-Ch ХЛ, сопровождающей индуцированное реакцией Фентона ПОЛ, можно считать доказательством того, что Cu-Ch способен ингибировать ПОЛ, вызванное атакой гидроксильных и пероксильных радикалов на молекулы липидов. А так как именно эти реакции обуславливают метаболизм липидных радиотоксинов, имеющий место при действии ионизирующего излучения на организм, можно говорить о том, что в настоящей работе получены доказательства того, что в механизме радиозащитного действия

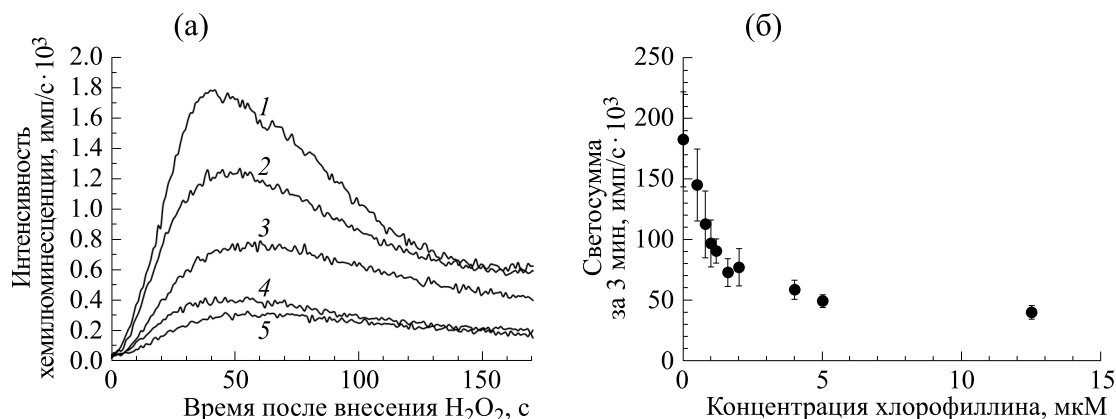


Рис. 3. Влияние хлорофиллина на интенсивность ХЛ, сопровождающей липидную пероксидацию, индуцированную 250 мкМ H₂O₂ в системе: 250 мкМ Fe²⁺, 1400 мкМ дилинолеилфосфатидной кислоты, хлорофиллин различных концентраций: (а) — кривые ХЛ при отсутствии Cu-Ch (кривая 1) и в присутствии Cu-Ch в концентрациях 0.5 мкМ (кривая 2), 1 мкМ (кривая 3), 5 мкМ (кривая 4), 12.5 мкМ (кривая 5); (б) — значения светосуммы системы за первые 3 мин реакции при различных концентрациях Cu-Ch.

препаратов на основе хлорофилла важную роль играет подавление реакций ПОЛ, вызванных действием радиации на клетки.

Необходимо указать, что при анализе результатов экспериментов по регистрации ХЛ на системах, в которых присутствуют хлорофилл или его производные, необходимо учитывать, что хлорофилл может проявлять свойства усилителя ХЛ [15]. Однако в случае настоящего исследования данный факт не вызывает беспокойства: возможное усиление интенсивности ХЛ под действием Cu-Ch могло искажать результаты лишь в пользу предположения, что Cu-Ch не является ингибитором ПОЛ. А так как было показано дозозависимое снижение интенсивности ХЛ в пробах, содержащих Cu-Ch, указанная авторами [15] способность хлорофилла усиливать ХЛ не служит основанием для сомнений в выводах, полученных при анализе данных на рис. 1. Ведь даже если она и искажила результат, то только в сторону мнимого увеличения интенсивности свечения, которое трактуется как повышение (а не снижение) интенсивности ПОЛ. А поскольку интенсивность ХЛ в пробах, содержащих Cu-Ch, ниже, чем в контроле, интенсивность ПОЛ в них тоже ниже.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, согласно данным, полученным методом регистрации хемилюминесценции, можно говорить о том, что медный хлорофиллин ингибирует липидную пероксидацию, запускаемую гидроксильными и пероксильными радикалами. А так как данные вещества являются в конечном счете основными продуктами радиолиза воды, можно сделать вывод, что аналогичными свойствами хлорофиллин может обладать и в жи-

вых клетках, подвергнутых радиационному воздействию. Данный результат подтверждает выдвинутое ранее предположение о том, что в механизме радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла важную роль играет подавление реакций липидной пероксидации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор настоящей работы выражают благодарность и признательность М.А. Кувшиновой, технику лаборатории Фармакологии противолучевых средств ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, за проведение ряда измерений интенсивности хемилюминесценции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор настоящей статьи заявляет, что не имеет конфликта интересов касательно материалов, представленных в работе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве экспериментальных объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ромодин Л. А. и Лысенко Н. П. Радиопротекторное действие препаратов на основе хлорофилла. *Биофизика*, **67** (1), 96–104 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010094
2. Kumar S. S., Shankar B., and Sainis K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1672** (2), 100–111 (2004). DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002
3. Поздеев А. В. *Разработка радиозащитных средств на основе веществ растительного и минерального происхождения*. Дисс. ... докт. биол. наук по специальности 03.01.01 — Радиобиология (Федер. центр токсиколог., радиац. и биол. безопасности, Кострома, 2015).
4. Ромодин Л. А. Угнетение хлорофиллином хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую комплексом цитохрома с с кардиолипином квазилипоксигеназную реакцию. *Изв. Саратовского ун-та. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология*, **20** (4), 427–432 (2020). DOI: 10.18500/1816-9775-2020-20-4-427-432
5. Ромодин Л. А., Лысенко Н. П. и Пашовкин Т. Н. Использование хинолизидиновых производных кумарина при изучении механизмов действия комплекса цитохрома с с кардиолипином. *Биол. мембраны*, **39** (3), 224–234. (2022). DOI: 10.31857/S0233475522020062
6. Владимиров Ю. А. и Арчаков А. И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах* (Наука, М., 1972).
7. Кузин А. М. *Структурно-метаболическая теория в радиобиологии* (Наука, М., 1986).
8. Лысенко Н. П., Пак В. В., Рогожина Л. В. и Кусурова З. Г. *Радиобиология: учебник*, под ред. Н. П. Лысенко и В. В. Пака, 5-е изд. (Изд-во «Лань», Санкт-Петербург, 2019).
9. Иванова И. П., Трофимова С. В. и Пискарёв И. М. Хемилюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, - математическое моделирование процесса; особенности, параметры и условия применения для биомедицинских исследований. *Современные технологии в медицине*, **6** (4), 14–25 (2014).
10. Бурлакова Е. Б., Аткарская М. В., Фаткуллина Л. Д. и Андреев С. Г. Радиационно-индуцированные изменения структурного состояния мембран клеток крови человека. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **54** (2), 162–168. (2014). DOI: 10.7868/S0869803114020040
11. Владимиров Ю. А. и Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биол. химии*, **49**, 341–388 (2009).
12. Пискарёв И. М. и Иванова И. П. Оценка окислительной и антиоксидантной способности биологических субстратов по хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона. *Современные технологии в медицине*, **8** (3), 16–26 (2016). DOI: 10.17691/stm2016.8.3.02
13. Ромодин Л. А. Хемилюминесценция в исследовании свободнорадикальных реакций. Часть 1. *Acta Naturae*, **13** (3), 90–100 (2021). DOI: 10.32607/acta-naturae.10912
14. Закотеев Ю. А. *Хемилюминесценция. Принципы и методики регистрации, оборудование, задачи*. (Москва, 2015). <http://louvaah-mar.narod.ru/doc/chemilumi-zakoteev.pdf>
15. Sharov V. S., Briviba K., and Sies H. Assessment of the C-525 laser dye as a chemiluminescence sensitizer for lipid peroxidation in biological membranes: A comparison with chlorophyll- α . *Free Radic. Biol. Med.*, **21** (6), 833–843 (1996).

Chlorophyllin Inhibits Lipid Peroxidation Triggered by the Fenton Reaction

L.A. Romodin*

*State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123098 Russia

The Fenton reaction was used to model a system in which particles similar to those formed during water radiolysis are created. A method of registering the chemiluminescence was applied to the analysis of the chlorophyllin-induced suppression of reactions caused by hydroxyl radicals. It has been shown that sodium copper chlorophyllin dose-dependently inhibits the chemiluminescence which accompanies the Fenton-mediated oxidation of phosphatidic acid. This leads us to conclude that copper chlorophyllin can inhibit the metabolism of lipid radiotoxins, also known as lipid peroxidation, caused by the attack of water radiolysis products to lipid molecules.

Keywords: Fenton reaction, hydroxyl radical, hydroperoxyl radical, chlorophyll, chlorophyllin, antioxidant, lipid peroxidation, chemiluminescence

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ И АМИНОКИСЛОТЫ В НЕОКОРТЕКСЕ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА *Urocitellus undulatus* НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ГИБЕРНАЦИИ

© 2024 г. М.В. Каранова*,[#], Н.М. Захарова*

*Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
«Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
ул. Институтская, 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

[#]E-mail: karanovari@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2023 г.

После доработки 29.11.2023 г.

Принята к публикации 07.12.2023 г.

Работа является продолжением проведенного авторами исследования изменения пулов аминокислот миокарда сусликов во время зимней спячки. Изучены нейрохимические профили аминокислот и вторичных метаболитов (таурина, фосфосерина и цистеиновой кислоты) в неокортексе суслика на разных стадиях оцепенения: в начале торпора (2–3 суток) и при длительном торпоре (9–10 суток), а также во время кратковременного зимнего пробуждения (зимней активности, эутермии). Во время оцепенения (в его начале и в конце соответственно) наблюдалось скоординированное снижение возбуждающих нейротрансмиттеров (глутамата — на 7 и 14%; аспартата — на 25 и 52%) и увеличение главного ингибитора трансмиссии — гамма-аминомасляной кислоты (на 50 и 67%). Количество аланина, незначительное в летнем неокортексе, в начальной стадии оцепенения и после длительного оцепенения увеличивалось (на 98 и 126% соответственно), свидетельствуя о частичном переключении на анаэробный гликолиз. Уровень названных субстанций во время кратковременной межбачной эутермии возвращался к контрольному. Поведение участников анаплеротических реакций цикла трикарбоновых кислот, глутамата и аспартата, во время торпора и зимней активности было аналогично их ответам в миокарде, но отличалось количественно. Ответы нейромодуляторов глицина, треонина и лизина отличались радикально в сравнении с их ответами в миокарде. Изменения пулов таурина и фосфосерина не выявлены, но уровень цистеиновой кислоты снижался, по сравнению с летним контролем, от 0.51 ± 0.06 мкмоль/г до 0.07 ± 0.01 мкмоль/г в конце торпора, а во время зимней эутермии увеличивался и становился в 2 раза ниже летнего уровня. Полученные данные показывают, что метаболические пути, в которых участвуют анаплеротические аминокислоты неокортекса, сохраняют, по сравнению с миокардом, большую активность во время зимней спячки, при этом пулы нейромодуляторов, регулирующих процессы торможения, увеличиваются.

Ключевые слова: гибернация, оцепенение, длиннохвостый суслик, неокортекс, миокард, аминокислоты, энергетический метаболизм.

DOI: 10.31857/S0006302924010026, EDN: RJBJNH

Характерные для гетеротермов изменения биохимического и гормонального статуса, процессы погружения в спячку и пробуждения в конце баута находятся не только под контролем гормонов и нейропептидов, но и в первую очередь центральной нервной системы (ЦНС). Согласно литературным данным, амплитуда электроэнцефалограммы (ЭЭГ) начинает изменяться задолго до снижения температуры тела, и до начала спяч-

ки, соответственно, изменяется и метаболизм [1, 2]. Предполагается, что активность структур мозга изменяет не температура; напротив, изменение активности мозга инициирует снижение внутренней температуры [3]. В состоянии глубокого торпора электрическая активность в мозге не регистрируется, но при этом осуществляется скоординированная экспрессия множества белков, необходимых для обеспечения жизнеспособности мозга при пробуждении [4].

Основной мишенью для холодового воздействия гомойотермных млекопитающих является ЦНС, клетки которой теряют активность даже

Сокращения: ЦНС — центральная нервная система, ЭЭГ — электроэнцефалограмма, ГАМК — гамма-аминомасляная кислота, ЦТК — цикл трикарбоновых кислот.

при непродолжительном (1,5 ч) охлаждении. Вслед за этим начинается глобальная дендритная регрессия: отек нейропиля, потеря очертаний клеточных тел дендритных отростков, исчезновение митохондриальных крист, синаптических пузырьков и разрушение клеточного скелета [5]. Однако нервная ткань гибернирующих сусликов в тех же условиях остается неповрежденной [6]. Предполагается, что нарушение нервной активности при охлаждении гомойотермных животных связано со значительным нарастанием концентрации K^+ во внеклеточном пространстве [7]. Возможно, у гибернирующих животных регулятором экстраклеточного K^+ может выступать глия, плотность которой у длиннохвостых сусликов в 3 раза выше, чем, например, у морских свинок [6, 8].

При гибернации наблюдаются значительные изменения не только в метаболизме, но и в экспрессии генов на уровне транскрипции, при этом сложную закономерность демонстрирует изменение экспрессии на протяжении нескольких стадий цикла оцепенения-пробуждения [9]. В головном мозге летучих мышей *Rhinolophus ferrumequinum* в состоянии спячки обнаружена сверхэкспрессия 41 гена; 17 из них известны, они имеют отношение к регуляции клеточного цикла и апоптоза, росту нейронов, переносу сигналов и нейропротекции [10].

Окислительно-восстановительные процессы тесно связаны с метаболизмом аминокислот. Аминокислоты служат строительными блоками белка; они функционируют во всем организме как ключевые метаболиты, предшественники других метаболитов и липидов, а также регуляторы экспрессии генов и клеточной сигнализации [11]. В ЦНС аминокислоты могут также играть специализированные роли — нейротрансмиттеров, нейромодуляторов, предшественников других низкомолекулярных нейротрансмиттеров [11]. Состав аминокислот в норме обладает высоким постоянством и специфичностью, но значительные перестройки защитно-адаптивных механизмов сопровождаются его изменением. Мозг формирует пул аминокислот, значительную часть которых он получает из печени через кровеносное русло. Благодаря наличию специфичных транспортеров и избирательному активному переносу через гематоэнцефалический барьер, между кровью и мозгом имеется высокий концентрационный градиент аминокислот. Профиль свободных протеиногенных аминокислот, а также ряда вторичных метаболитов является уникальной характеристикой каждого органа для каждого вида животных; его изменение имеет закономерности в процессе эволюции и не только: каждая стадия гибернации зимнеящих животных и каждый их орган отличаются специфиче-

скими особенностями аминокислотного профиля [12–15].

Изучение механизмов естественной адаптации к низким температурам имеет большое теоретическое и практическое значение, так как гетеротермные млекопитающие переносят тяжелую гипоксию, а также различные поражения ЦНС лучше, чем гомойотермные. Толерантность к гипоксии и гипотермии заложена в фундаментальных основах работы мозга, и выяснение ее механизмов ждет применения в медицинских и биотехнологических целях [16]. Изучение поведения аминокислот в разных органах во время оцепенения и кратковременного пробуждения (эутермия) должно способствовать дополнительному пониманию глубинных процессов, происходящих во время зимней спячки.

Опубликовано несколько работ, посвященных изменению аминокислотных пулов мозга зимнеящих во время гибернации, но эти данные в основном не полные и отчасти противоречивые. В большинстве работ изучались профили небольшого числа аминокислот, или исследовались показатели только одной стадии оцепенения либо не использовался период изотермии у гетеротермов в качестве контроля [1, 17–19]. Кроме того, в литературе отсутствует информация об участии в гибернации серо- и фосфоросодержащих вторичных метаболитов, таких как фосфосерин, цистеиновая кислота или, возможно, другие.

Цель данного исследования состояла в получении уточняющей и дополнительной информации об участии свободных аминокислот мозга гетеротермов в адаптации к гипометаболическому состоянию в разных стадиях зимней спячки. Вторая цель заключалась в выявлении участия фосфоро- и серосодержащих вторичных метаболитов неокортекса в процессах оцепенения и кратковременной зимней эутермии.

Задача работы:

— Изучить и сравнить ответы свободных аминокислот в неокортексе гетеротермных длиннохвостых сусликов в начале оцепенения (на 2-3-и сутки), через 9-10 суток оцепенения и во время кратковременных пробуждений (эутермии), в сравнении с летним контролем.

— Изучить участие в процессах гибернации вторичных метаболитов.

— Сравнить полученные данные с аналогичными результатами, полученными ранее на миокарде и скелетных мышцах этих же сусликов в тот же исследуемый период.

— Обсудить ответы аминокислот на разных стадиях, учитывая литературные данные о функции каждой из них в мозге.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовались взрослые длиннохвостые суслики (*U. undulatus*) мужского пола, масса тела 613 ± 60 г. Животных доставляли из Якутии в конце августа. До конца октября сусликов содержали индивидуально в специально оборудованном виварии при естественной фотопериодичности с достаточным запасом пищи и воды. В период спячки животные находились в темном помещении при температуре окружающей среды от 0 до 2°C. Для мониторинга баутов в гибернационный период часть сусликов индивидуально размещали в находящиеся в холодильной камере деревянные ящики (20 × 20 × 25 см), в дно которых был установлен термистор (чувствительность 0.2°C). Во время спячки температура подстилки достигала 1–4°C, тогда как при кратковременных периодах эутермии повышалась до 14°C.

Суслики состояли из 4 групп:

1-я группа ($n = 6$) — бодрствующие активные животные в летний период (июнь), контроль;

2-я группа ($n = 6$) — торпор, 2–3 суток (начало спячки), при ректальной температуре от 0.2 до 0.4°C; декабрь, январь;

3-я группа ($n = 6$) — торпор, 9–10 суток, при ректальной температуре от 0.2 до 0.4°C; декабрь–январь;

4-я группа ($n = 5$) — спонтанно пробудившиеся зимние активные животные, температура тела 37,6°C (зимняя эутермия).

Перед декапитацией торпидных животных взвешивали и измеряли ректальную температуру, после декапитации измеряли температуру в области сердца и мозга. Регистрацию ректальной температуры осуществляли с помощью специализированного датчика RET-2, температуру в области сердца и мозга измеряли с помощью датчика RET-3 (Physitemp, США, точность $\pm 0.1^\circ\text{C}$). После извлечения неокортекса биоматериал гомогенизировали в 0.5 н холодной хлорной кислоте (1 : 9) и центрифугировали при температуре 4°C 20 мин при 20000 об/мин на центрифуге Centricon (США). Супернатант нейтрализовали 2 н раствором КОН и снова центрифугировали. Конечный супернатант хранили для дальнейшего анализа в Криобанке ИБК РАН.

Операции для активных сусликов проводили под наркозом с Золетилом (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) (4 мг/кг внутримышечно); были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

Состав и количество свободных аминокислот определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии [20] на модульном хроматографе Infinity LC-1260 (Agilent, США). Разделение смеси аминокислот осуществляли на колонке с трехступенчатым градиентом натрий-цитратного бу-

фера: № 1 — 0.3 н, pH 2.98; № 2 — 0.4 н, pH 3.81; № 3 — 0.45 н, pH 9.97. Диапазон температуры от 55 до 74°C. Стационарная фаза: сульфированный сополимер стирола с дивинилбензолом. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.45 мл/мин. Послеколонная модификация аминокислот выполнялась с нингидрином; интенсивность окрашивания измеряли при 570 нм. Для каждой серии экспериментов делали хроматограмму стандартной смеси аминокислот; концентрация каждой из вносимых аминокислот составляла 2.5 нмоль. Содержание свободных аминокислот выражали в мкмоль/г влажной массы. Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США).

Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США). Для сравнения независимых измерений использовали *U*-тест Манна–Уитни. Данные выражали как среднее значение параллельных измерений, собранных в ходе трех выборочных анализов; для каждого анализа (пробы) использовано 2 животных ($n = 6$). Значения представлены как средние $\pm$ SEM.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наибольшее количество в содержании всех аминокислот головного мозга приходится на долю главного возбуждающего нейромедиатора — глутамата, участвующего в проведении основных потоков информации в ЦНС и обслуживающего около 40% всех нейронов. Вследствие эксайто-токсичности прохождение глутамата через гематоэнцефалический барьер имеет некоторые ограничения на аблюминальной мембране эндотелиальных клеток внутренней оболочки сосудов [21], и в экстрацеллюлярном пространстве мозга поддерживается низкая концентрация глутамата. Транспорт глутамата — энергозависимый процесс, осуществляемый как минимум пятью Na^+ -зависимыми транспортными системами, располагающимися, в зависимости от типа переносчика, в различных клетках мозга: эндотелии, астроцитах, нейронах [22]. С помощью переносчиков глутамат и глутамин перемещаются между клетками, причем глутамат для поддержания низкой внеклеточной концентрации аккумулируется внутри астроглии, где и метаболизируется [23].

Специфику метаболизма каждого вида животных и каждого органа определяют устойчивые количественные соотношения между свободными аминокислотами. Особенность метаболизма мозга млекопитающих, в частности длиннохвостого суслика, отражена в нейрохимическом профиле аминокислот неокортекса в изотермическом статусе, представленном в табл. 1. Сравнение этих

Таблица 1. Пулы заменимых аминокислот в неокортексе длиннохвостого суслика *U. undulatus* летом и в период гибернации

Аминокислота	Контроль (июнь)	Торпор I (начало)	Торпор II (конец)	Зимняя активность (активные)
Аспартат	1.80 ± 0.15	$1.35 \pm 0.10^*$	$0.86 \pm 0.07^*$	1.82 ± 0.16
Серин	0.25 ± 0.2	$0.34 \pm 0.03^*$	$0.38 \pm 0.03^*$	0.30 ± 0.03
Глутамат	9.20 ± 0.70	8.55 ± 0.71	8.05 ± 0.58	9.08 ± 0.75
Глицин	0.50 ± 0.04	0.53 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.46 ± 0.06
Аланин	0.53 ± 0.04	$1.05 \pm 0.06^*$	$1.73 \pm 0.15^*$	$0.24 \pm 0.02^*$
Цистин	0.25 ± 0.02	следовое количество	следовое количество	следовое количество
ГАМК	2.12 ± 0.25	$3.17 \pm 0.20^*$	$3.55 \pm 0.25^*$	1.90 ± 0.16

Примечание. Значения даны в мкмоль/г сырой массы. Контроль — летние активные животные в июне ($n = 6$); торпор I (2–3 суток от начала спячки, $n = 6$); торпор II (9–10 суток спячки, $n = 6$); зимняя активность — кратковременное пробуждение, эутермия ($n = 5$). Температура мозга сусликов от 1.6 до 2.0°C. * — $P < 0.05$ относительно контрольной группы (июнь). Глутамин и фенилаланин не обнаружены по техническим причинам.

профилей на разных стадиях оцепенения выявляет значительные изменения содержания вышеназванных метаболитов, связанных одновременно и с энергетикой, и с синаптической передачей — глутаминовой кислоты, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и аспартата. Для этого профиля в норме (в данном случае это летние измерения) характерно очень высокое содержание глутамата (9.20 ± 0.70 мкмоль/г) и в 17.3 раза ниже — содержание аланина. Аспартат составляет 1/5 часть пула глутамата, а количество ГАМК — в 4.3 раза меньше глутамата. Уровень глицина находится на уровне аланина (0.50 ± 0.04 мкмоль/г). Приблизительно такое же соотношение характерно в норме и для миокарда этих животных [12], за исключением отсутствующей ГАМК (рис. 1–4). Такое сходство в пропорции основных аминокислот в неокортексе и миокарде примечательно с учетом того, что источники энергии в сердце и мозге разные: преобладание β -окисления жирных кислот — в сердце [24], окисление глюкозы — в мозге [25].

Характер ответов наиболее ярких участников энергетического метаболизма, глутамата и аспартата, в разные периоды гибернации аналогичен наблюдаемому в миокарде [12], но отличается количеством (табл. 2). Обе аминокислоты уменьшают свои пулы во время торпора: глутамат от летнего уровня 9.20 ± 0.70 мкмоль/г снижается соответственно до 8.55 ± 0.71 и 8.05 ± 0.58 мкмоль/г в начале и в конце торпора, а во время эутермии возвращается к исходному уровню, до 9.08 ± 0.75 мкмоль/г.

Концентрация аспарагиновой кислоты падает от летней, 1.80 ± 0.15 мкмоль/г, до 1.35 ± 0.10 и 0.86 ± 0.07 на разных стадиях оцепенения и возвращается к исходному уровню при зимнем пробуждении (1.82 ± 0.16 мкмоль/г). Снижение активности аспартата может быть следствием снижения активности цикла Кребса, точнее, производства оксалоацетата и его переаминирования с образованием аспарагиновой кислоты. Снижение глутамата можно интерпретировать таким же образом, хотя оно может быть связано и с увеличением концентрации глутамина, который образуется в астроглии.

Конечно, в неокортексе нет и быть не может «сердечного» свойства реципрокного соотношения глутамата и аланина, постоянства суммы их количества. Глутамат убывает во время торпора в начале и конце гипотермии на 7 и 12% (рис. 1), при этом сохраняется его большой пул, поддерживающий необходимый уровень метаболизма мозговой ткани во время оцепенения. Как и в миокарде [12], снижение глутамата в неокортексе коррелирует с нарастанием аланина: от летнего уровня 0.53 ± 0.44 мкмоль/г до 1.05 ± 0.06 в начале торпора и до 1.73 ± 0.15 мкмоль/г к концу оцепенения, т.е. на 98 и 226% соответственно (табл. 2, рис. 1). Во время кратковременной эутермии между оцепенениями уровень аланина падает и становится даже меньше, чем летом (0.24 ± 0.02 мкмоль/г).

Тормозные процессы требуют от нейронов значительной мобилизации энергетических за-

Таблица 2. Пулы незаменимых аминокислот в неокортексе длиннохвостого суслика *U. undulatus* летом и в период гибернации

Аминокислоты	Контроль (июнь)	Торпор I (начало)	Торпор II (конец)	Зимняя активность (эутермия)
Треонин	0.114 ± 0.010	$0.195 \pm 0.030^*$	$0.260 \pm 0.020^*$	$0.080 \pm 0.006^*$
Гистидин	0.130 ± 0.009	$0.101 \pm 0.017^*$	$0.0410 \pm 0.0036^*$	$0.110 \pm 0.010^*$
Валин	0.165 ± 0.024	0.138 ± 0.016	0.154 ± 0.015	0.145 ± 0.014
Метионин	0.184 ± 0.016	$0.1400 \pm 0.0147^*$	0.150 ± 0.022	0.185 ± 0.020
Изолейцин	0.0200 ± 0.0017	$0.0090 \pm 0.0009^*$	$0.0760 \pm 0.0071^*$	$0.0900 \pm 0.0093^*$
Лейцин	0.0440 ± 0.0035	0.044 ± 0.004	0.035 ± 0.003	0.0400 ± 0.0035
Тирозин	0.057 ± 0.006	$0.035 \pm 0.003^*$	$0.0270 \pm 0.0023^*$	0.0470 ± 0.0049
Лизин	0.180 ± 0.016	$0.303 \pm 0.025^*$	$0.390 \pm 0.033^*$	$0.133 \pm 0.012^*$

Примечание. Значения даны в мкмоль/г сырой массы. Контроль – летние активные животные в июне ($n = 6$); торпор I (2–3 суток от начала спячки, $n = 6$); торпор II (9–10 суток спячки, $n = 6$); зимняя активность – кратковременное пробуждение, эутермия ($n = 5$). Температура мозга сусликов от 1.6 до 2.0°C. * – $P < 0.05$ относительно контрольной группы (июнь). Глутамин и фенилаланин не обнаружены по техническим причинам.

трат. В мозге ГАМК – универсальный тормозной нейромедиатор высших и низших позвоночных животных, функционирование которого связывают с подавлением метаболизма. ГАМК востребован постоянно и присутствует в значительном количестве, составляя четвертую-пятую часть от количества глутамата. В неокортексе суслика при

нормотермии уровень ГАМК составляет 2.12 ± 0.25 мкмоль/г (табл. 2); во время оцепенения возрастает до 3.55 ± 0.25 мкмоль/г. Межаутная эутермия уменьшает пул ГАМК более чем до исходного уровня, до 1.90 ± 0.16 мкмоль/г.

Простейшая аминокислота глицин является тормозным нейротрансмиттером спинного мозга, ствола головного мозга и мозжечка, при этом она присутствует во всех отделах мозга, но с другими функциями, выполняя, например, роль коагониста глутамата, модулятора ионотропных глутаматных *N*-метил-D-аспартатных рецепторов (NMDA-рецепторов) и способствуя передаче сигнала от нейромедиаторов глутамата и аспартата [26]. Кроме того, глицин стимулирует выделение ГАМК. Глициновые рецепторы имеются во многих участках головного мозга. В летнее время глицин присутствует в неокортексе в существенном количестве, 0.50 ± 0.04 мкмоль/г (табл. 1), сопоставимом с пулом глицина в миокарде [12], причем во время оцепенения и в активное летнее время баланс глицина практически одинаков (табл. 2), в отличие от миокарда, где во время торпора (вероятно, даже перед его началом) пул глицина снижается до минимального значения. При гипометаболическом состоянии отсутствие изменения или повышение внеклеточной концентрации тормозных нейромедиаторов может быть одним из важных звеньев подавления электриче-

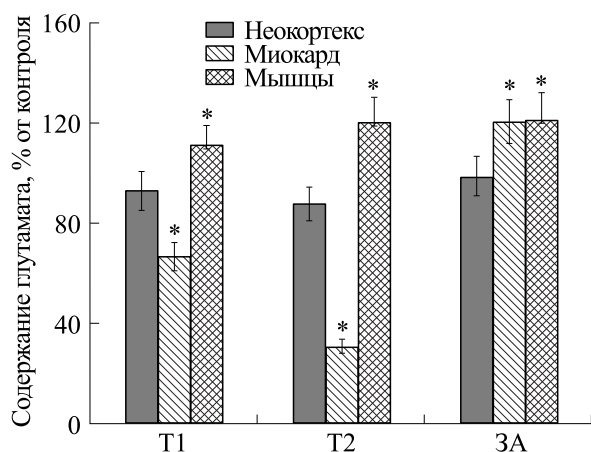


Рис. 1. Содержание глутамата в неокортексе, миокарде и скелетных мышцах длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 – начало торпора; T2 – конец торпора; 3A – зимняя активность (эутермия). * – $P < 0.05$ относительно контрольной группы (июнь).

Таблица 3. Вторичные метаболиты в неокортексе длиннохвостого суслика *U. undulatus* летом и в период гибернации

Вторичные метаболиты	Контроль (июнь)	Торпор I (начало)	Торпор II (конец)	Зимняя активность (эутермия)
НВ	следы	следы	следы	следы
Цистеиновая кислота	0.51 ± 0.06	$0.12 \pm 0.02^*$	$0.07 \pm 0.01^*$	$0.25 \pm 0.02^*$
Фосфосерин	1.42 ± 0.10	1.43 ± 0.16	1.22 ± 0.11	$1.05 \pm 0.07^*$
Таурин	1.52 ± 0.14	1.60 ± 0.15	1.70 ± 0.16	1.65 ± 0.16

Примечание. Значения даны в мкмоль/г сырой ткани. Контроль – летние активные животные в июне ($n = 6$); торпор I (2–3 суток от начала спячки, $n = 6$); торпор II (9–10 суток спячки, $n = 6$); зимняя активность – кратковременное пробуждение, эутермия ($n = 5$). Температура мозга сусликов от 1.6 до 2.0°C. * – $P < 0.05$ относительно контрольной группы (июнь). Глутамин и фенилаланин не обнаружены по техническим причинам. НВ – неизвестное вещество, высота пика которого составляет приблизительно 1/10 от высоты пика цистеиновой кислоты.

ской активности, позволяющим снижать потребление энергии.

Динамика изменения пулов незаменимых аминокислот в неокортексе во время зимней спячки представлена в табл. 2. Глюкогенная гидроксиаминокислота треонин регулирует нейротрансдукцию в головном мозге и используется для синтеза глицина во время эндогенной выработки L-карнитина. Аналогично другой гидроксиаминокислоте, серину (табл. 1), треонин увеличивается во время торпора от летнего уровня 0.114 ± 0.010 мкмоль/г до 0.195 ± 0.030 и 0.260 ± 0.020 мкмоль/г (табл. 2). При кратковременном пробуждении уровень треонина падает до 0.080 ± 0.006 мкмоль/г.

Среди других незаменимых аминокислот ярко выражено увеличение количества лизина, от летнего 0.180 ± 0.016 до 0.390 ± 0.033 мкмоль/г при длительном торпоре (табл. 2). При кратковременных пробуждениях пул лизина уменьшился в 3 раза и составил 0.133 ± 0.012 мкмоль/г. Содержание других незаменимых аминокислот менялось незначительно или оставалось постоянным, что еще раз доказывает эффективность гомеостатического механизма пула свободных аминокислот мозга.

Вторичные метаболиты, наблюдаемые в данной работе, выходят первыми из хроматографической колонки в последовательности: цистеиновая кислота, фосфосерин, таурин. Изменения их пулов на разных стадиях представлено в табл. 3. Сульфаминокислота таурин (табл. 3) известна как низкотемпературный протектор многих органов беспозвоночных и позвоночных, включая рыб и рептилий [27, 28]. Часть адаптогенных

функций таурин сохраняет и у млекопитающих, но, вероятно, уже в модифицированном виде. Несмотря на то что таурин проходит через гематоэнцефалический барьер, в мозге рыб его количество в зимнее время снижается, в отличие от мышечной ткани, в несколько раз увеличивающей пул [27]. У гетеротермных сусликов летний и зимний уровни таурина в мозге довольно высокие, но практически не изменяются на протяжении зимней спячки: 1.52 ± 0.14 , 1.70 ± 0.16 и 1.65 ± 0.16 мкмоль/г летом, в период длительного торпора и во время зимней эутермии соответственно (табл. 3).

Не изменяет пулы фосфосерин, сложный эфир серина и фосфорной кислоты (табл. 3). Известно, что в синапсах мозга из фосфосерина образуется D-серин, составляющий в мозге 1/3 от L-серина и играющий важную роль в процессах обучения и памяти [29].

Значительно снижается концентрация цистеиновой кислоты: 0.51 ± 0.06 , 0.12 ± 0.02 , 0.07 ± 0.01 и 0.25 ± 0.02 мкмоль/г летом, в начале и в конце торпора и во время эутермии соответственно (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокая интенсивность энергетического метаболизма мозга существенно отличается от энергетики сердца, которая на 65–70% поддерживается за счет окисления жирных кислот [24, 30]. В отличие от сердца, основным источником генерации АТФ в мозге служит аэробное окисление глюкозы, запасы которой в нем невелики (2.5 – 4.0 мкмоль/г), а потребности мозга в энер-

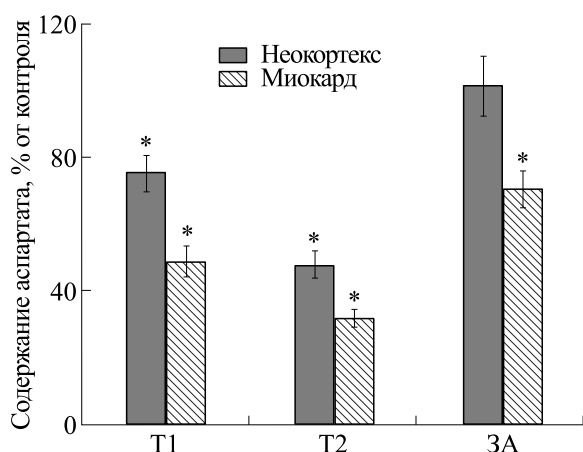


Рис. 2. Содержание аспартага в неокортексе и миокарде длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 — начало торпора; T2 — конец торпора; 3A — зимняя активность (эутермия). * — $P < 0.05$ относительно контрольной группы (июнь).

гии очень высоки [25], поэтому глюкоза, синтезированная в печени, с помощью транспортеров с высоким сродством (GLUT1), постоянно поступает в мозг [31]. Лишь при продолжительном голодании клетки мозга начинают использовать дополнительный источник энергии — кетоновые тела [32].

Несмотря на очень низкую скорость метаболизма во время оцепенения, ^{14}C - и ^{13}C -глюкоза, поступающая в кровь, транспортируется через гематоэнцефалический барьер и менее чем через 1 ч после внутривенной инфузии метаболизируется до лактата [19]. В присутствии кислорода лактат превращается в пируват, который поступает в митохондрии, в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Таким образом, мозговая ткань гибернаторов во время торпора сохраняет функциональный пируватдегидрогеназный комплекс и, следовательно, функцию ЦТК. Несмотря на то что расход энергии торпидного мозга низок (в отличие от эутермного) и отсутствуют потенциалы действия, как и многие процессы биосинтеза, синтез лактата и его использование в ЦТК для производства глутамата, ГАМК и глутамина является непрерывным метаболическим процессом [11]. Взаимосвязанное снижение в начальной стадии торпора и в его конце содержания глутамата и аспартата, участников анаплеротических реакций ЦТК, подтверждает этот вывод (табл. 1). Важно отметить, что характер ответов глутамата и аспартата на низкие температуры в неокортексе аналогичен их ответам в миокарде, вследствие участия в аэробном ЦТК, несмотря на то что их источники энергии различны: жирные кислоты (для миокарда) и глюкоза (для мозга). Однако в количественном отношении различия значительны: во время оце-

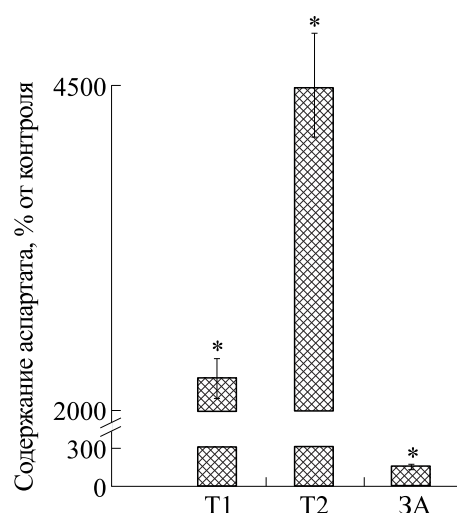


Рис. 3. Содержание аспартага в скелетных мышцах длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 — начало торпора; T2 — конец торпора; 3A — зимняя активность (эутермия). * — $P < 0.05$ относительно контрольной группы (июнь) [13].

пенения уровень глутамата в миокарде падает на 33 и 69% (рис. 1), а аспартата — на 51 и 68% (рис. 2) [12]. Следует учесть, что нейротрансмиттерная функция глутамата и аспартата составляет около одного процента всех остальных их функций, и количественный вклад этой доли трансмисмиттеров в уменьшение пулов вряд ли ощутим. Но как же радикально отличается характер ответов этих аминокислот в неокортексе от их ответов в мышечной ткани! Глутамат на обеих стадиях оцепенения практически не изменяется (рис. 1), отражая фундаментальное отличие путей синтеза АТФ (гликолиз) от путей, доминирующих в неокортексе и миокарде (ЦТК). И, наряду с этим, сенсационный и непредсказуемый взлет количества аспартата в скелетных мышцах: в 22.5 раза в начальной стадии торпора и в 45 раз в его конце (рис. 3) [13]. Имея в виду состояние покоя, в котором находятся мышцы во время длительного оцепенения, и низкий уровень метаболизма, предполагающий активацию процессов образования активных форм кислорода, можно достаточно уверенно предположить антиоксидантную функцию аспартата в мышечной ткани во время торпора и ее исключительное значение.

Ткани неокортекса, миокарда и мышц во время оцепенения в той или иной степени испытывают состояние гипоксии, вероятно, возрастающее по мере увеличения продолжительности торпора. Небольшая потребность в АТФ во время гипоксии обеспечивается гликолизом, а изменение уровня аланина характеризует интенсивность гликолиза. На рис. 4 представлено количественное участие аланина (в процентах от контроля),

отражающее вклад гликолиза в поддержание энергетического равновесия этих тканей.

Кажется удивительным и, может быть, даже парадоксальным: высокий процент увеличения аланина (98 и 226% в неокортексе, 83 и 207% в миокарде) наблюдается именно в тех органах, где в норме идет аэробное окисление (ЦТК и окислительное фосфорилирование). Но во время оцепенения эти органы все равно функционируют, хотя и в замедленном режиме, для которого необходимо меньшее количество АТФ, и оно обеспечивается в процессе гликолиза. Однако мышцы, для которых гликолиз в норме является доминирующим источником АТФ, во время оцепенения бездействуют, их метаболизм находится на более низком уровне, чем в неокортексе и миокарде, и небольшое увеличение содержания аланина (максимум на 34%) отражает вялотекущий процесс анаэробного окисления.

Другой особенностью энергетики мозга является ГАМК-шунт — альтернативный вариант и важный этап [33, 34]. Превращения ГАМК-шунта состоят в трансаминировании α -кетоглутарата в глутамат, в декарбоксилировании глутамата с образованием ГАМК, в образовании янтарного полуальдегида из ГАМК и его окислении до сукцината, который далее окисляется в ЦТК. Таким образом, в этом шунте ГАМК может использоваться в качестве энергетического субстрата. ГАМК-шунт отличается от универсальной последовательности ЦТК отсутствием реакции образования сукцинил-КоА, связанной с субстратным фосфорилированием, но характеризуется появлением возможности синтезировать нейромедиатор ГАМК [35]. Подобные механизмы наиболее ярко проявляются в глутамат- и ГАМК-эргических нейронах и окружающих их астроцитах [36].

Торможение — активный процесс, требующий собственных нервных клеток, собственных синопсов, собственных медиаторов и модуляторов. На торможение мозг тратит энергии, возможно, даже больше, чем на возбуждение. Учитывая реципрокные и количественно одинаковые изменения глутамата и ГАМК во время торпора (табл. 1) и постоянную конкуренцию ГАМК с глутаматом, можно полагать, что ГАМК-шунт работает и во время оцепенения, но с меньшей скоростью, а взаимосвязанное снижение глутамата и увеличение ГАМК играют важную роль в защите мозга от эксайтотоксического повреждения, вызываемого глутаматом [37]. Контроль за экстраклеточными концентрациями глутамата и ГАМК — одна из фундаментальных функций клеток глии [38]. Баланс концентраций этих двух нейротрансмиттеров решающий, он характеризует активность метаболических процессов. В связи с этим, поскольку для превращения ГАМК в сукцинат требуется активность ЦТК, увеличение ГАМК, на-

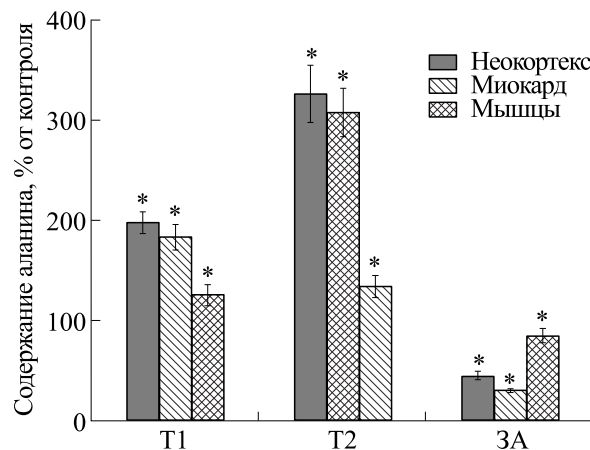


Рис. 4. Содержание аланина в неокортексе, миокарде и скелетных мышцах длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 — начало торпора; T2 — конец торпора; 3A — зимняя активность (эутермия). * — $P < 0.05$ относительно контрольной группы (июнь).

блюдаемое в настоящем исследовании, может быть результатом снижения активности цикла ЦТК [37].

Заслуживает упоминания давняя, но очень интересная работа [39], в которой было показано, что в результате искусственно вызванного охлаждения тела крысы (до 18–20°C) аминокислотный профиль коры мозга, изменявшийся стихийно, как ответ на стресс, радикально отличался от наблюдаемого в наших опытах у сусликов: уровень глутамата снижался в 2 раза — намного больше, чем у сусликов во время торпора (табл. 1, рис. 1); аспартат демонстрировал не снижение, а увеличение в 1.5 раза; концентрация ГАМК повышалась едва заметно (на уровне 10%). На фоне этой «авральной» перестройки сбалансированный, рассчитанный на длительный срок аминокислотный гомеостаз сусликов во время оцепенения выглядит как математическая формула.

Потребность мозга в кислороде исключительно велика [40], и оксигенация мозговой ткани сохраняется во время оцепенения, несмотря на низкий мозговой кровоток [19]. Тем не менее в мозге зимнеявляющихся животных в период торпора имеет место и анаэробный гликолиз [36, 41]. Увеличение количества аланина, коррелирующее с уменьшением глутамата во время торпора, является одним из подтверждений этого важного вывода (табл. 1, рис. 4). Однако отметим, что в неокортексе количество аланина во время торпора, особенно в конце оцепенения, существенно меньше, чем в это же время в миокарде (табл. 1, рис. 4). С учетом высокого спроса мозга на кислород этот факт подтверждает, что анаэробный гликолиз даже во время длительного гипометаболического состояния играет менее существенную

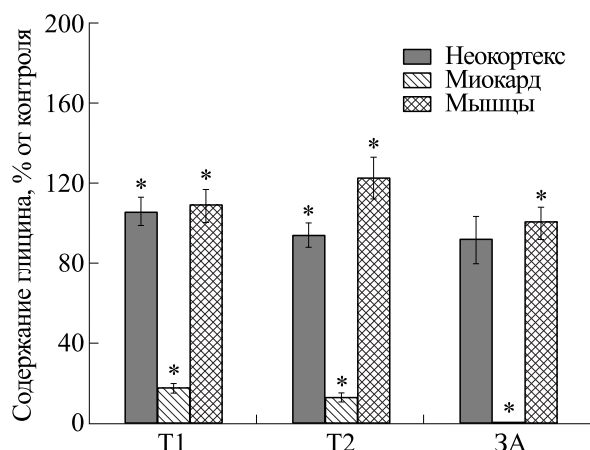


Рис. 5. Содержание глицина в неокортексе, миокарде и скелетных мышцах длиннохвостых сусликов на разных стадиях гибернации в % к летнему периоду. T1 – начало торпора; T2 – конец торпора; ЗА – зимняя активность (эутермия). * – $P < 0.05$ относительно контрольной группы (июнь).

роль в энергетике неокортекса, чем в энергетике миокарда [42]. Интересно упомянуть в связи с этим гипотезу авторов работы [37] о роли гипоксии в эволюции, которая, возможно, оказывала избирательное давление и сыграла положительную роль в сохранении ГАМК и глутамата как основных тормозящих и возбуждающих нейротрансмиттеров у позвоночных и беспозвоночных. Динамика изменения концентрации ГАМК, наблюдаемая в нашей работе (табл. 1), в основном совпадает с данными других авторов, различаясь степенью увеличения в начальной стадии оцепенения и степенью достижения прежнего уровня в статусе эутермии [17, 18, 43].

Глутамат участвует в поддержании метаболизма ЦТК на определенном высоком уровне, в снабжении митохондриальных синтетических процессов восстановительными эквивалентами. Одним из вариантов образования глутамата является перенос аминокислотной группы с аланина или аспартата на α -кетоглутарат в результате обратимого трансаминирования; направление реакции зависит от количества того или иного субстрата. При участии многочисленных аминотрансфераз аминокислотных групп различных аминокислот переносятся на глутаминовую кислоту, которая переаминируется с щавелевоуксусной кислотой с образованием аспартата. В связи с этим бесполезно отметить, что аспартат, рассматриваемый как вторичный возбуждающий нейротрансмиттер в ЦНС, появился в мозге на довольно поздних этапах эволюции. В мозге прудовой рыбы *P. glenii* он отсутствовал летом, но вдруг «зачем-то» возник в минимальном количестве зимой при температуре воды 4°C [27]. Как бывает в ходе эволюции, вещества, вдруг возникшие «зачем-то» в каких-то ор-

ганах именно при низких температурах, обнаруживаются в большем количестве уже на последующей стадии эволюции. Интересно, что аспартат, который совместно локализован в ГАМКергических нейронах, в экспериментах с зимнеспящими никогда не метился ни ^{14}C , ни ^{13}C , несмотря на высокое обогащение этими метками ГАМК [19]. Отсутствие метки предполагает, что превращение аспартата из оксалоацетата (участвует аспартаттрансфераза) имеет очень низкую активность как в нейронах, так и в астроцитах, а это подразумевает специфическую для оцепенения инактивацию малат-аспартатного челнока, на которую может влиять снижение количества аспартата и глутамата в тканях мозга, а также гипоксия.

Наши результаты относительно дикарбоновых аминокислот и ГАМК в самых общих чертах соответствуют данным дагестанских ученых, работавших только с четырьмя аминокислотами, для неокортекса гибернирующих сусликов *Citellus pigmaeus* [1, 17], а также данным работы [19] для хомяка *Mesocricetus auratus*. Однако неудивительно, что количественно эти данные существенно различаются: использовались разные виды животных и разные режимы содержания, а авторы работы [19] исследовали только период торпора и эутермию, тогда как летний контроль, сравнение с которым делает результаты более выразительными, у них отсутствовал. Исключение относится к ответам аспартата: при пробуждении уровень аспартата у *C. pigmaeus* не достигал контрольного [17].

В отличие от миокарда [12], в котором количество глицина оказалось минимальным уже в начале торпора (рис. 5), возможно даже до его наступления, уровень глицина в неокортексе, в летней норме соответствующий уровню аланина (0.50 и 0.53 мкмоль/г), во время оцепенения и во время кратковременной эутермии практически не изменялся (табл. 1; рис. 4, 5). Поразительно иным, как и ответ аспартата в мышечной ткани (рис. 2), был ответ цистина в мышцах, наблюдаемый в предыдущей работе: после летнего отсутствия цистин в начальной стадии гипотермии возник в количестве, равном аспартату (0.45 мкмоль/г), а после длительной торпидности вырос еще до 0.6 мкмоль/г [13]. Глицин – тормозной нейротрансмиттер, и можно было бы ожидать его повышения во время оцепенения, но тормозную функцию он выполняет в спинном мозге, стволе мозга и мозжечке [44, 45]. В других отделах мозга (по крайней мере, в неокортексе) он играет роль нейромодулятора ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов, эндогенными лигандами которых являются глутамат и аспартат, и для эффективной активации которых, помимо двух молекул глутамата, необходимы две

молекулы глицина [46]. Большая часть глицина синтезируется в головном мозге, особенно в неокортексе. Последним отделом мозга, в котором глицин переключается с функции активирующего медиатора развивающегося мозга на тормозной медиатор взрослого, является неокортекс. Основные источники глицина в ЦНС — серин и глюкоза [47].

Небольшое, по сравнению с миокардом [12], увеличение аланина в мозге (табл. 1, рис. 4), возможно, объясняется наличием небольшой гипоксии, на существовании которой во время торпора настаивают некоторые авторы, несмотря на то что дефицита кислорода у гибернаторов не наблюдается [48, 49]. Наши данные относительно соотношения аланина и глутамата заметно различаются с данными работы [19], полученными на переднем мозге хомяков, но эти различия не имеют принципиального значения. Аланин, совсем малое количество которого характерно для мозга суслика (0.53 мкмоль/г), после длинного торпора возрастал, по нашим данным, более чем в 3 раза по сравнению летним контролем (1.73 мкмоль/г) и обрушивался до 0.24 мкмоль/г во время зимней эутермии (табл. 1, рис. 4). Возрастал аланин и по данным работы [19], но неизвестно, во сколько раз, из-за отсутствия летнего контроля, однако количество глутамата во время оцепенения у этих авторов было намного ниже по сравнению с эутермией (5.85 и 9.02 мкмоль/г соответственно) и с нашими данными (8.05 и 9.08 мкмоль/г). Такие различия можно объяснить индивидуальными различиями этих животных, разницей в температуре тела во время оцепенения (у хомяков около 5°C, у сусликов около 0°C), а также длительностью нахождения в состоянии гипотермии.

Вполне вероятно, что значительные изменения в тканевых уровнях аминокислот происходят еще до вхождения в оцепенение, но не во время оцепенения. Наши данные показывают, что значительные изменения аминокислот, участвующих в энергоснабжении, происходят именно во время торпора (табл. 1). Таким изменениям подвержены прежде всего участники анаплеротических реакций ЦТК (глутамат, аспартат), а также аланин, пул которого находится в зависимости от уровня глутамата, от наличия и уровня гипоксии.

Серин напоминает о себе увеличением пула во время торпора (табл. 1). Эта крайне важная гидроксиаминокислота синтезируется из глюкозы в астроцитах [50]. Биосинтез в нейронах мембранных липидов — фосфатидилсерина, фосфатидилэтанолamina, сфинголипидов и цереброзидов — полностью зависит от L-серина [50]. L-Серин участвует в синтезе глицина, цистеина, метионина, триптофана и является метаболическим предшественником предполагаемого глиотрансмит-

тера D-серина, эндогенного коагониста NMDA-рецепторов [51].

Другая гидроксиаминокислота, треонин, также относится к категории аминокислот, увеличивающих присутствие во время торпора (табл. 2). Сведения о метаболизме и роли этой незаменимой аминокислоты в мозге крайне ограничены. Основная небелковая роль треонина в мозге может быть связана с тем, что он является предшественником глицина: введение треонина увеличивает концентрацию глицина в ЦНС крысы [52].

Увеличение пула незаменимой аминокислоты лизина, отличающейся необыкновенно интересным метаболизмом и промежуточными продуктами, таит немало неразгаданных смыслов (табл. 2). Не так много сведений о действиях, которые выполняет лизин в мозге, но известны его нейромодулирующие эффекты. Например, влияние на ГАМКергическую передачу и ингибирование связывания серотонина (5-НТ) с 5-НТ₄ рецепторами [53, 54].

Вторичные метаболиты (табл. 3) синтезируются из первичных; они не принимают непосредственного участия в нормальном росте, развитии и размножении организма, но выполняют другие важные функции. Присутствие небольшого количества фосфосерина в мозге рыб *Perccottus glenii* было обнаружено нами ранее, но обнаружено в мозге, а не в крови и мышцах, причем только зимой, а также в результате воздействия холодового шока летом [27]. Как упоминалось выше, появление при низких температурах метаболита, нового для данного органа, — знак того, что на последующих этапах эволюции он может появиться уже при нормальных температурах. Таким образом, низкотемпературные адаптогены — таурин, цистеиновая кислота, фосфосерин — в тех или иных органах млекопитающих, действительно, оказались участниками специфического метаболизма [55].

Фосфосерин, сложный эфир серина и фосфорной кислоты, присутствует в неокортексе в значительном количестве и в летнее время, и на обеих стадиях торпора (табл. 3). Фосфосерин является побочным продуктом гликолиза и последующим промежуточным звеном в биосинтезе серина. Известно, что добавление фосфорильной группы к аминокислоте или ее удаление играет роль в передаче сигналов клетки и в метаболизме. Фосфосерин имеет близкое структурное сходство с глутаматом и является мембранным метаболитом, обладающим острым ингибирующим эффектом, но замедленным возбуждающим действием. Предполагается, что ингибирование фосфосерином опосредовано пресинаптическим ингибированием высвобождения L-глутамата. Механизм замедленного возбуждения может за-

ключаться в тенденции фосфосерина имитировать действие L-2-амино-4-фосфономасляной кислоты, блокатора транспорта L-глутамата, чувствительного к хлоридам и кальцию. Также было обнаружено, что фосфосерин является конкурентным антагонистом в сайте распознавания NMDA-рецепторов и антагонистом гидролиза инозитол-фосфолипидов, опосредуемого метаботропными рецепторами [56]. С учетом такой характеристики фосфосерина можно представить его роль в качестве тонкого, почти ювелирного, регулятора нейрональных процессов. Эта роль востребована и при нормальной температуре, и в состоянии оцепенения.

Аминокислоты, содержащие серу, имеют особое адаптогенное значение. Возможно, это связано с большим диапазоном окислительно-восстановительных превращений серы: на внешнем энергетическом уровне ее атома 6 электронов. В то же время отсутствие количественных изменений серосодержащих соединений в разных метаболических состояниях не означает отсутствия участия в происходящих событиях. Таурин, малоактивный в нормальных условиях, не обнаруживал заметных изменений ни во время гипотермии, ни во время эутермии (табл. 4), однако известно, что функции таурина заложены в основе его ионно-мембранных взаимодействий, модулирующего влияния на возбуждающую и тормозную нейротрансмиссию [57, 58]. Ингибирование возбуждения нейронов внеклеточным таурином осуществляется через рецепторы ГАМК и глицина (таурин — агонист глициновых рецепторов) [57, 59]. Таурин регулирует в нейронах гомеостаз кальция и кальций-зависимую активность протектиназы С [58]. Неведомо, какие из названных характеристик используются во время оцепенения, но многие метаболиты изменяют свойства в зависимости от среды, и, возможно, во время зимней спячки таурин действует иначе, чем в активном состоянии.

Содержание цистеиновой кислоты, предшественника таурина, снижается в неокортексе торпидных сусликов (табл. 3), и не исключено, что снижение связано с ее возбуждающим действием [60].

ВЫВОДЫ

Панорама изменений аминокислот в неокортексе во время зимней спячки сусликов и сравнение с миокардом и скелетными мышцами [12, 13] показывают специфическую для каждого органа роль аминокислот в гомеостазе гипометаболического состояния.

Согласованные изменения на разных стадиях спячки таких участников энергоснабжения, как глутамата, аспартата и аланина, в общих чертах

аналогичны изменениям, обнаруженным ранее в миокарде [12]. В то же время уменьшение пула глутамата (не аспартата) в неокортексе существенно меньше, чем в миокарде, и отражает более значительную, чем в миокарде, роль кислорода и большую потребность в АТФ в неокортексе во время оцепенения. Пул аланина увеличивался эквивалентно изменениям пула глутамата, был небольшим в сравнении с изменением в миокарде и, вероятно, отражал переключение с аэробного энергоснабжения на гликолиз, стимулированный появлением в результате длительного оцепенения небольшой гипоксии.

Не очень значительные изменения пулов возбуждающих трансмиссивов, глутамата и аспартата, предполагают сохранение неокортекса в состоянии «боевой» готовности для продолжения активной жизнедеятельности. Вероятно, в этой готовности к возбуждению во время торпора участвуют нейромодуляторы глицин и таурин, сохранившие свой уровень, а также лизин и треонин, повысившие уровень.

Специфику метаболизма в неокортексе во время зимней спячки определяли цистеиновая кислота, глицин и лизин, ответы которых в неокортексе и миокарде были противоположны. Можно предположить, что в неокортексе их роль состоит в обеспечении различных видов торможения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность А.В. Петрову и В.В. Меркулову за помощь в выполнении хроматографического анализа аминокислот.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с сусликами были одобрены Комиссией по биоэтике Института биофизики клетки РАН (протокол № 3/092021 от 08 сентября 2021 года) и проведены в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Demin N. N., Shortanova T. H., and Emirbekov E. Z. *Neurochemistry of hibernation in mammals* (Science, Leningrad, 1988).
2. Drew K. L., Buck C. L., Barnes B. M., Christian S. L., Rasley B. T., and Harris M. B. Central nervous system regulation of hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *Neurochemistry*, **102**, 1713–1726 (2007). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04675.x
3. Белоусов А. В. Роль центральной нервной системы в контроле зимней спячки. *Успехи физиол. наук*, **2**, 109–123 (1993).
4. Giroud S., Habold C., Nespolo R. F., Mejías C., Terrien J., Logan S. M., Henning R. H., and Storey K. B. The Torpid State: Recent Advances in Metabolic Adaptations and Protective Mechanisms. *Front. Physiol.*, **11**, 623665 (2021). DOI: 10.3389/fphys.2020.623665
5. Fan T. T., Ni J. J., Dong W. C., An L. Z., Xiang Y., and Cao S. Q. Effect of low temperature on profilins and ADFs transcription and actin cytoskeleton reorganization in *Arabidopsis* et al., *Biol. Plant.*, **59**, 793–796 (2015). DOI: 10.1007/s10535-015-0546-6
6. Mednikova Yu. S., Zakharova N. M., Pasikova N. V., and D. N. Voronkov. Comparative Analysis of Morphofunctional Features of Cortical Neurons in Ground Squirrels and Guinea Pigs under Hypothermia. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **53** (4), 331–339 (2017). DOI: 10.1134/S002209301704010X
7. Largo C., Cuevas P. P., Somjen G. G., Martín del Río R., and Herreras O. The effect of depressing glial function in rat brain in situ on ion homeostasis, synaptic transmission, and neuron survival. *J. Neurosci.*, **16** (3), 1219–1229 (1996). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-03-01219.1996
8. Zakharova N. M., Voronkov D. N., Khudoerkov R. M., Pasikova N. V., and Mednikova Yu. S. Glia–Neuron Interactions in the Sensory-Motor Cortex of Warm-Blooded Animals (Guinea Pigs and Ground Squirrels) with Different Habitat Conditions and the M-Cholinergic Reaction of the Brain. *Biophysics*, **63** (2), 207–214 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918020264
9. Schwartz C., Hampton M., and Andrews M. T. Seasonal and Regional Differences in Gene Expression in the Brain of a Hibernating Mammal. *PLoS One*, **8** (3), e58427 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0058427
10. Chen J., Yuan L., Sun M., Zhan L., and Zhan S.. Screening of hibernation-related genes in the brain of *Rhinolophus ferrumequinum* during hibernation. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, **149** (2), 388–393 (2008). DOI: 10.1016/j.cbpb.2007.10.011
11. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, **37** (1), 1–17 (2009). DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0
12. Karanova M. V. and Zakharova N. M. Adaptive Modification of Amino Acid Pools in the Myocardium of a Long-Tailed Ground Squirrel *Urocyon undulatus* at Different Stages of Hibernation. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **59** (4), 1027–1036 (2023). DOI: 10.1134/S0022093023040038
13. Karanova M. V. and Zakharova N. M. Pools of Amino Acids of Skeletal Muscle in Yakutian Ground Squirrel *Urocyon undulatus* during Different Hibernation Stages. *Biophysics*, **67** (2), 288–293 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922020105
14. Al-Badry K. S. and Taha H. M. Hibernation hypothermia and metabolism in hedgehogs--changes in free amino acids and related compounds. *Comp. Biochem. Physiol.*, **72** (3), 541–547 (1982). DOI: 10.1016/0300-9629(82)90120-7
15. Raheem K. A. and el Mosallamy N. Metabolism of hibernating reptiles. Changes of free amino acids in blood, liver and brain. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, **64** (3), 305–308 (1979). DOI: 10.1016/0305-0491(79)90149-4
16. Forreider B., Pozivilko D., Kawaji Q., Geng X., and Ding Y. Hibernation-like neuroprotection in stroke by attenuating brain metabolic dysfunction. *Prog Neurobiol.*, **157**, 174–187 (2017). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.03.002
17. Emirbekov E. Z. and Meilanov I. S. *Neurochemical changes during hibernation* (Pushchino, 1992).
18. Henry P. G., Russeth K. R., Tkac I., Drewes L. R., Andrews M. T., and Gruetter R. Brain energy metabolism and neurotransmission at near-freezing temperatures: in vivo (1)H MRS study of a hibernating mammal. *J. Neurochem.*, **101**, 1505–1515 (2007). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04514.x
19. Osborne P. G. and Hashimoto M. Mammalian cerebral metabolism and amino acids neurotransmission during hibernation. *J. Neurochem.*, **106**, 1888–1899 (2008). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05543.x
20. Spackman D., Stein W., and Moore S. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190–1206 (1958).
21. Ezza H. S. A. and Khadrawy Y. A., Glutamate Excitotoxicity and Neurodegeneration. *J. Mol. Genet. Med.*, **8**, 141 (2014). DOI: 10.4172/1747-0862.1000141
22. Andersen J. V., Markussen K. H., Jakobsen E., Schousboe A., Waagepetersen H. S., Rosenberg P. A., and Aldana B. I. Glutamate Metabolism and Recycling at the Excitatory Synapse in Health and Neurodegeneration. *Neuropharm.*, **196**, 108719 (2021). DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108719
23. Watford M. Glutamine and Glutamate: Nonessential or Essential Amino Acids? *Anim. Nutr.*, **1**, 119–122 (2015). DOI: 10.1016/j.aninu.2015.08.008
24. Grynberg A. and Demaison L. Fatty Acid Oxidation in the Heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28** (1), 11–17 (1996). DOI: 10.1097/00005344-199600003-00003
25. Zhang S., Lachance B. B., Mattson M. P., and Jia X.. Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases. *Progr. Neurobiol.*, **204**, 102089 (2021). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2021.102089

26. Salceda R. Glycine neurotransmission: Its role in development. *Front. Neurosci.*, **16**, 947563 (2022). DOI: 10.3389/fnins.2022.947563
27. Karanova M. V. Impact of Seasonal Temperature Decrease and Cold Shock on the Composition of Free Amino Acids and Phosphomonoethers in Various Organs of Amur Sleeper *Perccottus glenii* (Eleotridae). *J. Ichthyol.*, **58** (4), 570–579 (2018). DOI: 10.1134/S0032945218040069
28. Karanova M. V. Secondary Metabolites and Aspartic Acid in the Brain of the Frog *Rana temporaria* as Low-Temperature Adaptogens. *J. Evol. Biochem. Phys.*, **56**, 218–223 (2020). DOI: 10.1134/S0022093020030047
29. R. Marion, V. Horn, M. Sild, and Ruthazer E. S. D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 39 (2013). DOI: 10.3389/fncel.2013.00039
30. Lionetti V., Stanley W. C., and Recchia F. A. Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc. Res.*, **90** (2), 202–209 (2011). DOI: 10.1093/cvr/cvr038
31. Benarroch E. E. Brain glucose transporters: Implications for neurologic disease. *Neurol.*, **82** (15), 1374–1379 (2014). DOI: 10.1212/WNL.0000000000000328
32. Andrews M. T., Russeth K. R., Drewes L. R., and Henry P. G. Adaptive mechanisms regulate preferred utilization of ketones in the heart and brain of a hibernating mammal during arousal from torpor. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **296** (2), R383–R 393 (2009). DOI: 10.1152/ajpregu.90795.2008
33. Watanabe M., Maemura K., Kanbara K., Tamayama T., and Hayasaki H. GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs. *Int. Rev. Cytol.*, **213**, 1–47 (2002). DOI: 10.1016/S0074-7696(02)13011-7
34. Andersen J. V. and Schousboe A. Milestone Review: Metabolic dynamics of glutamate and GABA mediated neurotransmission - The essential roles of astrocytes. *J. Neurochem.*, **166** (2), 109–137 (2023). DOI: 10.1111/jnc.15811
35. Petroff O. A. C. GABA and Glutamate in the Human Brain. *Neuroscientist*, **8** (6), 562–573 (2002). DOI: 10.1177/107385840223851
36. Popov V. A., Semenov D. V., Amakhin N. P., Veselkin N. P. Interaction of glutamate and GABA receptors in the receptors of the central nervous system. *Rus. J. Physiol.*, **102** (5), 529–539 (2016).
37. Nilsson G. E. and Lutz P. L. Role of GABA in hypoxia tolerance, metabolic depression and hibernation—possible links to neurotransmitter evolution. *Comp. Biochem. Physiol. Part C. Comp. Pharmacol.*, **105** (3), 329–336 (1993). DOI: 10.1016/0742-8413(93)90069
38. Pellerin L. and Magistretti P. J., Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** (22), 10625–10629 (1994). DOI: 10.1073/pnas.91.22.10625
39. Turinsky J., Mukherji B. and Sloviter H. A.. Effects of induced hypothermia on amino acids and glycogen in rat brain. *J. Neurochem.*, **18**, 233–235 (1971). DOI: 10.1111/j.1471-4159.1971.tb00561.x
40. Drew K., Harris M., LaManna J., Smith M., Zhu X., and Ma Y. Hypoxia tolerance in mammalian heterotherms. *J. Exp. Biol.*, **207**, 3155–3162 (2004). DOI: 10.1242/jeb.01114
41. Dave K. R., Christian S. L., Perez-Pinzon M. A., and Drew K. L. Neuroprotection: lessons from hibernators. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **162** (1–3), 1–9 (2012). DOI: 10.1016/j.cbpb.2012.01.008
42. Frerichs K. U. and Hallenbeck J. M.. Hibernation in ground squirrels induces state and species-specific tolerance to hypoxia and aglycemia: an in vitro study in hippocampal slices. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **18**, 168–175 (1998). DOI: 10.1097/00004647-199802000-00007
43. Bekshokov K. S., Emirbekov E. Z. and Emirbekova A. A. Severo-Kavkazskij region. *Estestvennye nauki. Prilozhenie*, **S6**, 42(2004).
44. Langosch D., Becker C. M., and Betz H. The inhibitory glycine receptor: A ligand-gated chloride channel of the central nervous system. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 1–8 (1990). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19419.x
45. Lynch J. W. Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Physiol. Rev.*, **84**, 1051–1095 (2004). DOI: 10.1152/physrev.00042.2003
46. Bonhaus D. W., Burge B. C., and McNamara J. O. Biochemical evidence that glycine allosterically regulates an NMDA receptor-coupled ion channel. *Eur. J. Pharmacol.*, **142** (3), 489–490 (1987). DOI: 10.1016/0014-2999(87)90096-3
47. Kurbat M. N. and Lelevich V. V. Metabolism of Amino Acids in the Brain. *Neurochem. J.*, **3** (1), 23–28 (2009).
48. Reis D. J., Golanov E. V., Galea E., and Feinstein D. L. Central neurogenic neuroprotection: central neural systems that protect the brain from hypoxia and ischemia. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **835**, 168–186 (1997). DOI: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48628.x
49. Ma Y. L., Zhu X., Rivera P. M., Tøien Ø., Barnes B. M., LaManna J. C., Smith M. A., and Drew K. L. Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **289**, R1297–R1306 (2005). DOI: 10.1152/ajp-regu.00260.2005
50. Hirabayashi Y. and Furuya S. Roles of l-serine and sphingolipid synthesis in brain development and neuronal survival. *Progr. Lipid Res.*, **47** (3), 188–203 (2008). DOI: 10.1016/j.plipres.2008.01.003
51. Murtas G., G. Marcone L., Sacchi S., and Pollegioni L. L-serine synthesis via the phosphorylated pathway in humans. *Cell Mol. Life. Sci.*, **77** (24), 5131–5148 (2020). DOI: 10.1007/s00018-020-03574-z
52. T Maher. J. and Wurtman R. J. L-Threonine administration increases glycine concentrations in the rat central nervous system. *Life Sci.*, **26**, 1283–1286 (1980). DOI: 10.1016/0024-3205(80)90086-7

53. Dalangin R., Kim A. and Campbell R. E. The role of amino acids in neurotransmission and fluorescent tools for their detection. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (17), 6197 (2020). DOI: 10.3390/ijms21176197
54. Severyanova L. A., Lazarenko V. A., Plotnikov D. V., Dolgintsev M. E., and Kriukov A. A. L-Lysine as the Molecule Influencing Selective Brain Activity in Pain-Induced Behavior of Rats. *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (8), 1899 (2019). DOI: 10.3390/ijms20081899
55. Karanova M. V. Influence of low temperature on the evolution of amino acid pools adaptive modifications in poikilothermal animals. *Int. J. Biochem. Biophys.*, **1** (2), 33–40 (2013). DOI: 10.13189/ijbb.2013.010202
56. Klunk W. E., McClure R. J., and Pettegrew J. W. Possible roles of L-phosphoserine in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol. Chem. Neuropathol.*, **15** (1), 51–73 (1991). DOI: 10.1007/BF03161056
57. Oja S. S. and Saransaari P. Significance of Taurine in the Brain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **975** (1), 89–94 (2017). DOI: 10.1007/978-94-024-1079-2_8
58. El Idrissi A. and Trenkner E. Taurine as a Modulator of Excitatory and Inhibitory Neurotransmission. *Neurochem. Res.*, **29**, 189–197 (2004). DOI: 10.1023/b:neure.0000010448.17740.6e
59. Hilgier W., Oja S. S., Saransaari P., and Albrecht J. Taurine prevents ammonia-induced accumulation of cyclic GMP in rat striatum by interaction with GABAA and glycine receptors. *Brain Res.*, **1043** (1–2), 242–246 (2005). DOI: 10.1016/j.brainres.2005.02.066
60. Iwata H., Yamagami S., and Baba A. Cysteine Sulfinic Acid in the Central Nervous System: Specific Binding of [³⁵S] Cysteic Acid to Cortical Synaptic Membranes—An Investigation of Possible Binding Sites for Cysteine Sulfinic Acid. *J. Neurochem.*, **38** (5), 1275–1279 (1982). DOI: 10.1111/j.1471-4159.1982.tb07901.x

Secondary Metabolites and Amino Acids in the Neocortex of the Long-Tailed Ground Squirrel *Urocyon undulatus* at Different Stages of Hibernation

M.V. Karanova* and N.M. Zakharova*

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

This study is a continuation of our previous research aimed at investigating changes in the pools of amino acids in the myocardium of the ground squirrel during winter torpor. Neurochemical profiles of amino acids and the secondary metabolites (taurine, phosphoserine, and cysteic acid) were explored in the neocortex of the ground squirrel at different stages of torpor: in the beginning of torpor (2–3 days) and during prolonged torpor (9–10 days), as well as during short-term winter arousal (winter activity, euthermia). Reduced excitatory neurotransmitter levels (glutamate by 7% and 14%; aspartate by 25% and 52% in a coordinated manner and the increased level of GABA, the main transmission inhibitor (by 50% and 67%) were observed from the onset of the torpor entry and at the end of the torpor arousal, respectively. Alanine, which was formed in negligible amounts in the neocortex in the summer season, increased at the initial stage of hibernation and after multiday torpor bout (by 98% and 126%, respectively), indicating a partial switch to anaerobic glycolysis. Short-term inter-bout euthermia returned levels of these substances back to normal. The behavior of glutamate and aspartate, the anaplerotic substrates, that supported cycling of the tricarboxylic acid cycle during torpor and winter activity periods was like their responses in the myocardium, though differed quantitatively. The responses of the neuromodulators such as glycine, threonine, and lysine differed radically when compared to their responses in the myocardium. No changes in taurine and phosphoserine pools were detected, but the level of cysteic acid decreased compared to the summer control from $0.51 \pm 0.06 \mu\text{mol/g}$ to $0.07 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$ at the end of torpor, while during winter euthermia it became 2 times lower than the summer level. Our data suggest that metabolic pathways, involving anaplerotic amino acids of the neocortex, are more active than the myocardium during winter torpor, while the pools of neuromodulators that regulate inhibition processes, increase.

Keywords: hibernation, torpor, long-tailed ground squirrel, neocortex, myocardium, amino acids, energy metabolism

СУПЕРОКСИДГЕНЕРИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НИКОТИНАМИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ

© 2024 г. Т.В. Сирота*,#

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

#E-mail: sirotatv@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.01.2024 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 26.01.2024 г.

Показано, что никотинамидные коферменты (НАДФН, НАДН, НАДФ⁺, НАД⁺) способны генерировать супероксид-анионы (O₂^{•−}) в щелочной среде. Супероксидгенерирующая активность коферментов проявляется при высоком значении pH и чувствительна к СОД. Однако сам никотинамид, который является функциональной частью молекул коферментов, не обладает таким свойством. Проведенные полярографические исследования показали, что в присутствии коферментов наблюдается потребление молекулярного кислорода из буфера, т.е. происходит активация кислорода, связанная с образованием O₂^{•−}. На основании полученных результатов и литературных данных предложен механизм возникновения O₂^{•−} через путь образования аддуктов никотинамида, входящего в состав молекулы кофермента, и гидроксильных анионов (ОН[−]). Возможно, что в щадящих условиях в организме исследованные коферменты, выполняя свои основные функции, при необходимости могут генерировать и супероксид, т.е. быть сигнальными молекулами.

Ключевые слова: супероксид, никотинамидные коферменты, НАДФН, НАДН, НАДФ⁺, НАД⁺, никотинамид, нитросиний тетразолий, полярография, аддукты, гидроксильные анионы.

DOI: 10.31857/S0006302924010032, EDN: RIBSKI

Ранее нами было обнаружено, что никотинамидные коферменты НАДФН, НАДН, НАДФ⁺ и НАД⁺ как в восстановленной, так и в окисленной формах способны с разной эффективностью генерировать супероксид-анионы в щелочной среде [1]. Электронодонором в этом процессе, очевидно, является молекула кофермента. Необходимое условие — высокая величина pH. Однако для существования супероксида и его идентификации необходимы именно такие условия, которые и создаются в различных методиках для обнаружения O₂^{•−} [1, 2]. Используя такой подход, мы выявили образование супероксида в реакции «глюкоза—глюкозооксидаза» [2]. Таких данных в литературе не было и считалось, что продуктом реакции является только пероксид водорода. Мы показали, что в этой реакции может происходить и одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода.

Обнаруженная супероксидгенерирующая активность коферментов в доступной литературе не описана; в обзорных статьях 2016 и 2023 гг., где перечисляются различные системы генерации супероксида, никотинамидные коферменты не представлены [3, 4].

Настоящая работа является продолжением наших исследований [1]. Феномен выявляется в щелочной среде, величина pH которой не может быть в условиях клетки и организма. Однако факт наличия такой активности дает возможность предположить, что в щадящих условиях, в живой системе, где физиологическая температура существенно выше, чем в экспериментах *in vitro*, процесс генерации O₂^{•−} может иметь место. Иные факторы, в том числе изменение pH, вероятно, может приводить к образованию супероксида молекулами коферментов в клетке.

НАД⁺ и НАДН, НАДФ⁺ участвуют во многих клеточных процессах, не связанных с окислительно-восстановительными реакциями [5–7]. В то же время способность этих соединений образовывать аддукты с различными ионами, в том

Сокращения: НСТ — нитросиний тетразолий, СОД — супероксиддисмутаза.

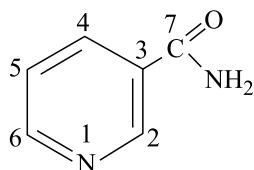


Рис. 1. Структурная формула никотинамида [9].

числе и с гидроксильным анионом OH^- , может иметь функциональное значение [8], но какое именно не обсуждается.

Известно, что функционально активная часть молекулы кофермента в окислительно-восстановительных реакциях — никотинамид (рис. 1) [9].

Химизм окислительно-восстановительного процесса с участием кофермента представлен на рис. 2.

Полученные в настоящей работе результаты показывают, что только никотинамидные коферменты, но не молекула никотинамида способны создавать супероксидные анион-радикалы. В предыдущей работе [1] было сделано предположение, что именно молекула кофермента и является электронодонором. Но был неясен механизм этого процесса, т.е. как это «работает».

Цель настоящего исследования — выяснить механизм супероксидгенирующей активности коферментов. Были проведены спектральные и полярографические исследования. Полученные результаты и литературные данные позволили

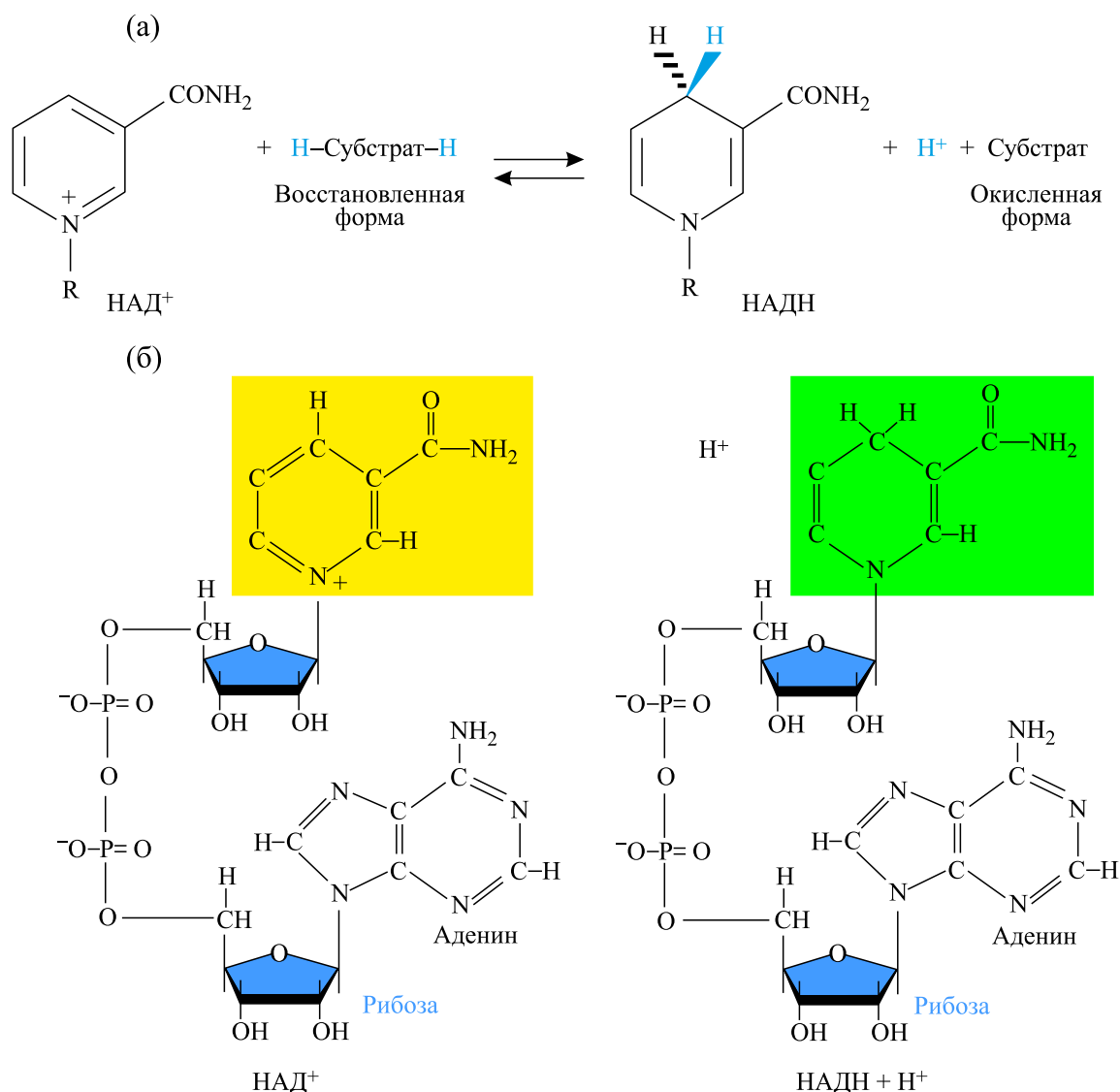


Рис. 2. (а) — Окислительно-восстановительный процесс с участием никотинамидных коферментов в общем виде; (б) — структурные формулы окисленной и восстановленной форм коферментов [9].

предположить механизм этого феномена и объяснить, почему обнаруженное свойство характерно как для восстановленных, так и для окисленных форм коферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кинетические исследования проводили на спектрофотометре UVIKON 923 Double Beam UV/VIS Spectrophotometer (Kontron instruments, Италия) в односантиметровой кювете в режиме time Driver в течение 5–10 мин при длине волны 560 нм в 0.2 М карбонатном буфере при заданных значениях pH, температура (комнатная или иная) указана в подписях. В работе также использовали спектрофотометр Specord UV/VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) с компьютерной регистрацией. В буфер вносили исследуемые вещества: никотинамид, никотинамидные коферменты (НАДФН, НАДН, НАДФ⁺, НАД⁺). Нитросиний тетразолий (НСТ) в концентрации 0.05 или 0.075 мМ присутствовал во всех пробах. В некоторых экспериментах после записи кинетики реакции содержимое спектрофотометрической кюветы переносили в пробирки с плотно закрывающейся пробкой, чтобы изолировать от кислорода воздуха, и оставляли на продолжительное время. Наблюдала появление или отсутствие окрашенных продуктов.

Опыты с разной концентрацией коферментов проводили, используя пробы после записи спектров. Из этих проб, где в 2 мл воды находится вещество с заданной концентрацией, отбирали 1 мл раствора, вносили 0.05 мМ НСТ и добавляли 1 мл 0.2 М карбонатного буфера, pH 10.9. Регистрировали кинетику образования диформаза фотометрически при длине волны 560 нм и температуре 32°C. Таким образом, в кювете в 0.1 М карбонатном буфере находилась половина исследуемого вещества, которое присутствовало в кювете при регистрации спектра.

Супероксидгенирующую активность исследуемых соединений представляли как скорость реакции и рассчитывали изменение величины оптической плотности при длине волны 560 нм в единицу времени (за 1 мин) на линейном участке кривой. В случае если кинетика имеет гиперболический характер, брали для расчета начальный участок кривой. Выявленные различия активности исследуемых соединений сохранялись и в том случае, когда за интервал времени принимали 5 мин.

Полярографические исследования проводили на установке с закрытым платиновым электродом Кларка в термостатированной кювете объемом 1 мл с фиксированной скоростью перемешивания при температуре 32°C. Использовалась система автоматической регистрации потребления

кислорода: АЦП и программное обеспечение. Условия проведения реакции такие же, как и в спектрофотометрических исследованиях с некоторой детализацией, указанной в подписях к рисунку. Для сравнения были поставлены эксперименты с супероксидгенирующей модельной системой автоокисления адреналина в щелочной среде. Реакцию проводили согласно протоколу, разработанному нами ранее [10] и описанному в работе [2], однако pH буфера поднимали до 10.9, как в спектрофотометрических экспериментах. Реакцию начинали внесением в кювету 0.23 мМ адреналина гидрохлорида. Также были поставлены опыты с сульфитом натрия (Na₂SO₃), который вносили в кювету в сухом виде на шпателе.

После полярографической регистрации содержимое из кюветы переносили в пробирки с плотно закрывающейся пробкой и добавляли НСТ. Визуально наблюдали образование или отсутствие окраски.

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: никотинамид (Allichem, Германия); НАД⁺ (Sigma, США; «Диа-М», Россия); НАДФН, НАДФ⁺, НАДН (Reanal, Венгрия; Sigma-Aldrich, Fluka); СОД (супероксиддисмутаза, КФ 1.15.1.1, 3.35 units/мг белка, Sigma, США); Na₂CO₃, нитросиний тетразолий (Sigma, США; «Диа-М», Россия), NaHCO₃ (J. T. Baker, Голландия); фармакопейную форму 0.1% адреналина гидрохлорида Московского эндокринного завода. Сульфит натрия – отечественный препарат.

Во всех экспериментах восстановленные формы пиридиннуклеотидов, НАДН и НАДФН, спектрально проверяли на наличие пика при длине волны 340 нм.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel: определяли среднее значение (*M*), стандартное отклонение (*SD*). Представленные графики являются конкретными экспериментальными кривыми из типичных многократно полученных при четырех-шести параллельных измерениях в каждом опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что никотинамидные коферменты способны в щелочной среде генерировать супероксид-анионы. Согласно величине скорости генерации O₂^{-•} был представлен ряд активности этих соединений: НАДФН > НАДН ≥ ≥ НАДФ > НАД [1].

В настоящей работе продолжено исследование этого феномена. Важно было изучить поведение никотинамида, функционально активной части молекулы кофермента. На рис. 3 показаны полученные результаты. Никотинамид не проявил су-

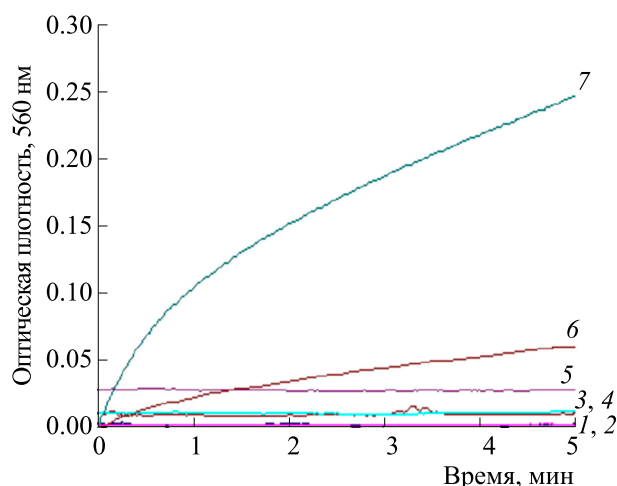


Рис. 3. Регистрация образования диформаза в присутствии никотинамида (кривые 1–5) и НАДФ⁺ (кривые 6 и 7) в 0.2 М карбонатном буфере, pH 10.6 или 11.3, содержащем 0.075 мМ НСТ, температура 20°C: 1 – 1.5 мМ никотинамида, pH 10.6; 2 – продолжение записи; 3 – 1.5 мМ никотинамида, pH 11.3; 4 – продолжение записи; 5 – 3 мМ никотинамида, pH 11.3; 6 – 0.5 мМ НАДФ⁺, pH буфера 11.3; 7 – 1.5 мМ НАДФ⁺, pH 11.3.

пероксидгенерирующую активность при pH 10.6 и 11.3, регистрация 5 мин и еще 5 мин (кривые 1 и 2, кривые 3 и 4), а также и при более высокой концентрации вещества – 3 мМ, pH среды 11.3 (кривая 5). В этих же условиях (при pH 11.3) в присутствии кофермента НАДФ⁺ в концентрациях 0.5 и 1.5 мМ (кривые 6 и 7) регистрировали образование диформаза, продукта восстановления НСТ. Пробы с никотинамидом, соответствующие записи кривых 1–5, были перенесены в пробирки на более продолжительную экспозицию (см. раздел «Материалы и методы»). В продолжении 20 ч не наблюдали образования цветной окраски, т.е. никотинамид не создает супероксиды.

Величина pH – необходимый параметр для проявления супероксидгенерирующей активности кофермента. Кинетика реакции образования $O_2^{\cdot-}$ в присутствии НАДФН при разных значениях pH показана на рис. 4, табл. 1 представлены данные рассчитанной скорости процесса.

На рис. 5 представлены результаты эксперимента с разными концентрациями НАДФН; постановка опыта детально описана в разделе «Материалы и методы», и процесс происходит при более высокой температуре (32°C). В этих условиях образование супероксида наблюдалось при более низких концентрациях кофермента.

На рис. 6 показано ингибирующее действие СОД на процесс генерации $O_2^{\cdot-}$ коферментом

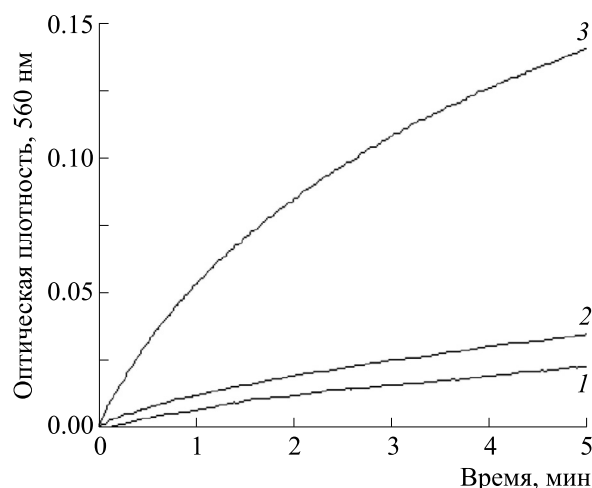


Рис. 4. Кинетика образования диформаза в присутствии 1.5 мМ НАДФН в 0.2 М карбонатном буфере, содержащем 0.075 мМ НСТ, при разных значениях pH: 1 – pH 10.6; 2 – pH 10.8; 3 – pH 11.3. Температура 21°C.

НАДФ⁺ (кривая 1). Скорость реакции в течение первой минуты снижается на 66.7%, и кинетика становится линейной в сравнении с контролем, где в пробе только буфер и НАДФ⁺ (кривая 2). Эффект СОД наблюдался и в предыдущих опытах с использованием НАДН [1].

Ранее нами было высказано предположение, что супероксидгенерирующая активность, очевидно, связана со структурными перестройками никотинамида в составе молекулы кофермента, что и приводит к высвобождению электрона, который далее используется для восстановления молекулярного кислорода [1]. Иначе говоря, донором электронов является именно молекула кофермента, сам же никотинамид, как показано выше (рис. 3), не способен «отдавать» электроны и генерировать $O_2^{\cdot-}$.

Мы провели полярографические исследования с целью «отследить» в присутствии кофер-

Таблица 1. Супероксидгенерирующая активность НАДФН при разных значениях pH

Величина pH	Скорость, ед. опт. пл. (560 нм)/мин
10.6	0.0046 ± 0.0004
10.8	0.0072 ± 0.0006
11.3	0.0290 ± 0.0014

Примечание. Условия реакции: 1.5 мМ НАДФН, 0.2 М карбонатный буфер, 0.075 мМ НСТ. Температура 21°C.

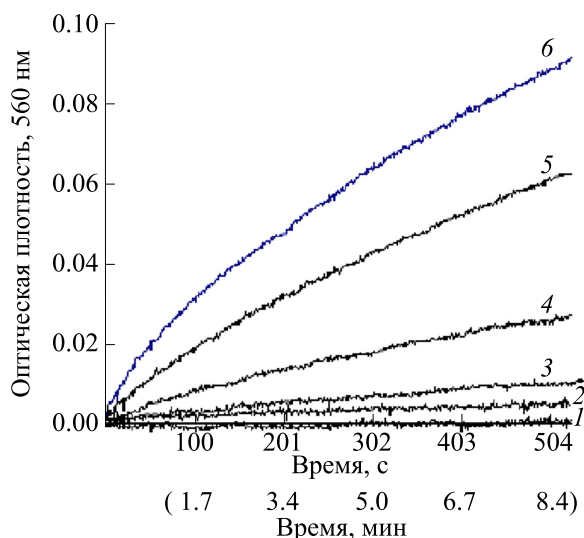


Рис. 5. Кинетика образования диформаза в присутствии разных концентраций НАДФН в 0.1 М карбонатном буфере, pH 10.9, содержащем 0.075 мМ НСТ: 1 – 0.00078 мМ; 2 – 0.00156 мМ; 3 – 0.00313 мМ; 4 – 0.00625 мМ; 5 – 0.0125 мМ; 6 – 0.025 мМ. Описание постановки опыта в разделе «Материалы и методы». Температура 32°C.

ментов поведение молекулярного кислорода, растворенного в буфере. Если действительно электрон поступает в буфер и «попадает» далее на кислород, то, как известно, происходит активация молекулярного кислорода, и должна наблюдаться его убыль из среды, что и регистрирует электрод Кларка. В супероксидгенирирующих системах, как нами показано ранее [2], такой процесс и происходит. На рис. 7 представлены полученные результаты. Как и ожидалось, мы увидели потребление молекулярного кислорода после внесения в буфер НАДН и НАДФН (кривые 2 и 3). Полученные результаты указывают, что действительно происходит активация кислорода. Добавка НСТ к пробам из полярографической кю-

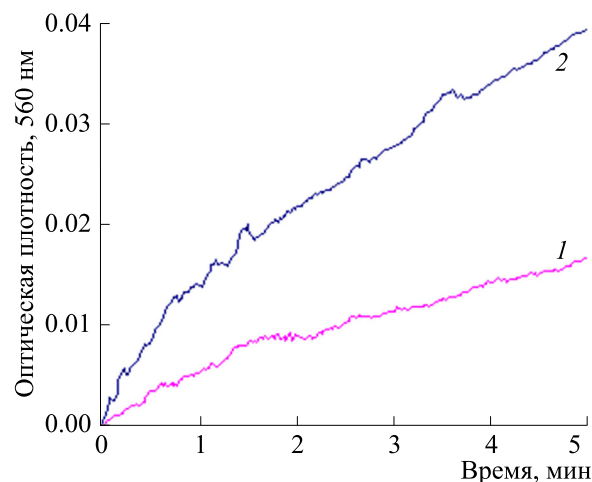


Рис. 6. Действие СОД на генерацию супероксида при участии НАДФ⁺: 1 – фермент, 0.92 мкг белка/мл, находится в 0.2 М карбонатном буфере, pH 11.2, содержащем 0.075 мМ НСТ; 2 – контроль: буфер и НАДФ⁺. Температура 31°C.

веты демонстрирует наличие цветной окраски образующегося диформаза (визуальные наблюдения), что указывает на образование $O_2^{\cdot-}$.

«Кислородные» эффекты коферментов сравнили с классической супероксидгенирирующей модельной системой автоокисления адреналина, которая хорошо изучена [2, 10–13]. На рис. 7 (кривая 4) показана полярографическая регистрация потребления кислорода при внесении в буфер адреналина. Регистрируется интенсивная убыль кислорода, и добавка в эту пробу НСТ вызывает образование большого количества диформаза, цветного продукта восстановления НСТ, который, как известно [14], плохо растворим, и потому наблюдаются как цвет, так и мощный осадок.

В качестве альтернативного контроля была поставлена проба с сульфитом натрия. Данное ве-

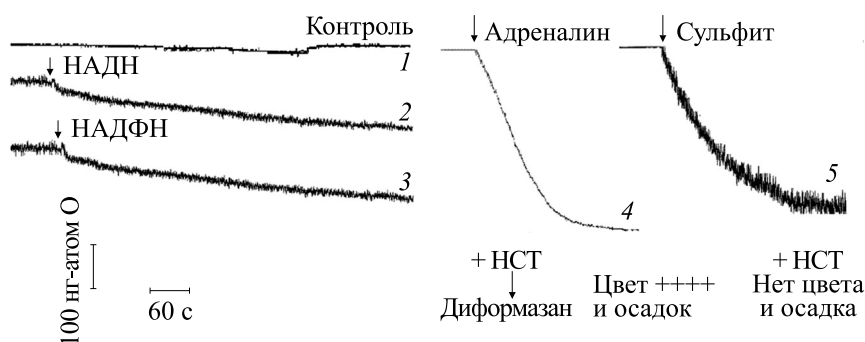


Рис. 7. Регистрация потребления кислорода при добавлении в 0.2 М карбонатный буфер, pH 10.9, следующих соединений: 2 – 8 мМ НАДН; 3 – 8 мМ НАДФН; 4 – 0.23 мМ адреналин; 5 – сульфит натрия. Кривая 1 – контроль, в кювете только буфер. Температура 31°C.

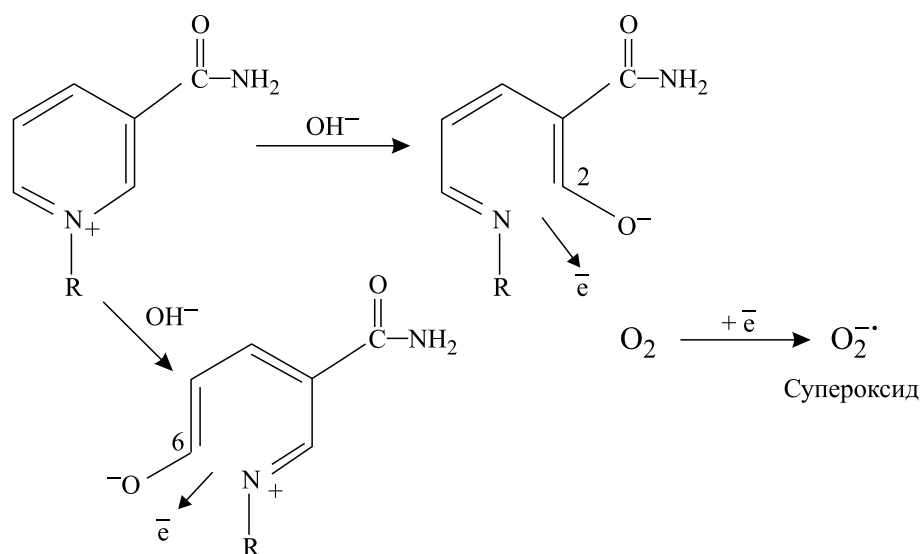


Рис. 8. Образование аддуктов пиридиннуклеотидами с гидроксильной группой OH^- (согласно работам [8, 15], с некоторыми изменениями). Объяснения в тексте.

щество используется для полного удаления кислорода из раствора. При добавлении его в буфер наблюдается мощное потребление кислорода (рис. 7, кривая 5); сульфит натрия вступает в химическую реакцию с кислородом, диффузно растворенным в буфере, образуя сульфат натрия. Внесение НСТ в эту пробу не выявляет цветного продукта, нет и осадка, т.е. $O_2^{\cdot -}$ не образуется.

Возникает вопрос — откуда берется электрон в экспериментах с коферментами, который восстанавливает молекулярный кислород с образованием супероксида и каков механизм этого феномена? Ответ был найден в литературных данных, где описана способность никотинамидных коферментов $НАД^+$ и $НАДФ^+$ образовывать аддукты в различных условиях [8, 15], в том числе и в присутствии гидроксильных анионов (OH^-). В работе [15] авторы показали, что же происходит в результате взаимодействия DPN (Diphosphopyridine Nucleotide — устаревшее название, современное название — NAD , $НАД^+$) и OH^- . Методами ИК-спектроскопии, УФ-флуоресценции и ЯМР были выделены и охарактеризованы щелочные продукты DPN. Сделан вывод: происходит разрыв никотинамидного кольца в молекуле кофермента в положении 2 и 6 (рис. 8). Необходимо отметить, что «судьба» кислорода не отслеживалась и речь о супероксиде не велась. Тема эта не обсуждалась.

Полученные результаты настоящего исследования и наши ранние данные [1] позволяют сообщить о новом свойстве никотинамидных коферментов — наличии супероксидгенирующей активности; донором электронов в этом процессе,

очевидно, является никотинамид в молекуле кофермента, а механизм явления связан с высвобождением электрона при раскрытии никотинамидного кольца (рис. 8). Собственно, молекула никотинамида не в составе кофермента не обладает супероксидгенирующей активностью. Вероятно, необходимо наличие других соединений, входящих в состав молекулы кофермента, а именно: аденина, рибозы и фосфата. Они, по-видимому, и облегчают раскрытие никотинамидного кольца, но при этом, очевидно, неважно, окисленная или восстановленная форма кофермента взаимодействует с OH^- . Представляемые в работе физико-химические процессы связаны не с окислительно-восстановительными превращениями никотинамида в составе кофермента, а исключительно с его иными структурными изменениями.

Следует отметить, что образование аддуктов никотинамидными коферментами возможно и с участием других анионов, например CN^- [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обнаружена и впервые исследована уникальная способность никотинамидных коферментов генерировать $O_2^{\cdot -}$. В литературе этот феномен не описан. Механизм процесса связан, очевидно, с образованием аддуктов при участии кольца никотинамида и гидроксильного аниона OH^- среды. Возможно, благодаря этой способности через $O_2^{\cdot -}$ может выполняться сигнальная функция молекулы кофермента. Известно, что митохондрии и $НАД(Ф)Н$ -оксидазы, главные источники супероксида в клетке [3, 4,

16], и, несмотря на наличие мощных антиоксидантных систем, именно они «поставляют» как вредные, так и полезные активные формы кислорода. Описанные в проведенной работе возможности коферментов предполагают их участие в образовании активных форм кислорода. Относительно простые химические соединения, «маленькие» молекулы, коферменты, а не биологические структуры, могут быть донорами электронов и неферментативно образовывать супероксиды, и они, эти супероксиды, не биологического происхождения. Этот химический путь образования супероксида с участием коферментов заслуживает особого внимания, поскольку коферменты имеют биогенное происхождение и их биосинтез происходит исключительно в организме. Реализация супероксидгенирующей способности коферментов в живой системе может быть предметом дальнейшего исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам ИТЭБ РАН В.А. Шлектарёву и Ф.И. Ильясову, а также В.С. Семёнову (ИБК РАН) за техническую помощь при работе с полярографической установкой и спектрофотометром, а также Н.Е. Ляминой (ИТЭБ РАН) за техническую помощь в проведении экспериментов и в подготовке публикации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00224-24-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сирота Т. В. Генерация супероксида никотинамидными коферментами. *Biomed. Chem.: Research and Methods*, **6** (1), e00188 (2023). DOI: 10.18097/BMCRM00188
2. Сирота Т. В. и Сирота Н. П. К механизму активации кислорода в химических и биологических системах. *Биофизика*, **67** (1), 5–13 (2022). DOI: 10.31857/S000630292201001X
3. Naayan M., Hashim M. A., and Al Nashef I. M. Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chem. Rev.*, **116** (5), 3029–3085 (2016). DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00407
4. Andrés C. M. C., Pérez de la Lastra J. M., Andrés Juan C., Plou F. J., and Pérez-Lebeña E. Superoxide anion chemistry – its role at the core of the innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (3), 1841, (2023). DOI: 10.3390/ijms24031841
5. Ray P. D., Huang Bo-W., and Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.*, **24** (5), 981–990 (2012). DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008
6. Weihai Y. NAD^+ and NADH in cellular functions and cell death, *Front. Biosci.*, **11**, 3129–3148 (2006). DOI: 10.2741/2038
7. Pollak N., Dölle C., and Ziegler M. The power to reduce: pyridine nucleotides-small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J.*, **402** (2), 205–218 (2007). DOI: 10.1042/BJ20061638
8. Мешлер Д. *Биохимия: химические реакции в живой клетке* (Мир, М., 1980), т. 2, сс. 250–253.
9. http://vmode.org/sait/?page=15&id=Bioorganicheskaja_himija_tykavkina_2010&menu=Bioorganicheskaja_himija_tykavkina_2010
10. Sirota T. V. A novel approach to study the reaction of adrenaline autooxidation: a possibility for polarographic determination of superoxide dismutase activity and antioxidant properties of various preparations. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomedical Chemistry*, **5** (3), 253–259 (2011). DOI: 10.1134/S1990750811030139
11. Сирота Т. В. Использование нитросинего тетразолия в реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы. *Биомедицинская химия*, **59** (4), 399–410 (2013). DOI: 10.18097/pbmc20135904399
12. Сирота Т. В. Цепная реакция автоокисления адреналина — модель хиноидного окисления катехоламинов. *Биофизика*, **65** (4), 646–655 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920040031
13. Misra H. P. and Fridovich I. J. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **247** (10), 3170–3175 (1972).
14. Altman F. P. Tetrazolium salts and formazans. *Progr. Histochem. Cytochem.*, **9** (3), 1–56 (1976). DOI: 10.1016/S0079-6336(76)80015-0
15. Guilbert C. C. and Johnson S. L. Isolation and characterization of the fluorescent alkali product from diphosphopyridine nucleotide. *Biochemistry*, **10** (12), 2313–2316 (1971). DOI: 10.1021/bi00788a021
16. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39** (1), 44–84 (2007). DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

Superoxide Generating Activity of Nicotinamide Coenzymes

T.V. Sirota*

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

It has been shown that nicotinamide coenzymes (NADPH, NADH, NADP^+ , NAD^+) are capable of generating superoxide anions ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in an alkaline environment. The superoxide-generating activity of coenzymes is associated with high pH values and is sensitive to SOD. However, nicotinamide itself, being a functional part of coenzyme molecules, does not have this property. Polarographic studies have shown that in the presence of coenzymes, molecular oxygen is consumed from the buffer, namely oxygen activation occurs due to the formation of $\text{O}_2^{\cdot-}$. Based on the results obtained and in accordance with the literature, our observations suggest that the formation of adducts of nicotinamide, which is part of the coenzyme molecule, and hydroxyl anions (OH^-) may lead to the formation of $\text{O}_2^{\cdot-}$. Under mild conditions in the organism, the studied coenzymes, while performing their main functions, are expected to generate superoxide, meaning that they can be signaling molecules.

Keywords: superoxide, nicotinamide coenzymes, NADPH, NADH, NADP^+ , NAD^+ , nicotinamide, nitroblue tetrazolium, polarography, adducts, hydroxyl anions

АННОТАЦИЯ НОВОГО НИЗКОПОРОГОВОГО ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО КАЛЬЦИЕВОГО КАНАЛА ТРИХОПЛАКСА *Trichoplax adhaerens* (ТИП Placozoa)

© 2024 г. А.В. Кузнецов*, **, #, Л.Е. Карташов***

*Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, Севастополь, 299011, Россия

**Институт радиозлектроники и информационной безопасности Севастопольского государственного университета, Университетская ул., 33, Севастополь, 299053, Россия

*** Кафедра приборных систем и автоматизации технологических процессов Севастопольского государственного университета, ул. Гоголя, 12-14, Севастополь, 299007, Россия

#E-mail: kuznet@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 29.06.2020 г.

После доработки 17.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Изучение потенциалзависимых кальциевых каналов проливает свет на формирование систем, ответственных за сопряжение сенсоров и актуаторов в живой клетке. На основании данных по потенциалчувствительному кальциевому каналу TCav3 (2063 аминокислотных остатка) из клеток *Trichoplax adhaerens* идентифицированы гомолог длиной 2090 аминокислотных остатков в скаффолде *Trichoplax* sp. H2 и неполный полипептид длиной 1510 аминокислотных остатков в скаффолде *Trichoplax adhaerens*. Последний гипотетический белок аннотирован как Ca_v3-канал. Для всех трех белков найден EEDD селективный фильтр и реконструирована коровая структура кальциевого канала, состоящая из 24 трансмембранных α-спиралей. Тем не менее исследуемые белки отличаются цитоплазматическими доменами, что свидетельствует о различной специализации Ca_v3-каналов при проведении сигнала внутрь клетки. Так, часть AID-мотива (alpha-interacting domain) и прилежащего сенсора потенциала из аннотированного канала имеют гомологии в 25 видах костистых рыб, а соответствующая область из обоих других каналов в 41 виде костистых рыб и в 4 видах змей. Существенно, что ниже от AID-мотива костистых рыб, как и у трихопласа, обнаружена высококонсервативная петля IIS1-S2 с последовательностью IENHNQР, в то время как у змей найдена гомологичная последовательность IENNEQР, отличающаяся отрицательным остатком глутаминовой кислоты, который также присутствует в соответствующих белках крысы и человека. На основании анализа первичных транскриптов и зрелых полипептидов предполагается модульный механизм эволюции Ca_v3-каналов путем вставок и объединения белковых доменов, выполняющих разнообразные регуляторные функции.

Ключевые слова: трихоплас, Ca_v3-каналы, домены, инсерции, модульная эволюция.

DOI: 10.31857/S0006302924010043, **EDN:** RHWLPC

Трихоплас (Placozoa) является простейшим многоклеточным животным [1, 2] с наименьшим ядерным [3] и наибольшим митохондриальным геномами [4, 5]. Интересно, что ДНК трихопласа кодирует полипептиды, гомологичные белкам высших метазоа. Считается, что трихоплас обладает всеми тремя типами регулируемых напряжением кальциевых каналов [3, 6], как и человек, у

которого Ca²⁺-каналы L-типа (Ca_v1) участвуют в постсинаптической передаче сигналов в нейронах и мышцах, Ca²⁺-каналы N-, P-/Q- и R-типа (Ca_v2) отвечают за преобразование электрических потенциалов действия в химические сигналы, а Ca²⁺-каналы T-типа (Ca_v3) участвуют в регулировании клеточной возбудимости [7, 8].

Существенно, что кальциевые каналы трихопласа не только предвосхищают доменную архитектуру соответствующих белков из животных с развитой нервной системой, но и демонстрируют похожие биофизические характеристики [9].

Сокращения: нп — пары нуклеотидов, аа — аминокислотные остатки, LSS — лидерный сайт сплайсинга (leader splice site), AID — альфа-взаимодействующий домен (alpha-interacting domain), IML — внутренняя срединная петля (inner mid-loop), кДа — килодальтон.

Предполагается, что Ca_v -каналы, содержащие четыре схожих трансмембранных повтора, возникли в результате двух раундов дубликации последовательностей односубъединичных каналов, таких как потенциалзависимые калиевые каналы, которые состоят из четырех отдельных субъединиц, объединенных в тетрамерный комплекс, или в результате дублирования промежуточного двухсубъединичного канала [10–12].

Подробное исследование низкопорогового потенциалзависимого Ca_v -канала Т-типа из *Trichoplax adhaerens* H1 (TCa_v3 по новой классификации) было начато сравнительно недавно [6]. Первоначально был идентифицирован и аннотирован ген KJ466205.1, позднее был получен профиль гидрофобности аминокислотной последовательности соответствующего белка AII29365.1, и на основе этих данных была предложена доменная модель интересующего мембранного белка. Ген KJ466205.1 был клонирован, а с помощью гетерологической системы экспрессии удалось охарактеризовать биохимические и физиологические свойства TCa_v3 -канала [6, 9].

Несмотря на достигнутый прогресс, отсутствует полное понимание направления развития кальциевых каналов и дифференцировки их функций [13]. Мы сосредоточились на изучении модульных механизмов усложнения Ca^{2+} -каналов и в дополнение к гипотезе «двойной дубликации», которая подразумевает последовательное возникновение двухсубъединичных и четырехсубъединичных белков путем удвоения соответствующих генов [10], полагаем, что эволюция кальциевых каналов шла по пути слияния отдельных субъединиц в единую полипептидную цепь, дальнейшей инсерции новых доменов с регуляторными функциями в спейсеры, соединяющие трансмембранные сегменты, и последующего объединения дополнительных белковых субъединиц, которые взаимодействуют с регуляторами канала, в макромолекулярный комплекс, который интегрируется в единую сеть управления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформационный анализ *in silico* осуществляли на удаленных серверах. Поиск ортологов среди кальциевых каналов трихопакса и других биологических видов состоял в последовательном применении программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) против таких баз данных, как nr, pdb, wgs и tsa, внутри реляционной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), а также в InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). Кроме того, использовали коллекцию белков PFAM (<http://pfam.xfam.org>), а в ряде экспериментов анализ дополняли поиском с помощью SmartBLAST и MOTIF Search ([\[genome.jp/tools/motif\]\(https://www.genome.jp/tools/motif\)\). Параметры оценки гомологии как счет \(BitScores\) и ожидание \(E-value\) приводятся в тексте.](https://www.</p></div><div data-bbox=)

Поиск в базе данных консервативных доменов CDD осуществляли с помощью BLAST-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). В отдельных случаях, чтобы идентифицировать гомологичные белковые последовательности, применяли программу PHMMER (<http://hmmer.org>). Множественные выравнивания выполнены с помощью Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Распознавание сигналов сплайсинга и выявление экзонов осуществили благодаря утилите Splign [14]. Для форматирования и анализа коротких полипептидных последовательностей локально использовали пакет SMS2 [15].

Предсказание консервативных белковых доменов и функциональных участков мембранных белков проводили с помощью InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) и дополняли профилями гидропатии, используя ExPASy ProtScale [16]. Построение пространственных моделей белков выполняли на Phyre2-сервере [17]. Заключительный анализ и визуализацию молекулярных структур осуществляли с использованием программы UCSF Chimera [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интрон-экзонная природа исследуемых полипептидов. Исходные данные по нуклеотидным последовательностям были взяты из геномных проектов, опубликованных в работах [3, 19]. Ген белка RDD42051.1 занимал положение с координатами 226881–241350 на скаффолде *Trichoplax* sp. H2 strain Panama scaffold_62, а соответствующие гены белка AII29365.1 и гипотетического неполного белка TRIADDRAFT_21513 находились в разных положениях 48355–61646 и 1727–13230 (6781672–6793175) на скаффолде *Trichoplax adhaerens* TRIADscaffold_2 (рис. 1, 2). Следует отметить, что длина экзонов всех трех белков была сопоставима, варьировала от 69 до 1442 пар нуклеотидов (нп) и в среднем составляла 221 нп. Длина интронов колебалась от 82 до 689 нп при среднем значении 267 нп (табл. 1). Длины первичных транскриптов AII29365.1 и RDD42051.1 существенно не отличались и составляли 6192 и 7499 нп соответственно, а длина первичного транскрипта TRIADDRAFT_21513 была несколько короче и равнялась 4530 нп. Число экзонов для полных полипептидов AII29365.1 и RDD42051.1 составляло 28, а для укороченного белка TRIADDRAFT_21513 имело значение 26.

Сравнение белков AII29365.1 и RDD42051.1. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал, что белок AII29365.1

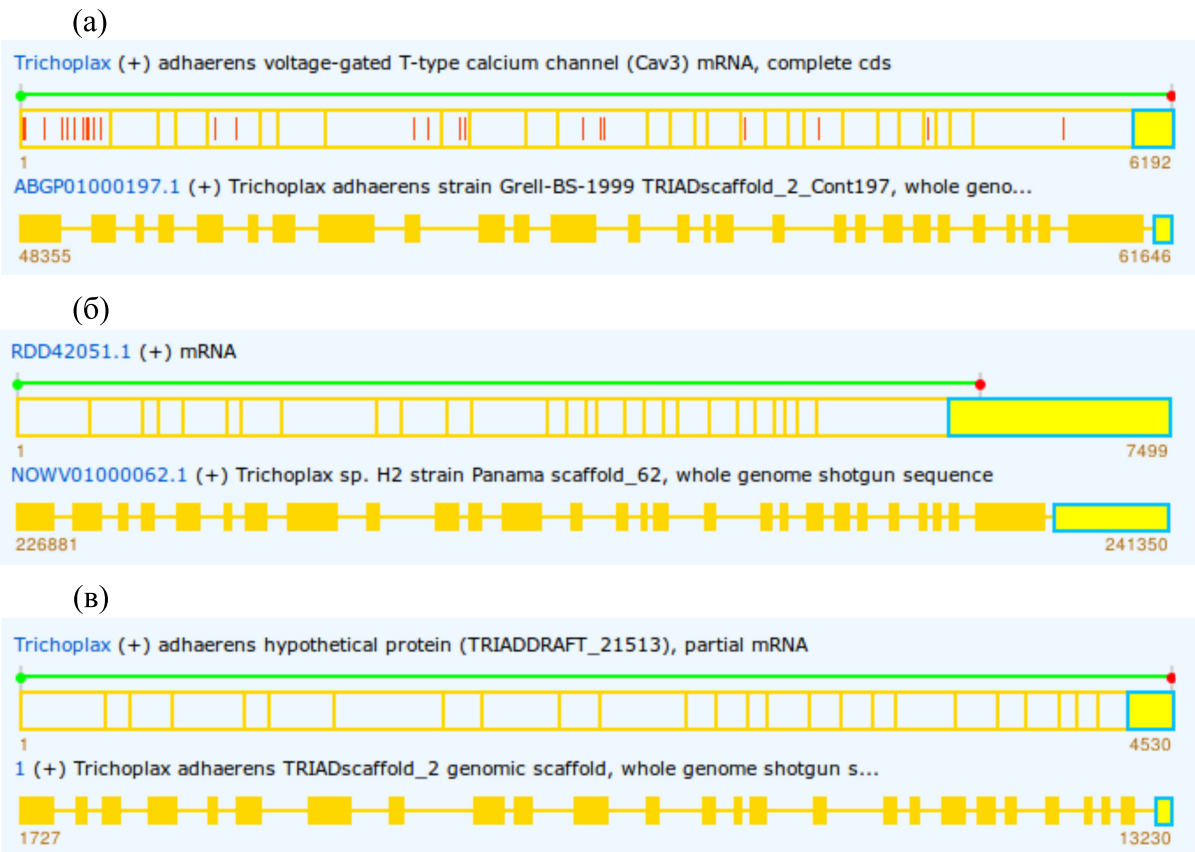


Рис. 1. Физические карты генов и первичных транскриптов, кодирующих белки AIJ29365.1 (а), RDD42051.1 (б) и гипотетический полипептид TRIADDRAFT_21513 (в).

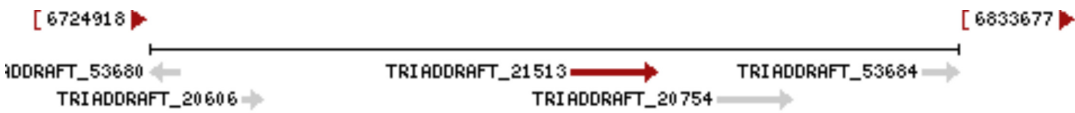


Рис. 2. Местоположение гена 6750759 в локусе TRIADDRAFT_21513 на скаффолде *Trichoplax adhaerens* (strain: Grell-BS-1999) [3], кодирующего гипотетический белок TRIADDRAFT_21513.

длиной 2063 аминокислотных остатка (аа) из штамма Н1 имеет 97% гомологии с полипептидом RDD42051.1 длиной 2090 аа из штамма Н2, а также выявил 13 точечных аминокислотных замен и отсутствие N-концевого пептида длиной 13 аа во втором белке, причем 5 аминокислотных замен

Таблица 1. Характеристики изучаемых первичных транскриптов на основе геномных данных *Trichoplax adhaerens* (Н1) и *Trichoplax* sp. (Н2)

Белок	Гаплотип	Длина первичного транскрипта, нп	Число экзонов	Экзоны, нп			Интроны, нп		
				мин.	макс.	ср.	мин.	макс.	ср.
AIJ29365.1	Н1	6192	28	69	855	221	82	688	263
RDD42051.1	Н2	7499	28	69	1442	267	82	689	259
TRIADDRAFT_21513	Н1	4530	26	71	430	174	97	688	279
Суммарное среднее				70	909	221	87	688	267



Рис. 3. Физическая карта (а) и парное выравнивание (б) белковых последовательностей AIJ29365.1 и RDD42051.1, которые являются низкопороговыми кальциевыми каналами Т-типа из трихоплаксов штаммов H1 и H2, соответственно, N-концевой пептид выделен зеленым цветом, лидерный фрагмент с участком сплайсинга — желтым, сайты связывания иона кальция — красным, аминокислотные замены — бирюзовым, IEHHNQ-сайт — малиновым, жирным шрифтом указано положение каналаобразующих повторов I–IV, места сплайсирования PHK указаны прописными буквами.

повтор/доля/домен IV

AIJ29365.1 KVKEKKKNHIPPVEDYPAWRRKLYRFCVHRYFDITITITIVIAVNIIFMATEHYKMSqaWEEVHKYANYFFTIVVFTLEAVIH 1560
 RDD42051.1 KVKEKKKNHIPPVEDYPAWRRKLYRFCVHRYFDITITITIVIAVNIIFMATEHYKMSqaWEEVHKYANYFFTIVVFTLEAVIH 1587

AIJ29365.1 LVAFGVVYFRDrwNIFDLLIVILSWTGIIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVriLKLIKAAGGIRALLRTIMNAMPq 1640
 RDD42051.1 LVAFGVVYFRDrwNIFDLLIVILSWTGIIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVriLKLIKAAGGIRALLRTIMNAMPq 1667

AIJ29365.1 vVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCTTDNPNCLSGHANFKTFGMAMTLFRIATGDNWQGILqdTLRENCDSRENC 1720
 RDD42051.1 vVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCTTDNPNCLSGHANFKTFGMAMTLFRIATGDNWQGILqdTLRENCDSRENC 1747

AIJ29365.1 QQNCCSNPILSSLFFVIFVLAQYVLTNNVVAVLMKHLEESDEKENNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNYYPPGLTDI 1800
 RDD42051.1 QQNCCSNPILSSLFFVIFVLAQYVLTNNVVAVLMKHLEESDEKENNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNYYPPGLTDI 1827

AIJ29365.1 HLSSNHKNLKDIGEDYTTHQFDQNHTLKSPLPYQNKYARITVSRISITAIVPQKSTLDQAENEVVMQDKFQVHDIRTSSY 1880
 RDD42051.1 HLSSNHKNLKDIGEDYTTHQFDQNHTLKSPLPYQNKYARITVSRISITAIVPQKSVLDQAENEVVMQDKFQVHDIRTSSY 1907

AIJ29365.1 PLDDHDDVEDQMELTASIHENRKLHRQGNSSDDGHPYLLQHSPLFRHQSYESNCHHGSIQSDFNSFNLSSDTSSFSSEN 1960
 RDD42051.1 PLDDHDDVEDQMELTASIHENRKLHRQGNSSDDGHPYLLQHSPLFRHQSYESNCHHGSIQSDFNSFNLSSDTSSFSSEN 1987

AIJ29365.1 PLKSNNKDNPTDRDIYTADDLNRILSKKRKslKRSNSWDFSFTSEFSNHRYPCKSKKTIYPFHYPTKLSKDDSTIPD 2040
 RDD42051.1 PLKSNNKDNPTDRDIYTADDLNRILSKKRKslKRSNSWDFSFTSEFSNHRYPCKSKKTIYPFHYPTKLSKDDSTISD 2067

AIJ29365.1 QPMVVIACEKKVTLPKMIQTLv 2063
 RDD42051.1 QPMVVIACEKKVTLPKMIQTLv 2090

Рис. 3. Окончание.

приходились на сравнительно небольшую N-концевую часть белка. Тем не менее существенное отличие RDD42051.1 заключается в пептидной вставке LSS (leader splice site — лидерный сайт сплайсинга) длиной 40 аа, массой 4.81 кДа, с высоким содержанием алифатических (8 Ile, 20%, и 4 Leu, 10%) и ароматических (6 Phe, 15%, и 4 Tyr, 10%) аминокислот, что составляет 55% от общего числа его аминокислотных остатков. Интересной особенностью данного пептида является внутренняя метка сайта сплайсинга, по которому объединяются экзоны I и II, кодирующие белок RDD42051.1 (рис. 3).

Последовательность LSS-пептида оказалась уникальной. Так, его сравнение при помощи BLAST-сервера с глобальным банком данных NCBI (база nr) выявило присутствие укороченного участка MRSIIINFYLFYLPYHSKISGLNFCFLT с 100%-й гомологией лишь в одном неполном гипотетическом белке TRIADDRAFT_21513 (GeneID: 6750759, ProteinID: XP_002109544.1) — предполагаемом переносчике ионов, принадлежащему *Trichoplax adhaerens* (H1). Повторное сравнение короткого пептида длиной 27 аа с базами данных PFAM и InterPro не помогло найти дополнительные существенные гомологии.

Построение структурных моделей белков AIJ29365.1 и RDD42051.1. Полипептидные последовательности AIJ29365.1 и RDD42051.1 длиной 2063 и 2090 аа были использованы для создания трехмерных моделей соответствующих кальциевых каналов на Phyre2-сервере методом гомологического сравнения с известными белковыми структурами [20].

В случае AIJ29365.1 с наибольшим количеством очков и с 100%-й достоверной вероятностью по единичному шаблону натриевого канала были смоделированы 1194 аминокислотных остатка, составляющие 58% общей длины. Дополнительно 1431 остатков (69%) были смоделированы с достоверной вероятностью больше 90% с использованием нескольких шаблонов.

Для RDD42051.1 с наибольшим счетом и с 100%-й вероятностью по одному шаблону были построены 1143 остатка, составляющие 55% последовательности. Кроме того, 1405 остатков (67%) были смоделированы с вероятностью больше 90% с применением нескольких дополнительных шаблонов.

Оба ионных канала имели схожую структуру и состояли из центрального участка, формирующего пору, и четырех потенциалчувствительных доменов, которые окружают кор (рис. 4а,б). Установлено, что ион-проводящая пора образована четырьмя парными антипараллельными α -спиралями, собирающимися в четыре пальца, которые вместе связывают один ион кальция. По периферии к каждому из пальцев присоединены по одному датчику потенциала, каждый из которых образован четырьмя антипараллельными α -спиралями.

В процессе моделирования было потеряно до половины аминокислотных остатков в каждом из исследуемых белков. Из-за отсутствия гомологии с базовыми полипептидами можно предположить, что утраченные белковые фрагменты выполняют delicate регуляторные функции и не являются широко распространенными структу-

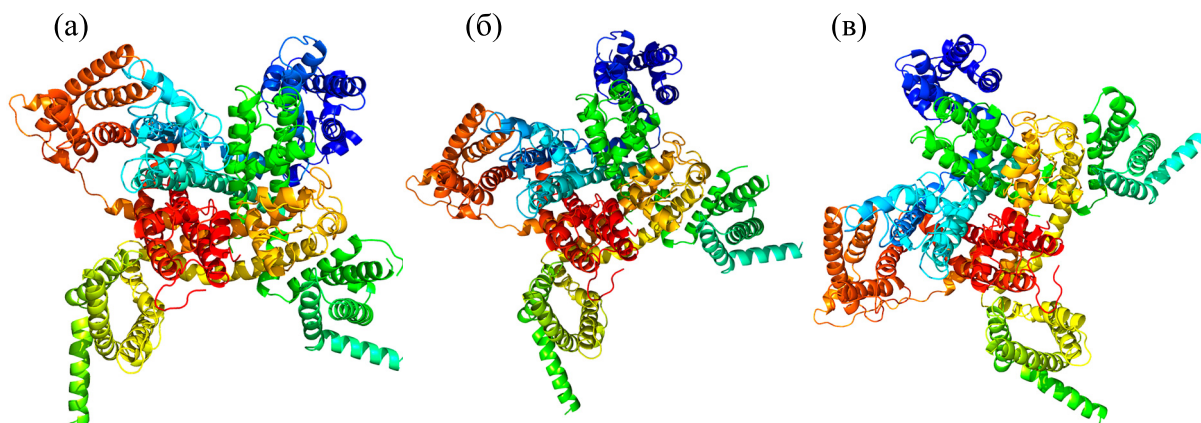


Рис. 4. Реконструкция трехмерных структур Ca_v3 -каналов по первичным аминокислотным последовательностям AIJ29365.1 (а), RDD42051.1 (б) и TRIADDRAFT_21513 (в) из трихоплаксов штаммов Н1 и Н2, первая доля тетрамера обозначена голубым цветом, далее по часовой стрелке.

рами. В частности, в модель не был включен уникальный пептид LSS (рис. 3).

Суммарные данные свидетельствуют, что найденный в белке RDD42051.1 из *Trichoplax* sp. Н2 пептид LSS длиной 40 аа располагается близко к N-концу аминокислотной цепи перед α -спиралью S1 сенсорного домена из повтора I. В силу того, что эта часть мембранного белка образована алифатическими и ароматическими аминокислотными остатками, но обращена в цитоплазму клетки, можно предположить, что данный пептид способен взаимодействовать с гидрофобной частью некой вспомогательной белковой субъединицы, выполняющей модуляторные функции.

В дополнение к структурному анализу для всех исследуемых белков были идентифицированы и картированы трансмембранные домены потенциалзависимых кальциевых каналов, закодированные в первичных аминокислотных последовательностях (табл. 2), что позволило сопоставлять данные и присваивать отдельным пептидным

фрагментам предполагаемые функциональные характеристики.

Аннотация белка TRIADDRAFT_21513 (XP_002109544.1). Гипотетический белок TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens* (Gene ID: 6750759, ProteinID: XP_002109544.1) гомологичен имеющим высокое сходство полипептидам AIJ29365.1 и RDD42051.1, однако имеет ряд отличий. Так, в неполном полипептиде TRIADDRAFT_21513 был обнаружен укороченный вариант (ΔLSS) пептида с сайтом сплайсинга внутри. Необходимо подчеркнуть, что фрагмент ΔLSS фактически является N-концевым участком этого белка (рис. 3, 5). Следующей особенностью белка TRIADDRAFT_21513 являются значительные делеции на участках, обозначенных как альфа-взаимодействующий домен (AID – alpha-interacting domain) [21, 22] и IML-домен (inner mid-loop) длиной 66 и 51 аа соответственно. Кроме того, отмечены изменения в паттерне сплайсирования РНК при образовании

Таблица 2. Положение основных четырех трансмембранных доменов, образующих пору кальциевого канала, на аминокислотных последовательностях белков AIJ29365.1, RDD42051.1 и TRIADDRAFT_21513 (XP_002109544.1)

Белок	Повтор/домен							
	I		II		III		IV	
	Интервал	E	Интервал	E	Интервал	E	Интервал	E
AIJ29365.1	161–485	1.19e^{-38}	733–964	1.24e^{-53}	1177–1447	6.73e^{-62}	1509–1755	1.90e^{-47}
RDD42051.1	190–512	1.59e^{-37}	760–991	1.36e^{-53}	1204–1474	2.42e^{-61}	1536–1782	5.11e^{-47}
XP_002109544.1	28–350	4.73e^{-32}	532–763	3.46e^{-48}	924–1189	4.00e^{-53}	1254–1500	2.65e^{-42}

Примечание. E – значение ожидания.

AIJ29365.1	mDISFAIIPFNYNMTLLSILSANWNVLVLLLVDMSSNGHRCHQRFAASSSYQSDQPSHHA	60
RDD42051.1	-----mTLLSILSANWNVLVLLLVDMSSNGHRCHQRFAASSSYQSDQPSHHA	47
XP_002109544.1	-----mTLLSILSANWNVLVLLLVDMSSNGHRCHQRFAASSSYQSDQPSHHA	0
AIJ29365.1	IDRNKHQDLPYHGKAKSPDLLSPISAYDRYQQGRQQQDGTNQNYKADNYRQPHDTIREFQ	120
RDD42051.1	IDRNKHQDLPYHGKAKSPDLLSPISAYDRYQQGRQQQDRTNQNYKADNYRQPHDVIREFQ	107
XP_002109544.1	-----IDRNKHQDLPYHGKAKSPDLLSPISAYDRYQQGRQQQDRTNQNYKADNYRQPHDVIREFQ	0
AIJ29365.1	SEQQINSNDADIIEEIHPPVVCWYLHKDQWPRKYFVKLSQWr-----	162
RDD42051.1	SEQQINSNDADIIDDEIHPPVVCWYLHKDEWPRKYFVKLSQWrYPFIDGFNIiniYMRSII	167
XP_002109544.1	-----mRSII	5
AIJ29365.1	-----wFERITIIIVILINCVTLGSPNPAGQFKNNTCVDSTCQI	200
RDD42051.1	INFYLFYLPYHPSKSIIGLNFCLTIFERITIIIVILINCVTLGSPNPAGQFKNNTCVDSTCQI	227
XP_002109544.1	INFYLFYLPYHPSKSIIGLNFCLTIFERITIIIVILINCVTLGSPNPAGQFKNNTCVDSTCQI	65
AIJ29365.1	TSVVDNIIFGYFVVEMIKMKVALGVFGKYAYFSSGWNRLDFIIVLTgcLEYLINEGEFLT	260
RDD42051.1	TSVVDNIIFGYFVVEMIKMKVALGVFGKYAYFSSGWNRLDFIIVLTgcLEYLINEGEFLT	287
XP_002109544.1	TSVVDNIIFGYFVVEMIKMKVALGVFGKYAYFSSGWNRLDFIIVLTgcLEYLINEGEFLT	125
AIJ29365.1	IIRTVRVLRPLRAINRVpsMRLLVNLLLDTLPLLGNVLMMLCFIVFSIFGIVGVQLWKGIL	320
RDD42051.1	IIRTVRVLRPLRAINRVpsMRLLVNLLLDTLPLLGNVLMMLCFIVFSIFGIVGVQLWKGIL	347
XP_002109544.1	IIRTVRVLRPLRAINRVpsMRLLVNLLLDTLPLLGNVLMMLCFIVFSIFGIVGVQLWKGIL	185
AIJ29365.1	RSRCTLQONITAPPgiFLYRYLPSYEDPDYVCSLPEYNGIHHCRDLTSLNLTDLTCKI	380
RDD42051.1	RSRCTLQONITAPPgiFLYRYLPSYEDPDYVCSLPEYNGIHHCRDLTSLNLTDLTCKI	407
XP_002109544.1	RSRCTLQONITAPPgiFLYRYLPSYEDPDYVCSLPEYNGIHHCRDLTSLNLTDLTCKI	245
EL1		
AIJ29365.1	TNQTLASQYGDGTCTEYLQFYDTCSTSGPNIFYDNISFDNFAMAFIAIFqvITLEAWVDI	440
RDD42051.1	TNQTLASQYGDGTCTEYLQFYDTCSTSGPNIFYDNISFDNFAMAFIAIFqvITLEAWVDI	467
XP_002109544.1	TNQTLASQYGDGTCTEYLQFYDTCSTSGPNIFYDNISFDNFAMAFIAIFqvITLEAWVDI	305
AIJ29365.1	MYAIQDGHASIDWIYFVILILIGSLFLLNFTLVVMATQFSETKRR	500
RDD42051.1	MYAIQDGHASIDWIYFVILILIGSLFLLNFTLVVMATQFSETKRR	527
XP_002109544.1	MYAIQDGHASIDWIYFVILILIGSLFLLNFTLVVMATQFSETKRR	365
AIJ29365.1	RGSFSTLSSSAESRTCYNETIRLIRRIILYIAYLIQQFYSRCLKKIwNRLYNRCIICKRK	560
RDD42051.1	RGSFSTLSSSAESRTCYNETIRLIRRIILYIAYLIQQFYSRCLKKIwNRLYNRCIICKRK	587
XP_002109544.1	RGSFSTLSSSAESRTCYNETIRLIRRIILYIAYLIQQFYSRCLKKI-----	411
AIJ29365.1	WSSRHQRSTSMSES RVNGNAKFTSDDQRLDRLHQNFFLPDIDGSCSLSDGTERSTYLAFLI	620
RDD42051.1	WSSRHQRSTSMSES RVNGNAKFTSDDQRLDRLHQNFFLPDIDGSCSLSDGTERSTYLAFLI	647
XP_002109544.1	-----STYLAFLI	419
AIJ29365.1	DNWRQRSYSQNTTTTSQIYQESALRDLGKRNGLDINNSLYDGTDDNDGDTPIHPLESN	680
RDD42051.1	DNWRQRSYSQNTTTTSQIYQESALRDLGKRNGLDINNSLYDGTDDNDGDTPIHPLESN	707
XP_002109544.1	DNWRQRSYSQNTTTTSQIYQESALRDLGKRNGLDINNSLYDGTDDNDGDTPIHPLESN	479
AIJ29365.1	TELQLFNFQLRHQPDGVSLTTDLNKNPTNYQKLKQIRRLRVRCIIFTKSQFSLIVLFA	740
RDD42051.1	TELQLFNFQLRHQPDGVSLTTDLNKNPTNYQKLKQIRRLRVRCIIFTKSQFSLIVLFA	767
XP_002109544.1	TELQLFNFQLRHQPDGVSLTTDLNKNLTNYQKLKQIRRLRVRCIIFTKSQFSLIVLFA	539
AIJ29365.1	ILANTIVMAIEHHNqpTYQIQALEVCNIIIFTIFFTLEMVFKLFALGLLRYAKDSFNVFDA	800
RDD42051.1	ILANTIVMAIEHHNqpTYQIQALEVCNIIIFTIFFTLEMVFKLFALGLLHYAKDSFNVFDA	827
XP_002109544.1	ILANTIVMAIEHHNqpTYQIQALEVCNIIIFTIFFTLEMVFKLFALGLLHYAKDSFNVFDA	599
AIJ29365.1	IIVIVsLVEIATDGKGLSVLRSFRLRLRIKIVRFLPTLQROMMVMAQTFDNVVIFLGLLF	860
RDD42051.1	IIVIVsLVEIATDGKGLSVLRSFRLRLRIKIVRFLPTLQROMMVMAQTFDNVVIFLGLLF	887
XP_002109544.1	IIVIVsLVEIATDGKGLSVLRSFRLRLRIKIVRFLPTLQROMMVMAQTFDNVVIFLGLLF	659
AIJ29365.1	LFMFTFSILGMHLFGNRFCLARVKDGPVVC SRKNFDSLWAFVTVFqiLTQEDWNVVMYD	920
RDD42051.1	LFMFTFSILGMHLFGNRFCLARVKDGPVVC SRKNFDSLWAFVTVFqiLTQEDWNVVMYD	947
XP_002109544.1	LFMFTFSILGMHLFGNRFCLARVKDGPVVC SRKNFDSLWAFVTVFqiLTQEDWNVVMYD	719
EL2		
AIJ29365.1	GMLARGKWAAYFLALVTLGNVYLLNLLVAILVNGFQEQEkdeKNRKKDLTAKMG RALKH	980
RDD42051.1	GMLARGKWAAYFLALVTLGNVYLLNLLVAILVNGFQEQEkdeKNRKKDLTAKMG RALKH	1007
XP_002109544.1	GMLARGKWAAYFLALVTLGNVYLLNLLVAILVNGFQEQEkde-----	760
AIJ29365.1	YCDSTITDVRSEDQPANRQVNAPDENS GYQVGRDLQGIPTTQIVEGYGKSTPICDHQSCA	1040
RDD42051.1	YCDSTITDVRSEDQPANRQVNAPDENS GYQVGRDLQGIPTTQIVEGYGKSTPICDHQSCA	1067
XP_002109544.1	-----LQGIPTTQIVEGYGKSTPICDHQSCA	788
AIJ29365.1	MESSALNQSNKREEDGDSQTEFYIRTFQSSSLSCNHNQEEEEQQQLPNLVDPNEVQIFPCR	1100
RDD42051.1	MESSALNQSNKREEDGDSQTEFYIRTFQSSSLSCNHNQEEEEQQQLPNLVDPNEVQIFPCR	1127
XP_002109544.1	MESSALSQSNKREEDGDSQTEFYIRTFQSSSLSCNHNQEEEEQQQLPNLVDPNEVQIFPCR	848

Рис. 5. Начало.

AIJ29365.1	VPIGPRDPPQSKNKFALRLRLMPwISKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLLI	1160
RDD42051.1	VPIGPRDPPQSKNKFALRLRLMPwISKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLLI	1187
XP_002109544.1	VPIGPRDPPQSKNKFALRLRLMPw-sKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLLI	907
AIJ29365.1	LPKENrfrKWCKNVVKNPYFDRIILVVIIFNCVTLAMERPGIDPNSmerHFLNLMVIIIFT	1220
RDD42051.1	LPKENrfrKWCKNVVKNPYFDRIILVVIIFNCVTLAMERPGIDPNSmerHFLNLMVIIIFT	1247
XP_002109544.1	LPKENrfrKWCKNVVKNPYFDRIILVVIIFNCVTLAMERPGIDPNSmerHFLNLMVIIIFT	967
AIJ29365.1	FIFTSEMIikvLALGLVTGDKSYLRNGWNVLDLLLVIISWVDLIITYTGGASNILGVLRI	1280
RDD42051.1	FIFTSEMIikvLALGLVTGDKSYLRNGWNVLDLLLVIISWVDLIITYTGGASNILGVLRI	1307
XP_002109544.1	FIFTSEMIikv-----vTGDKSYLRNGWNVLDLLLVIISWVDLIITYTGGASNILGVLRI	1022
AIJ29365.1	LRGFRTLRLPLrvINRAPGLKLVVQTLFSSSLKAIGNIVICVAFFVIFGILGVqlFSGKFY	1340
RDD42051.1	LRGFRTLRLPLrvINRAPGLKLVVQTLFSSSLKAIGNIVICVAFFVIFGILGVqlFSGKFY	1367
XP_002109544.1	LRGFRTLRLPLrvINRAPGLKLVVQTLFSSSLKAIGNIVICVAFFVIFGILGVqlFSGKFY	1082
AIJ29365.1	YCKATDDVENKTQCVEQYGLSEWVNRPNYNFDDLvnaSLSLFVISSKDGWMDITYHGIDAR	1400
RDD42051.1	YCKATDDVENKTQCVEQYGLSEWVNRPNYNFDDLvnaSLSLFVISSKDGWMDITYHGIDAR	1427
XP_002109544.1	YCKATDDVENKTQCVEQYGLSEWVNRPNYNFDDLvnaSLSLFVISSKDGWMDITYHGIDAR	1142
EL3		
AIJ29365.1	GVDLqpKKNHNVVLLYFISFLLLVGFFVLNMFVGVVVENFHKQEEHERRQREKKRNRK	1460
RDD42051.1	GVDLqpKKNHNVVLLYFISFLLLVGFFVLNMFVGVVVENFHKQEEHERRQREKKRNRK	1487
XP_002109544.1	GVDLqpKKNHNVVLLYFISFLLLVGFFVLNMFVGVVVENFHKQEEHERRQREKKRNRK	1202
AIJ29365.1	LQRAKKNQKANAKkV--I-IKKVKKEKKKNHIPPVEDYPAWRRKLYRFCVHRYFDITIT	1517
RDD42051.1	LQRAKKNQKANAKkV--I-IKKVKKEKKKNHIPPVEDYPAWRRKLYRFCVHRYFDITIT	1544
XP_002109544.1	LQRAKKNQKANAKSVSQIFCikKVKEKKKNHIPPVEDYPAWRRKLYRFCVHRYFDITIT	1262
AIJ29365.1	IVIAVNIIFMATEHYKMSqaWEEVHKYANYFFTVVFTLEAVIHLVAFGVVYFRDrwNIF	1577
RDD42051.1	IVIAVNIIFMATEHYKMSqaWEEVHKYANYFFTVVFTLEAVIHLVAFGVVYFRDrwNIF	1604
XP_002109544.1	IVIAVNIIFMATEHYKMSqaWEEVHKYANYFFTVVFTLEAVIHLVAFGVVYFRDrwNIF	1322
AIJ29365.1	DLILVILSWTGIIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVriLKLIKAAGKIRALLRTIMNA	1637
RDD42051.1	DLILVILSWTGIIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVriLKLIKAAGKIRALLRTIMNA	1664
XP_002109544.1	DLILVILSWTGIIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVriLKLIKAAGKIRALLRTIMNA	1382
AIJ29365.1	MPqvVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCTTDNPNCLSGHANFKTFGMAMLTFLRIA	1697
RDD42051.1	MPqvVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCTTDNPNCLSGHANFKTFGMAMLTFLRIA	1724
XP_002109544.1	MPqvVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCTTDNPNCLSGHANFKTFGMAMLTFLRIA	1442
EL4a		
AIJ29365.1	TGDNWQGILqdTLRENCDSRENCQONCCSNPILSSLFFVIFVLAQYVLTNVVVAVLMKH	1757
RDD42051.1	TGDNWQGILqdTLRENCDSRENCQONCCSNPILSSLFFVIFVLAQYVLTNVVVAVLMKH	1784
XP_002109544.1	TGDNWQGILqdTLRENCDSRENCQONCCSNPILSSLFFVIFVLAQYVLTNVVVAVLMKH	1502
EL4b		
AIJ29365.1	LEESDEKENNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNNYPPGLTDIHLSSNHKNLKDIGEDYT	1817
RDD42051.1	LEESDEKENNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNNYPPGLTDIHLSSNHKNLKDIGEDYT	1844
XP_002109544.1	LEESDEKe-----	1510
AIJ29365.1	THQFDQNHTLKSPLPYQNKYARITVSRISITAIVPQKSTLDOAENEVVMQDKFQVHDIRTK	1877
RDD42051.1	THQFDQNHTLKSPLPYQNKYARITVSRISITAIVPQKSTLDOAENEVVMQDKFQVHDIRTK	1904
XP_002109544.1	-----	1510
AIJ29365.1	SSYPLDDHDDVEDQMELTASIHCCENRKLHRQGQNSDDGHPYLQQHSPLFRHQSYESNCHH	1937
RDD42051.1	LSYPLDDHDDVEDQMELTASIHCCENRKLHRQGQNSDDGHPYLQQHSPLFRHQSYESNCHH	1964
XP_002109544.1	-----	1510
AIJ29365.1	GSIQSDFNSFSNLSSDTSSFSSENPLKSNNSKDNPTDRDIYTADDLNRILSKKRKsIKRSN	1997
RDD42051.1	GSIQSDFNSFSNLSSDTSSFSSENPLKSNNSKDNPTDRDIYTADDLNRILSKKRKsIKRSN	2024
XP_002109544.1	-----	1510
AIJ29365.1	SWDFSFTSEFSNHRRYPCKSKKKTYPFHYPTKLSKDDSTIPDQPMVVIACEKKVTLPRK	2057
RDD42051.1	SWDFSFTSEFSNHRRYPCKSKKKTYPFHYPTKLSKDDSTISDQPMVVIACEKKVTLPRK	2084
XP_002109544.1	-----	1510
AIJ29365.1	MIQTLv 2063	
RDD42051.1	MIQTLv 2090	
XP_002109544.1	----- 1510	

Рис. 5. Множественное выравнивание полипептидов AIJ29365.1, RDD42051.1 и TRIADDRAFT_21513, N-концевой пептид отмечен зеленым цветом, лидерный фрагмент с сайтом сплайсинга (LSS) и его укороченная форма (Δ LSS) выделены желтым, AID-фрагмент обозначен черным, внутренняя срединная петля IML – серым, C-концевой фрагмент – светло-серым, сайты связывания иона кальция окрашены красным, аминокислотные замены – бирюзовым, короткие вставки и делеции – голубым, IEHNP-сайт – малиновым, желтым шрифтом маркирована последовательность «зонда», жирным шрифтом – позиции каналаобразующих доменов I–IV, линии подчеркивания обозначают внешние аминокислотные петли, сайты сплайсинга PHK отмечены прописью.

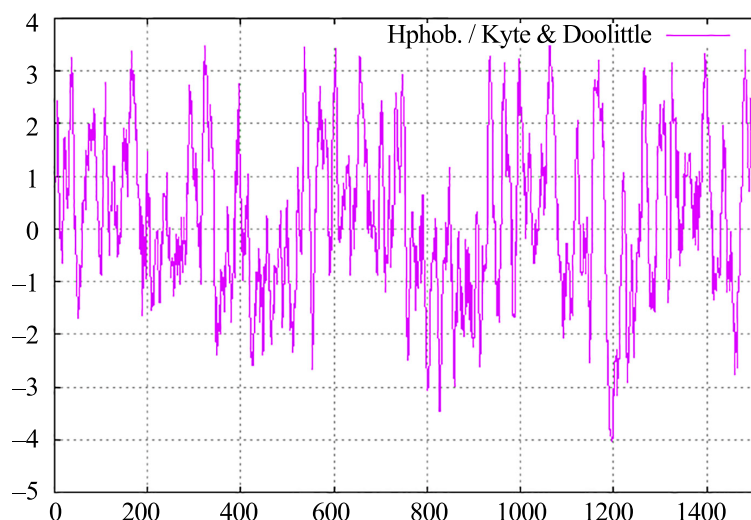


Рис. 6. Масштабный профиль гидропатии Kyte-Doolittle с окном 9 предполагаемого Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens*, номер позиции в последовательности — по абсциссе, счет — по ординате.

зрелого транскрипта, выявленные в полипептиде TRIADDRAFT_21513. Например, это точечная делеция в IML-петле, делеция 4 аминокислотных остатков в доле III и короткая вставка с заменой из 7 аа в линкере, соединяющем доли III и IV. Существенно, что все изменения произошли в непосредственной близости от участков сплайсирования РНК. Следует также отметить полное отсутствие С-концевой части в полипептиде TRIADDRAFT_21513, в отличие от белков AIJ29365.1 и RDD42051.1 из штаммов Н1 и Н2 соответственно (рис. 5).

Особо следует подчеркнуть идентичное расположение сайтов связывания ионов Ca^{2+} во всех трех белках, образующих EEDD-селективный фильтр [6, 23, 24]. Данное обстоятельство позволяет утверждать, что полипептид TRIADDRAFT_21513 является кальциевым каналом семейства Ca_v3 (рис. 5).

На Phyge2-сервере по единичному шаблону натриевого канала с наибольшим количеством очков и с 100%-й достоверной вероятностью были смоделированы 1139 аминокислотных остатка, составляющие 75% общей последовательности белка TRIADDRAFT_21513. Дополнительно 1375 остатков (91%) были смоделированы с достоверной вероятностью >90% с использованием нескольких шаблонов, что позволило выявить коровую структуру белка TRIADDRAFT_21513, схожую с каналами AIJ29365.1 и RDD42051.1 (рис. 4). Полученная 3D-модель представляет характерную структуру тетрамерного Ca_v3 -канала, включающую по шесть трансмембранных α -спиралей (сегменты S1-S6) в каждом из четырех гомологичных повторов (I-IV).

Профили гидропатии и анализ вторичной последовательности белка TRIADDRAFT_21513 показывают, что AID-вставка между повторами I и II со стороны цитоплазмы клетки представляет структуру «спираль—петля—спираль» (gating brake structure) с последующей длинной аминокислотной петлей (рис. 6, 8) [6].

Восстановление функций отдельных модулей Ca_v3 -каналов трихоплакса. При поиске в базах данных использовали аминокислотные последовательности изучаемых пептидов, а также прилежащие к ним участки, образующие вместе последовательности «зондов» (рис. 5, табл. 3, 4). Отметим, что AID-мотив белка TRIADDRAFT_21513 короче, чем его аналог в полипептидах AIJ29365.1 и RDD42051.1. Было обнаружено, что AID-зонд из TRIADDRAFT_21513 имеет гомологии в каналах Т-типа костистых рыб (табл. 5), тогда как AID-зонд из AIJ29365.1 и RDD42051.1 имеет гомологии в соответствующих белках костистых рыб и змей (табл. 6).

Например, AID-зонд предполагаемого Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens* показал 45% (32/71) гомологии с $\alpha 1$ -субъединицей потенциалзависимого кальциевого канала Т-типа XM_019071747.1 из костистой рыбы *Cyprinus carpio* при счете 62.8 и ожидании $4e^{-08}$ (рис. 8). Особо следует обратить внимание на высококонсервативную последовательность IENHNQP, которая входит в состав «зонда», но расположена ниже по аминокислотной последовательности чем AID-мотив, а именно, в начале второго повтора между сегментами S1 и S2. Данный сайт встречался возле AID-мотива костистых рыб, в то время как похожий сайт IENNEQP был найден рядом с AID-мотивом змей. Последняя

Таблица 3. Последовательности регуляторных пептидов из Ca_v3-каналов трихопакса

Пептид	Аминокислотная последовательность
N-концевой пептид	mdisfaiipfnyn
LSS	ypfidgfniiinyMRSIIINFYFLYPHSHKSIQGLNFCFLT
ΔLSS, укороченный вариант LSS	MRSIIINFYFLYPHSHKSIQGLNFCFLT
AID-мотив из Cav3-каналов AIJ29365.1 и RDD42051.1	VTKKARNSPSAIRSRRGSFSTLSSSAESRTCYNETIRLIRRIILYIAYLIQQFYSRCLK KIWNRLYNRLCLICKRKWSSRHQRSTSMSESrvngNAKFTSDDQRLDRLHQNF LPDIDGSCSLSDGTERSTYLAFLDNRQSRYSQNTTTTSQIYQESALRDLGKRN GDLAINNSLYDGTDDNDGDTPIHPLESNTLQLFNFQLRHQPDGVSLLTDLNPK PTNYQKLKQIRRLRVCCIFTKSQK
AID-мотив из белка TRIADDRAFT_215	VTKKARNSPSAIRSRRGSFSTLSSSAESRTCYNETIRLIRRIILYIAYLIQQFYSRCLK KISTYLAFLDNRQSRYSQNTTTTSQIYQESALRDLGKRNGLAINNSLYDGT TDNDGDTPIHPLESNTLQLFNFQLRHQPDGVSLLTDLNPKLTNYQKLKQIRRL LRVCCIFTKSQK
IML из AIJ29365.1	EKNRKKDLTAKMGRALKHYCDSITDVRSEDQPANRQVNAPDENSGYQVGRDLQ GIPTTQIVEGYGKSTPICDHQSCAYCDSITDVRSEDQPANRQVNAPDENSGYQV GRDLQGIPTTQIVEGYGKSTPICDHQSCAVPIGPRDPPQSKNKFALRLRLMPWK SKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLILPKENRFRKWCKNVVK
IML из TRIAD-DRAFT_215	LQGIPTTQIVEGYGKSTPICDHQSCAMESSALSQSNKREEDGDSQTEFYIRTFQS SSLSCNHNQEEEEQQQLPNLVDPNVQIFPCRVPIGPRDPPQSKNKFALRLRLMP WSKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLILPKENRFRKWCKNVVK

короткая последовательность была также обнаружена с помощью MOTIF Search в банке данных UniProt/SWISS-PROT внутри α-1I субъединицы кальциевых каналов Т-типа у крысы (CAC1I_RAT) и человека (CAC1I_HUMAN).

Далее было показано, что полипептидный фрагмент IML располагается с внутренней стороны мембраны в виде неупорядоченного клубка и соединяет повторы II и III в белках AIJ29365.1 и RDD42051.1, а предполагаемый Ca_v3-канал TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens* имеет делецию в начале IML-аминокислотной петли (рис. 5, 6). Поиск подобных последовательностей в других организмах не выявил значимых гомологий. При соответствующем анализе также не было обнаружено сходство с линкером III–IV, кото-

рый представляет цитоплазматическую структуру «α-спираль–клубок» между повторами III и IV. Кроме того, С-концевой фрагмент кальциевых каналов AIJ29365.1 и RDD42051.1, который отсутствует в белке TRIADDRAFT_21513 (рис. 5), тоже не демонстрировал существенных гомологий при использовании программ BLASTp и tBLASTn против баз nr, pdb, wgs и tsa (табл. 7).

В заключение следует отметить, что нам не удалось обнаружить значимые гомологии для N-концевого пептида, LSS/ΔLSS пептида, IML-соединительной аминокислотной петли, линкера III–IV и С-концевого фрагмента ни с помощью алгоритма BLAST, использующего основное локальное выравнивание, ни с применением алгоритма PHMMER, имплементирующего скрытую

Таблиц. 4. Примеры запросов (Query) или виртуальных зондов при поиске в информационных базах данных

Пептид	Аминокислотная последовательность
N-концевой пептид	mdisfaiipfnyn
LSS	ypfidgfniiinyMRSIIINFYLFLYPHSSKISGLNFCFLT
ΔLSS, укороченный вариант LSS	MRSIIINFYLFLYPHSSKISGLNFCFLT
C-фрагмент AID-мотива, из каналов AIJ29365.1 и RDD42051.1 с прилегающим N-фрагментом из повтора II	CKRKWSSRHQRSTSMSES RVNGNAKFTSDDQRLDRLHQNFFLPDIDGSCLSDG TERSTYLAFRLDNWRQRSYSQNTTTTSQIYQESALRDRLGKRNGDLAINNSLYD GTTDNDGDTPIHPLESNTELQLFNFQLRHQPDGVS LT TDLSNKP TNYQKLKQRI RRLRVCCIFTKSQKFS LIVLFAILANTIVMAIEHHNQPTYQIQALEVCNIIFTIFFTL
C-фрагмент AID-мотива из белка TRIAD-DRAFT_215 с прилегающим N-фрагментом из повтора II	STYLAFRLDNWRQRSYSQNTTTTSQIYQESALRDRLGKRNGDLAINNSLYDGT TD NDGDTPIHPLESNTELQLFNFQLRHQPDGVS LT TDLSNKP TNYQKLKQRI RRLR VCCIFTKSQKFS LIVLFAIANTIVMAIEHHNQPTYQIQALEVCNIIFTIFFTL
IML-фрагмент	EKNRKKDLTAKMGRALKHYCDSITDVRSEDQPANRQVNAPDENS GYQVG
C-концевой фрагмент	NNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNNYPPGLTDIHLSSNHKNLDKIGEDYTT HQFDQNHTLKSPLPYQNKYARITVSR SITAIVPQKSVLDQAENEVVMQDKFQVHD IRTKLSYPLDDHDDVEDQMELTASIH CENRKLHRQGQNSDDGHPYLQQHSPLF RHQSYESNCHHGSIQSDFNSFSNLSSDTS SFSENPLKSNNSKDNPTRDRIYTADD LNRILSKKRKSLKRSNSWDFSFTSEFSNHRRYPCSKKKTIYPFHYPSTKLSKDDST ISDQPMVVIAKEKKVTLPRKMIQTLV

марковскую модель, что подчеркивает уникальность и функциональную значимость данных структур в кальциевых каналах у трихоплакса (табл. 7).

Визуализация полученных данных и их интерпретация. При анализе геномов *Trichoplax adhaerens* H1 [3] и *Trichoplax* sp. H2 [19] мы обнаружили ген 6750759 в локусе TRIADDRAFT_21513 на скаффолде *T. adhaerens* (штамм Grell-BS-1999), кодирующий гипотетический полипептид TRIADDRAFT_21513 с идентификатором XP_002109544.1 длиной 1510 аа, у которого отсутствует С-концевой фрагмент, и аннотировали этот белок как низковольтный потенциалзависимый кальциевый канал семейства Ca_v3. Особенностями данного белка являются делеция N-кон-

цевого пептида, а также укороченные LSS-пептид, AID-фрагмент и IML-соединительная петля, несущие редкие аминокислотные замены. Кроме того, в доле III обнаружена делеция сегмента LALGL из 5 аминокислот, а также индел длиной 7 аа в линкере III–IV (рис. 5, табл. 7). Тем не менее, белок TRIADDRAFT_21513 проявлял на обширных участках полную гомологию с Ca_v3-каналами AIJ29365.1 и RDD42051.1 из *T. adhaerens* H1 и *Trichoplax* sp. H2 соответственно (рис. 5), что позволило построить пространственные модели всех трех кальциевых каналов (рис. 4). Следует отметить большее структурное соответствие между полипептидами AIJ29365.1 и RDD42051.1 из штаммов трихоплакса H1 и H2 (рис. 3) по сравнению с белками AIJ29365.1 и TRIADDRAFT_21513

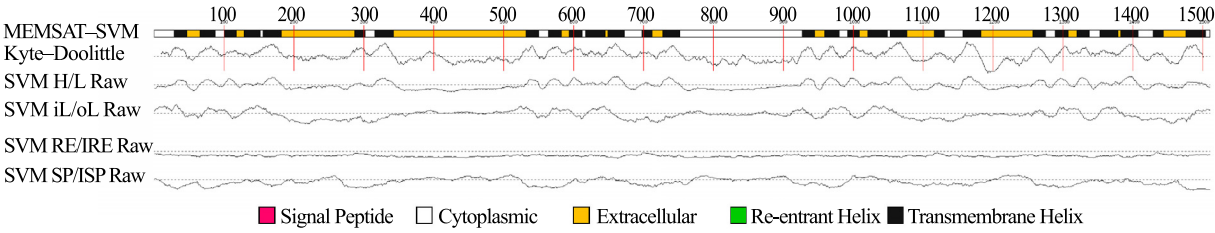


Рис. 7. Доменная структура и профили гидропатии предполагаемого Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens*, позиции аминокислотных остатков на полипептидной цепи обозначены вертикальными красными отрезками через каждые 100 аа, белым, темным и желтым цветом отмечены цитоплазматические, трансмембранные и внеклеточные участки/домены, соответственно, вдоль полипептидной цепи изображены один под другим профили гидропатии, рассчитанные разными методами: Kyte-Doolittle, SVM H/L Raw, SVM iL/oL Raw, SVM RE/IRE Raw и SVM SP/ISP Raw, где SVM – Support Vector Machine.

из *T. adhaerens* H1 (рис. 5). Данный факт может свидетельствовать в пользу независимой эволюции данных каналов по пути дифференцировки и приобретения новых функций.

Нам не удалось выяснить точное функциональное значение N-концевого пептида, участка

LSS/ Δ LSS, петли IML, линкера III–IV и C-концевого фрагмента с помощью поиска гомологичных известных структур. Тем не менее местоположение данных фрагментов внутри молекулы белка и их строение дает основание делать предположения относительно их функциональности.

Таблица 5. Гомологи AID-зонда из предполагаемого потенциалзависимого Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 *Trichoplax adhaerens*, обнаруженные в костистых рыбах (BLASTp против nr)

Организм	BLAST-категория	BLAST-счет	Организм	BLAST-категория	BLAST-счет
<i>Cyprinus carpio</i>	Костистые рыбы	62.8	<i>Gadus morhua</i>	Костистые рыбы	60.1
<i>Sinocyclocheilus grahami</i>	Костистые рыбы	62.8	<i>Oryzias latipes</i>	Костистые рыбы	60.1
<i>Carassius auratus</i>	Костистые рыбы	62.0	<i>Neolamprologus brichardi</i>	Костистые рыбы	59.7
<i>Oryzias melastigma</i>	Костистые рыбы	62.0	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Костистые рыбы	59.7
<i>Ictalurus punctatus</i>	Костистые рыбы	62.0	<i>Takifugu rubripes</i>	Костистые рыбы	59.7
<i>Danio rerio</i>	Костистые рыбы	61.6	<i>Mastacembelus armatus</i>	Костистые рыбы	59.7
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Костистые рыбы	61.6	<i>Nothobranchius furzeri</i>	Костистые рыбы	59.3
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	Костистые рыбы	59.3
<i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Larimichthys crocea</i>	Костистые рыбы	59.3
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Костистые рыбы	58.9
<i>Anabas testudineus</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Poecilia mexicana</i>	Костистые рыбы	58.9
<i>Clupea harengus</i>	Костистые рыбы	60.5	<i>Xiphophorus hellerii</i>	Костистые рыбы	58.9
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Костистые рыбы	60.1			

Таблица 6. Гомологи AID-зонда из низковольтных потенциалзависимых Cav3-каналов AII29365.1- и RDD42051.1-штаммов трихоплакса H1 и H2 соответственно, найденные в других животных (BLASTp против nr)

Организм	BLAST-категория	BLAST-счет	Организм	BLAST-категория	BLAST-счет
<i>Cyprinus carpio</i>	Костистые рыбы	62.4	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i>	Костистые рыбы	62.4	<i>Hippocampus comes</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Sinocyclocheilus grahami</i>	Костистые рыбы	62.0	<i>Parambassis ranga</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Carassius auratus</i>	Костистые рыбы	61.6	<i>Anabas testudineus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Ictalurus punctatus</i>	Костистые рыбы	61.6	<i>Cottoperca gobio</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Danio rerio</i>	Костистые рыбы	61.2	<i>Poecilia reticulata</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Cyclopterus lumpus</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Betta splendens</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Notechis scutatus</i>	Змеи	60.8	<i>Sander lucioperca</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Thamnophis elegans</i>	Змеи	60.5	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	Костистые рыбы	60.5	<i>Larimichthys crocea</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Костистые рыбы	60.5	<i>Etheostoma spectabile</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Clupea harengus</i>	Костистые рыбы	60.1	<i>Acanthochromis polyacanthus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Pantherophis guttatus</i>	Змеи	60.1	<i>Gouania willdenowi</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Костистые рыбы	60.1	<i>Periophthalmus magnuspinnatus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Thamnophis sirtalis</i>	Змеи	59.7	<i>Stegastes partitus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Perca flavescens</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Takifugu rubripes</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Labrus bergylta</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Salarias fasciatus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Gadus morhua</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Neolamprologus brichardi</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Xiphophorus couchianus</i>	Костистые рыбы	58.2
<i>Mastacembelus armatus</i>	Костистые рыбы	58.9	<i>Poecilia mexicana</i>	Костистые рыбы	58.2
<i>Astyanax mexicanus</i>	Костистые рыбы	58.9	<i>Poecilia formosa</i>	Костистые рыбы	58.2
<i>Nothobranchius furzeri</i>	Костистые рыбы	58.5			

Таблица 7. Функциональные аминокислотные последовательности внутри низковольтных потенциалзависимых Ca_v3 -каналов трихоплекса

Полипептид	Длина, aa	Присутствие в кальциевом канале			Свойства
		AIJ29365.1	RDD42051.1	XP_002109544.1	
N-концевой пептид	13	+	—	—	Значимые совпадения отсутствуют
LSS / Δ LSS	40 / 27	—	+	Укороченный фрагмент	Уникальный пептид с неизвестной функцией
AID-мотив	247 / 181	+	+	Укороченный фрагмент	Внутренний затвор канала между повторами I и II
Петля IENHNQP	7	+	+	+	Соединяет снаружи трансмембранные сегменты IIS1 и IIS2 в повторе II
IML	214 / 162	+	+	Укороченный фрагмент	Линкер между повторами II и III
Линкер III–IV	61 / 64	+	+	Удлиненный фрагмент	α -Спираль–клубок между повторами III и IV
C-концевой фрагмент	298	+	+	—	Уникальный неупорядоченный внутренний пептид

Например, участок LSS/ Δ LSS располагается непосредственно перед сегментом IS1 сенсорного домена в повторе I, а аминокислотный состав данного пептида позволяет гидрофобное взаимодействие с неизвестным фактором, что указывает на возможную модуляцию проводимости канала. Кроме того, пространственное положение петли IENHNQP в белке между трансмембранными сегментами IIS1 и IIS2 с наружной стороны мембраны клетки (рис. 9) и ее высокий консерватизм в различных таксономических группах позволяют предположить, что она определяет чувствительность потенциалзависимого кальциевого канала.

Детальное изучение структуры сенсорного домена во второй доле гипотетического низковольтного потенциалзависимого кальциевого канала TRIADDRAFT_21513 (рис. 10) показывает, что аминокислотная петля IENHNQP с двумя положительно заряженными гистидинами H551 и H552, соединяющая сегменты IIS1 и IIS2, может

электростатически взаимодействовать с потенциалчувствительным сегментом IIS4, несущим положительно заряженные аминокислотные остатки K614, R620, R623, R626, K629 и R632. Как известно, сегмент IIS4 играет решающую роль в конформационном переходе кальциевого канала, индуцированном изменением потенциала покоя, что, в свою очередь, регулирует проницаемость поры и поток ионов Ca^{2+} [25–27]. Таким образом, изменение заряда петли IENHNQP в результате аминокислотной замены N→E с нейтрально заряженного остатка Asn553 на положительно заряженный остаток Glu может иметь драматический эффект на взаимодействие линкера IIS1–S2 с подвижным сегментом IIS4, а следовательно, повлиять на чувствительность кальциевого канала.

В противоположность рассматриваемой возможности были обнаружены две несущественные аминокислотные замены в сенсоре II, изучаемых

Query	94	KLTNYQKLKQRIIRLRVRC	CIFTKSQKFS	LIVLFAILANTIVMA	IEHHNQPT	YQIQALEV	153
		K T + K K	+RV+	+S+ F+ ++	AIL NTI M	IEHHNQPT	LE+
Sbjct	1633	KRTCFGKCKDVWDEMRVK	LWGIVESKYFNRGIMIA	ILINTISMGI	IEHHNQPT	DELTNVLEI	1812
Query	154	CNIIFTIFFTL	164				
		CNI+FT FTL					
Sbjct	1813	CNIVFTSMFTL	1845				

Рис. 8. Выявленная гомология между AID-зондом Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 *Trichoplax adhaerens* (Query) и аналогичной структурой в потенциалзависимом кальциевом канале T-типа XM_019071747.1 *Cyprinus carpio* (Sbjct), последовательность IEHHNQPT выделена цветом.

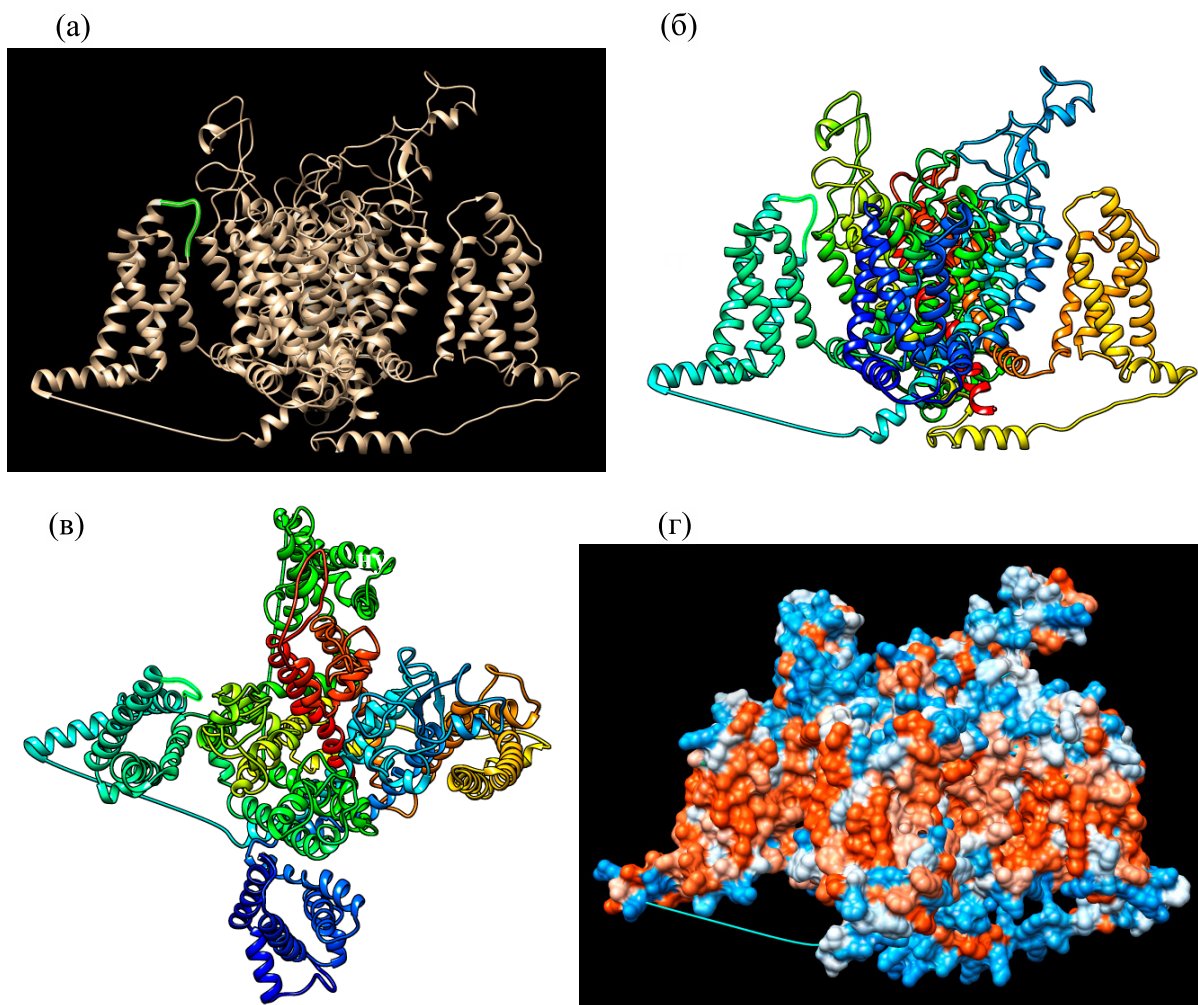


Рис. 9. Пространственное представление Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 *Trichoplax adhaerens*: (а) — положение консервативной петли IEHHNQPT в экстрацеллюлярном пространстве, образующей соединение между сегментами S1 и S2 в доле II, что отмечено зеленым цветом; (б, в) — взаимное расположение 4 долей белка, окрашенных от синего к красному следуя направлению полипептидной цепи от N- к C-концу, представлены: вид сбоку с долей I на переднем плане и вид сверху с долей I внизу и далее по часовой стрелке соответственно; (г) — поверхность трансмембранного белка, где красным цветом обозначены гидрофобные участки, тонкие линии заменяют потерянные в процессе моделирования части и соединяют соответствующие фрагменты белка.

кальциевых каналов трихоплакса. Так, позитивный гидрофильный остаток His588 в линкере IIS2–S3 белка TRIADDRAFT_21513, обращенный в цитоплазму клетки, заменен на остаток аргинина с такими же свойствами в соответствующей

позиции в белке AII29365.1, а неполярный алифатический остаток Val604 в сегменте IIS3, расположенный на уровне верхнего липидного бислоя клеточной мембраны, заменен на похожий остаток изолейцина в белке RDD42051.1

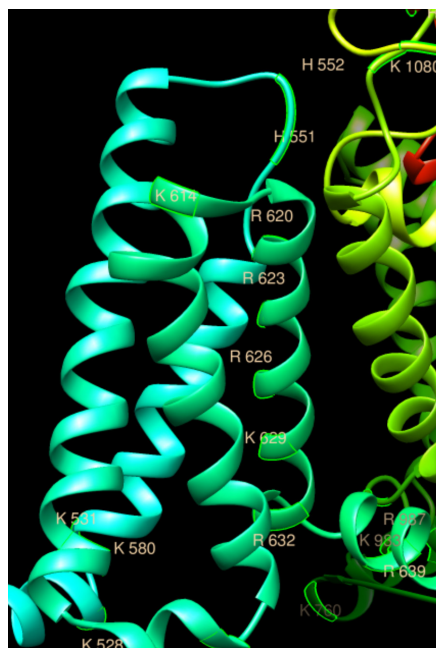


Рис. 10. Сенсорная часть повтора II в Ca_v3 -канале TRIADDRAFT_21513 *Trichoplax adhaerens*, N-конец сенсорного домена находится в левом нижнем углу. Светло-бирюзовая α -спираль IIS1 направлена по диагонали слева направо и снизу вверх в глубину на заднем плане сцены, где последовательно переходит в соединительную петлю IENHNQP с двумя положительно заряженными остатками гистидина H551 и H552. Далее IENHNQP-линкер поворачивает налево и преобразуется в более темную бирюзовую α -спираль IIS2, которая спускается из глубины на передний план. Внизу она превращается в гибкую петлю, поворачивает направо, уходит в глубину и преобразуется в светло-зеленую α -спираль IIS3, которая из глубины поднимается и выходит на передний план. Здесь она трансформируется в петлю, а затем превращается в зеленую регуляторную α -спираль IIS4, которая имеет 5 положительно заряженных аминокислотных остатков R620, R623, R626, K629 и R632, расположенных на одной стороне жесткой α -спирали. Предположительно, изменение поверхностного заряда мембраны с положительного на отрицательный приводит к частичному «всплыванию» α -спирали IIS4, что провоцирует ее поворот, вызывает структурную перестройку канала и открытие поры.

(рис. 5), что, вероятно, не влияет существенно на работу сенсорного домена.

Дополнительно следует отметить, что внешние петли у всех трех изучаемых белков оказались абсолютно схожими как в четырех сенсорных доменах, так и в каналообразующем домене (рис. 5). Данное обстоятельство подчеркивает их консерватизм. Петли EL1, EL2, EL3 и EL4a, EL4b, окружающие пору, имеют отрицательные значения гидропатии (табл. 8) [16]. Интересно, что при нейтральном значении pH петли EL1 и EL3, а также EL4a и EL4b приобретают отрицательный заряд и лишь петля EL2 заряжена положительно, что в целом благоприятно для притягивания катионов. Длинные петли EL1 и EL3 с негативным зарядом могут взаимодействовать с более короткой положительно заряженной петлей EL2, образуя купол над входом в канал, что, возможно, также влияет на его проницаемость для ионов кальция (рис. 9).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ионы Ca^{2+} отличаются тем, что они не только несут заряд, но и являются вторичными мессен-

джерами. Зависимые от напряжения кальциевые каналы позволяют клеткам сопрягать электрическую активность с внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализацией [28]. Кальциевый канал образован $\alpha 1$ -субъединицей, в которую входят ион-проводящая пора, сенсоры напряжения и затвор канала, а также сайты регулирования проводимости канала вторичными мессенджерами, лекарствами и токсинами [29]. Коровая структура натриевых, калиевых и кальциевых каналов включает четыре полипептидных пучка, каждый из которых состоит из шести спиралей, где пять из этих трансмембранных сегментов (S1, S2, S3, S5, S6) являются гидрофобными, в то время как шестой (S4) положительно заряжен и служит в качестве датчика электрического потенциала [26, 30].

Низковольтные потенциалзависимые Ca_v3 -каналы ответственны за фазу деполяризации потенциала действия в большинстве электрически возбуждаемых клеток [31]. Тем не менее если у трихопакса кальциевые каналы Т-типа, возможно, принимают участие в секреции регуляторных пептидов и в управлении движением [32], то у человека встречаются множественные структурные

Таблица 8. Биохимические свойства внешних полипептидных петель изучаемых Ca_v3 -каналов трихоплакса

Петля	Положение	Длина, aa	Молекулярная масса, кДа	Изоэлектрическая точка (pI)	Заряд при pH 7.00	GRAVY
EL1	IS5-P1	101	11.51	4.59	–3.8	–0.361
EL2	IIS5-P1	19	2.09	8.82	1.9	–0.258
EL3	IIIS5-P1	39	4.67	4.17	–3.1	–0.879
EL4a	IVS5-P1	27	2.99	5.51	–0.9	–0.563
EL4b	IVP2-S6	7	2.00	4.43	–1.2	–1.459

Примечание. Значение GRAVY (grand average of hydropathy) рассчитывается путем сложения значений гидропатии для каждого остатка и деления суммы на число остатков в последовательности.

и функциональные изоформы Ca_v3 -каналов, спектр действия которых гораздо шире: от выделения гормонов [33] и возбудимости гладкой мускулатуры [34] до активности нейронов при нормальном функционировании мозга, как глубокий сон, а также до патологических состояний, таких как эпилепсия [35].

Субъединичная структура свойственна многим кальциевым каналам [36]. Возможно, в нашем случае основная $\alpha 1$ -субъединица TCa_v3 -канала трихоплакса штамма H2, в отличие от штамма H1, взаимодействует в цитоплазме клетки не только через AID-мотив, но и благодаря обнаруженному сегменту LSS с вспомогательной β -субъединицей кальциевого канала, которая, в свою очередь, связывается с RIM-регулятором экзоцитоза SNARE (soluble NSF attachment receptor), запуская высвобождение нейромедиатора [37, 38]. Также не исключено взаимодействие гидрофобного LSS-пептида с альтернативным внутриклеточным фактором с участием GPCR-рецепторов (G-protein coupled receptors), сопряженных с G-белками [39]. Предполагаемый механизм регуляции, включающий уникальную пептидную вставку возле сенсорного домена I, присутствует у *Trichoplax* sp. H2, но отсутствует у *Trichoplax adhaerens*. Другое отличие – это существенная делеция размером 52 aa в петле IML, соединяющей повторы II и III в гипотетическом белке TRIADDRAFT_21513, которая может модулироваться множеством клеточных регуляторов, как кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CaM-

KII), протеинкиназы A (PKA), C (PKC) и G (PKG), протеинтирозинкиназа (ПТК), фосфолипаза C (PLC), полиненасыщенные жирные кислоты и другие макромолекулы [40]. Упомянутые структурные отличия в управлении потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами Т-типа могут быть причиной разного поведения штаммов трихоплакса H1 и H2 в электрических полях [41].

Интересно, что С-концевой фрагмент длиной 298 aa представляет неупорядоченный клубок, локализованный в цитоплазме, что может говорить о его участии в формировании надмолекулярного комплекса, так как, например, известно, что многие рибосомальные белки поодиночке образуют хаотические клубки, но структурируются при сборке в рибосому [42]. Данное наблюдение в меньшей степени относится и к IML-внутренней соединительной аминокислотной петле (рис. 5, табл. 8).

Наиболее изученным оказался AID-мотив длиной 181 aa в белке TRIADDRAFT_21513 и длиной 247 aa в белках AIJ29365.1 и RDD42051.1 (рис. 5, табл. 8). Схожие AID-фрагменты, включающие часть сенсора II, с низкой гомологией были обнаружены в 25 видах костистых рыб для белка TRIADDRAFT_21513 (табл. 5), а также в 41 виде костистых рыб и в 4 видах змей для белков AIJ29365.1 и RDD42051.1 (табл. 6). Минимальное расхождение в последовательностях AID-зонда TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens* и AID-фрагмента XM_019071747.1 из *Cyprinus carpio*

при счете 62.8 и ожидании $4e^{-08}$ составило 32/71, т.е. 45% гомологии (рис. 8). Интересно, что возле AID-мотива костистых рыб, как и возле AID трихопакса в составе сенсора II, находится консервативный сайт IENHNQP, в то время как возле AID у змей располагается последовательность IENNEQP, отличающаяся заменой нейтрально заряженного остатка аспарагина на отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты. Особо следует отметить, что короткий IENNEQP-фрагмент был также найден в Ca_v3 -каналах крысы и человека. Полученные данные могут указывать не только на дивергенцию низкопороговых кальциевых каналов Т-типа между рыбами и пресмыкающимися, но и на возможное изменение чувствительности Ca_v -каналов, а следовательно, и на реорганизацию их функции с выходом жизни на сушу.

Возможно, в отличие от трихопакса, у млекопитающих зависящие от напряжения кальциевые каналы Т-типа представляют большие белковые комплексы, которые формируются за счет гидрофобных взаимодействий [43], где, например, линкер IS6–AID связывается с регуляторной β -субъединицей (PDB код 1T3L), что вызывает структурные перестройки, приводящие к изменению проницаемости канала для ионов кальция [44]. Исследования Ca_v -каналов с высоким разрешением привели как к пониманию тонкой структуры поры канала (6KZO) [45], так и указывают на наличие множественных регуляторных сайтов с внутренней и внешней сторон клеточной мембраны (6BYO) [46]. Так, в комплексе с основной $\alpha 1a$ -субъединицей кролика были охарактеризованы как цитоплазматическая β -субъединица, так и массивная внешняя $\alpha 2\delta$ -субъединица, а также трансмембранная γ -субъединица (5GJW) [47].

Обнаружение вставок и делеций, граничащих с сайтами сплайсирования РНК, во всех трех изучаемых белках с короткими интронами у трихопакса (табл. 1) позволяет по-новому взглянуть на возможную эволюцию кальциевых каналов с позиций функциональных вставок и модуляризации белков на основе механизма, отдаленно напоминающего альтернативный сплайсинг, обнаруженный в иммунной [48] и нервной [49] системах у организмов с высоким содержанием интронов. Просто устроенные Ca_v3 -каналы трихопакса дают возможность связать воедино функцию со структурой и определить отправную точку в усложнении и диверсификации кальциевых каналов вплоть до высокоорганизованных животных и человека. Дальнейшее усовершенствование методов реконструкции отдельных

белков, их высокомолекулярных комплексов и сети взаимодействия [50–52] позволяет надеяться на конечное понимание роли сопряжения сенсоров и актуаторов в живой клетке, а также механизмов взаимодействия отдельных клеток в многоклеточном организме.

ВЫВОДЫ

1. С помощью набора методов биоинформатики идентифицированы гомолог потенциалчувствительного кальциевого канала TCa_v3 RDD42051.1 длиной 2090 аа в геноме *Trichoplax* sp. H2 и неполный белок XP_002109544.1 длиной 1510 аа в скаффолде *Trichoplax adhaerens*.
2. Для обоих белков найден EEDD селективный фильтр и реконструирован кор кальциевого канала, состоящий из 24 трансмембранных α -спиралей. Исследуемые белки отличаются цитоплазматическими доменами, что свидетельствует об их различной специализации при проведении сигнала.
3. На основании анализа первичных транскриптов предполагается модульный механизм эволюции Ca_v3 -каналов, выполняющих разнообразные регуляторные функции, путем вставок и соединения белковых доменов за счет сплайсинга РНК.
4. На примере белков AIJ29365.1, RDD42051.1 и XP_002109544.1, последний из которых аннотирован впервые, продемонстрирована модульная архитектура кальциевых каналов и охарактеризованы функции некоторых доменов. Проведен анализ линкера IIS2–S3 белка XP_002109544.1, и описаны аминокислотные замены.
5. Изучение структуры сенсорного домена показало, что петля IENHNQP с двумя положительно заряженными гистидинами H551 и H552, соединяющая сегменты IIS1 и IIS2, может электростатически взаимодействовать с потенциалчувствительным сегментом IIS4, несущим положительно заряженные аминокислотные остатки. Следовательно, изменение заряда петли IENHNQP в результате замены нейтрального Asn553 на положительный Glu влияет на взаимодействие линкера IIS1–S2 с подвижным сегментом IIS4.
6. Возле AID-мотива костистых рыб, как и возле AID трихопакса в составе сенсора II, находится консервативный сайт IENHNQP, в то время как возле AID у змей располагается последовательность IENNEQP, отличающаяся заменой нейтрально заряженного остатка Asn на отрицательно заряженный остаток Glu. Это обстоятельство свидетельствует о дивергенции низкопороговых кальциевых каналов Т-типа между рыбами и пресмыкающимися при выходе жизни на сушу.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Л.В. Пузаковой и М.В. Пузакову за любезное прочтение рукописи, а также за ценные советы и замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации по Постановлению № 220 (договор № 14.W03.31.0015 от 28.02.2017).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schulze F. E. *Trichoplax adhaerens*, nov. gen., nov. spec. *Zool. Anzeiger*, **6**, 92–97 (1883).
- Schulze F. E. Über *Trichoplax adhaerens*. *Physik Abh. Kgl. Akad. Wiss. (Berlin)*, **1**, 1–23 (1891).
- Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N. H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamon A., Carpenter M. L., Signorovitch A. Y., Moreno M. A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I. V., Buss L. W., Schierwater B., Dellaporta S. L., and Rokhsar D. S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, **454** (7207), 955–960 (2008). DOI: 10.1038/nature07191
- Dellaporta S. L., Xu A., Sagasser S., Jakob W., Moreno M. A., Buss L. W., and Schierwater B. Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports placozoa as the basal lower metazoan phylum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** (23), 8751–8756 (2006). DOI: 10.1073/pnas.0602076103
- Signorovitch A. Y., Buss L. W., and Dellaporta S. L. Comparative genomics of large mitochondria in placozoans. *PLoS Genet.*, **3** (1), e13 (2007). DOI: 10.1371/journal.pgen.0030013
- Senatore A., Raiss H., and Le P. Physiology and Evolution of Voltage-Gated Calcium Channels in Early Diverging Animal Phyla: Cnidaria, Placozoa, Porifera and Ctenophora. *Front. Physiol.*, **7**, 481 (2016). DOI: 10.3389/fphys.2016.00481
- Ertel E. A., Campbell K. P., Harpold M. M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R. W., and Catterall W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **25** (3), 533–535 (2000). DOI: 10.1016/s0896-6273(00)81057-0
- Rang H. P., Ritter J. M., Flower R. J., and Henderson G. *Rang & Dale's Pharmacology*, 8th Edition (Churchill Livingstone, 2014).
- Smith C. L., Abdallah S., Wong Y. Y., Le P., Harrack-singh A. N., Artinian L., Tamvacakis A. N., Rehder V., Reese T. S., and Senatore A. Evolutionary insights into T-type Ca^{2+} channel structure, function, and ion selectivity from the *Trichoplax adhaerens* homologue. *J. Gen. Physiol.*, **149** (4), 483–510 (2017). DOI: 10.1085/jgp.201611683
- Strong M., Chandy K. G., and Gutman G. A. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol. Biol. & Evolution*, **10** (1), 221–242 (1993). DOI: 10.1093/oxford-journals.molbev.a039986
- Ishibashi K., Suzuki M., and Imai M.. Molecular Cloning of a Novel Form (Two-Repeat) Protein Related to Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270** (2), 370–376 (2000). DOI: 10.1006/bbrc.2000.2435
- Rahman T., Cai X., Brailoiu G. C., Abood M. E., Brailoiu E., and Patel S. Two-pore channels provide insight into the evolution of voltage-gated Ca^{2+} and Na^{+} channels. *Science Signaling*, **7** (352), ra109 (2014). DOI: 10.1126/scisignal.2005450
- Warnier M., Gackière F., Roudbaraki M., and Mariot P. Expression and Role of T-type Calcium Channels during Neuroendocrine Differentiation. *J. Cell Signal.*, **1** (2), 113 (2016). DOI: 10.4172/2576-1471.1000113
- Kapustin Y., Souvorov A., Tatusova T., and Lipman D. Splign: algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs. *Biol. Direct*, **3** (20), 1–13 (2008). DOI: 10.1186/1745-6150-3-20
- Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *BioTechniques*, **28**, 1102–1104 (2000). DOI: 10.2144/002861r01
- Kyte J. and Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157** (1), 105–132 (1982). DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0
- Kelley L. A. and Sternberg M. J. E. Protein structure prediction on the Web: A case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, **4** (3), 363–371 (2009). DOI: 10.1038/nprot.2009
- Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., and Ferrin T. E. UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.*, **25** (13), 1605–1612 (2004). DOI: 10.1002/jcc.20084
- Kamm K., Osigus H. J., Stadler P. F., DeSalle R., and Schierwater B. *Trichoplax* genomes reveal profound admixture and suggest stable wild populations without bisexual reproduction. *Sci Rep.*, **8** (1), 11168 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-29400-y
- Kelley L. A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N., and Sternberg M. J. The Phyre2 web portal for protein

- modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, **10** (6), 845–858 (2015). DOI: 10.1038/nprot.2015.053
21. Berrou L., Dodier Y., Raybaud A., Tousignant A., Dafi O., Pelletier J. N., and Parent L. The C-terminal Residues in the Alpha-interacting Domain (AID) Helix Anchor CaV β Subunit Interaction and Modulation of CaV2.3 Channels. *J. Biol. Chem.*, **280** (1), 494–505 (2005). DOI: 10.1074/jbc.M410859200
 22. Findeisen F., Campiglio M., Jo H., Abderemane-Ali F., Rumpf C. H., Pope L., Rossen N. D., Flucher B. E., DeGrado W. F., and Minor D. L., Jr. Stapled Voltage-Gated Calcium Channel (CaV) α -Interaction Domain (AID) Peptides Act As Selective Protein-Protein Interaction Inhibitors of CaV Function. *ACS Chem. Neurosci.*, **8** (6), 1313–1326 (2017). DOI: 10.1021/acschemneuro.6b00454
 23. Cloues R. K., Cibulsky S. M., and Sather W. A. Ion Interactions in the High-Affinity Binding Locus of a Voltage-Gated Ca $^{2+}$ Channel. *J. Gen. Physiol.*, **116** (4), 569–586 (2000). DOI: 10.1085/jgp.116.4.569
 24. Cibulsky S. M. and Sather W. A. The Eeee Locus Is the Sole High-Affinity Ca $^{2+}$ Binding Structure in the Pore of a Voltage-Gated Ca $^{2+}$ Channel: Block by Ca $^{2+}$ Entering from the Intracellular Pore Entrance. *J. Gen. Physiol.*, **116** (3), 349–362 (2000). DOI: 10.1085/jgp.116.3.349
 25. Catterall W. A. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron*, **67** (6), 915–928 (2010). DOI: 10.1016/j.neuron.2010.08.021
 26. Jensen M. O., Jogini V., Borhani D. W., Leffler A. E., Dror R. O., Shaw D. E. Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science*, **336** (6078), 229–233 (2012). DOI: 10.1126/science.1216533
 27. Tuluc P., Yarov-Yarovoy V., Benedetti B., and Flucher B. E. Molecular Interactions in the Voltage Sensor Controlling Gating Properties of CaV Calcium Channels. *Structure*, **24** (2), 261–271 (2015). DOI: 10.1016/j.str.2015.11.011
 28. *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*. Ed. by S. Brady, G. Siegel, and R. W. Albers, 8th Edition (Elsevier, 2011). 1120 pages. ISBN-10: 0125468075.
 29. Catterall W. A., Striessnig J., Snutch T. P., and Perez-Reyes E. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.*, **55** (4), 579–581 (2003). DOI: 10.1124/pr.55.4.8
 30. Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanaoka Y., and Minamino N. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, **312** (5990), 121–127 (1984). DOI: 10.1038/312121a0
 31. Akaike N., Kostyuk P. G., and Osipchuk Y. V. Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **412**, 181–195 (1989). DOI: 10.1113/jphysiol.1989.sp017610
 32. Senatore A., Reese T. S., and Smith C. L. Neuropeptidergic integration of behavior in *Trichoplax adhaerens*, an animal without synapses. *J. Exp. Biol.*, **220** (18), 3381–3390 (2017). DOI: 10.1242/jeb.162396
 33. Enyeart J. J., Mlinar B., and Enyeart J. A. T-type Ca $^{2+}$ channels are required for adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by bovine adrenal zona fasciculata cells. *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1031–1040 (1993).
 34. Loirand G., Mironneau C., Mironneau J., and Pacaud P. Two types of calcium currents in single smooth muscle cells from rat portal vein. *J. Physiol.*, **412**, 333–349 (1989). DOI: 10.1113/jphysiol.1989.sp017619
 35. Huguenard J. R. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, **58**, 329–348 (1996). DOI: 10.1146/annurev.ph.58.030196.001553
 36. Catterall W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3** (8), a003947 (2011). DOI: 10.1101/cshperspect.a003947
 37. Kiyonaka S., Wakamori M., Miki T., Uriu Y., Nonaka M., Bito H., Beedle A. M., Mori E., Hara Y., De Waard M., Kanagawa M., Itakura M., Takahashi M., Campbell K. P., and Mori Y. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle the vesicular SNARE protein synaptobrevin (syb) was dispensable for dockinganchoring to presynaptic Ca $^{2+}$ channels. *Nat. Neurosci.*, **10** (6), 691–701 (2007). DOI: 10.1038/nn1904
 38. Smith C. L., Varoqueaux F., Kittelmann M., Azzam R. N., Cooper B., Winters C. A., Eitel M., Fasshauer D., and Reese T. S. Novel cell types, neurosecretory cells, and body plan of the early-diverging metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Curr. Biol.*, **24** (14), 1565–1572 (2014). DOI: 10.1016/j.cub.2014.05.046
 39. Yim Y. Y., Zurawski Z., and Hamm H. GPCR Regulation of Secretion. *Pharmacol. Ther.*, **192**, 124–140 (2018). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.07.005
 40. Zhang Y., Jiang X., Snutch T. P., and Tao J. Modulation of low-voltage-activated T-type Ca $^{2+}$ channels. *Biochim. Biophys. Acta*, **1828** (7), 1550–1559 (2013). DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.08.032
 41. Кузнецов А. В., Кулешова О. Н., Пронозин А. Ю., Кривенко О. В. и Завьялова О. С. Действие прямоугольных электрических импульсов низкой частоты на трихоплекса (тип Placozoa). *Морской биол. журн.*, **5** (2), 50–66 (2020). DOI: 10.21072/mbj.2020.05.2.05
 42. Uversky V. N. Dancing Protein Clouds: The Strange Biology and Chaotic Physics of Intrinsically Disordered Proteins. *J. Biol. Chem.*, **291**, 6681–6688 (2016). DOI: 10.1074/jbc.R115.685859
 43. Catterall W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca $^{2+}$ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16** (16), 521–555 (2000). DOI: 10.1146/annurev.cell-bio.16.1.521
 44. Opatowsky Y., Chen C. C., Campbell K. P., and Hirsch J. A. Structural Analysis of the Voltage-Dependent Calcium Channel Beta Subunit Functional Core

- in Complex with Alpha1 Interaction Domain. *Neuron*, **42**, 387–399 (2004). DOI: 10.1016/S0896-6273(04)00250-8
45. Zhao Y., Huang G., Wu Q., Wu K., Li R., Lei J., Pan X., and Yan N. Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Cav3.1. *Nature*, **576**, 492–497 (2019). DOI: 10.1038/s41586-019-1801-3
 46. Cardozo T. J. and Martinez-Ortiz W. Residue assignment correction to the voltage gated calcium Cav1.1 rabbit alpha 1 subunit PDB entries 3JBR & 5GJV. *Cell Rep.*, **23**, 1399–1408 (2018). DOI: 10.2210/pdb6BYO/pdb
 47. Wu J. P., Yan Z., Li Z. Q., Zhou Q., and Yan N. Structure of the mammalian voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex for ClassII map. *Nature*, **537**, 191–196 (2016). DOI: 10.2210/pdb5GJW/pdb
 48. Maki R., Roeder W., Traunecker A., Sidman C., Wabl M., Raschke W., and Tonegawa S. The Role of DNA Rearrangement and Alternative RNA Processing in the Expression of Immunoglobulin Delta Genes. *Cell*, 1981 **24** (2), 353–365. DOI: 10.1016/0092-8674(81)90325-1
 49. Schmucker D., Clemens J. C., Shu Huidy, Worby C. A., Xiao Jian, Muda M., Dixon J.E., and Zipursky S. L. Drosophila Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell*, **101** (6), 671–684 (2000). DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80878-8
 50. Leman J. K., Ulmschneider M. B., and Gray J. J. Computational modeling of membrane proteins. *Proteins*, **83** (1), 1–24 (2015). DOI: 10.1002/prot.24703
 51. Martinez-Ortiz W., and Cardozo T. J. An Improved Method for Modeling Voltage-Gated Ion Channels at Atomic Accuracy Applied to Human Cav Channels. *Cell Rep.*, **23** (5), 1399–1408 (2018). DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.02452
 52. Seb  -Pedr  s A., Chomsky E., Pang K., Lara-Astiaso D., Gaiti F., Mukamel Z., Amit .I, Hejnol A., Degnan B. M., and Tanay A. Early metazoan cell type diversity and the evolution of multicellular gene regulation. *Nat. Ecol. Evol.*, **2** (7), 1176–1188 (2018). DOI: 10.1038/s41559-018-0575-6

Annotation of a New Low Voltage Activated Calcium Channel of *Trichoplax adhaerens* (Phylum Placozoa)

A.V. Kuznetsov*, ** and L.E. Kartashov***

*Federal Research Center “A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas”, Russian Academy of Sciences, prosp. Nakhimova 2, Sevastopol, 299011 Russia

**Institute of Radio-electronics and Information Security, Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

***Department of Instrumental Systems and Automation of Technological Processes, Sevastopol State University, ul. Gogolya 12-14, Sevastopol, 299007 Russia

Studying the voltage-gated calcium channels sheds light on the formation of systems responsible for the coupling of sensors and actuators in a living cell. A homologue of 2090 aa length in the *Trichoplax* sp. H2 scaffold and an incomplete protein of 1510 aa length in the *Trichoplax adhaerens* scaffold were identified on the basis of the data on the voltage-gated calcium channel TCa_v3 (2063 aa) from the *Trichoplax adhaerens* cells. The incomplete hypothetical protein is annotated as Ca_v3-channel. An EEDD selective filter was found for all 3 proteins and the calcium channel core structure consisting of 24 trans-membrane α -helices was reconstructed. However, the studied proteins demonstrated significant variations in their cytoplasmic domains that indicates the different specialization of Ca_v3-channels in the signal transduction. So part of the AID motive (alpha-interacting domain) and the adjacent potential sensor from the annotated channel have homologies in 25 species of bony fish, and the corresponding region from both other channels in 41 species of bony fish and in 4 species of bony fish was found. Significantly, a highly conserved IIS1-S2 loop with the IEHNNQP sequence was identified lower from the AID motif of bony fish, like in *Trichoplax*, while the homologous IEHHEQP sequence was revealed in snakes, which differs in the negative residue of glutamic acid that is also present in the corresponding proteins of the rat and human. A modular mechanism for the evolution of Ca_v3-channels by insertions and merging of protein domains that perform various regulatory functions is suggested based on the analysis of primary transcripts and mature proteins.

Keywords: *trichoplax*, Ca_v3-channels, domains, insertions, modular evolution

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ КАЗОКСИНА С

© 2024 г. Н.А. Ахмедов*,[#], Л.Н. Агаева*, Р.М. Аббаслы*, Л.И. Исмаилова*

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

[#]E-mail: Namiq.49@bk.ru

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 05.07.2022 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекулы казоксина С (Tyr1-Ile2-Pro3-Ile4-Gln5-Tyr6-Val7-Leu8-Ser9-Arg10-OH). Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации молекулы казоксина С, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в состав молекулы, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура молекулы казоксина С представляется конформациями 8 шейпов пептидного скелета. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул казоксина.

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

DOI: 10.31857/S0006302924010051, EDN: RGZNER

Регуляторные пептиды, впервые обнаружены 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, объединяющих три регуляторные системы организма — нервную, эндокринную и иммунную в единое целое. В настоящее время у разных видов животных и у человека охарактеризовано уже более 9000 физиологически активных пептидов. Это короткие цепочки аминокислот (2–70 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. Эти пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пепти-

дов, получаемых с пищей, обладают опиоподобными 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. Обнаружен ряд молочных экзорфинов, имеющих свойства антагонистов опиоидных рецепторов. К ним относятся казоксины А, В, С, человеческий казоксин D, а также лактоферроксины А, В и С. Возможность образования этих пептидов при гидролизе соответствующих белков пептидазами желудочно-кишечного тракта доказана *in vitro*.

Казоксины и казоморфины представляют собой пептиды, которые воздействуют на опиоидную систему, которая влияет на темп пищеварения. Казоморфины являются опиоидными агонистами (активаторами), а казоксины — опиоидными антагонистами. Казеин обладает высоким содержанием казоксина и казоморфинов, что объясняет сниженную пропускную способность после потребления (поскольку активация опиоидной системы снижает моторику кишечника). Физиологическое действие антагонистических экзорфинов до сих пор изучено очень слабо. Некоторые молочные экзорфины (казоморфины, казоксины, лактоферроксины) могут не только

образовываться при переваривании молока в желудочно-кишечном тракте, но и содержаться в сырах, поскольку технология изготовления сыра связана с ферментативной обработкой [1–3].

Мы исследовали структурно-функциональную организацию опиоидных пептидов энкефалинов, эндорфинов, эндоморфинов, динарфинов, неоэндорфинов, адренорфина, в настоящее время исследуется пространственная структура экзорфинов. Эта работа является продолжением наших предыдущих исследований [4–12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда–Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывали в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы казоксина С 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, 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 $\phi - \psi$: $R(\phi, \psi = -180... 0^\circ)$, $B(\phi = -180... 0^\circ, \psi = 0-180^\circ)$, $L(\phi, \psi = 0-180^\circ)$ и $P(\phi = 0-180^\circ, \psi = -180... 0^\circ)$; $ij... = 11..., 12..., 13..., 21...$ определяет положение боковой цепи ($\chi_1, \chi_2...$), причем индекс 1 соответствует значению угла в пределах от 0 до 120° , индекс 2 – от 120 до -120° и индекс 3 – от -120 до 0° . Обозначения и отсчеты двугранных углов враще-

ния соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная структура декапептидной молекулы казоксина С исследована фрагментарно. На первом этапе на основе низкоэнергетических конформаций соответствующих аминокислотных остатков рассчитаны конформационные возможности трех тетрапептидных фрагментов Tyr1–Ile2–Pro3–Ile4, Ile4–Gln5–Tyr6–Val7 и Val7–Leu8–Ser9–Arg10. На втором этапе на основе низкоэнергетических структур тетрапептидных фрагментов Tyr1–Ile4 и Ile4–Val7 изучена пространственная структура гептапептидного участка Tyr1–Ile2–Pro3–Ile4–Gln5–Tyr6–Val7. На третьем этапе на основе оптимальных конформаций N-концевого гептапептидного фрагмента Tyr1–Val7 и C-концевого тетрапептидного фрагмента Val7–Arg10 исследована пространственная структура всей декапептидной молекулы казоксина С.

Расчет конформационных возможностей N-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr1–Ile2–Pro3–Ile4 выполнен на основе низкоэнергетических конформаций аминокислотных остатков метиламидов N-ацетил–L-тирозина, N-ацетил–L-изолейцина и N-ацетил–L-пролина. Известно, что R-форма основной цепи аминокислотного остатка, стоящего перед Pro, является высокоэнергетической. Поэтому при расчете R-форма основной цепи Ile2 не выбиралась, пришлось рассчитывать конформации всего 4 шейпов пептидного скелета. Энергетическое распределение рассчитанных конформаций N-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr1–Ile2–Pro3–Ile4 казоксина С показано в табл. 1. Результаты расчета показывают, что в энергетический интервал 0–20 кДж/моль попадают конформации 4 шейпов. Шейп eef представлен 43 конформациями, шейп eef – 33 конформациями, шейп fee – 10 конформациями, шейп fef представлен всего 8 конформациями (табл. 1). Поэтому для расчета трехмерной структуры молекулы казоксина С выбраны конформации 4 шейпов N-концевого тетрапептидного фрагмента Tyr1–Ile2–Pro3–Ile4.

Конформационные возможности тетрапептидного участка Ile4–Gln5–Tyr6–Val7 изучены на основе оптимальных конформаций монопептидов изолейцина, глутамина, тирозина и валина. Как видно, в данный тетрапептидный фрагмент входят лабильные, многоатомные аминокислотные остатки, поэтому возникает энергетическая дифференциация между шейпами пептидного скелета, между формами основной цепи и между конформациями. В энергетический интервал свыше 20 кДж/моль попадают конформации

Таблица 1. Энергетическое распределение конформаций фрагментов казоксина С

Фрагмент NTyr1–Ile2–Pro3–Ile4						
Шейп	Форма основной цепи	Интервал энергии, кДж/моль				
		0–4	4–8	8–12	12–16	16–20
eee	BBBB	5	16	7	9	6
eef	BBRR	4	6	7	8	8
fee	RBBB	1	1	—	—	8
fef	RBRR	—	—	—	3	5
Фрагмент Ile4–Gln5–Tyr6–Val7						
Шейп	Форма основной цепи	Интервал энергии, кДж/моль				
		0–4	4–8	8–12	12–16	16–20
eee	BBBB	4	2	9	23	14
eef	BBRR	—	—	—	—	2
efe	BRBB	1	2	7	4	2
eff	BRRR	—	—	2	3	4
fff	RRRR	—	—	—	—	—
ffe	RRBB	—	1	3	6	6
fef	RBRR	—	—	—	—	—
fee	RBBB	—	—	2	2	6
Фрагмент -Val7–Leu8–Ser9–Arg10–OH						
Шейп	Форма основной цепи	Интервал энергии, кДж/моль				
		0–4	4–8	8–12	12–16	16–20
eee	BBBB	—	—	2	2	3
eef	BBRR	—	—	—	—	—
efe	BRBB	2	1	1	1	—
eff	BRRR	—	—	—	—	—
fff	RRRR	—	—	—	—	—
ffe	RRBB	2	4	3	6	5
fef	RBRR	—	—	—	—	—
fee	RBBB	—	—	—	—	—

6 шейпов пептидного скелета. Конформации свернутого шейпа fff и полусвернутого шейпа fef являются высокоэнергетическими. В энергетический интервал 0–20 кДж/моль попадают 52 конформации развернутого шейпа eee, 16 конформаций шейпа efe, 9 конформаций шейпа eff, 16 конформаций шейпа ffe и 10 конформаций шейпа fee (табл. 1). Для расчета пространственной структуры N-концевого гептапептидного фрагмента выбраны конформации всех 8 шейпов пептидного скелета Tyr1–Val7.

Теоретический конформационный анализ C-концевого тетрапептидного фрагмента Val7–Leu8–Ser9–Arg10–OH выполнен на основе ста-

бильных конформаций соответствующих аминокислотных остатков. Были рассчитаны конформации 8 возможных шейпов, энергетическое распределение которых показано в табл. 1. Как видно из табл. 1, возникает сильная энергетическая дифференциация между шейпами, формами основной цепи и конформациями. В энергетический интервал 0–20 кДж/моль попадают конформации 4 шейпов ffe, efe, eee и fff, но относительная энергия конформации шейпа fff больше 20 кДж/моль. Фактически низкоэнергетическими являются конформации 3 шейпов efe, ffe и eee. Для расчета трехмерной структуры молекулы казоксина С выбраны конформации 4 шейпов,

Таблица 2. Относительная энергия и энергетические вклады взаимодействий предпочтительных конформаций фрагмента Tyr1–Val7 молекулы казоксина С

№	Шейп	Конформация	Энергетический вклад, кДж/моль			$U_{\text{отн}}$, кДж/моль
			$U_{\text{нев}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$	
1	eefffe	B ₂₁₁ B ₁₂₂₂ RR ₂₂₂₂ R ₂₁₃ B ₃₁₁ B ₃₂₂	–146.6	18.1	28.6	0
2	eeffee	B ₂₁₁ B ₁₂₂₂ RR ₂₂₂₂ B ₂₁₃ B ₃₁₁ B ₃₂₂	–129.8	16.8	23.5	9.7
3	eeeefe	B ₂₁₁ B ₂₂₂₁ BB ₃₂₂₂ R ₂₁₃ B ₃₁₁ B ₃₂₂	–121.8	16.4	18.9	13.0
4	fefffe	R ₂₁₁ B ₁₂₂₂ RR ₃₂₂₂ R ₂₁₃ B ₃₁₁ B ₃₂₂	–131.0	19.7	25.6	13.4
5	eeeeee	B ₂₁₁ B ₂₂₂₂ BB ₃₂₂₂ B ₂₁₃ B ₃₁₁ B ₃₂₂	–112.1	15.5	17.6	20.6
6	eeeeff	B ₂₁₁ B ₂₂₂₂ BB ₁₂₂₂ R ₂₁₃ R ₂₁₁ R ₃₂₂	–123.9	17.2	26.0	18.5
7	eeffef	B ₂₁₁ B ₁₂₂₁ RR ₃₂₁₂ B ₂₁₃ R ₂₁₁ R ₃₂₂	–119.7	15.5	25.6	21.0

Примечание. $U_{\text{нев}}$ – невалентные, $U_{\text{эл}}$ – электростатические, $U_{\text{торс}}$ – торсионные взаимодействия.

имеющие относительную энергию меньше 20 кДж/моль.

Пространственная структура N-концевого гептапептидного фрагмента Tyr1–Ile2–Pro3–Ile4–Gln5–Tyr6–Val7 изучена на основе оптимальных конформаций тетрапептидных фрагментов Tyr1–Ile4 и Ile4–Val7, поэтому пришлось рассчитывать конформации 16 шейпов пептидного скелета. Результаты показывают, что возникает резкая энергетическая дифференциация между шейпами, формами основной цепи и конформациями. В широкий энергетический интервал 0–42 кДж/моль попадают конформации всего 7 шейпов пептидного скелета. Из каждой формы выбраны самые стабильные конформации, которые представлены в табл. 2. Здесь указаны энергетические вклады невалентных ($U_{\text{нев}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$), торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий и относительная ($U_{\text{отн}}$) энергия оптимальных конформаций гептапептидного фрагмента Tyr1–Val7. В этих конформациях невалентные взаимодействия изменяются в энергетическом интервале –146.6... –112.1 кДж/моль, электростатические взаимодействия 15.5–19.7 кДж/моль, торсионные взаимодействия 17.6–28.6 кДж/моль. Все эти оптимальные конформации выбраны в качестве начальных приближений для расчета пространственной структуры всей молекулы казоксина С.

Пространственная организация декапептидной молекулы казоксина С исследована на основе конформаций 7 низкоэнергетических шейпов

N-концевого гептапептидного фрагмента и конформаций 5 низкоэнергетических шейпов С-концевого тетрапептидного участка Val7–Arg10. Были рассчитаны несколько десятков конформаций декапептидной молекулы казоксина С. Результаты расчета показали, что возникает резкая энергетическая дифференциация между шейпами пептидного скелета, между формами основной цепи и между конформациями. В широкий энергетический интервал 0–42 кДж/моль попадают конформации 8 шейпов. От каждого шейпа выбраны самые стабильные конформации, которые представлены в табл. 3. Здесь указаны энергетические вклады невалентных ($U_{\text{нев}}$), электростатических ($U_{\text{эл}}$), торсионных ($U_{\text{торс}}$) взаимодействий и относительная ($U_{\text{отн}}$) энергия оптимальных конформаций казоксина С. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий, геометрические параметры четырех конформаций, относительная энергия которых меньше 16.8 кДж/моль представлены в табл. 4 и 5. На рис. 2 показано пространственное расположение аминокислотных остатков в этих низкоэнергетических конформациях молекулы казоксина С.

N-концевой гептапептидный участок Tyr1–Ile2–Pro3–Ile4–Gln5–Tyr6–Val7 молекулы казоксина С является конформационно жестким. Он представлен 4 шейпами (eefffe, eeffee, eeeee и eeeeff). С-концевой тетрапептидный участок Val7–Leu8–Ser9–Arg10–ОН является конформационно лабильным и представлен 4 шейпами (efe, eee, fef, fff) (табл. 3).

Таблица 3. Относительная энергия и энергетические вклады взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы казоксина С

№	Шейп	Конформация	Энергетический вклад, кДж/моль			$U_{\text{отн}}$, кДж/моль
			$U_{\text{нев}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{торс}}$	
1	eefffeefe	$B_{211}B_{1222}RR_{2222}R_{213}B_{311}B_{322}R_{213}B_{22}B_{3122}$	–201.6	24.4	34.0	0
2	eefffeeee	$B_{211}B_{1222}RR_{2222}R_{213}B_{311}B_{322}B_{1222}B_{32}B_{1222}$	–178.1	24.4	44.1	33.2
3	eefffeefe	$B_{211}B_{1222}RR_{2222}B_{213}B_{311}B_{322}R_{2122}B_{22}B_{3122}$	–196.1	24.8	30.7	2.1
4	eefffeeee	$B_{211}B_{1222}RR_{2222}B_{213}B_{311}B_{322}B_{1222}B_{32}B_{1222}$	–193.6	21.0	34.9	7.1
5	eeeeeeeee	$B_{211}B_{1222}BB_{3222}B_{213}B_{311}B_{322}B_{1222}B_{32}B_{1222}$	–176.0	18.9	30.7	16.4
6	eeeeeeefe	$B_{211}B_{1222}BB_{3222}B_{213}B_{311}B_{322}R_{1222}B_{32}B_{1222}$	–172.2	20.2	26.0	16.8
7	eeeeffef	$B_{211}B_{2222}BB_{1222}R_{213}R_{211}R_{322}B_{2122}R_{22}R_{3222}$	–198.2	25.2	31.1	1.3
8	eeeeffff	$B_{211}B_{2222}BB_{1222}R_{213}R_{211}R_{322}R_{2122}R_{12}R_{1222}$	–175.1	29.4	37.0	34.4

Примечание. $U_{\text{нев}}$ – невалентные, $U_{\text{эл}}$ – электростатические, $U_{\text{торс}}$ – торсионные взаимодействия.

Энергия невалентных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях изменяется в энергетическом интервале –201.6... –172.2 кДж/моль, электростатических взаимодействий 18.9–29.4 кДж/моль, торсионных взаимодействий 26.0–44.1 кДж/моль (табл. 3). Глобальной структурой молекулы казоксина С является конформация $B_{211}B_{1222}RR_{2222}R_{213}B_{311}B_{322}R_{213}B_{22}B_{3122}$ шейпа eefffeefe. В этой конформации трипептидный фрагмент Pro3–Ile4–Gln5 образует свернутую форму основной цепи RRR и от нее отходит N-концевой дипептидный участок Tyr1–Ile2. Другой дипептидный участок Tyr6–Val7 образует развернутую форму основной цепи В–В, при этом Leu8 находится в R-форме основной цепи и поворачивает C-концевой дипептидный участок Ser9–Arg10 к N-концу молекулы (рис. 2а). В этой конформации возникают эффективные дисперсионные притяжения между атомами, как видно из табл. 3, вклад невалентных взаимодействий наибольший: –201.6 кДж/моль. Здесь возникает водородная связь между атомами С=О основной цепи Ile2 и атомами N–H основной цепи Tyr6. Также возникает водородная связь между атомами С=О основной цепи Leu8 и атомами N–H боковой цепи Arg10. Первый остаток тирозин эффективно взаимодействует с дипептидными участками Ile2–Pro3 и Tyr6–Val7, вклад которых в общую энергию составляет соответственно –31.1 и –20.2 кДж/моль; Ile2 эффективно взаимодействует с дипептидным участком Pro3–Ile4 и Tyr6,

вклад которых составляет соответственно –23.1 и –16.8 кДж/моль. Далее Pro3 эффективно взаимодействует с тетрапептидным участком Ile4–Val7, вклад которых составляет –18.5 кДж/моль, Gln5 с Tyr6, вклад которых –16.8 кДж/моль, Val7 с трипептидным участком Leu8–Arg10, вклад которых составляет –21.8 кДж/моль, Leu8 с дипептидным участком Ser9–Arg10, вклад которых составляет –18.5 кДж/моль (табл. 4).

Конформация

$B_{211}B_{1222}RR_{2222}B_{213}B_{311}B_{322}R_{2122}B_{22}B_{3122}$ шейпа eefffeefe имеет относительную энергию 2.1 кДж/моль. Она отличается от глобальной конформации только формой основной цепи Gln5. В глобальной конформации три аминокислотных остатка Pro3–Ile4–Gln5 имеют свернутую форму основной цепи, а здесь 2 аминокислотных остатка Pro3–Ile4 имеют свернутую (R–R)-форму основной цепи. Поэтому вклады межостаточных взаимодействий между аминокислотными остатками остаются почти такими же, как в глобальной конформации (табл. 4, рис. 2б).

Конформация

$B_{211}B_{1222}BB_{3222}B_{213}B_{311}B_{322}B_{1222}B_{32}B_{1222}$ полностью развернутого шейпа eeeeeeee пептидного скелета имеет относительную энергию 16.4 кДж/моль. Эта конформация по вкладам невалентных взаимодействий на 25.6 кДж/моль проигрывает глобальной конформации, а по электростатическим взаимодействиям – на

Таблица 4. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий в шейпах молекулы казоксина С

Tyr1	Ile2	Pro3	Ile4	Gln5	Tyr6	Val7	Leu8	Ser9	Arg10	
15.1	−18.5	−12.6	−0.4	0.8	−14.3	−5.9	−2.9	−0.4	4.2	Tyr1
14.3	−20.6	−10.9	−0.8	−5.9	−10.9	−7.1	−0.4	−0.4	4.6	
11.3	−18.9	−16.4	−3.4	0	−2.1	0	0	0	2.9	
11.3	−18.1	−16.8	−2.5	0	−0.2	−4.6	−5.9	0	−0.4	
	3.8	−12.6	−10.5	0.8	−16.8	−0.4	0	0	−0.4	Ile2
	3.4	−13.0	−9.7	−5.9	−0.4	0	0	0	−0.8	
	5.9	−16.4	−16.4	0	−1.7	0	0	0	−0.4	
	5.0	−16.4	−14.7	0	0	−1.7	0	0	0	
		1.3	−6.3	−4.2	−4.2	−3.8	0	0	−0.4	Pro3
		1.3	−5.5	−5.5	−5.5	0	0	0	0.4	
		1.3	−1.7	−0.8	−0.4	0	0	0	0.4	
		1.3	−3.4	−0.8	0	−0.8	−3.8	0	−0.4	
			3.4	−5.0	−2.9	−0.8	0	0	−0.4	Ile4
			3.4	−4.6	−6.7	0	0	0	−0.4	
			3.8	−5.9	−16.8	0	0	0	−0.4	
			2.5	−5.5	−10.9	−2.1	−12.2	−0.4	0.4	
				−1.7	−16.8	−0.2	0	0	−0.4	Gln5
				−1.3	−12.2	−4.6	0	0	−0.4	
				−1.7	−8.0	−3.8	0	0	−1.3	
				−0.4	1.3	−4.2	−6.3	−5.5	0.4	
					3.8	−7.6	−0.8	0	−0.4	Tyr6
					3.8	−7.6	−0.8	0	−0.4	
					−17.6	−8.0	−2.9	0	−4.2	
					4.6	−13.4	−3.8	0.4	0	
						3.4	−5.0	−3.8	−13.0	Val7
						3.4	−5.5	−4.2	−14.7	
						4.2	−8.8	−0.8	−1.3	
						8.4	−2.5	−1.7	−0.4	
							−5.0	−6.3	−12.2	Leu8
							−5.2	−6.3	−25.2	
							0.8	−9.7	−12.6	
							−5.0	−6.7	12.6	
								4.2	−9.7	Ser9
								3.8	−9.7	
								4.6	−8.0	
								4.2	−10.5	
									−9.7	Arg10
									−9.7	
									−12.6	
									−12.6	

Примечание. Энергия взаимодействий дана в кДж/моль; 1-я строка – шейп eefffeefe ($U_{\text{отн}} = 0$ кДж/моль), 2-я строка – шейп eeffeeefe ($U_{\text{отн}} = 2.1$ кДж/моль), 3-я строка – шейп eeeeeeeeee ($U_{\text{отн}} = 16.4$ кДж/моль), 4-я строка – шейп eeeefffef ($U_{\text{отн}} = 1.3$ кДж/моль).

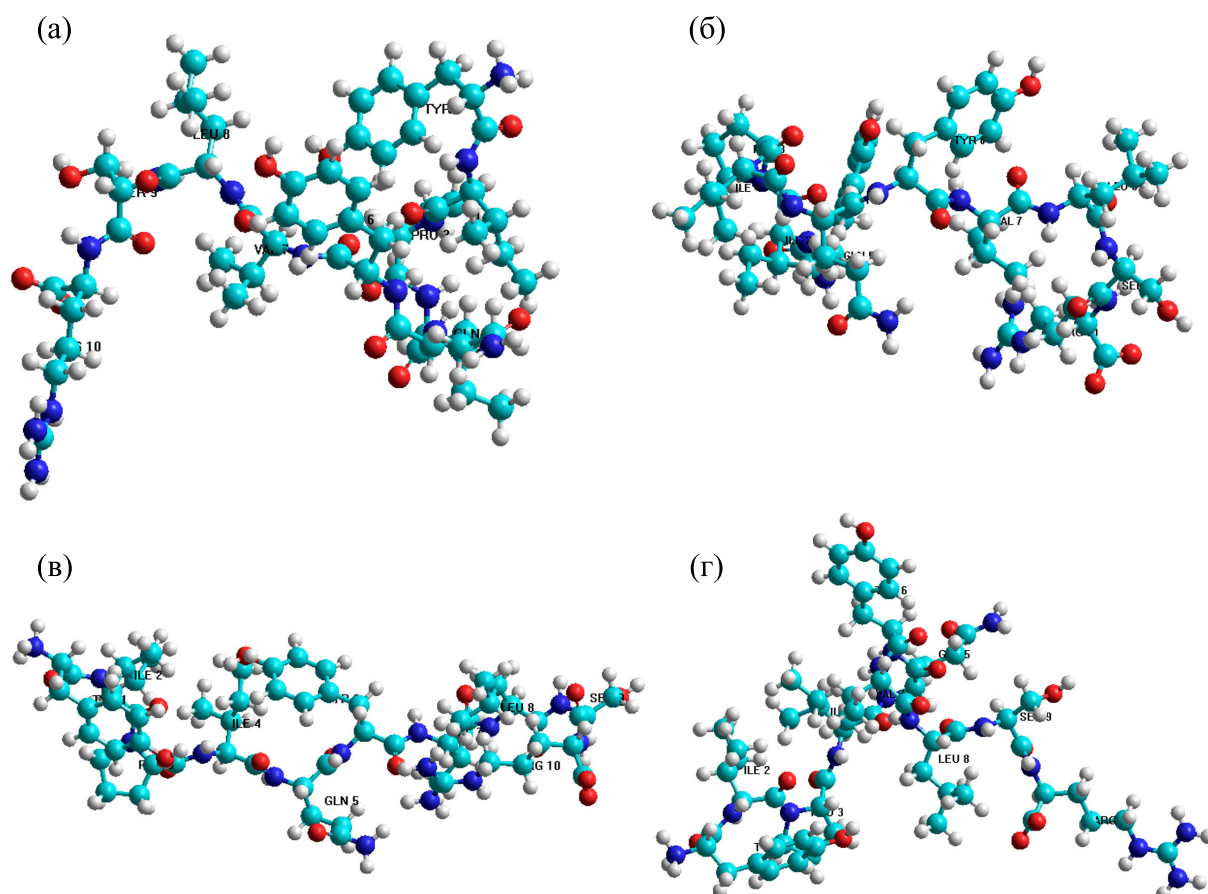


Рис. 1. Пространственное расположение аминокислотных остатков в низкоэнергетических конформациях: (а) — $B_{211}B_{1222}RR_{2222}R_{213}B_{311}B_{322}R_{213}B_{22}B_{3122}$, 0 кДж/моль; (б) — $B_{211}B_{1222}RR_{2222}B_{213}B_{311}B_{322}R_{2122}B_{22}B_{3122}$, 2.1 кДж/моль; (в) — $B_{211}B_{1222}BB_{3222}B_{213}B_{311}B_{322}B_{1222}B_{32}B_{1222}$, 16.4 кДж/моль; (г) — $B_{211}B_{1222}BB_{1222}R_{213}R_{211}R_{322}B_{2122}R_{22}R_{3222}$, 1.3 кДж/моль.

23.1 кДж/моль выгоднее, чем в глобальной конформации. Вообще, эта конформация является самой выгодной по электростатическим взаимодействиям (табл. 3). Она в основном стабилизируется за счет ди- и трипептидных взаимодействий между аминокислотными остатками (табл. 4). Tyr1 эффективно взаимодействует с дипептидным фрагментом Ile2–Pro3, вклад которых составляет –35.3 кДж/моль, Ile2 с дипептидным фрагментом Pro3–Ile4, вклад которых составляет –32.8 кДж/моль, Ile4 с дипептидным участком Gln5–Tyr6, вклад которых составляет –22.7 кДж/моль, Leu8 с дипептидным участком Ser9–Arg10–ОН, вклад которых составляет –26.5 кДж/моль (табл. 4, рис. 2в).

Относительная энергия конформации $B_{211}B_{2222}BB_{1222}R_{213}R_{211}R_{322}B_{2122}R_{22}R_{3222}B_{211}$ шейпа eeeeeffef пептидного скелета всего на 1.3 кДж/моль выше, чем у глобальной. В этой конформации N-концевой тетрапептидный фрагмент Tyr1–Ile2–Pro–Ile4 образует развернутую форму основной цепи BBBB, потом трипеп-

тидный фрагмент Gln5–Tyr6–Val7 образует свернутую форму основной цепи RRR и сворачивает пептидную цепь, Leu8 находится в В-форме основной цепи и удаляет от предыдущих остатков С-концевого дипептидного участка Ser9–Arg10–ОН, который образует свернутую (R–R)-форму основной цепи (табл. 3, рис. 2г). В этой конформации образуется водородная связь между атомами C=O основной цепи Ile4 и (N–H)-атомами основной цепи Leu8.

Tyr1 эффективно взаимодействует с дипептидом Ile2–Pro3, вклад которых составляет –34.9 кДж/моль, вклад взаимодействия Pro3 с дипептидным участком составляет –31.1 кДж/моль, Ile4 эффективно взаимодействует с тетрапептидным участком Gln5–Tyr6–Val7–Leu8, вклад которых составляет –34.9 кДж/моль, Gln5 с трипептидным участком Val7–Leu8–Ser9, вклад которых составляет –16.0 кДж/моль, Tyr6 с дипептидом Val7–Leu8, вклад которого –17.2 кДж/моль, Leu8 с дипептидом Ser9–Arg10, вклад которого равен –19.3 кДж/моль (табл. 4).

Таблица 5. Геометрические параметры (в градусах) оптимальных конформаций шейпов eefffeefe, eeffeeefe, eeeeeeeeee, eeeefffef молекулы казоксина С

Остаток	Шейпы			
	eefffeefe	eeffeeefe	eeeeeeeee	eeefffef
Tyr1	–93 139 170 167 82 0	–91 149 175 172 81 0	–81 154 174 173 83 0	–82 149 174 172 82 0
Ile2	–136 137 180 46 –177 165 –175	–127 141 –176 49 –177 164 –174	–136 119 173 179 –176 –175 –179	–139 120 171 178 –175 –175 –179
Pro3	–60 –49 –167	–60 –48 –166	–60 111 175	–60 111 177
Ile4	–63 –40 –176 –165 –172 174 –172	–60 –42 180 –167 –172 174 –172	–138 152 178 –60 –176 174 –172	–139 157 –175 58 –174 173 –172
Gln5	–89 –54 –175 180 63 –102	–98 137 –177 –179 61 –101	–97 116 180 –179 63 –112	–59 –39 –171 –176 65 –197
Tyr6	–108 144 –179 –53 96 0	–111 145 –178 –60 86 0	–109 151 –178 –56 92 0	–59 –56 –174 –177 90 0
Val7	–133 152 –179 –61 179 –178	–136 154 –179 –62 179 –177	–126 145 180 –57 –179 –178	–80 –40 176 –54 –179 –177
Leu8	–103 –58 179 176 61 180 177	–103 –58 179 176 61 180 177	–165 170 175 68 162 –168 179	–112 121 178 177 64 179 173
Ser9	–103 142 178 –179 180	–103 142 178 –179 180	–83 117 –178 –59 180	–88 –53 179 –179 –179
Arg10	–108 121 – –77 79 171 –177	–108 121 – –77 79 171 –176	–162 161 – 52 180 175 –179	–137 –61 – –60 –177 180 180
ΔU	0 кДж/моль	2.1 кДж/моль	16.4 кДж/моль	1.3 кДж/моль

Как видно из аминокислотной последовательности молекулы казоксина С, в нее входят аминокислоты с многоатомными, лабильными, неполярными, полярными, заряженными боковыми цепями, поэтому стерически реализуется только некоторые конформации, возникает энергетическая дифференциация между конформациями, формами основной цепи и шейпами пептидного скелета.

ВЫВОДЫ

Показано, что пространственную структуру молекулы казоксина С можно представить восемью структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет именно в этих структурах. На основе полученных трехмерных структур можно предположить для данной молекулы ее синтетические аналоги и исследовать конформационные возможности боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в молекулу. Теоретический конформационный анализ декапептидной молекулы казоксина С привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию молекулой целого ряда функций, требу-

ющих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чеснокова Е. А., Сарычева Н. Ю., Дубынин В. А. и Каменский А. А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей, и их влияние на нервную систему. *Успехи физиол. наук*, **46** (1), 22–46 (2015).
2. Соколов О. Ю., Кост Н. В., Андреева О. О., Корнеева Е. В., Мешавкин В. К., Тараканова Ю. Н., Дадаян А. К., Золотарев Ю. А., Грачев С. А., Михеева И. Г. и Зозуля А. А. Возможная роль казоморфинов в патогенезе аутизма. *Психиатрия*, **45** (3), 29–35 (2010).

3. Sienkiewicz-Szlapka E., Jarmolowska B., Krawczuk S., Kostyara E., Kostyra H., and Iwan M. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *Int. Dairy J.* **19** (4), 258–263 (2009).
4. Ахмедов Н. А. Теоретический конформационный анализ молекул бета-казоморфина, валмуцептина и морфицептина. *Молекуляр. биология*, **23** (1), 240–248 (1989).
5. Ахмедов Н. А., Годжаев Н. М., Сулейманова Е. В. и Попов Е. М. Структурная организация молекул Мет-энкефалина и эндорфинов. *Биоорг. химия*, **16** (5), 649–667 (1990).
6. Akhmedov N. A., Ismailova L. I., Abbasli R. M., Agayeva L. N., and Akhmedova S. R. Spatial structure of Octarphin Molecule. *IOSR J. Appl. Phys.*, **8**, 66–70 (2016).
7. Akhmedov N. A., Abbasli R. M., Agayeva L. N., and Ismailova L. I. Three-dimensional structure of exorpin B5 molecule. In: *Conf. proc. "Modern Trends In Physics"* (2019), V. II, pp. 201–204.
8. Akhmedov N. A., Agayeva L. N., Akverdieva G. A., Abbasli R. M., and Ismailova L. I. Spatial structure of the ACTH-(6-9)-PGP molecule. *J. Chem. Soc. Pak.*, **43** (5), 500–504 (2021).
9. Akhmedov N. A., Agayeva L. N., Akhmedova S. R., Abbasli R. M., and Ismailova L. I. Spatial structure of the β -Casomorphin-7 Molecule. *IOSR J. Appl. Phys.*, **13** (5), 62–67 (2021). DOI: 10.9790/4861-1305026267
10. Агаева Л. Н., Абдинова А. А., Ахмедова С. Р. и Ахмедов Н. А. *Биофизика*, **66** (4), 629–633 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921040013
11. Akhmedov N. A., Agayeva L. N., Gadjieva Sh. N., Abbasli R. M., and Ismailova L. I. Spatial structure of exorpin A4 and A5 molecules. *Rus. J. Biol. Phys. Chem.*, **4** (1), 63–67 (2019).
12. Ismailova L. I., Abbasli R. M., and Akhmedov N. A. Computer Modeling of the Spatial Structure of Nonapeptide Molecule. In: *Proc. 7th Int. Conf. on Control and Optimization with Industrial Applications (COIA-2020)* (Baku, Azerbaijan, 2020), v. 1, pp. 218–221.
13. *IUPAC-IUB. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry* (Blackwell Scientific, Oxford, 1993).

Spatial Structure of the Casoxin C Molecule

N.A. Akhmedov*, L.N. Agaeva*, R.M. Abbasli*, and L.I. Ismailova*

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

A theoretical conformational analysis was performed to study the conformational possibilities for the casoxin C molecule (Tyr1-Ile2-Pro3-Ile4-Gln5-Tyr6-Val7-Leu8-Ser9-Arg10-OH). The potential function of the system is chosen as a sum of non-valence, electrostatic and torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. The low-energy conformations of the casoxin C molecule were found, the values of dihedral angles of the main and side chains of the amino acid residues that make up the molecule were determined, and the energy of intra- and interresidual interactions was estimated. It has been shown that the spatial structure of the casoxin C molecule is represented by conformations of eight shapes of the peptide skeleton. The results obtained can be used to elucidate the structural and structural-functional organization of casoxin molecules.

Keywords: exorpin, casoxin, opioid, structure, conformation

УДК 577.3

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ КАЛОРИМЕТРИЯ ПИЩЕВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО БЕЛКА В СМЕСИ С ГЛИЦЕРИНОМ

© 2024 г. А.М. Лукин*, М.М. Дотлов*, Н.В. Поздняков*, **, С.В. Шилов*, Р.Х. Садреева***, Д.С. Белоклоков***, А.А. Залятдинов***, В.В. Кононенко*, Е.А. Согорин*.*

*Институт биологического приборостроения Российской академии наук обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», ул. Институтская, 5, Пушкино, Московская обл., 142290, Россия

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

***Альметьевский государственный нефтяной институт, ул. Ленина, 2, Альметьевск, Республика Татарстан, 423462, Россия

#E-mail: evgenysogorin@gmail.com

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 17.11.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Изоляты растительных белков – распространенные пищевые ингредиенты. Дифференциальная сканирующая калориметрия изолятов используется для предсказания их функциональных свойств, в том числе для оценки способности образовывать биопластик благодаря формированию межмолекулярных дисульфидных, гидрофобных и других типов связей при нагревании. В данной работе мы использовали дифференциальную сканирующую калориметрию суспензии изолята белка сои в глицерине. Было показано, что процесс нагревания изолята в присутствии глицерина идет с выделением тепла. Предварительная тепловая денатурация водного раствора белков сои (95°C, 30 мин) увеличивала тепловой эффект, в то время как ферментативный гидролиз белка приводил к потере экзотермического теплового эффекта. Добавление β-меркаптоэтанола к изоляту белков сои никак не влияло на наблюдаемый экзотермический процесс, что свидетельствует об отсутствии вклада формирования новых дисульфидных связей в данном случае. Таким образом, образование биопластика изолятом белков сои не зависит от формирования новых дисульфидных связей, а использование метода дифференциальной сканирующей калориметрии можно рассматривать как метод оценки растворимости препарата белка.

Ключевые слова: дифференциальная сканирующая калориметрия, изолят белка сои, лизоцим, экзотермический процесс, экзотермический процесс, глицерин.

DOI: 10.31857/S0006302924010069, EDN: REXVFM

Изоляты пищевых белков активно используются как ингредиенты продуктов питания с высокой пищевой ценностью. Кроме пищевой ценности изоляты обладают такими свойствами, как пенообразование, эмульсификация, гелеобразование и прочее, что влияет на технологический процесс производства продуктов питания с использованием изолятов. Эти свойства определяются главным образом растворимостью белка, а также внутри- и межмолекулярными взаимодействиями белков изолята. Особенности структуры белков определяют характер этих

взаимодействий. Таким образом, технологические свойства белоксодержащего ингредиента могут определяться особенностями структуры входящих в его состав белков, свойства которых, в свою очередь, могут меняться условиями его получения: температурой (например, в разных типах сушки [1]), воздействием химических веществ и др.

Изолят белков сои (ИБС) – один из самых распространенных белковых ингредиентов в пищевой промышленности [2]. Это связано как с пищевой ценностью изолята, так и со способностью данного ингредиента изменять текстуру и другие технологические свойства готового продукта.

Сокращения: ИБС – изолят белков сои, ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия.

Технологические свойства изолятов белка можно изменять целенаправленно под действием протеолитических ферментов. Например, ферментативная обработка может менять пенообразующие свойства ИБС [3], использование разных ферментов может снижать горечь гидролизатов [4], ферментативные гидролизаты разной степени гидролиза имеют разные пенообразующие, жиростойкие свойства и различную растворимость [5, 6].

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) используется очень широко для задач пищевой промышленности. С помощью ДСК была замечена разница в термостабильности белков, высушенных лиофильно или с помощью распылительной сушки [7]. Метод позволяет оценить свойства эмульсии на основе ИБС [8, 9] и другие его свойства, в том числе свойства гидролизатов [10–12].

Обычно методом ДСК исследуют водные растворы белков. Иногда в качестве растворителя также используют глицерин. Было показано, что глицерин стабилизирует белки и повышает температуру их тепловой денатурации, например для лизоцима, что регистрируется сдвигом эндотермического пика в высокотемпературные области [13–15]. Для ряда других белков, например для белков сои, при нагревании с глицерином методом ДСК регистрируется выделение тепла [16, 17]. Экзотермический эффект объясняется образованием новых межмолекулярных взаимодействий белков при нагревании в присутствии глицерина: вследствие тепловой денатурации наружу экспонируются гидрофобные аминокислоты, которые начинают взаимодействовать с глицерином [16]. Глицерин также используется в качестве пластификатора при формировании биodeградируемой пластмассы (биопластик), например на основе изолята белка сои [18]. Глицерин является стимулятором этого процесса [19, 20]. Кроме межмолекулярных гидрофобных взаимодействий, образующихся при нагревании белков с глицерином, к причинам образования биопластика причисляют формирование новых дисульфидных связей [20], однако прямые доказательства этого в литературе отсутствуют.

В нашей работе мы оценили вклад образования новых дисульфидных связей в образование биопластика при нагревании ИБС в растворе глицерина, добавляя восстанавливающий агент (β -меркаптоэтанол). Также мы сравнили влияние глицерина в тигле сравнения на качественный результат получаемых термограмм в двух разных калориметрах теплового потока. Было показано, что наличие тигля с глицерином в ячейке сравне-

ния с разной степенью влияло на качество получаемых термограмм в зависимости от используемого калориметра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали изолят белков сои (ИБС) Shansong 90 (Linyi Shansong Biological Products Co., Ltd., Китай; 90% белка), лизоцим куриного белка («Реахим», Россия), глицерин (PanReac Applichem, 151339.1211), β -меркаптоэтанол (PanReac Applichem, A1108,0100).

Предварительную тепловую обработку ИБС проводили следующим образом. 10%-й водный раствор ИБС нагревали при 95°C в течение 30 мин при активном перемешивании и охлаждали при комнатной температуре. Далее проводили лиофильную сушку.

Для определения растворимости взвешивали 2.5 г изолята белка и постепенно вносили в стакан с 50 мл деионизированной воды, предварительно нагретой до 25°C и перемешиваемой на магнитной мешалке. Полученные суспензии инкубировали 2 ч при температуре 25°C с перемешиванием, после чего центрифугировали 20 мин при 3000 g и еще 10 мин при 12000 g. Для удаления нерастворившихся остатков отобранный супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Содержание белка в полученных образцах определяли по реакции с биуретовым реактивом, оптическую плотность измеряли при помощи планшетного фотометра при длине волны 540 нм после 10 мин инкубации образцов с биуретовым реактивом в соотношении 1 : 4 (образец : биуретовый реактив). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Измеряли протеолитическую активность ферментного препарата и проводили гидролиз ИБС, как описано ранее [21]. Раствор ИБС гидролизировали с помощью Alkalase 2.4 LFG (Novozymes, Дания) из расчета 3 ед. на 1 г белка при 50°C при активном перемешивании в течение 2 ч. Образцы лиофильно высушивали в течение 2 суток при остаточном давлении в 3–4 Па до температуры образца, равной комнатной, с помощью лиофильной сушилки ЛС-1000 («Проинтех-Био», Россия).

Пробоподготовку для дифференциальной сканирующей калориметрии проводили следующим образом. В емкость с глицерином засыпали порошкообразный исследуемый образец массой в 5 раз меньше массы глицерина в емкости. Образец перемешивали с глицерином до получения гомогенной смеси. В случае использования β -

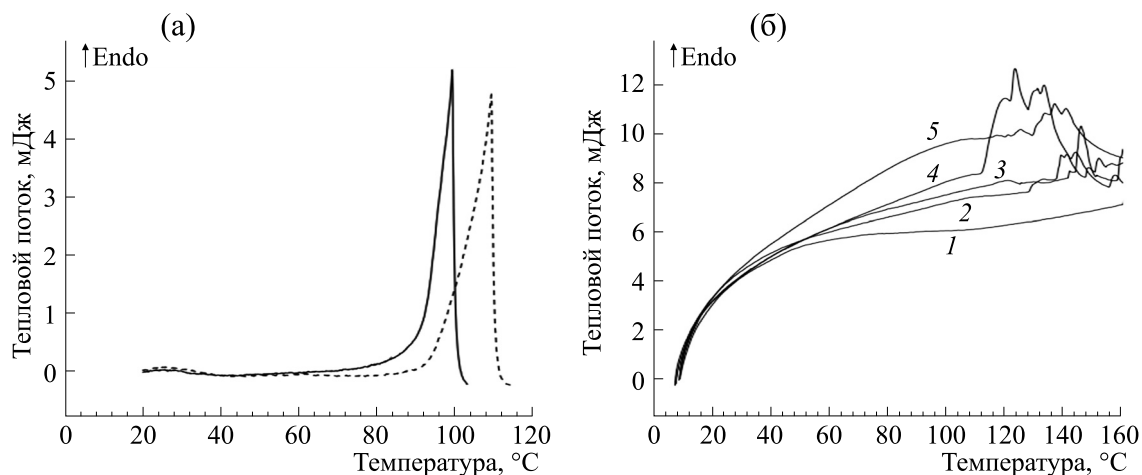


Рис. 1. Термограммы ДСК: (а) — вода (3.44 мкл) в открытом тигле (сплошная кривая) и в закрытом тигле (пунктирная кривая); (б) — смесь глицерина с водой (кривая 1 — без воды, кривая 2 — 10%, кривая 3 — 15%, кривая 4 — 20%, кривая 5 — 25% воды в глицерине; базовая термограмма прибора не вычтена; в ячейке сравнения пустой тигель). Результаты получены на калориметре ЛТК-ДСМ-КБ-80 (ИБП РАН, Россия).

меркаптоэтанола в полученную смесь добавляли восстанавливающий агент и активно перемешивали. Измерение со свежеприготовленной смесью (не более часа после приготовления) проводили на калориметрах теплового потока ЛТК-ДСМ-КБ-80 (ИБП РАН, Россия) и DSC 204 HP Phoenix (Netzsch, Германия): 90–120 мг или 25–35 мг образца (смесь белка с глицерином) соответственно помещали в открытый алюминиевый тигель. В ячейку сравнения помещали пустой тигель или тигель с глицерином, по массе равным образцу в экспериментальном тигле (при получении ДСК-кривых, представленных на рис. 1, в ячейке сравнения находился пустой тигель). В случае использования β-меркаптоэтанола в глицерин тигля сравнения добавляли восстанавливающий агент до конечной концентрации, равной в исследуемом образце. Из полученных термограмм вычитали базовую термограмму прибора.

В случае калориметра DSC 204 HP Phoenix измерение проводили как описано в ГОСТ Р 56754-2015. Калибровку ЛТК-ДСМ-КБ-80 проводили по индию (ГСО 2313-82) и олову (ГСО 2314-82): начало фронта фазового перехода индия и олова брали за стандартную температуру фазового перехода, затем вычисляли коэффициенты для уравнения, чтобы согласовать код аналого-цифрового преобразователя с температурой.

Скорость измерения составляла 10°C/мин, как в других работах по ДСК изолята белков сои в глицерине [16, 17]. Все измерения проводили при нормальном атмосферном давлении.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При нормальном атмосферном давлении испарение воды порошкообразных препаратов белков будет влиять на получаемые термограммы в диапазоне интересующих температур. Чтобы исключить вклад испарения воды, в качестве растворителя был использован глицерин. Известно, что температура кипения воды в смеси с глицерином возрастает: например, 10%-й водно-глицериновый раствор (с содержанием воды 10%) имеет температуру кипения 139.8°C [22].

Нами было показано, что испарение воды вносит вклад в результаты ДСК начиная с 60 или 90°C при использовании соответственно открытого или герметично закрытого тигля (рис. 1а). В последнем случае разгерметизация происходит по причине повышения давления внутри тигля. Если же воду смешать с глицерином, то начало ее испарения регистрируется лишь после 110°C, что позволяет использовать открытый тигель и получать результаты ДСК для белка без вклада испарения воды в получаемые термограммы до данных значений температур (рис. 1б).

Обычно в экспериментах ДСК в ячейку сравнения помещают тигель с растворителем. Мы решили проверить, насколько это важно для получения качественного результата при использовании глицерина как растворителя. Влияние глицерина в ячейке сравнения проверяли на двух разных приборах. Как на калориметре SC 204 HP Phoenix (рис. 2а), так и на калориметре ЛТК-ДСМ-КБ-80 (рис. 2б,в) наличие глицерина в тиг-

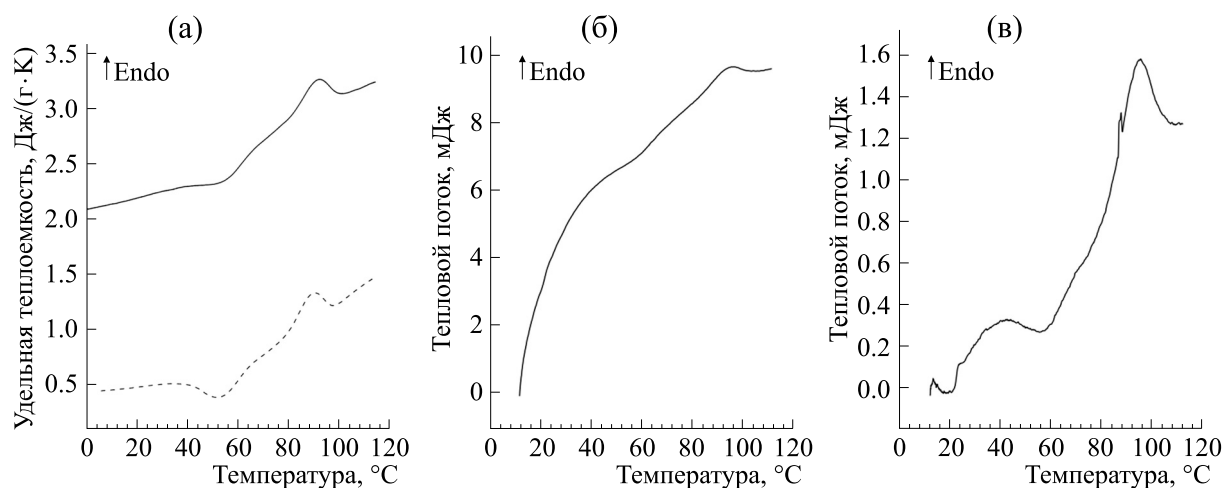


Рис. 2. Термограммы ДСК: (а) — смесь лизоцима с глицерином с использованием (пунктирная кривая) и без использования (сплошная кривая) тигля с глицерином в ячейке сравнения, результаты получены на калориметре SC 204 HP Phoenix (Netzsch, Германия); (б) — смесь лизоцима с глицерином без использования тигля с глицерином в ячейке сравнения; (в) — смесь лизоцима с глицерином с использованием тигля с глицерином в ячейке сравнения. Термограммы (б) и (в) получены на калориметре ЛТК-ДСМ-КБ-80 (ИБП РАН, Россия).

ле сравнения качественно улучшало результаты ДСК. Для калориметра ЛТК-ДСМ-КБ-80 наличие глицерина в тигле сравнения было более критично при получении термограмм в сравнении с калориметром DSC 204 HP Phoenix. Это объясняется теплофизическими свойствами блока первого калориметра, обладающего меньшей чувствительностью. В качестве примера: измерительные ячейки блока ЛТК-ДСМ-КБ-80 выполнены из нержавеющей стали, теплопроводность которой в 23 раза ниже, чем серебро, служащее материалом блока калориметра DSC 204 HP Phoenix. Следовательно, использование тигля с глицерином в ячейке сравнения может быть особенно критично для некоторых калориметров, например с блоками, сделанными из материала с низкой теплопроводностью.

Пик эндотермического процесса ДСК лизоцима наблюдали при 90°C при использовании обоих приборов, что соответствует ранним наблюдениям [15]. Интересно отметить, что при 55°C наблюдался экзотермический ДСК-процесс лизоцима, который отчетливо детектировался при использовании тигля с глицерином в ячейке сравнения (рис. 2а,в). Наблюдаемый экзотермический процесс при 55°C мы пока объяснить не можем.

Исследование с помощью ДСК изолята белка сои в смеси с глицерином ранее показало, что пик экзотермического процесса при нагревании приходится на 70–80°C в зависимости от соотношения воды и глицерина в смеси с белком [16]. В на-

ших экспериментальных условиях он находится в области 105°C (рис. 3а).

Предварительная тепловая обработка водного раствора ИБС (95°C, 30 мин) приводила к увеличению растворимости белка: растворимость исходного препарата ИБС составляла 45% ($SD = 2$), после обработки — 82% ($SD = 4$). Данная обработка также приводила к увеличению экзотермического теплового эффекта примерно в два раза и к сдвигу пика в область 95°C (рис. 3а). ДСК ферментативного гидролизата ИБС (распределение молекулярных масс пептидов: <1 кДа — 5.5%, 1–12.5 кДа — 72%, >12.5 кДа — 22% [21]), полученного с помощью препарата алкалазы, показало значительное снижение экзотермического теплового эффекта (рис. 3б).

Экзотермический процесс при пластификации белков в присутствии глицерина объясняется образованием новых связей, в том числе образованием дисульфидных связей при нагревании. Чтобы оценить вклад в экзотермический процесс образования дисульфидных связей, мы провели ДСК изолята белка сои в глицерине в присутствии 1% β -меркаптоэтанола для исходного препарата ИБС (рис. 3в) и для препарата ИБС после тепловой обработки водного раствора (рис. 3г). Известно, что β -меркаптоэтанол восстанавливает дисульфидные связи. Оказалось, что β -меркаптоэтанол значительно не влияет на наблюдаемый экзотермический тепловой эффект белков ИБС.

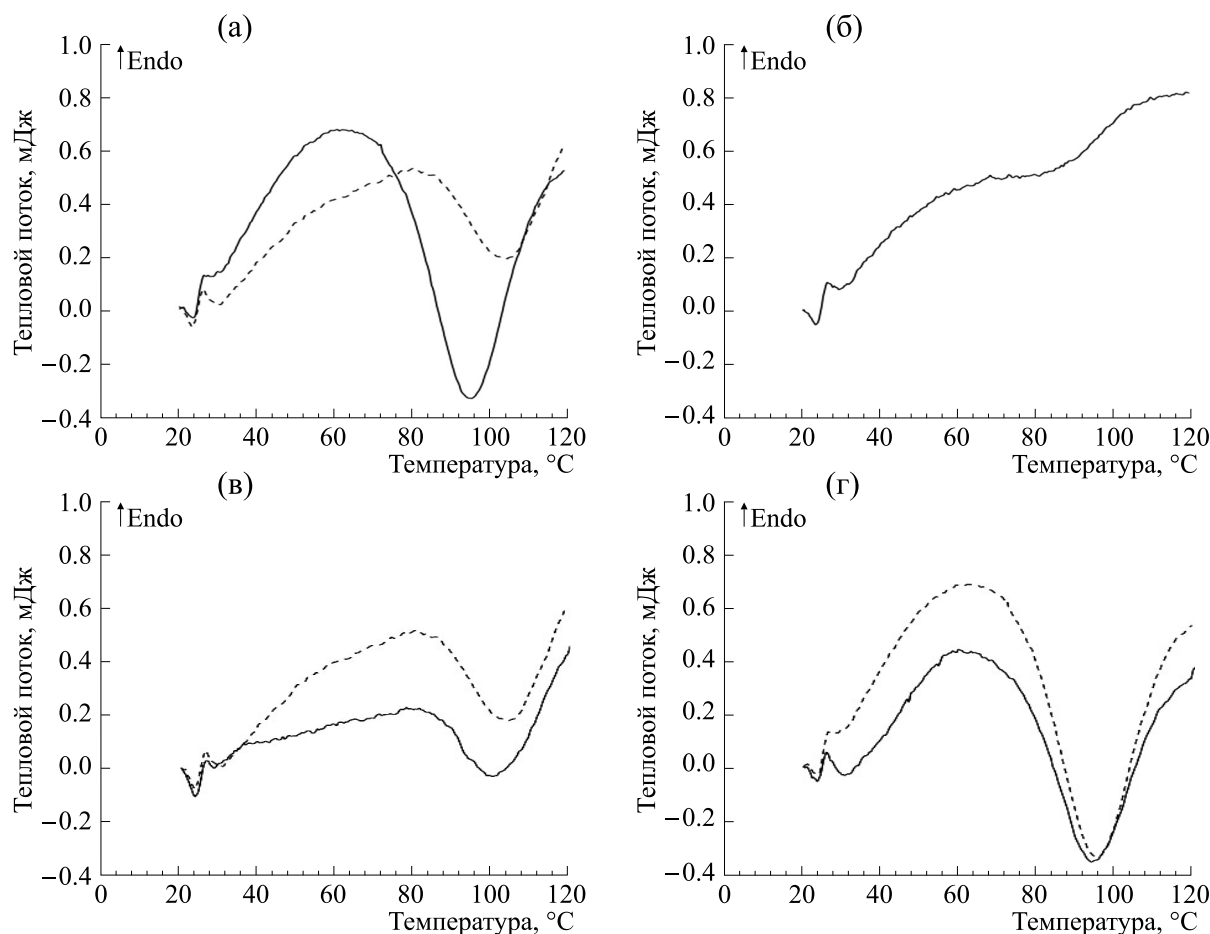


Рис. 3. Термограммы изолята белка сои в глицерине: (а) — исходный ИБС (пунктирная кривая) и ИБС после нагревания раствора при 95°C в течение 30 мин (сплошная кривая), (б) — гидролизат ИБС, (в) — исходный ИБС (пунктирная кривая) и он же в присутствии 1% β-меркаптоэтанола (сплошная кривая), (г) — ИБС после нагревания раствора при 95°C в течение 30 мин (пунктирная кривая) и он же в присутствии 1% β-меркаптоэтанола (сплошная кривая).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было известно, что при тепловой денатурации изолята белка сои в присутствии глицерина наблюдается экзотермический тепловой эффект [16, 17]. Выделение тепла объясняется новыми гидрофобными взаимодействиями, а также формированием дисульфидных связей в процессе нагревания. Действительно, известно, что в водном растворе некоторые белки сои при нагревании при 80–100°C образуют новые межмолекулярные дисульфидные связи [23], хотя они и не являются движущей силой при агрегации [24]. Происходит ли формирование дисульфидных связей белков сои в глицерине при нагревании, до сих пор экспериментально не представлено.

В нашей работе было показано, что в случае ИБС экзотермический тепловой эффект не зависит от формирования дисульфидных мостиков, что экспериментально продемонстрировано до-

бавлением в смесь восстанавливающего агента (β-меркаптоэтанола). Интересным наблюдением является увеличение теплового эффекта для ИБС после предварительного нагрева при 95°C. Вероятно, такая предварительная процедура позволит в будущем получать биопластик с улучшенными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии широко используется как для исследования стабильности структуры белков, так и для предсказания функциональных свойств пищевых белоксодержащих ингредиентов. Использование глицерина в качестве растворителя вместо воды при ДСК ИБС приводит к наблюдению экзотермического теплового эффекта. При этом экзотермический эффект при ДСК ИБС не зависит от образования дисульфидных мостиков. В

дальнейшем полученные результаты могут лечь в основу предсказания функциональных свойств препаратов пищевых белков, по крайней мере растворимости. Также полученные результаты могут способствовать пониманию механизмов формирования биопластика на основе ИБС при нагревании в присутствии глицерина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Т.Н. Мельник за критические и конструктивные замечания по тексту статьи, а также Е.М. Согорину за моральную поддержку.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hu X.-Z., Cheng Y.-Q., Fan J.-F., Lu Z.-H., Yamaki K., and Li L.-T. Effects of drying method on physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *J. Food Processing and Preservation*, **34** (3), 520–540 (2010).
2. Astawan M. and Prayudani A. P. The overview of food technology to process soy protein isolate and its application toward food industry. *World Nutrition J.*, **4** (S1), 12–17 (2020).
3. Liang G., Chen W., Qie X., Zeng M., Qin F., He Z., and Chen J. Modification of soy protein isolates using combined pre-heat treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improving foaming properties. *Food Hydrocolloids*, **105**, 105764 (2020).
4. Meinschmidt P., Schweiggert-Weisz U., and Eisner P. Soy protein hydrolysates fermentation: Effect of debittering and degradation of major soy allergens. *LWT-Food Sci. Technol.*, **71**, 202–212 (2016).
5. Jung S., Murphy P. A., and Johnson L. A. Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *J. Food Sci.*, **70** (2), C180–C187 (2005).
6. Kempka A., Honaiser T., Fagundes E., and Prestes R. Functional properties of soy protein isolate of crude and enzymatically hydrolysed at different times. *Int. Food Res. J.*, **21** (6), 2229–2236 (2014).
7. Keeratiurai M., Wang Z., and Corredig M. Adsorption of soy protein isolate in oil-in-water emulsions: difference between native and spray dried isolate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **88**, 1593–1602 (2011).
8. Keeratiurai M. and Corredig M. Heat-induced changes occurring in oil/water emulsions stabilized by soy glycinin and β -conglycinin. *J. Agricultural Food Chem.*, **58** (16), 9171–9180 (2010).
9. Keeratiurai M. and Corredig M. Heat-induced changes in oil-in-water emulsions stabilized with soy protein isolate. *Food Hydrocolloids*, **23** (8), 2141–2148 (2009). DOI: 10.1016/j.foodhyd.2009.05.010
10. Sousa I. M., Mitchell J. R., Ledward D. A., Hill S. E., and Beirao da Costa M. L. Differential scanning calorimetry of lupin and soy proteins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, **201**, 566–569 (1995).
11. Arntfield S. and Murray E. The influence of processing parameters on food protein functionality I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. *Can. Institute Food Sci. Technol. J.*, **14** (4), 289–294 (1981).
12. Ryan M., McEvoy E., Duignan S., Crowley C., Fenelon M., O'Callaghan D., and FitzGerald R. Thermal stability of soy protein isolate and hydrolysate ingredients. *Food Chemistry*, **108** (2), 503–510 (2008).
13. Burova T. V., Grinberg N. V., Grinberg V. Y., Rariy R. V., and Klibanov A. M. Calorimetric evidence for a native-like conformation of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1478** (2), 309–317 (2000).
14. Fatkhutdinova A., Mukhametzyanov T., and Schick C. Refolding of lysozyme in glycerol as studied by fast scanning calorimetry. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (5), 2773 (2022).
15. Cinelli S., De Francesco A., Onori G., and Paciaroni A. Thermal stability and internal dynamics of lysozyme as affected by hydration. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6** (13), 3591–3595 (2004).
16. Wang S., Sue H.-J., and Jane J. Effects of polyhydric alcohols on the mechanical properties of soy protein plastics. *J. Macromol. Sci. Part A: Pure and Applied Chemistry*, **33** (5), 557–569 (1996).
17. Mo X., Sun X. S. и Wang Y. Effects of molding temperature and pressure on properties of soy protein polymers. *J. Appl. Polymer Sci.*, **73** (13), 2595–2602 (1999).
18. Swain S., Biswal S., Nanda P., and Nayak P. L. Biodegradable soy-based plastics: opportunities and challenges. *J. Polymers Environ.*, **12**, 35–42 (2004).
19. Gennadios A. and Weller C. Edible films and coatings from soymilk and soy protein. *Cereal foods world*, **36** (12), 1004–1009 (1991).
20. Calva-Estrada S. J., Jimenez-Fernandez M., and Lugo-Cervantes E. Protein-based films: Advances in the

- development of biomaterials applicable to food packaging. *Food Eng. Rev.*, **11**, 78–92 (2019).
21. Pozdnyakov N., Shilov S., Lukin A., Bolshakov M., and Sogorin E., Investigation of enzymatic hydrolysis kinetics of soy protein isolate: laboratory and semi-industrial scale. *Bioresources and Bioprocessing* **9** (1), 1–13 (2022).
 22. Рахманкулов Д. Л., Кимсанов Б. Х. и Чанышев Р. Р. *Физические и химические свойства глицерина*, Под общ. ред. акад. АН РБ Д. Л. Рахманкулова (Химия, М., 2003).
 23. Ruan Q., Chen Y., Kong X. and Hua Y. Analysis using fluorescence labeling and mass spectrometry of disulfide-mediated interactions of soy protein when heated. *J. Agricult. Food Chem.*, **63** (13), 3524–3533 (2015).
 24. Ruan Q., Chen Y., Kong X., and Hua Y. Heat-induced aggregation and sulphydryl/disulphide reaction products of soy protein with different sulphydryl contents. *Food Chem.*, **156**, 14–22 (2014).

Differential Scanning Calorimetry of Edible Plant-based Protein Using Glycerol as a Medium

A.M. Lukin*, M.M. Dotlov*, N.V. Pozdnyakov*, **, S.V. Shilov*, R.Kh. Sadreeva*,
D.S. Beloklov***, A.A. Zalyatdinov***, V.V. Kononenko*, and E.A. Sogorin***

*Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

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

***Almetyevsk State Oil Institute, ul. Lenina 2, Almetyevsk, Republic of Tatarstan, 423462 Russia

Plant-based protein isolates are common food ingredients. Differential scanning calorimetry is used to forecast functional properties of these isolates as well as to evaluate the propensity of these isolates for bioplastic formation through heat-induced formation of intermolecular disulfide, hydrophobic, and other types of bonds. In this work, differential scanning calorimetry was employed in the study of a suspension containing soy protein isolate and glycerol. It was shown that heat release occurred upon heating the isolate in the presence of glycerol. Preheating-induced denaturation of soy proteins in aqueous solution (95°C, 30 min) made the observed heat more exothermic, whereas exothermic reaction was not observed during enzymatic hydrolysis of the protein. Since adding β -mercaptoethanol to soy protein isolate had no effect on the observed exothermic process, this chemical compound could not contribute to formation of new disulfide bonds. Thus, bioplastic formation using soy protein isolate occurs independently of the formation of new disulfide bonds, and differential scanning calorimetry can be used to assess protein solubility.

Keywords: differential scanning calorimetry, soy protein isolate, lysozyme, endothermic process, exothermic process, glycerol

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДВУХ QTL, КОНТРОЛИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЬНА К ФУЗАРИОЗНОМУ УВЯДАНИЮ

© 2024 г. Т.А. Рожмина*, А.А. Канапин**, М.П. Банкин**, М.Г. Самсонова**, #

*Федеральный научный центр лубяных культур, Комсомольский пр., 17/56, Тверь, 170041, Россия

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

#E-mail: m.g.samsonova@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 20.06.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Совместный анализ сегрегантов был применен для анализа популяции F₂ от скрещивания двух сортов льна, различающихся по генам устойчивости к фузариозному увяданию. Возбудитель этого заболевания, гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* — один из основных патогенов льна, причиняющий огромный экономический ущерб его мировому производству. Секвенирование пулов ДНК сильно устойчивых и чувствительных к фузариозному увяданию растений F₂ и их последующий анализ идентифицировали два района на 9-й и 13-й хромосомах, которые обуславливают устойчивость к фузариозному увяданию. Гены-кандидаты для последующего анализа выбраны путем функциональной аннотации генов и анализа экспрессии генов QTL-районов в транскриптомных данных, полученных в результате заражения устойчивого к фузариозу сорта Atalante. В результате объединения двух подходов было идентифицировано по три гена в каждом из QTL-районов, которые по литературным данным участвуют в ответе растения на заражение и дифференциально экспрессировались в транскриптомном эксперименте.

Ключевые слова: лен; фузариозное увядание, устойчивость, QTL, совместный анализ сегрегантов.

DOI: 10.31857/S0006302924010072, EDN: RDOSAW

Одним из основных патогенов льна (*Linum usitatissimum* L.), причиняющим огромный экономический ущерб производству этой важной сельскохозяйственной культуры, является гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Гриб проникает в растение через корни, а затем колонизирует ксилему и блокирует поступление воды и питательных веществ. В результате растение желтеет, листья увядают, а повреждение сосудистой ткани в конечном итоге приводит к гибели растения [1]. Хламидоспоры гриба в почве крайне трудно поддаются элиминации и могут сохраняться в ней до 50 лет [2].

Для борьбы с фузариозом используют различные агротехнические приемы и пестициды [3], однако пестициды опасны для здоровья человека [4] и наносят ущерб структуре и функционированию экосистемы [5]. Поэтому наиболее эффективными средствами борьбы с заболеванием остаются создание устойчивых сортов и мониторинг почв на присутствие патогена [6, 7].

Коллекция льна, созданная в Федеральном научном центре лубяных культур, является одной из крупнейших в мире. Скрининг этой коллекции

на устойчивость к фузариозному увяданию позволил идентифицировать 10 генов устойчивости [6, 7], однако локализация этих генов в геноме льна не установлена.

Механизмы устойчивости льна к фузариозному увяданию до сих пор полностью не изучены. Важную роль в восприятии патогена на начальном этапе заражения играют рецепторы распознавания паттерна [8], которые являются эволюционно консервативными рецептор-подобными киназами, локализованными в мембране. Они распознают характерные молекулы — молекулярные паттерны, связанные с патогенами/микробами, и тем самым включают иммунный ответ, называемый «иммунитетом, запускаемым паттерном». Данный иммунитет играет важную роль в базальной резистентности в ответ на успешное заражение адаптированным патогеном [9]. В установлении следующего уровня защиты, так называемого эффекторного иммунитета, принимает участие второй класс рецепторов, кодируемых R-генами и распознающих эффекторы — продукты генов авирулентности патогена [10, 11]. Гены R классифицированы по пяти классам и

включают гены, кодирующие белки NBS-LRR с доменом связывания нуклеотидов и богатыми лейцином повторами: гены рецептор-подобных киназ, гены, продуцирующие рецептор-подобные трансмембранные белки, гены серинтреонинкиназ и атипичные R-гены [12, 13]. Не так давно было продемонстрировано, что распознавание R-гена эффектором может быть как прямым, так и опосредованным [14]. Нижестоящие сигнальные пути, такие как каскады MAP-киназ, потоки кальция, продукция активных форм кислорода и сети гормональной регуляции, являются во многом общими для иммунитета, запускаемого паттерном, и эффекторного иммунитета [15].

Из-за возросшего экономического значения лен становится объектом интенсивных исследований в области геномики. Анализ омиксных данных расширил наши знания о генах устойчивости к фузариозному увяданию, полученных с помощью классических генетических подходов [2]. Транскриптомные эксперименты подтвердили важную роль R-белков, компонентов клеточной стенки, факторов транскрипции, вторичных метаболитов и антиоксидантов в ответной реакции льна на *F. oxysporum* f. sp. *lini* [16–18].

QTL-анализ (анализ локусов количественных признаков — Quantitative Trait Loci) позволил идентифицировать два района, объясняющих 38 и 26% фенотипической вариативности по признаку устойчивости, расположенных в группах сцепления 6 и 10 [19, 20], а в наших исследованиях были выявлены три района на 1-й, 8-й и 13-й хромосомах, ассоциированных с устойчивостью [21].

Ассоциативное картирование широко используется для идентификации районов генома, обуславливающих наблюдаемую фенотипическую вариацию признака. Одним из его вариантов является BSA-анализ (совместный анализ сегрегантов — Bulk Segregant Analysis) [22, 23]. Метод оперирует с сегрегирующей популяцией от генетического скрещивания, растения которой тестируют на признак интереса и создают две группы (пула) сегрегантов путем отбора растений из хвостов фенотипического распределения. Частоты аллелей оцениваются в этих двух группах путем полногеномного секвенирования суммарной ДНК образцов, входящих в группы. В геномных регионах, не содержащих ассоциаций, влияющих на признак, частоты аллелей должны быть приблизительно равны между двумя группами. И наоборот, регионы генома, содержащие причинные ассоциации, должны иметь статистически значимые различия в частоте аллелей между группами, которые выявляют путем вычисления G-статистики.

Здесь мы применили BSA-анализ для анализа сегрегирующей популяции F_2 от скрещивания двух сортов льна, различающихся по генам устойчивости, и идентифицировали два района на 9-й

и 13-й хромосомах льна, обуславливающих устойчивость к фузариозу. Один из этих районов на 9-й хромосоме является новым, не выявленным ранее в GWAS-анализе [21].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве исходного материала были использованы гибриды F_1 и F_2 от скрещиваний селекционной линии № 3896 (Ru5635, Россия), обладающей геном устойчивости к фузариозному увяданию *Fu4* [24] и высокоустойчивой к популяции патогена линии AGT 987 (CzAGT7225, Чехия). Оценка гибридов F_1 , F_2 и их исходных родительских форм проведена на инфекционном фоне с моноизолятом MI39 гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.

Оценка на устойчивость к фузариозному увяданию выполнена в условиях вегетационного домика в ящичном посеве. Закладка питомников и оценка материала осуществлялись в соответствии с методическими указаниями по фитопатологической оценке устойчивости льна-долгунца к болезням. Инфекционный фон при посеве в ящиках создавался путем внесения чистой культуры моноизолята MI39 гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* из расчета 400 г на ящик размером 50 × 85 × 20 см.

Почва для инфекционного питомника на устойчивость к фузариозному увяданию рано весной была просеяна через грохот, в первых числах мая приступили к набивке (заполнению) ящиков. После набивки на 2/3 ящика в него была внесена чистая культура возбудителя, затем ее засыпали почвой до верха ящика. Наполненные таким образом ящики с почвой обильно поливали водой, затем покрывали полиэтиленовой пленкой для развития инфекции фузариума в почве. Посев гибридов F_1 , F_2 и их родительских форм был проведен спустя две недели после внесения инфекции. Родительские формы и гибриды F_1 высевались по 16 штук семян, гибриды F_2 — 190 штук семян. В качестве стандартов использовали контрастные по устойчивости к фузариозному увяданию генотипы льна-долгунца: сильновосприимчивый AP 5 и высокоустойчивый И-7. Перед посевом почва тщательно выравнивалась, затем маркировалась ящичным маркером. Площадь питания одного растения составляла 2.5 × 2.5 см.

Учет пораженности болезнями проводили в фазу полных всходов льна. Окончательный учет пораженности льна фузариозом выполнен в период уборки — в фазу ранней желтой спелости. При фитопатологическом анализе стеблей льна определяли количество пораженных растений и степень поражения по четырехбалльной шкале:

0 — отсутствие поражения, здоровое растение;

1 — частичное побурение растения, одностороннее побурение стебля;

2 — побурение всего растения с коробочками;

3 — полностью бурое, погибшее или отмершее растение до образования коробочек.

При анализе расщепления в F_2 по устойчивости к фузариозному увяданию все растения были разделены на два класса — устойчивые (балл 0) и восприимчивые (баллы 1, 2, 3).

Для проведения молекулярных исследований выполнен сбор листьев с каждого растения гибридов F_2 , который осуществляли в период начала фазы «елочка» (три-четыре пары настоящих листьев). После проведения фитопатологической оценки для данных целей был отобран биоматериал от контрастных по устойчивости к фузариозному увяданию растений, выборка включала 17 устойчивых и 17 восприимчивых растений.

Выделение ДНК и секвенирование. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США) был использован для выделения ДНК из собранных листьев. Для секвенирования ДНК в Пекинском институте генома (BGI, Китай) использовался протокол Illumina, генерирующий парные концевые чтения 150 п.н. Чтения были обработаны и выровнены относительно референсной геномной сборки льна NCBI ASM22429v2 с помощью bwa-мет с использованием параметров по умолчанию [25]. NGSEP [26] версии 4.0. использовался для поиска вариантов.

G'-анализ. Поиск районов со статистически значимыми различиями в частоте аллелей между группами сегрегантов выполнили, применяя пакет QTLsegr [22, 27], версия 0.7.5.2. Фильтрацию данных проводили со следующими параметрами: refAlleleFreq = 0.25, minTotalDepth = 50, maxTotalDepth = 300, depthDifference = 50, minSampleDepth = 40, minGQ = 99. Значение параметра фильтрации для функции runGprimeAnalysis по параметру absolute delta SNP index составляло 0.1.

Транскриптомный анализ. Проростки устойчивого к фузариозному увяданию сорта масличного льна Atalante заразили штаммом гриба MI39. Выделение РНК было выполнено в трех независимых повторностях (репликатах) на третьи и пятые сутки после заражения как в контрольных условиях, так и при грибковой инфекции. Из девяти образцов, каждый из которых включал материал от трех до пяти корней, была выделена РНК. Тотальную РНК из инфицированных корней выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). Качество тотальной РНК оценивали методом капиллярного электрофореза на чипах с помощью биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technologies, США). Образцы РНК хранили при -20°C . Выделенные транскрипты секвенировали на платформе DNBSEQ в Пекин-

ском институте генома с длиной парных прочтений 100 нуклеотидов. Полученные прочтения были отфильтрованы с помощью SOAPnuke [28] со следующими параметрами: доля пропущенных значений менее 3%, совпадение последовательности прочтения с последовательностями адаптеров менее 25%, качество половины нуклеотидов в прочтении более 20 по шкале phred64 [29].

Аннотирование генов в QTL-регионах. Функция генов-кандидатов была определена на основе функции их ортологов у *Arabidopsis* (база данных TAIR), аннотации генома льна, предоставленной группой С. Клуэе (Научно-исследовательский центр Оттавы, Канада) [30], и функции гомологичных генов у других видов растений, как описано в литературе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетический анализ сегрегирующей популяции. Для идентификации районов генома льна, обуславливающих устойчивость к фузариозному увяданию была получена сегрегирующая популяция F_2 от скрещивания сортов 3896 (Ru5635) $\times$ AGT 987 (CzAGT7225), устойчивых к фузариозному увяданию под воздействием высоковирулентного моноизолята MI39 *F. oxysporum* f. sp. *lini*.

Оценка родительских форм льна на фоне с MI39 показала высокий уровень их устойчивости к патогену: 100 и 93.7% соответственно. На жесткость инфекционного фона указывает степень поражения восприимчивого стандарта — линии AP 5, степень поражения которого составила 87.5%. Высокий уровень устойчивости линии AGT 987 к MI39 указывает на наличие у нее высокоэффективных генов устойчивости к фузариозному увяданию. Устойчивость к фузариозному увяданию у льна детерминруется доминантными генами, что подтверждают результаты оценки F_1 от скрещиваний родительских линий, где устойчивость составила 100%.

По результатам гибридологического анализа расщепления F_2 соотношение составило 169 устойчивых и 19 восприимчивых к фузариозному увяданию растений. Как показывают расчеты, проведенные с учетом неполной пенетрантности признака [31], данное расщепление соответствует теоретически ожидаемому 15R : 1S (табл. 1).

Из полученных результатов следует, что устойчивость к фузариозному увяданию у линии AGT 987 детерминруется одним доминантным эффективным геном, который не идентичен гену *Fu4*.

Таблица 1. Расщепление по устойчивости к фузариозному увяданию в F₂ от скрещивания между устойчивыми линиями (инфекционный фон – М139 *F. oxysporum*)

Ген Fu ♀	Гибридная комбинация	Поражено растений, %			Соотношение фенотипов R : S в F ₂		χ^2	P
		P ₁	P ₂	F ₁	фактическое	теоретическое		
4	№ 3896 (Ru5635) × AGT 987 (CzAGT7225)	0	6.3	0	168 : 19	15 : 1	0.12	0.5–0.8

Примечание: χ^2 рассчитан с поправкой на неполную пенетрантность признака.

Формирование и секвенирование пулов ДНК.

У 17 сильно устойчивых и 17 чувствительных к фузариозному увяданию растений были собраны листья, из которых затем была выделена ДНК. Пулы ДНК для растений устойчивой и чувствительных групп были созданы путем объединения аликвот ДНК индивидуальных растений, рассчитанных так, чтобы количество ДНК, пришедшее от каждого растения в пул, было бы одинаковым.

Секвенирование пулов дало 282134312 прочтений или около 141 млн прочтений на пул ДНК. Для исходных родительских генотипов было получено 64 460786 прочтений или около 32 млн прочтений на образец. Выравнивание с референсной геномной сборки льна NCBI ASM22429v2 позволило картировать не ниже 95% чистых прочтений. Средняя глубина секвенирования для пулов ДНК составила 68×, а для родительских линий – 12×. Поиск вариантов выявил 1282380 биаллельных снупов, различающихся у родительских сортов.

BSA-анализ. Совместный анализ сегрегантов идентифицировал два статистически значимых района, которые локализуются на 9-й и 13-й хромосомах (табл. 2). QTL на хромосоме 13 имеет размер 840691 п.н. и включает в себя полиморфную позицию 4884610, ассоциированную с устойчивостью к фузариозу по результатам ранее выполненного GWAS [21]. QTL на хромосоме 9 идентифицирован впервые, он имеет размер 748334 п.н.

Выбор генов-кандидатов для последующего анализа. Гены-кандидаты для последующего анализа выбирали, используя два подхода: путем функциональной аннотации генов и анализа экспрессии генов QTL-районов в транскриптомных данных, полученных в результате заражения устойчивого к фузариозу сорта Atalante моноизолятом М139. В результате объединения этих двух подходов было идентифицировано по три гена на каждой из хромосом, которые по литературным данным участвуют в ответе растения на заражение и дифференциально экспрессировались в транскриптомном эксперименте (табл. 3). Гены *Lus10005483*, *Lus10005484* и *Lus10005491* начинали экспрессироваться на третьи сутки после заражения.

Таблица 2. QTL-районы устойчивости к фузариозному увяданию, выявленные методом совместного анализа сегрегантов

QTL	Хромосома	Координаты		Количество снупов	Пик G'	Координата пика	Среднее G'	Стандартное отклонение G'	qval
		начало	конец						
1	9	8147198	8895532	1151	5.31	8895532	5.28	0.06	0.005
2	13	4386470	5227161	587	5.22	5121314	5.12	0.09	0.006

Примечание: qval – p-уровень значимости с поправкой Бенджамини–Хохберга (q-value).

Таблица 3. Гены QTL-районов, значимо экспрессирующиеся при заражении устойчивого к фузариозу сорта At-alante моноизолятом MI39

Хромосома	Ген	Координаты	Функция	Дифференциальная экспрессия			
				на третьи сутки		между третьими и пятыми сутками	
				qval	LFC	qval	LFC
9	Lus10005483	8277987–8280578	NADP-malic enzyme 2	5.74e-4	3.22	—	—
9	Lus10005484	8281754–8284844	NADP-malic enzyme 3	7.03e-4	2.61	—	—
9	Lus10005491	8321723–8324951	Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain	6.44e-5	2.80	—	—
13	Lus10009328	4871884–4875204	Homolog of RPW8 3	2.61e-4	6.42	0.04	1.75
13	Lus10009352	5059456–5061003	Accelerated cell death 2 (ACD2)	0.007	1.35	0.04	1.45
13	Lus10034795	4643996–4646254	RLK	—	—	0.003	11.33

Примечание: LFC — логарифм по основанию 2 отношения нормализованных количественных оценок экспрессии между условиями; qval — *p*-уровень значимости с поправкой Бенджамини–Хохберга (*q*-value).

Lus10005483 и *Lus10005484*, ортологи генов *AT5G11670* и *AT5G25880* соответственно, кодируют НАДФ-зависимые ферменты, которые участвуют в метаболизме малата и обеспечивают строительные блоки и энергию для синтеза двух связанных с защитой от патогенов вторичных метаболитов, флавоноидов и предшественника лигнина, монолигнола. Кроме того, эти ферменты могут производить НАДФ для синтеза активных форм кислорода [32]. Киназы с доменами, составленными обогащенными лейцином повторами (LRR), одну из которых кодирует ген *Lus10005491*, играют центральную роль в передаче сигналов во время распознавания патогенов и последующей активации защитных механизмов растений [33]. Ортолог этого гена у *A. thaliana*, *AT5G25930*, кодирует LRR-киназу трансмембранного рецептора, который связывает фитоцитоклиновые сигнальные пептиды SCREW во время иммунного ответа растения [34]. Гены *Lus10009328* и *Lus10009352* на хромосоме 13 дифференциально экспрессируются на третьи сутки заражения и между третьими и пятыми сутками. Ортолог *Lus10009328* у *Arabidopsis*, *AT3G50470* (*RPW8*, *HR3*), определяет устойчивость этого растения к грибу-возбудителю мучнистой росы и локализуется в экстрагаусториальной мембране

[35]. Интересно, что у льна также обнаружен кластер генов *RPW8* на 13-й хромосоме, который ассоциирован с устойчивостью к мучнистой росе и положение которого (4.7–5.2 Mb), совпадает с обнаруженным нами QTL [36]. Белок *Arabidopsis ACCELERATED CELL DEATH 2* (*ACD2*), ортолог *Lus10009352*, участвует в регуляции гиперчувствительного ответа растений при патогенной инфекции [37]. Еще один ген на хромосоме 13, *Lus10034795*, кодирует рецептор-подобную протеинкиназу и сильно дифференциально экспрессируется между третьими и пятыми сутками заражения. Ферменты этого класса играют ключевую роль в базальном иммунитете путем распознавания патогенных/микробно-ассоциированных молекулярных паттернов [38].

ВЫВОДЫ

Совместный анализ сегрегантов популяции F₂ от скрещивания двух устойчивых сортов льна, позволил идентифицировать новый район, ассоциированный с устойчивостью к фузариозному увяданию, на 9-й хромосоме QTL-Lu9-(8147198-8895532) и подтвердить статистическую значимость QTL-Lu13-(4386470-5227161) на 13-й хромосоме. Последнее важно, поскольку, хотя в ра-

боте [21] в этой области и был идентифицирован QTN Chr13:4884610, ассоциированный с устойчивостью, аллельный эффект этого полиморфизма не был статистически значим. Значимость района QTL-Lu13-(4386470-5227161) для контроля устойчивости к фузариозному увяданию подтверждается также присутствием в этой области генов с высоким уровнем транскрипционного ответа на инфекцию (табл. 3). Интересно также, что QTL-Lu13-(4386470-5227161) совпадает с QTL, обнаруженным в работе [36] и ассоциированным с устойчивостью к мучнистой росе. Вместе с тем высокая гетерозиготность родительских генотипов не позволяет однозначно ответить на вопрос о том, какой из этих районов соответствует гену *Fu4*, идентифицированному классическими методами гибридологического анализа. Ответ на этот вопрос может быть получен при аналогичном анализе популяции F₂ от скрещивания растений *Fu4* на чувствительный сорт.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-16-00037).

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

- Dean R., Van Kan J. A., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D., Rudd J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, **13** (4), 414–430 (2012). DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- Knowles P. F. and Houston B. R. Inheritance of Resistance to Fusarium Wilt of Flax in Dakota Selection 48–94. *Agron. J.*, **47**, 131–135 (1955). DOI: 10.2134/agronj1955.00021962004700030006x
- Rashid K. Y. and Kenaschuk E. O. Effect of trifluralin on fusarium wilt in flax. *Can. J. Plant Sci.*, **73**, 893–901 (1993). DOI: 10.4141/cjps93-117
- Sánchez-Martín J. and Keller B. Contribution of recent technological advances to future resistance breeding. *Theor. Appl. Genet.*, **132**, 713–732 (2019). DOI: 10.1007/s00122-019-03297-1
- Sanchez-Bayo F. Impacts of Agricultural Pesticides on Terrestrial Ecosystems. In: *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, Ed. by F. Sánchez-Bayo, P. J. van den Brink, and R. M. Mann (Bentham Science Publishers Ltd, 2011), pp. 63–87.
- Рожмина Т. А. и Лошакова Н. И. Образцы прядильного и масличного льна (*Linum usitatissimum* L.) — источники эффективных генов устойчивости к фузариозному увяданию и ее зависимость от температуры. *С.-х. биология*, **51** (3), 310–317 (2016). DOI: 10.15389/agrobiology.2016.3.310rus
- Рожмина Т. А., Пролётова Н. В. и Ушаповский И. В. Изучение контроля устойчивости к фузариозному увяданию (*Fusarium oxysporum* f. *lini*) на начальных этапах селекционного процесса льна-долгунца Кормопроизводство, HYPERLINK “https://elibrary.ru/contents.asp?id=50173285&selid=50173290” **9**, 22–26 (2022).
- Kourelis J. and van der Hoorn R. A. L. Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *Plant Cell*, **30** (2), 285–299 (2018). DOI: 10.1105/tpc.17.00579J.
- Jones J. D. G. and Dangl J. L. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **444** (7117), 323–329 (2006). DOI: 10.1038/nature05286
- Tsuda L., Inoue Y. H., Yoo M. A., Mizuno M., Hata M., Lim Y. M., Adachi-Yamada T., Ryo H., Masamune Y., and Nishida Y. A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the raf kinase in *Drosophila*. *Cell*, **72**, 407–414 (1993).
- Künstler A., Bacsó R., Gullner G., Hafez Y. M., and Király L. Staying alive — is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **93**, 75–84 (2016). DOI: 10.1016/j.pmpp.2016.01.003
- Zhong Y. and Cheng Z. M. A unique RPW8-encoding class of genes that originated in early land plants and evolved through domain fission, fusion, and duplication. *Sci. Rep.*, **6**, 32923 (2016). DOI: 10.1038/srep32923
- Balint-Kurti P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol. Plant Pathol.*, **20** (8), 1163–1178 (2019). DOI: 10.1111/mpm.12821
- de Araújo A. C., Fonseca F. C. D. A., Cotta M. G., Alves G. S. C., and Miller R. N. G. Plant NLR receptor proteins and their potential in the development of durable genetic resistance to biotic stresses. *Biotechnol. Res. Innovation*, **3**, 80–94 (2019).
- Block A., Alfano J. R. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 39–46 (2011). DOI: 10.1016/j.mib.2010.12.011
- Dmitriev A. A., Krasnov G. S., Rozhmina T. A., Novakovskiy R. O., Snezhkina A. V., Fedorova M. S., Yurkevich O. Yu., Muravenko O. V., Bolsheva N. L., Kudryavtseva A. V., and Melnikova N. V. Differential gene expression in response to *Fusarium oxysporum* infection in resistant and susceptible genotypes of flax

- (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biol.*, **17** (Suppl. 2), Art. 253 (2017). DOI: 10.1186/s12870-017-1192-2
17. Galindo-González L. and Deyholos M. K. RNA-seq Transcriptome Response of Flax (*Linum usitatissimum* L.) to the Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Front. Plant Sci.*, **24** (7), 1766 (2016). DOI: 10.3389/fpls.2016.01766
 18. Boba A., Kostyn K., Kozak B., Zalewski I., Szopa J., and Kulma A. Transcriptomic profiling of susceptible and resistant flax seedlings after *Fusarium oxysporum lini* infection. *PLoS One*, **16** (1), e0246052 (2021). DOI: 10.1371/journal.pone
 19. Spielmeier W., Green A., Bittisnich D., Mendham N., and Lagudah E. S. Identification of quantitative trait loci contributing to Fusarium wilt resistance on an AFLP linkage map of flax (*Linum usitatissimum*). *Theor. Appl. Genet.*, **97**, 633–641 (1998). DOI: 10.1007/s001220050939
 20. Spielmeier W., Lagudah E. S., Mendham N., and Green A. G. Inheritance of resistance to flax wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* Schlecht) in a doubled haploid population of *Linum usitatissimum* L. *Euphytica*, **101**, 287–291 (1998).
 21. Kanapin A., Bankin M., Rozhmina T., Samsonova A., and Samsonova M. Genomic regions associated with Fusarium wilt resistance in flax. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12383 (2021). DOI: 10.3390/ijms222212383
 22. Takagi H., Abe A., Yoshida K., Kosugi S., Natsume S., Mitsuoka C., Uemura A., Utsushi H., Tamiru M., Takuno S., Innan H., Cano L. M., Kamoun S., and Terauchi R. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J.*, **74**, 174–183 (2013). DOI: 10.1111/tpj.12105
 23. Magwene P. M., Willis J. H., and Kelly J. K. The statistics of bulk segregant analysis using next generation sequencing. *PLoS Comput. Biol.*, **7**, e1002255 (2011).
 24. Рожмина Т. А. Селекционно-ценные гены устойчивости к фузариозному увяданию у льна. Достижения науки и техники АПК, **29** (12), 47–49 (2015).
 25. Li H. and Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25** (14), 1754–1760 (2009). DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324
 26. Tello D., Gil J., Loaiza C. D., Riascos J. J., Cardozo N., and Duitama J. NGSEP3: accurate variant calling across species and sequencing protocols. *Bioinformatics*, **35** (22), 4716–4723 (2019). DOI: 10.1093/bioinformatics/btz275
 27. Singh V. K., Khan A. W., Jaganathan D., Thudi M., Roorkiwal M., Takagi H., Garg V., Kumar V., Chitiki-neni A., Gaur P. M., Sutton T., Terauchi R., and Varshney R. K. QTL-seq for rapid identification of candidate genes for 100-seed weight and root/total plant dry weight ratio under rainfed conditions in chickpea. *Plant Biotechnol. J.*, **14** (11), 2110–2119 (2016). DOI: 10.1111/pbi.12567
 28. Chen Y., Chen Y., Shi C., Huang Z., Zhang Y., Li S., Li Y., Ye J., Yu C., Li Z., Zhang X., Wang J., Yang H., Fang L., and Chen Q. Soapnuke: a mapreduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. *GigaScience*, **7** (1), 1–6 (2018). DOI: 10.1093/giga-science/gix120
 29. Ewing B., Hillier L., Wendl M. C., and Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, **8** (3), 175–185 (1998). DOI: 10.1101/gr.8.3.175
 30. You F. M. and Cloutier S. Mapping quantitative trait loci onto chromosome-scale pseudomolecules in flax. *Methods Protoc.*, **3**, 28 (2020). DOI: 10.3390/mps3020028
 31. D. R. Metcalfe and S. B. Helgason. Inheritance of loose smut resistance. *Can. J. Plant Sci.*, **42**, 472–480 (1962). DOI: 10.4141/cjps62-075
 32. Sun X., Han G., Meng Z., Lin L., and Sui N. Roles of Malic Enzymes in Plant Development and Stress Responses. *Plant Signal. Behav.*, **14** (10), e1644596 (2019). DOI: 10.1080/15592324.2019.1644596
 33. Romeis T. Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4** (5), 407–414 (2001). DOI: 10.1016/s1369-5266(00)00193-x
 34. Liu Z., Hou S., Rodrigues O., Wang P., Luo D., Munemasa S., Lei J., Liu J., Ortiz-Moreno F. A., Wang X., Nomura K., Yin C., Wang H., Zhang W., Zhu-Salzman K., He S. Y., He P., and Shan L. Phytocytokine signalling reopens stomata in plant immunity and water loss. *Nature*, **605** (7909), 332–339 (2022). DOI: 10.1038/s41586-022-04684-3
 35. Berkey R., Zhang Y., Ma X., King H., Zhang Q., Wang W., and Xiao S. Homologues of the RPW8 Resistance Protein Are Localized to the Extrahaustorial Membrane that Is Likely Synthesized De Novo. *Plant Physiol.*, **173** (1), 600–613 (2017). DOI: 10.1104/pp.16.01539
 36. C. Zheng, K. Y. Rashid, S. Cloutier, et al., In: *The FlaxGenome. Compendium of Plant Genomes*. Ed by F. M. You and B. Fofana (Springer, 2023), pp. 121–148.
 37. Yao N. and Greenberg J. T. Arabidopsis ACCELERATED CELL DEATH2 modulates programmed cell death. *Plant Cell*, **18** (2), 397–411 (2005). DOI: 10.1105/tpc.105.036251
 38. He K. and Wu Y. Receptor-like kinases and regulation of plant innate immunity. *Enzyme*, **40**, 105–142 (2016). DOI: 10.1016/bs.enz.2016.09.003

Identification of Two QTLs Controlling Flax Resistance to Fusarium Wilt

T.A. Rozhmina*, A.A. Kanapin**, M.P. Bankin**, and M.G. Samsonova**

*Federal Research Centre for Bast Crops, Komsomolsky prosp. 17/56, Tver, 170041 Russia

**Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytechnicheskaya ul. 29, Saint-Petersburg, 195251 Russia

Bulk segregant analysis was applied to the evaluation of F₂ population developed by crossing two flax cultivars which differ in the resistance genes to Fusarium wilt. The causative agent of this disease, the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, is one of the main flax pathogens causing enormous economic damage to the linen industry worldwide. DNA pools of highly resistant and susceptible F₂ plants to Fusarium wilt were sequenced and subsequent data analysis identified two regions on chromosomes 9 and 13 that conferred resistance to Fusarium wilt. Candidate genes for subsequent analysis were selected by functional gene annotation and by analyzing the expression of genes in QTL regions based on data generated in transcriptomic experiment made with the infected flax cultivar Atalante resistant to Fusarium. By combining these two approaches, three candidate genes were identified within each of QTL regions which, according to the literature data, are involved in the plant response to infection and have been differentially expressed in the transcriptomics experiment.

Keywords: flax; Fusarium wilt, resistance, QTL, bulk segregant analysis

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПЛАНАРИЙ *Schmidtea mediterranea*

© 2024 г. Г.В. Кузнецов*, Д.Е. Митьковский**, Н.Д. Крещенко*,.#

*Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», ул. Институтская, 3, Пушкино, Московская обл., 142290, Россия

#E-mail: nkreshch@rambler.ru

**Серпуховский колледж, ул. Центральная, 154, Серпухов, Московская область, 142207, Россия

Поступила в редакцию 10.08.2023 г.

После доработки 22.11.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Нервная система планарий представлена головным ганглием в переднем отделе тела и парой хорошо выраженных брюшных нервных стволов, простирающихся вдоль всего тела животного. Серотонинергические компоненты нервной системы определяли непрямым иммуоцитохимическим методом окраски тотальных препаратов тканей планарий *Schmidtea mediterranea* с последующим анализом с помощью флуоресцентного микроскопа. Присутствие серотонинергических компонентов было обнаружено в центральных и периферических отделах нервной системы планарий *S. mediterranea*. Проведены измерения морфологических параметров серотонин-иммунопозитивных структур, а также подсчет числа нейронов в головном ганглии. Измерения проводили на микрографиях, полученных с окрашенных тотальных препаратов с помощью цифровой фотокамеры. Учитывали размер серотониновых нейронов в трех областях тела, толщину нервных стволов и головного ганглия, расстояние между нервными стволами и комиссурами. Впервые получены новые количественные данные, характеризующие морфологические свойства нервной системы планарий *S. mediterranea*. Также наблюдали за регенерацией глаз планарий после декапитации и воздействия серотонином. Обнаружено, что экзогенный серотонин в концентрации 0.01–1.00 мкМ ускорял дифференцировку глаз в ходе регенерации головного конца планарий *S. mediterranea*.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия, планарии, нервная система, серотонин, морфометрия, регенерация.

DOI: 10.31857/S0006302924010081, EDN: RCZGGL

Плоские черви (тип Platyhelminthes) представляют собой процветающую группу животных, у которых впервые появляется билатеральная симметрия и происходит централизация нервной системы. Изучение паразитических плоских червей, вызывающих опасные заболевания человека и сельскохозяйственных животных, чрезвычайно важно с медицинской и экономической точки зрения. Свободноживущие же представители плоских червей — планарии (класс Turbellaria) давно используются в качестве модельного биологического объекта при изучении процессов регенерации, биологии стволовых клеток, развития и эволюции нервной системы, и механизмов мышечного сокращения [1–6]. Геном планарий *Schmidtea mediterranea* секвенирован [7], что позволяет ученым проводить большинство молекулярно-биологических исследований с использованием данного вида [8, 9].

Микроскопические и ультраструктурные исследования выявили, что нервная система у представителей плоских червей ортогонального типа: она состоит из головных нервных ганглиев и трех пар продольных нервных стволов — дорсальных, брюшных и латеральных, соединенных между собой поперечными нервными комиссурами [10–12]. Клетки ортогона содержат главным образом двигательные и ассоциативные нейроны. Парный головной ганглий называется эндоном. Он представлен нейропилем — внутренней частью, состоящей из нервных отростков, и окружающим его скоплением нервных клеток (тел нейронов). Нейропиль состоит из тонких немиелинизированных отростков нервных клеток, которые тесно прилегают друг к другу, тела нейронов головного ганглия, как правило, расположены на его периферии [13, 14]. Брюшные нервные стволы образованы скоплениями нервных клеток и нервных волокон.

У планарий в передней части тела имеется головной ганглий и пара хорошо выраженных продольных брюшных нервных стволов. Планарии обладают и развитой периферической нервной системой, состоящей из субэпителиального и субмышечного нервных плексусов, а также глоточной нервной сетью и сетью, обеспечивающей иннервацию репродуктивных органов у видов, размножающихся половым путем [15]. Субэпителиальная нервная сеть представляет собой скопления чувствительных клеток со свободными нервными окончаниями [16]. Ранее при изучении морфологии нервной системы была показана большая гетерогенность популяции нервных клеток, связанная с размером и плотностью секретируемых ими везикул, и структурой синапсов нейронов. Так, в проведенном ультраструктурном исследовании [17, 18] было обнаружено, что нейроны планарий подразделяются на три основных типа. Наиболее распространен тип нейронов, содержащих плотные везикулы, они могут быть уни-, би- и мультиполярными. Второй тип — пептидэргические нейроны, содержащие большие везикулы, это уни- и биполярные нейроны. Третий тип — сенсорные нейроны, обычно биполярные.

Нервные клетки планарий при отсутствии у этих животных настоящей эндокринной системы обладают способностью к нейросекреции [17, 19–21]. С помощью ряда радиоиммунологических, гистохимических и ультраструктурных методов в нейронах планарий обнаружено присутствие классических нейротрансмиттеров, характерных для высших многоклеточных. В нервной системе планарий описана ацетилхолинэстеразная активность (у *Dugesia lugubris*, *Bdellocephala punctata*, *Planaria torva* [22] и *Provortex karlingi* [23]), показано присутствие ацетилхолина у *Procotyla fluviatilis* [24] и *Planaria torva* [25]. Катехоламины — дофамин и норадреналин — были идентифицированы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в экстракте тканей планарий *Dugesia tigrina*, *P. fluviatilis* и *Phagocata oregonensis* [26], а также у некоторых других турбеллярий [27, 28]. Гистамин-положительные клетки наблюдали в нервной системе *Polycelis nigra* и *Microstomum lineare* [29]. В нервных волокнах и клетках глоточной нервной системы планарий *D. tigrina* выявлен оксид азота [30]. Присутствие гамма-аминобутириловой кислоты было показано с помощью иммуноцитохимического метода и ВЭЖХ у *D. tigrina* [31], а также в тканях *Dugesia japonica* с помощью *in situ* гибридизации [32]. В нейронах планарий обнаружены нейропептиды, такие как соматостатин, мет-энкефалин, нейротензин и в-эндорфин [33–37]. Субстанция Р выявлена у *Stenostomum leucops* и *M. lineare* [38]. В нервной системе планарий *D. tigrina* был идентифицирован нейропептид F [13], а у *Artioposthia triangulata* [39],

D. tigrina и *Bdelloura candida* выявлены FMRF-подобные пептиды [40, 41]. Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что нервная система этих животных является хорошо дифференцированной и специализированной. В ней присутствуют нейромедиаторы, свойственные позвоночным животным, а также специфические для данного таксона.

Настоящая работа посвящена идентификации биогенного амина серотонина у планарий *Schmidtea mediterranea* (Turbellaria, Platyhelminthes) с помощью иммуноцитохимического метода, позволяющего на современном уровне изучать нервную систему с использованием специфических антител, а также применения флуоресцентной или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Задачами настоящего исследования являются определение морфологических параметров серотонинэргических компонентов нервной системы планарий *S. mediterranea* и изучение функции серотонина у планарий. Впервые получены значительные количественные данные о числе и размерах серотонин-иммунопозитивных нервных компонентов. В статье также представлен обзор существующих литературных данных, посвященных изучению серотонина у планарий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект. Лабораторных планарий *Schmidtea mediterranea* (рис. 1а) содержали в аквариумах с водопроводной и дистиллированной водой в соотношении 2:1, в затененном помещении при температуре 19–21°C. На дно аквариума помещены плоские камни, под поверхностью которых животные любят собираться. Воду в аквариумах меняли один раз в 3–4 месяца. Кормили планарий два раза в неделю личинками насекомых (мотылем). После кормления остатки пищи удаляли со дна аквариума. Перед опытом животных оставляли голодными в течение 7 суток. Для иммуноцитохимического окрашивания отбирали особей размером 9–10 мм.

Иммуноцитохимический метод. Планарий *S. mediterranea* ($n = 12$ особей) плоско фиксировали, помещая их между предметным и покровным стеклом в каплю свежеприготовленного 4%-го параформальдегида (ПФА, МР Biomedicals, США) на 0.1 М фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7.4 (Helicon, Россия) на 2 ч при комнатной температуре, затем переносили в пробирки типа Eppendorf на 1.5 мл в параформальдегид на 4 ч при 4°C. После этого образцы промывали в 0.1 М фосфатно-солевом буфере, содержащем 0.3% Тритона X-100 (МР Biomedicals, Франция), 0.1% азида натрия (Helicon, Россия) и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (Amresco, Канада)

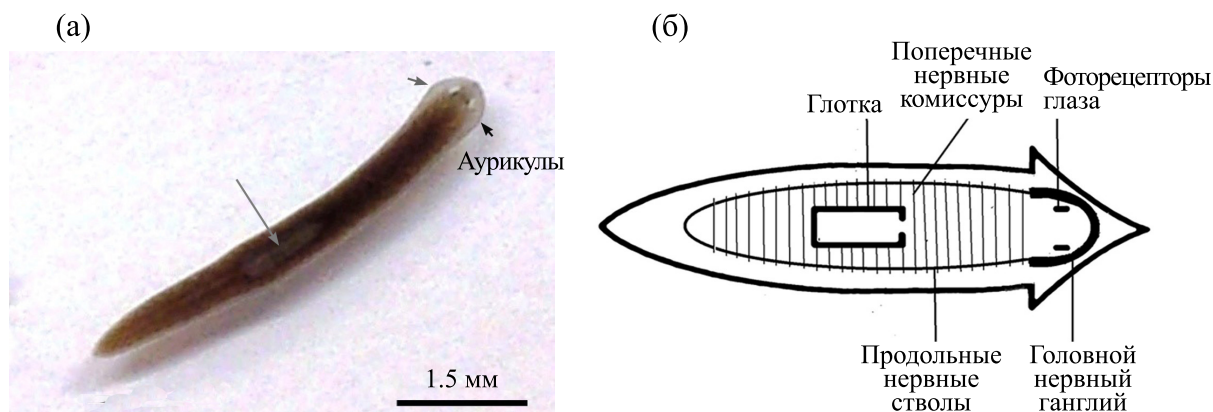


Рис. 1. Планария *Schmidtea mediterranea*: (а) — прижизненное фото, (б) — схема строения нервной системы планарий.

при 4°C в течение 18 ч. Полученные тотальные препараты планарий окрашивали с помощью коммерческих антител к серотонину. Для этого препараты инкубировали в течение 5 суток при 4°C с первичными антителами (Immunostar, США, разведение 1:500), полученными у кролика, затем промывали фосфатно-солевым буферным раствором с Тритоном X-100 в течение 24 ч и помещали во вторичные AlexaFluor488-меченые иммуноглобулины (козьи-антикроличьи, Abcam, США, в разведении 1:500 на фосфатно-солевом буфере) на 4 суток в темное место при 4°C. После этого промывали в фосфатно-солевом буфере в течение 2 ч. Затем препараты заключали в 75%-й раствор глицерина (Helicon, Россия) на фосфатно-солевом буфере под покровное стекло (Menzel-Glaser, Германия) и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Для контроля специфичности иммуноцитохимической окраски использовали по пять препаратов планарий. В качестве контроля окраски образцы инкубировали: (а) — только с вторичными иммуноглобулинами без использования первичных антител, (б) — использовали неиммунную сыворотку вместо первичной антисыворотки. Оба контроля показали отсутствие окраски в тканях планарий.

Микроскопия. Препараты планарий анализировали с помощью светового и флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B (Leica, Германия), оснащенного цифровой фотокамерой DC300F (Leica Microsystems, Германия). Для анализа в проходящем свете использовали фильтр ВФ (bright field). Для анализа локализации флуорохрома AlexaFluor488 использовали флуоресцентный фильтр I3 со спектром возбуждения при 450–490 нм и спектром эмиссии при 515 нм. Микрофотографии, полученные с помощью светового и флуоресцентного микроскопа, сохраняли и анализировали.

Компьютерная морфометрия изображений.

Морфометрический анализ параметров нервной системы планарий, таких как размеры головного нервного ганглия, серотониновых нейронов, расстояние между нервными стволами и комиссурами, осуществляли на изображениях, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа. Измерения проводили с помощью программы AxioVision Rel 4.8.1.0. (AxioVision, Carl Zeiss, Германия). Для каждого морфологического параметра выполняли не менее пяти измерений. Определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение измеряемых морфологических показателей нервной системы (табл. 1 и данные в тексте). Для максимальных и минимальных значений размеров нейронов применили следующий алгоритм: для полученного массива измерений считали медиану, затем отбирали все величины, которые больше медианы (как группу максимума), а те, которые меньше медианы, составили группу минимума. Для этих двух групп стандартно вычисляли среднее значение и стандартное отклонение. Расчеты проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007. Для создания иллюстраций использована программа Adobe Photoshop CS2 10.0. (Adobe Systems Inc., США). Статистический анализ морфологических показателей нервной системы (табл. 1) был проведен с помощью критерия Стьюдента (непарного two-tailed теста, для доверительного уровня 95%, при котором значение $P < 0.05$). Для этого использовали статистическую программу GrafPad Prizm 3 (Graphpad Software, Inc., США).

Регенерация глаз. В подопытную и контрольную группу отбирали особей *S. mediterranea* одинакового размера (6–7 мм). Животных перед экспериментом выдерживали голодными в течение 7 суток. В ходе операции животным отсекали головной конец тела, примерно 1/6 части тела. Прооперированных особей помещали в стеклянные стаканчики, содержащие 150 мл воды (кон-

Таблица 1. Морфологические параметры серотонинергических компонентов в нервной системе планарий *S. mediterranea*

Параметры нервной системы	Головной отдел (1)	Середина тела (2)	Хвостовой отдел (3)
Толщина дуги головного ганглия	130.7 ± 3.7 ($n = 15$)	—	—
Расстояние от кончика головы до головного ганглия	275.8 ± 4.4 ($n = 5$)	—	—
Расстояние от бокового края тела до нервного ствола	386.6 ± 9.6 ($n = 10$)	408.1 ± 53.1 ($n = 10$) $P1 < 0.2723$ ns	330 ± 51.1 ($n = 10$) $**P2 < 0.0057$ $**P3 < 0.0033$
Толщина нервных стволов	93.3 ± 9.6 ($n = 20$)	74.5 ± 16.1 ($n = 23$) $***P1 < 0.0001$	45.3 ± 5.1 ($n = 20$) $***P2 < 0.0001$ $***P3 < 0.0001$
Расстояние между нервными стволами	447.2 ± 44.5 ($n = 14$)	477.2 ± 31.1 ($n = 16$) $*P1 < 0.0396$	251.8 ± 30.8 ($n = 18$) $***P2 < 0.0001$ $***P3 < 0.0001$
Расстояние между комиссурами	71.6 ± 8.1 ($n = 15$)	95.5 ± 19.9 ($n = 18$) $***P1 < 0.0002$	71.2 ± 9.9 ($n = 22$) $P2 < 0.8655$ ns $***P3 < 0.0001$
Длина нейронов (max)	17.3 ± 1.6 ($n = 19$)	17.2 ± 1.3 ($n = 23$)	15.7 ± 1.0 ($n = 25$)
Длина нейронов (min)	13.5 ± 1.5 ($n = 19$)	14.3 ± 1.1 ($n = 23$)	12.9 ± 1.1 ($n = 25$)
Длина нейронов (средний)	15.4 ± 2.4 ($n = 38$)	15.8 ± 1.8 ($n = 46$) $P1 < 0.46$ ns	14.3 ± 1.7 ($n = 50$) $*P2 < 0.0176$ ns $***P3 < 0.0002$
Ширина нейронов (max)	11.5 ± 0.9 ($n = 17$)	12.2 ± 0.9 ($n = 23$)	10.7 ± 1.8 ($n = 24$)
Ширина нейронов (min)	9.7 ± 0.8 ($n = 21$)	10.1 ± 0.8 ($n = 23$)	10.2 ± 1.1 ($n = 26$)
Ширина нейронов (средний)	10.4 ± 1.2 ($n = 38$)	11.1 ± 1.4 ($n = 46$) $*P1 < 0.0334$	10.5 ± 1.4 ($n = 50$) $P2 < 0.9669$ ns $*P3 < 0.0351$
Длина нейронов нервного плексуса	14.5 ± 1.5 ($n = 30$)	14.8 ± 1.5 ($n = 30$) $P1 < 0.5162$ ns	15.3 ± 1.6 ($n = 30$) $P2 < 0.0505$ ns $P3 < 0.1791$ ns
Ширина нейронов нервного плексуса	9.2 ± 0.9 ($n = 30$)	10.1 ± 1.3 ($n = 30$) $**P1 < 0.0038$	11.1 ± 1.3 ($n = 30$) $***P2 < 0.0001$ $**P3 < 0.0029$

Примечание. $P1$ — значение вероятности различий средних значений в колонках 1 и 2; $P2$ — в колонках 1 и 3; $P3$ — в колонках 2 и 3; ns — нет статистически значимых различий. Данные представлены в мкм как среднее $\pm$ стандартное отклонение, n — число измерений.

трольная группа) или свежеприготовленного раствора серотонина в концентрации 1.0 и 0.1 мкМ (подопытные группы) и оставляли регенерировать в темноте при $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Опыты проводили методом слепого контроля, наблюдателю не было известно, какая группа контрольная, а какая подопытная. Начиная с третьих суток после операции в одно и то же время каждую планарию просматривали под бинокулярным микроскопом Stemi DV4 (Carl Zeiss, Германия), оценивая появление глаз и стадию их дифференцировки. Визу-

альные наблюдения сопровождались прижизненной фотосъемкой с помощью цифровой фотокамеры Scopetek DCM130E («Микромед», Россия), соединенной с бинокулярным микроскопом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммуноцитохимическое определение серотонина в нервной системе планарий *S. mediterranea*. На дорзальной стороне головного отдела тела расположена пара глаз (рис. 1а, 2а, 3а) и «ушек», или

аурикул. Иммуоцитохимическое исследование тотальных препаратов выявило наличие серотонин-иммунопозитивной окраски в нервной системе *S. mediterranea*. У планарий обнаружено обилие серотонин-иммунопозитивных клеток и нервных волокон (нейритов). Серотонин-иммунопозитивные нейроны и их отростки выявлены в составе головного нервного ганглия, пары брюшных нервных стволов и нервных комиссур (рис. 2), входящих в состав центральной нервной системы планарий. Головной нервный ганглий расположен в переднем отделе тела и имел форму дуги (рис. 1б, 2б). Внутренняя часть окрашенного антителами к серотонину головного ганглия, как и нервных стволов, состоит из тонких серотонин-иммунопозитивных нервных волокон (рис. 2б). На тотальных препаратах планарий в головном конце тела удалось насчитать 150.9 ± 8.8 (число особей $n = 9$) на площади 850–920 мкм². У *S. mediterranea* тела серотонин-иммунопозитивных нейронов располагались в основном по периферии головного ганглия. Число серотониновых нейронов, ассоциированных с дугой головного ганглия, составило 75.6 ± 3.4 (число особей $n = 5$).

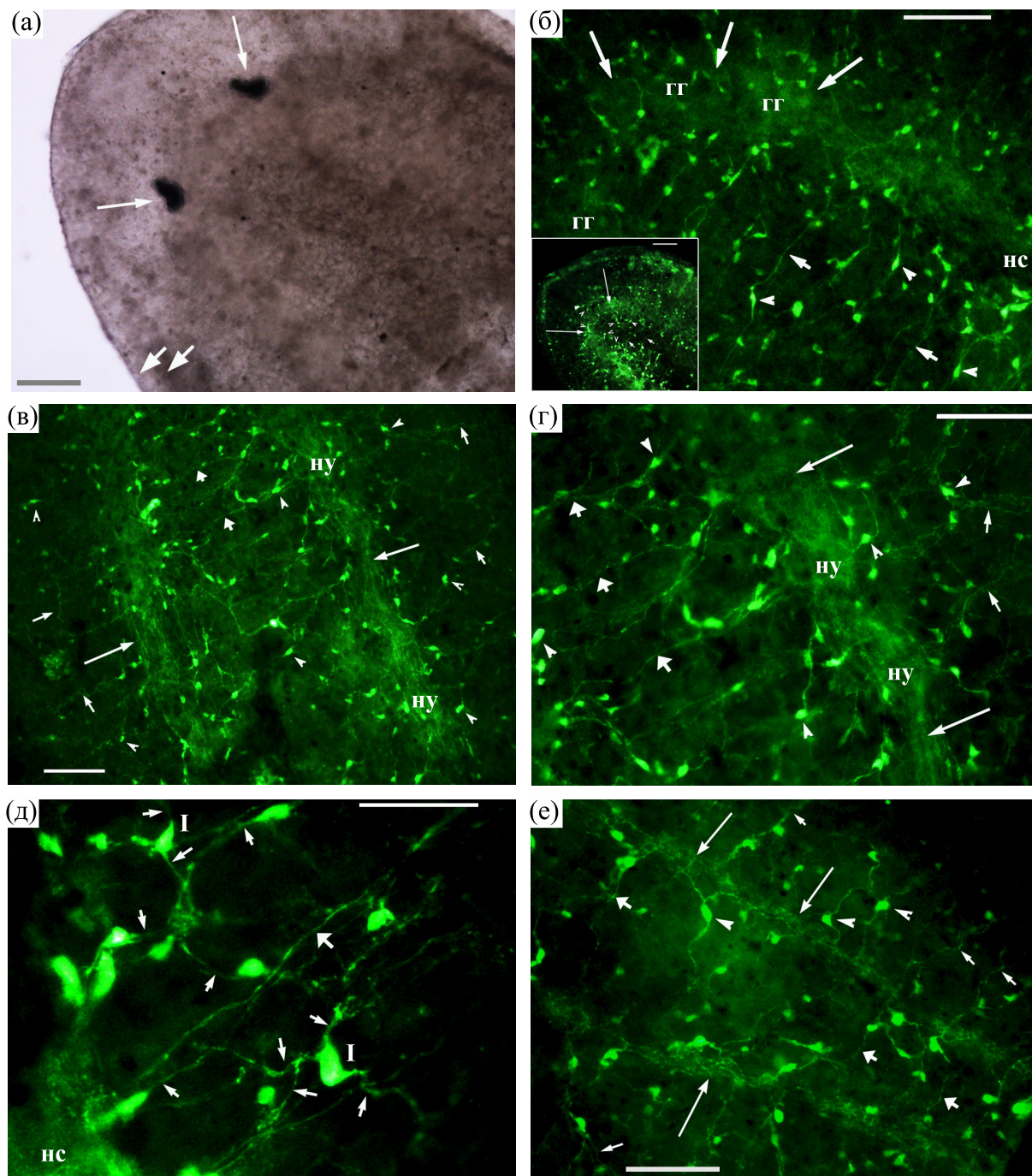
Оказалось, что вдоль внутренней поверхности дуги головного ганглия располагается больше серотонинергических нейронов, чем по его внешней поверхности, соотношение составляет примерно 65:35%. По нашим наблюдениям, в головном ганглии распространены униполярные и псевдоуниполярные нейроны, биполярные нейроны видны нечасто, и расположены они преимущественно с внутренней стороны ганглия, редко можно заметить мультиполярные нейроны. Средние размеры нейронов головного конца тела, и толщина дуги головного ганглия, а также глубина его залегания указаны в табл. 1.

Брюшные нервные стволы берут начало от головного ганглия и тянутся вдоль всего тела к хвостовому концу планарии (рис. 2в–д). Брюшные нервные стволы связаны поперечными тонкими нервными комиссурами (рис. 1б, 2в–д). Тела серотонин-иммунопозитивных, в основном мультиполярных нейронов расположены по периферии нервных стволов. По внутренней границе нервных стволов распространены биполярные нейроны, по внешней — псевдоуниполярные. Вдоль нервных комиссур хорошо заметны вытянутые веретенообразные тела биполярных серотонин-иммунопозитивных нейронов, входящих в состав комиссуры (рис. 2б). Между двумя нервными стволами по всей длине тела животного расположено множество мультиполярных нейронов, имеющих не менее трех отростков (от трех до четырех-пяти), вероятно, также входящих в состав комиссур или просто ответвлений, формирующих внутреннюю нервную сеть (рис. 2д). Наблюдаются периодические утолщения нервных

стволов — нервные узлы. В нервных узлах отмечена большая аккумуляция нейронов — от 5 до 8 (рис. 2в,г). Толщина нервных стволов в области нервного узла примерно вдвое больше толщины нервного ствола вне узла, указанной в табл. 1. Толщина нервных стволов планарий изменяется от наибольшей в головном отделе тела до минимальной в хвостовом отделе (табл. 1). В головном и хвостовом отделах расстояния между нервными комиссурами сравнительно небольшие, а в центральном отделе расстояние между комиссурами увеличивается (табл. 1), при этом повышается их разветвленность и увеличивается количество ответвлений. Это может быть связано с иннервацией важной области тела — окологлоточной, расположенной как раз в центральном районе: здесь находится ротовое отверстие и глоточный карман, в котором лежит мускулистая глотка, принимающая активное участие в поглощении пищи.

Выявлены многочисленные серотонин-иммунопозитивные нервные волокна, направляющиеся от нервного ствола к боковому краю тела, разветвляющиеся (рис. 2в,г,е). Между боковым краем тела и нервным стволом расположены тела мультиполярных серотонин-иммунопозитивных нейронов, реже биполярных, форма тел нейронов округлая или овальная. Вместе многочисленные серотонин-иммунопозитивные нервные волокна и тела нейронов составляют периферические отделы нервной системы, а именно субмышечный и субэпителиальный нервные плексусы. Нейроны плексуса, расположенные в головном отделе тела, пусть и незначительно, но уступают в размерах нейронам головного ганглия. Нейроны нервного плексуса в центральном отделе примерно соответствуют по размерам нейронам, ассоциированным с нервными стволами. Нейроны нервного плексуса в хвостовом отделе, пусть и незначительно, но превосходят по размерам нейроны, связанные с нервными стволами хвоста (табл. 1). По нашим наблюдениям, в первой трети тела нейроны нервного плексуса имеют преимущественно овальную или прямоугольную форму; во второй трети тела — преимущественно округлую или веретенообразную; в третьей — тела серотонин-иммунопозитивных нейронов чаще неправильной формы («звезды», «кляксы»). Таким образом, варьирование размера и формы серотониновых нейронов, а также числа нейритов, отходящих от тела клетки (уни-, би- и мультиполярность) могло зависеть, вероятно, как от места их локализации в теле планарии, так и от возможной функциональной роли.

Влияние серотонина на регенерацию глаз у планарий *S. mediterranea*. При проведении опытов у планарий *S. mediterranea* наблюдали за динамикой появления глаз (или фоторецепторов) после отсечения головного конца тела. Всего было прооперировано более 850 животных. Регенерация



глаз у *S. mediterranea* проходила в разных группах с третьих по пятые сутки после операции. За это время их структура претерпевала несколько стадий развития: сначала может появиться один глаз, а затем второй; иногда, если появилось сразу два глаза, то один из них может быть развит слабее, чем второй; кроме того, даже если оба глаза уже видны на третьей или четвертые сутки регенерации, они все еще достаточно слабо развиты, по сравнению с интактными глазами (рис. 36,в).

Максимальное число особей *S. mediterranea* с дифференцированными фоторецепторами наблюдали в большинстве групп на четвертые сутки регенерации. В каждой из групп число особей с фоторецепторами в разной степени дифференцировки варьировало, вероятно, в зависимости от индивидуальной регенерационной способности. При этом с каждым днем увеличивалось число более развитых глаз, к четвертым-пятым суткам регенерации происходило усиление степени диф-

Рис. 2. Микрофотографии препаратов планарий *Schmidtea mediterranea*: (а, б) — головной, (в–д) — срединный, (е) — хвостовой отделы тела. На всех микрофотографиях ориентация головного конца тела планарии — к верхнему левому углу, как на (а). Иммуноцитохимическая окраска к серотонину (зеленым на цветных, светлым — на черно-белых); (а) — световая, (б)–(е) — флуоресцентная микроскопия; тотальные препараты. (а) — Головной конец тела, общий вид с парой простых глаз (или фоторецепторов), расположенных на дорзальной поверхности (длинные стрелки), и аурикулами (толстая стрелка). (б) — Окраска к серотонину в головном ганглии (гг), имеющем форму дуги — врезка (длинные стрелки), поперечные комиссуры (тонкие короткие стрелки) соединяют ганглии и нервные стволы (нс) в головном отделе тела. Отмечены тела серотонинергических нейронов (острия стрелок) в головном ганглии и пространстве между нервными стволами. (в) — Срединный отдел туловища, серотонин-иммунопозитивных волокна в нервных стволах (длинные стрелки) с утолщениями — нервными узлами (ну) — и в поперечных нервных комиссурах (тупые короткие стрелки), тела серотонин-иммунопозитивных нейронов отмечены остриями стрелок. (г) — Большее увеличение, середина тела, отмечены нервные стволы (длинные стрелки), нервные узлы (ну) и серотонин-иммунопозитивные нервные комиссуры (тупые короткие стрелки), тела би- и мультиполярных нейронов (острия стрелок), заметны волокна субмышечного нервного плексуса (короткие тонкие стрелки) между нервными стволами и боковыми краями тела. (д) — Большее увеличение средней части тела с многочисленными телами нейронов, два мультиполярных нейрона отмечены (I), а также их отростками (тонкие короткие стрелки), расположенными между нервными стволами, виден левый ствол (нс), и тонкими поперечными комиссурами, одна из которых отмечена короткой тупой стрелкой. (е) — Хвостовой отдел тела, нервные стволы истончаются (длинные стрелки), комиссуры менее заметны (тупые короткие стрелки), тела серотонин-иммунопозитивных нейронов отмечены остриями стрелок, а волокна нервного плексуса — тонкими короткими стрелками. Масштаб: (а)–(г), (е) — 100 мкм; (д) — 50 мкм.

ференцированности фоторецепторов за счет добавления пигментных и светочувствительных клеток, далее дифференцировка глаз должна продолжаться до полного их восстановления. Итак, мы показали, что процесс регенерации глаз у планарий поддается качественному и количественному анализу.

Изучение влияния серотонина на регенерацию показало, что он ускоряет дифференцировку фоторецепторов в подопытных группах планарий. Так, на третьи-четвертые сутки регенерации процент особей с двумя глазами был больше в подопытных группах, чем в контрольных, в семи опытах из восьми (табл. 2), проведенных в разное время. При этом в одном опыте с концентрацией серотонина 10 мкМ эффект не был выявлен. Таким образом, серотонин оказывал положительное влияние на регенерацию глаз в концентрациях 0.01–1.00 мкМ. Исследования в данном направлении продолжаются.

ОБСУЖДЕНИЕ

Серотонин [42] — широко распространенный нейромедиатор в нервной системе человека и животных. Он обнаружен у большинства животных, стоящих на различных ступенях эволюционной лестницы. Как нейротрансмиттер, серотонин у позвоночных животных регулирует чувство голода, температуру тела, болевую чувствительность, а также модулирует настроение, возбуждение, сексуальное поведение и выделение гормонов.

Серотонин к настоящему времени обнаружен у более чем 40 представителей паразитических червей: трематод, цестод и моногеней [43, 44], с помощью различных методов исследования. Такой интерес к изучению нервной системы паразитических червей связан с их большим медицинским, сельскохозяйственным и экономическим значением. В то же время представителям свободноживущих червей — турбеллярий (или плана-

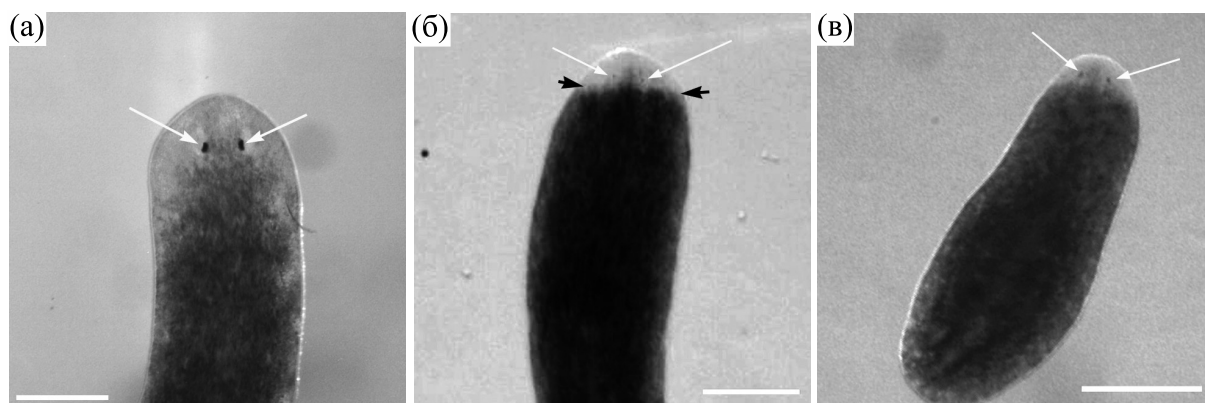


Рис. 3. Планария *Schmidtea mediterranea*: (а) — интактная, хорошо развитые глаза (стрелки); (б) — на третьи сутки после операции, появление двух слабо развитых глаз (длинные стрелки), граница головной регенерационной бластемы отмечена короткими стрелками; (в) — четвертые сутки регенерации фоторецепторов, стрелки. Масштаб: (а) и (б) — 1 мм, (в) — 1.5 мм.

Таблица 2. Регенерация глаз у планарий *Schmidtea mediterranea*, находящихся под воздействием серотонина, количество животных и их процент от общего числа

Дата постановки опыта	Группы	Стадии регенерации, %			Число особей
		Два глаза	Один глаз	Без глаз	
22/11/19 4д	контроль серотонин 10 мкМ	53.0–79.9 54.0–77.1	12.0–17.6 9.0–12.9	3.0–4.4 7.0–10.0	$n = 68$ $n = 70$
30/11/20 3д	контроль серотонин 1 мкМ	8.0–10.7 23.0–30.7 ↑	8.0–10.7 6.0–8.0	59.0–78.7 46.0–61.3	$n = 75$ $n = 75$
24/01/20 4д	контроль серотонин 1 мкМ	36.0–50.7 46.0–66.7 ↑	21.0–29.6 14.0–20.3	14.0–19.7 9.0–13.1	$n = 71$ $n = 69$
21/01/20 4д	контроль серотонин 1 мкМ	47.0–63.5 56.0–76.7 ↑	15.0–20.3 10.0–13.7	12.0–16.2 7.0–9.6	$n = 74$ $n = 73$
22/03/19 4д	контроль серотонин 0.1 мкМ	9.0–36.0 15.0–62.5 ↑	7.0–28.0 6.0–25.0	9.0–36.0 3.0–12.5	$n = 25$ $n = 24$
21/02/19 4д	контроль серотонин 0.1 мкМ	16.0–69.6 26.0–92.9 ↑	4.0–17.4 1.0–3.6	3.0–13.0 1.0–3.6	$n = 23$ $n = 28$
17/06/18 4д	контроль серотонин 0.1 мкМ	61.0–85.9 70.0–92.1 ↑	7.0–9.9 5.0–6.6	3.0–4.2 1.0–1.3	$n = 71$ $n = 76$
15/03/19 4д	контроль серотонин 0.01 мкМ	14.0–40.0 16.0–2.7 ↑	6.0–4.0 4.0–18.2	5.0–20.0 2.0–9.1	$n = 25$ $n = 22$

Примечание. ↑ – Направление эффекта серотонина; 3д, 4д – дни наблюдения.

рий) уделялось гораздо меньше внимания. Серотонин был идентифицирован в тканях нескольких видов планарий: *Dendrocoelum lacteum* [45, 46], *Polycelis nigra* [47], *Dugesia tigrina* [48], *Polycelis tenuis* [46], *Dugesia japonica* [49], *Bipalium kewense* [50]. У *Crenobia alpina* серотонин-положительные клетки связаны с брюшными нервными стволами или разбросаны в периферической нервной сети [51]. У *Castrella truncata* серотонин был выявлен в мозге, трех парах нервных стволов, глоточном нервном кольце [52]. Серотонин был найден в нейронах глотки [48, 53] и центральной нервной системы планарий *Girardia tigrina* и *S. mediterranea* [54–56]. Большинство данных были получены при изучении серийных срезов тканей планарий.

В настоящей работе для идентификации были использованы препараты планарий *S. mediterranea*. Использование тотальных препаратов и иммуноцитохимической окраски к серотонину позволяет проследить взаимоотношения серотонинергических элементов в нервной системе планарий и извлечь максимум информации об их пространственной локализации в различных отделах тела, не прибегая к необходимости реконструкции морфологических данных, полученных с помощью серийных срезов. Проведенные нами

исследования подтвердили присутствие серотонина у планарий *S. mediterranea*. Окраска к серотонину была интенсивной в центральных (головной ганглий, нервные стволы и комиссуры) и периферических (нервные плексусы) отделах нервной системы планарий. Полученные нами данные о локализации серотонинергических нейронов в отделах нервной системы *S. mediterranea* согласуются со сведениями, имеющимися в отношении других видов планарий [46, 47, 55].

В настоящей работе были выявлены дополнительные, не описанные ранее детали строения нервной системы. Так, отмечено большое число серотонин-иммунопозитивных нейронов, расположенных между нервными стволами, а также нервная сеть многочисленных и разветвленных серотонин-иммунопозитивных нервных волокон между нервным стволом и боковой поверхностью тела. Выявлено, что серотонин-иммунопозитивные клетки имели более округлую форму в головной ганглии планарий, а в нервных стволах тела нейронов были более вытянуты вдоль нервных стволов и имели овальную или неправильную форму. Обнаружена специфическая локализация большинства серотонин-иммунопозитивных

клеток по внутренней поверхности головного ганглия и брюшных нервных стволов.

В отношении планарий *S. mediterranea* количественной оценки серотонинергических компонентов не существовало, морфометрический анализ их нервной системы не проводился, исследования были затруднены как достаточно большими размерами этих животных (до 1.2 см в длину), так и трудностью получения качественной иммуноцитохимической окраски. Мы провели окраску нервной системы на тотальных препаратах и впервые получили детальные данные о параметрах серотонинергических компонентов и их распределении в нервной системе планарий *S. mediterranea* с использованием большого числа повторных измерений. Полученные результаты позволили отметить, что наибольшее количество серотониновых нейронов располагается в головном конце планарий, число их уменьшается по направлению к хвостовому концу. Толщина дуги головного ганглия у *S. mediterranea* также превышала толщину отходящих от нее нервных стволов. Толщина стволов постепенно уменьшалась от головного конца тела к хвостовому. Нами впервые получены достоверные статистические данные о различии морфологических параметров, таких как толщина нервных стволов, расстояние между стволами, расстояние между комиссурами, а также размеров серотониновых нейронов, входящих в состав центральной нервной системы, и находящихся в разных зонах тела планарий *S. mediterranea*. Таким образом, полученные нами сведения о размерах и количестве серотонин-иммунопозитивных нейронов в головном ганглии, и морфологических показателях других серотонинергических структур указывают на продвинутый процесс централизации нервной системы планарий в процессе ее эволюции.

Сами по себе морфологические характеристики являются ценным методом количественной оценки компонентов нервной системы у разных видов планарий. Эти сведения могут быть полезны при проведении сравнительного анализа нервной системы у представителей свободноживущих и паразитических видов плоских червей. Помимо этого, знание размерных характеристик интактной нервной системы планарий может быть использовано при изучении дифференцировки серотониновых нейронов в ходе регенерации. Это позволит не только качественно, но и количественно оценивать степень восстановления нервных структур после операции, такие исследования уже начаты в нашей лаборатории.

О физиологической роли серотонина у планарий в литературе имеются немногочисленные данные. Так, серотонин стимулировал двигательную активность взрослых особей и личиночных форм паразитических плоских червей [57, 58]. Се-

ротонин также проявлял возбуждающее влияние на мышечные препараты и изолированные мышечные клетки паразитических червей [59–61]. Роль серотонина, как возбуждающего нейромедиатора, показана и в отношении мускулатуры планарий *Bdelloura candida* [40] и *Procerodes littoralis* [54]. Функциональные тесты выявили положительное влияние серотонина на биение ресничек, покрывающих поверхность тела планарий и способствующих передвижению животных в воде [62]. Наконец, есть отрывочные и давние сведения об участии серотонина в регенерационных процессах у планарий [63].

Помимо изучения морфологических характеристик нервной системы нами в настоящей работе начато исследование функции серотонина в организме планарий *S. mediterranea*. Для этого нами была использована модель регенерации фоторецепторов (глаз) после отсечения головного конца тела. Глаза планарий состоят из фоторецепторных и пигментных клеток, расположенных на дорзальной поверхности тела, с помощью которых животные могут различать интенсивность и направление светового потока [64]. Глаза планарий регенерируют после ампутации головного конца тела. Определены сроки появления глаз в ходе регенерации, так, у планарий *Girardia tigrina* регенерация глаз происходила с третьих по шестые сутки в отсеченных срединных и хвостовых фрагментах тела [65].

В настоящей работе показано, что у планарий процесс регенерации глаз не только поддается качественному описанию с помощью визуального наблюдения, но и описывается с помощью определенных количественных критериев, характерных для группы регенерирующих особей. Разработанные нами показатели регенерации глаз отражают степень их дифференцировки: сначала может появляться один глаз, затем второй, если сразу появляются оба глаза, один из них может быть развит слабее, чем второй, или оба глаза все еще слабо развиты. Ранее при изучении регенерации глаз у планарий *Polycelis tenuis* и *Dugesia tigrina* применялись функциональные тесты, основанные на реакции отрицательного фототаксиса (или избегания света), которая постепенно восстанавливается в ходе регенерации [64]. О биохимической регуляции процесса регенерации фоторецепторов практически ничего не известно. У планарий *G. tigrina* было обнаружено, что серотонин в концентрации 1.0 и 0.1 мкМ ускорял регенерацию глаз в отсеченных срединных фрагментах тела на 5-й день их регенерации [65]. Настоящее исследование продемонстрировало влияние серотонина на регенерацию глаз и у планарий *S. mediterranea*. Ранее зарубежными авторами было показано, что инъекция триптофангидроксилазы, ключевого фермента участвующего в синтезе серотонина, является необходимым условием

восстановления пигментации глаз в ходе их регенерации у планарий после нокаута гена фермента TRH с помощью РНК интерференции [66]. Экспериментальные данные о положительном влиянии серотонина на регенерацию глаз у планарий являются первым шагом для дальнейшего детального изучения наблюдаемого эффекта и выявления клеточных и молекулярных механизмов этого влияния. Исследования процесса регенерации глаз у планарий будут нами продолжены, а результаты будут проанализированы в отдельной статье, посвященной регенерации фоторецепторов, с привлечением литературных молекулярно-биологических данных и обсуждением генов-регуляторов, участвующих в этом процессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена исследованию локализации и функциональной активности биогенного амина, серотонина у планарий. С помощью современного иммуноцитохимического метода, флуоресцентной микроскопии и использования тотальных препаратов, впервые изучены и описаны количественные морфологические характеристики серотонинергических нейронов головного ганглия и нервных стволов у *S. mediterranea*. Результаты позволяют детально охарактеризовать строение нервной системы у изучаемого вида и дополняют имеющиеся сведения о строении нервной системы планарий. Полученные данные и имеющиеся литературные сведения свидетельствуют о широком распространении серотонина в нервной системе представителей Platyhelminthes. Это, в свою очередь, указывает на важное эволюционное значение биогенного амина, который присутствует у животных, находящихся на самых ранних этапах эволюционного развития. Обнаружено влияние серотонина на регенерационные процессы, происходящие в организме планарий *S. mediterranea*. Функциональная роль серотонина у плоских червей остаются мало изученной вследствие почти полного отсутствия лабораторных моделей среди паразитических видов, а также трудности их добывания из природных источников в достаточном количестве. В этой связи планарии, введенные в лабораторную культуру, могут стать удобным биологическим объектом для проведения таких исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе было использовано оборудование Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пушино, Россия).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котикова Е. А. Нервная система *Anoploplidium mediale* (Turbellaria, Anoplodiidae). *Паразитология*, **20** (2), 149–151 (1986).
2. Reuter M. and Gustafsson M. The flatworms nervous system – pattern and phylogeny. In: *The nervous system of Invertebrate - Evolutionary and Comparative Approach.*, Ed. by O. Breidbach and W. Kutsch (Birkhauser Verlag, Basel, 1995), pp. 25–59.
3. Evolution and regeneration of the planarian central nervous system. *Develop. Growth Differ. Develop. Growth Differ.*, **51**, 185–195 (2009). DOI: 10.1111/j.1440-169X.2009.01099.x
4. Durant F., Lobo D., Hammelman J., and Levin M., Physiological controls of large-scale patterning in planarian regeneration: a molecular and computational perspective on growth and form. *Regeneration*, **3** (2), 78–103 (2016). DOI: 10.1002/reg2.54
5. Chachain N. F., Abdulhadi F. S. and Mzhr N. N. Systems of the body as a planaria, biology, ecology and regeneration: a review. *Biochem. Cell. Arch.*, **20** (1), 1619–1622 (2020).
6. Крещенко Н. Д. Изучение механизмов действия FMRF-подобных пептидов на мышечное сокращение у планарий (Platyhelminthes). *Биофизика*, **66** (3), 555–566 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921030157
7. Robb S. M. C., Gotting K., Ross E., and Sanchez Alvarado A. SmedGD 2.0: The Schmidtea mediterranea genome database. *Genesis*, **53** (8), 535–546 (2015). DOI: 10.1002/dvg.22872
8. Schmidt D., Reuter H., Hüttner K., Ruhe L., Rabert F., Seebeck F., Irimia M., Solana J., and Bartscherer K., The Integrator complex regulates differential snRNA processing and fate of adult stem cells in the highly regenerative planarian *Schmidtea mediterranea*. *PLoS Genet.*, **14** (12), e1007828 (2018). DOI: 10.1371/journal.pgen.1007828
9. Bagunà J. Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* N. sp. *J. Exp. Zool.*, **195** (1), 65–79 (1976).
10. Kotikova E. A. Comparative characterization of the nervous system of the Turbellaria. *Hydrobiologia*, **132**, 89–92 (1986).

11. Котикова Е. А. Ортогон плоских червей и основные пути его эволюции. Морфологические основы филогенетики плоских червей. *Тр. Зоол. ин-та АН СССР*, **241**, 88–111 (1991).
12. Joffe B. I. and Reuter M. The nervous system of *Bothriomolus balticus* (Proseriata) – a contribution to the knowledge of the orthogon in the Plathelminthes. *Zoomorphology*, **113**, 113–127 (1993).
13. Reuter M., Maule A. G., Halton D. W., Gustafsson M. K. S., and Shaw C. The organization of the nervous system in Plathelminthes. The neuropeptide F-immunoreactive pattern in Catenulida, Macrostromida, Proceriata. *Zoomorphology*, **115**, 83–97 (1995).
14. Reuter M., Mäntylä K., and Gustafsson M. K. S. Organization of the orthogon – main and minor nerve cords. *Hydrobiologia*, **383**, 175–182 (1998).
15. Koopowitz H. Primitive Nervous Systems. A Sensory Nerve-Net in the Polyclad Flatworm *Notoplana acticola*. *Biol. Bull.*, **145** (2), 352–359 (1973).
16. Baguna J. and Ballester R. The nervous system in Planarians: peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation, and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. *J. Morph.*, **155**, 237–252 (1978).
17. Reuter M. and Gustafsson M. K. S. “Neuorendocrine cells” in flatworms Progenitors to metazoan neurones? *Arch. Histol. Cytol.*, **52**, 253–263 (1989).
18. Reuter M. and Halton D. W. Comparative neurobiology of Platyhelminthes. In: *Interrelationships of Platyhelminthes*, Ed. by D. T. J. Littlewood and R. A. Bray (Taylor & Francis, London, New York, 2001), pp. 239–249.
19. Morita M. and Best J. B. Electron microscopic studies on Planaria. II. Fine structure of the neurosecretory system in the planarian *Dugesia dorotocephala*. *J. Ultrastruc. Res.*, **13** (5/6), 398–408 (1965).
20. Lender T. The role of neurosecretion in freshwater planarians. In: *Biology of the Turbellaria*, Ed. by N. W. Riser and M. P. Morse (Mc Craw-Hill, London, 1974), pp. 460–475.
21. Кудикина Н. П. Организация эндокринной функции у плоских червей. *Вест. Балтийского федерального университета им. И. Канта*, **7**, 126–131 (2011).
22. Тирас Х. П., Шейман И. М. и Сахарова Н. Ю. Активность АХЭ в нервной системе некоторых трикладид (класс ресничных червей). *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **11** (4), 427–429 (1975).
23. Котикова Е. А. и Иоффе Б. И. Катехоламины и холинэстеразы в нервной системе турбеллярии. *Pro-vortex karlingi. Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **24** (2), 142–148 (1988).
24. Lentz T. L. Histochemical localization of acetylcholinesterase activity in a planarian. *Comp. Biochem. Physiol.*, **27** (3), 715–716 (1968). DOI: 10.1016/0010-406X(68)90612-9
25. Erzen I. and Brzin M. Cholinergic mechanisms in *Planaria torva*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **64**, 207–216 (1979). DOI: 10.1016/0306-4492(79)90050-9
26. Welsh J. H. and King E. C. Catecholamines in planarians. *Comp. Biochem. Physiol.*, **36** (4), 683–686 (1970).
27. Reuter M. and Eriksson K. Catecholamines demonstrated by glyoxylic acid-induced fluorescence and HPLC in same microturbellarians. *Hydrobiologia*, **227**, 209–220 (1991).
28. Joffe B. I. and Kotikova E. A. Distribution of catecholamines in turbellarians with a discussion of neuronal homologies in the Plathelminthes. In: *Simpler Nervous Systems*, Ed. by D. A. Sakharov, and W. Winlow (Manchester University Press, Manchester, New York, 1991), pp. 77–112.
29. Wikgren M., Reuter M., Gustafsson M. K. S., and Lindroos P. Immunocytochemical localization of histamine in flatworms. *Cell Tiss. Res.*, **260**, 479–484 (1990). DOI: 10.1007/BF00297227
30. Eriksson K. S. Nitric oxide synthase in the pharynx of the planarian *Dugesia tigrina*. *Cell Tiss. Res.*, **286**, 407–410 (1996).
31. Eriksson K. S. and Panula P. Gamma-aminobutyric acid in the nervous system of a planarian. *J. Comp. Neurol.*, **345** (4), 528–533 (1994). DOI: 10.1002/cne.903450405
32. Nishimura K., Kitamura Y., Umesono Y., Takeuchi K., Takata K., Taniguchi T., and Agata K. Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience*, **153** (4), 1103–1114 (2008). DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.026
33. Shilt J., Richoux J. P., and Dubois M. P. Demonstration of peptides immunologically related to vertebrate neurogones in *Dugesia lugubris* (Turbellaria, Tricladida). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **43** (3), 331–335 (1981).
34. Carraway R., Ruane S. E. and Kim H.-R. Distribution and immunochemical character of neurotensin-like material in representative vertebrates and invertebrates: apparent conservation of the COOH-terminal region during evolution *Peptides*, **1**, 115–123 (1982).
35. Venturini G., Carolei A., Palladini G., Margotta V., and Lauro M. G. Radioimmunological and immuno-cytochemical demonstration of Met-enkephalin in planaria. *Comp. Biochem. Physiol.*, **74**, 23–25 (1983). DOI: 10.1016/0742-8413(83)90141-x
36. Kerschbaum H., Polhammer K., Hacker G., Treibl-mayr K., and Adam H. Endorphin ähnliche Immunoreaktivität bei *Crenobia alpina* (Turbellaria, Tricladida). *Mikroskopie*, **41**, 30–33 (1984).

37. Bautz A. and Shilt J. Somatostatin-like peptide and regeneration capacities in planarians. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **64**, 267–272 (1986).
38. Reuter M. Substance P immunoreactivity in sensory structures and the central and pharyngeal nervous system of *Stenostomum leucops* (Catenulida) and *Microstomum lineare* (Macrostomida). *Cell Tiss. Res.*, **276**, 173–180 (1994).
39. Curry W. J., Shaw C., Johnston C. F., Thim L., and Buchanan K. D. Neuropeptide F: primary structure from the Turbellarian, *Artioposthia triangulate*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **110** (2), 269–274 (1992). DOI: 10.1016/0742-8413(92)90272-9
40. Johnston R. N., Shaw C., Halton D. W., Verhaert P., and Baguna J. GYIRFamide: a novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad turbellarian, *Dugesia tigrina*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **209**, 689–697 (1995). DOI: 10.1006/bbrc.1995.1554
41. Johnston R. N., Shaw C., Halton D. W., Verhaert P., Blair K. L., Brennan G. P., Price D. A., and Anderson P. A. Isolation, localization, and bioactivity of the FMRFamide-related neuropeptides GYIRFamide and YIRFamide from marine turbellarian *Bdelloura candida*. *J. Neurochem.*, **67**, 814–821 (1996). DOI: 10.1046/j.1471-4159.1996.67020814.x
42. Rapport M. M., Green A. A., and Page I. H. Crystalline Serotonin. *Science*, **108** (2804), 329–330 (1948).
43. Gustafsson M. K., Fagerholm H. P., Halton D. W., Hanzelová V., Maule A. G., Reuter M., and Shaw C. Neuropeptides and serotonin in the cestode, *Proteocephalus exiguus*: an immunocytochemical study. *Int. J. Parasitol.*, **25** (6), 673–682 (1995). DOI: 10.1016/0020-7519(94)00169-0
44. Tolstenkov O., Terenina N., Kreshchenko N., and Gustafsson M. The pattern of FMRFamide and serotonin immunoreactive elements in the nervous system of *Aspidogaster conchicola* K. Baer, 1827 (Aspidogastrea, Aspidogastriidae). *Belgian J. Zool.*, **144**, 133–136 (2010).
45. Плотникова С. И. и Кузьмина Л. В. Распределение нервных элементов, содержащих биогенные амины, у представителя плоских червей — молочно-белой планарии *Dendrocoelum lacteum*. В кн.: *Физиология и биохимия беспозвоночных* (Л.: Наука, 1968), сс. 23–29.
46. Reuter M., Gustafsson M. K. S., Mäntylä K., and Grimmelikhuijzen C. J. P. The nervous system of Tricladida. III. Neuroanatomy of *Dendrocoelum lacteum* and *Polycelis tenuis* (Plathelminthes, Paludicola): an immunocytochemical study. *Zoomorphology*, **116**, 111–122 (1996). DOI: 10.1007/BF02526943
47. Лурье Б. Л. Моноаминсодержащие нейроны планарии *Polycelis nigra*. *Вестник МГУ. Сер. биол.*, **2**, 3–13 (1975).
48. Reuter M., Gustafsson M. K. S., Sheiman I. M., Terenina N., Halton D. W., Maule A. G., and Shaw C. The nervous system of Tricladida II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Plaudicola, Dugesiiidae): an immunocytochemical study. *Invert. Neurosci.*, **1**, 133–143 (1995). DOI: 10.1007/BF02331911
49. Itoh M. T. and Igarashi J. Circadian rhythm of serotonin levels in planarians. *Neuroreport*, **11** (3), 473 (2000). DOI: 10.1097/00001756-200002280-00009
50. Fernandes M. C., Alvares E. P., Gama P., and Silveira M. Serotonin in the nervous system of the head region of the land planarian *Bipalium kewense*. *Tissue Cell.*, **35** (6), 479–486 (2003). DOI: 10.1016/s0040-8166(03)00074-0
51. Kerschbaum H., Freiblmaier K., and Pohlhammer K. Localization of 5-HT and gastrin-cck-immunoreactivity *Crenobia alpina* (Tricladida, Plathelminthes). *Fortschr. Zool.*, **36**, 177 (1988).
52. Kotikova E. A., Raikova O. I., Reuter M., and Gustafsson M. K. S. The nervous and muscular systems in the free-living flatworm *Castrella truncata* (Rhabdocoela): an immunocytochemical and phalloidin fluorescence study. *Tissue Cell.*, **34** (5), 365–374 (2002).
53. Kabotyanski E. A., Nezhlin L. P., and Sakharov D. A. Serotonin neurons in planarian pharynx. *Stud. Neurosci.*, **13**, 138–152 (1991).
54. Крешенко Н. Д. Иммуноцитохимическая идентификация серотонинергических нейронов у планарий *Girardia tigrina*. *Бiol. мембраны*, **33** (5), 353–362 (2016).
55. Cebrià F. Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study. *Neurosci. Res.*, **61** (4), 375–384 (2008).
56. Крешенко Н. Д., Кузнецов Г. В., Митьковский Д. Е., Мочалова Н. В., Теренина Н. Б., Мовсесян С. О. Идентификация серотониновых нейронов у *Hymenolepis diminuta* и *Schmidtea mediterranea* с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM). В сб. «Науч. труды VII съезда биофизиков России» (КубГТУ, Краснодар, **1**, 2023), сс. 286–287. DOI: 10.26297/SbR6.2023.001
57. Prior D. J. and Uglem G. L. Behavioral and physiological aspects of swimming in cercariae of the digenetic trematode, *Proterometra macrostoma*. *J. Exp. Biol.*, **83**, 239–247 (1979).
58. Hrcckova G., Maule A., Velebny S., and Halton D. *Mesocestoides corti* (syn. *M. vogae*): Modulation of larval motility by neuropeptides, serotonin and acetylcholine. *Parasitology*, **124** (4), 409–421 (2002).
59. Day T. A., Bennett J. L., and Pax R. A. Serotonin and its requirement for maintenance of contractility in muscle fibres isolated from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **108**, 425–432 (1994).
60. Ribeiro P., Gupta V., and El-Sakkary N. Biogenic amines and the control of neuromuscular signaling in schistosomes. *Invertebr. Neuroscience*, **12** (1), 13–28 (2012).
61. Patocka N., Sharma N., Rashid M., and Ribeiro P. Serotonin signaling in *Schistosoma mansoni*: serotonin-

- activated G protein-coupled controls parasite movement. *PLoS Pathog.*, **10** (1), e1003878 (2014). DOI: 10.1371/journal.ppat.1003878
62. Sakharov D. A., Golubev A. I., Malyutina L. V., Kabotyanski E. A., and Nezhlin L. P. Serotonergic control of ciliary locomotion in a turbellarian flatworm. In: *Neurobiology of invertebrates: transmitters, modulators and receptors*, Ed. by J. Salanki and K. S. Rózsa (Budapest, Akadémiai Kiadó, 1988), pp. 479–491.
63. Franquinet R. The role of serotonin and catecholamines in the regeneration of the Planaria *Polycelis tenuis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **51**, 85–95 (1979).
64. Шейман И. М., Крещенко Н. Д. и Нетреба М. В. Формирование функции фоторецепторной системы на ранних этапах развития. *Биофизика*, **55** (4), 680–685 (2010).
65. Крещенко Н. Д., Гребенщикова Е. В. и Карпов А. Н. Влияние серотонина на регенерацию фоторецепторов планарий. В кн.: *Сб. науч. статей по мат. межд. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями»* **20**, 278–283 (2019). DOI: 10.31016/978-5-9902340-8-6.2019.20
66. Lambrus B. G., Cochet-Escartin O., Gao J., Newmark P. A., Collins E. M., and Collins J. J. Tryptophan hydroxylase is required for eye melanogenesis in the Planarian *Schmidtea mediterranea*. *PLoS One*, **10**, e0127074 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0127074

Morphometric Analysis of Serotonergic Structures in the Nervous System of Planarian *Schmidtea mediterranea*

G.V. Kuznetsov*, D.E. Mitkovskii**, and N.D. Kreshchenko*

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

** Serpukhov college, Centralnaya ul. 154, Serpukhov, Moscow Region, 142207 Russia

The nervous system of planarians includes cerebral ganglia situated in the anterior part of the body and a pair of well-defined ventral nerve cords that extend throughout the whole animal. Serotonergic components of the nervous system were determined by indirect method of immunocytochemical staining of whole mount tissue preparations of planarians *Schmidtea mediterranea*, followed by analysis using a fluorescence microscope. The results obtained show the presence of serotonergic components in the central and peripheral parts of the nervous system of planarians *S. mediterranea*. The morphological parameters of serotonin-immunopositive structures were estimated, as well as neuron counts in the cerebral ganglion were done. The measurements were carried out on micrographs taken through a digital camera from stained whole mount preparations. The size of serotonin neurons in three areas of the body, the thickness of the nerve trunks and cerebral ganglion, and the distance between the nerve cords and transversal commissures were taken into consideration. For the first time, the new quantitative data were obtained characterizing the morphological properties of the nervous system of planarian *S. mediterranea*. Also, the observation of the eyes regeneration in planarians in response to decapitation and exposure to serotonin was performed. It was found that exogenous serotonin at concentrations of 0.01–1 μM accelerated eye differentiation during the regeneration of the head end of *S. mediterranea* planarian.

Keywords: fluorescent microscopy, planarian, nervous system, serotonin, morphometry, regeneration

АСТАКСАНТИН ПРЕДОТВРАЩАЕТ ДИСРЕГУЛЯЦИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИНАМИКИ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫС, ИНДУЦИРОВАННУЮ ИЗОПРОТЕРЕНОЛОМ

© 2024 г. Р.Р. Крестинин*, Ю.Л. Бабурина*, И.В. Одиноква*,
Л.Д. Сотникова*, О.В. Крестинина*,#

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

#E-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 23.10.2023 г.

После доработки 13.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Митохондрии принимают участие в заболеваниях различной этиологии. Использование препаратов, направленных на улучшение функционального состояния митохондрий, может представлять собой многообещающий терапевтический подход к заболеваниям различной природы. Астаксантин представляет собой кето-каротиноид (ксантофилл) преимущественно морского происхождения. Он обладает как липофильными, так и гидрофильными свойствами и может проникать через клеточную мембрану, локализуясь в митохондриях, и предотвращать митохондриальную дисфункцию. В настоящем исследовании изучили влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга крысы, изменение митохондриальной динамики и митофагии при изопротеренол-индуцированном повреждении. При действии астаксантина митохондрии были более устойчивы к Ca^{2+} -индуцированному открытию неспецифической поры, активность комплексов I, IV и V дыхательной цепи повышалась. Более того, астаксантин изменял уровень маркеров деления и слияния митохондрий, а также митофагии при изопротеренол-индуцированной митохондриальной дисфункции, что, вероятно, приводило к повышению количества функциональных митохондрий мозга крыс и улучшению их состояния. Астаксантин можно рассматривать как митохондриально-направленный агент в терапии при патологических состояниях, связанных с окислительным повреждением и митохондриальной дисфункцией, вызванных сердечной недостаточностью. В качестве пищевой добавки астаксантин обладает потенциалом антиоксидантной защиты клеток при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Ключевые слова: астаксантин, изопротеренол-индуцированная митохондриальная дисфункция, митофагия, митохондриальные динамики.

DOI: 10.31857/S0006302924010091, EDN: RCSHTH

Сердечная недостаточность представляет собой совокупность расстройств, которые обусловлены низкой сократительной способностью сердечной мышцы – миокарда. Это такое состояние сердца и сосудистой системы, при котором невозможно полноценно обеспечивать организм кислородом и питательными веществами. В результате нарушения питания, гипоксемии и гипоксии развиваются необратимые нарушения и

изменения во внутренних органах. Заболевания сердца являются одной из причин, из-за которых возникает расстройство мозгового кровообращения, в результате чего нарушается кровоток в артериях и уменьшается кровоснабжение мозга [1, 2]. Причиной этого часто является недостаточное снабжение мозга кислородом. Поддержание структурной и функциональной целостности митохондрий необходимо для нормального функционирования клетки. Митохондриальная дисфункция приводит к развитию различных патологий, таких как нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и др. [3]. Митохондриальная дисфункция может вызывать окислительный стресс [4]. Снизить окислительный стресс способны антиоксиданты [5]. Одним из таких анти-

Сокращения: мРТП – пора неспецифической проницаемости (mitochondrial permeability transition pore), OPA1 – белок 1 атрофии зрительного нерва, DRP1 – родственник динамину белок 1, PINK1 – PTEN-индуцированная киназа 1, $\nu_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in}}$ – скорость входа Ca^{2+} в митохондрии, ММК – митохондрии мозга крыс.

оксидантов является астаксантин — представитель ксантофиллов, который представляет собой фитонутриент темно-красного цвета, который может быть синтезирован микроводорослями *Haematococcus pluvialis* [6]. Он имеет уникальную молекулярную структуру, которая позволяет ему оставаться как внутри, так и вне клеточной мембраны [7]. Известно, что астаксантин значительно ослабляет митохондриальную дисфункцию, связанную с ишемическим повреждением миокарда, может снижать окислительный стресс [8] и предотвращать развитие сердечно-сосудистых заболеваний [8–11]. Более того, было показано, что астаксантин улучшает обучение и способствует восстановлению памяти, снижает повреждение нейронов, увеличивает количество пирамидных нейронов в гиппокампе и восстанавливает нормальную морфологию нейронов [12]. Ранее мы показали, что астаксантин снижал дегенерацию, отек мышечных волокон сердца и степень фиброзного повреждения миокарда после введения изопротеренола. Изопротеренол используется в качестве модели сердечной недостаточности [13]. Кроме того, астаксантин улучшал функциональное состояние митохондрий сердца у крыс. Введение астаксантина в сочетании с инъекцией изопротеренола увеличивало дыхательный контроль в митохондриях сердца крыс. Также астаксантин повышал Ca^{2+} -емкость и снижал скорость набухания митохондрий, что замедляло открытие поры неспецифической проницаемости (mPTP — mitochondrial permeability transition pore), т.е. снижало проницаемость митохондриальной мембраны [10, 11].

Митохондрии млекопитающих образуют высокодинамическую ретикулярную сеть, в которой происходят слияние и деление митохондрий, при этом относительный баланс этих двух событий влияет на контроль качества митохондрий. Слияние (fusion) опосредуется митофузином 1, митофузином 2 и белком OPA1 (белком 1 атрофии зрительного нерва), которые играют роль в слиянии внешней и внутренней мембран митохондрий соответственно. Родственный динамину белок 1 (DRP1) необходим для деления (fission) митохондрий и регулируется посредством фосфорилирования с помощью протеинкиназы A и Cdk1/циклина B [14, 15]. Когда митохондрии повреждены, слияние митохондрий может снимать окислительный стресс, позволяя функциональным митохондриям дополнять дисфункциональные митохондрии путем диффузии и обмена компонентами между органеллами. Деление необходимо для создания новых митохондрий, однако оно также способствует контролю качества митохондрий, позволяя удалять поврежденные митохондрии [16].

Митофагия — это процесс избирательной деградации митохондрий путем доставки в лизосомы/вакуоли с использованием процессов аутофагии. Он представляет значительный интерес как для ученых-биологов, так и для клиницистов из-за многих новых аспектов этого пути и связей между митофагией и физиологическими процессами, такими как развитие и старение, а также некоторыми заболеваниями, например нейродегенеративными и онкологическими [17–19]. В нормальных условиях митохондрии постоянно подвергаются циклам деления и слияния, что помогает сохранить нормальную функцию митохондрий за счет обмена содержимого матрикса. Дисбаланс в равновесии деления/слияния или повреждение митохондрий может привести к деградации митохондрий путем митофагии. Взаимосвязанные факторы, такие как индукция митофагии, динамика митохондрий (деление и слияние), модуляция молекулярных механизмов митофагии путем нацеливания на отдельные компоненты, взаимодействие с другими видами аутофагии и митохондриальный биогенез образуют сложную взаимодействующую сеть, которая управляет митохондриальной деградацией посредством митофагии, и, таким образом, митохондриальной функцией, и клеточной целостностью [20].

В настоящем исследовании мы изучили влияние астаксантина на изменение функционального состояния митохондрий мозга, митохондриальной динамики и митофагии у крыс с изопротеренол-инициированной митохондриальной дисфункцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка животных к эксперименту. Для исследования использовали четыре группы крыс линии Вистар (в возрасте 2 месяца, массой 220–250 г). Первая группа была контрольная, второй группе вводили астаксантин (150 мг/кг, Natural, Китай) в течение 14 суток [21] ежедневно с помощью пластиковых трубочек, позволяющих безболезненно вводить вещество; третьей группе делали инъекцию изопротеренола (100 мг/кг) [13] дважды в течение двух суток подкожно; четвертой группе вводили астаксантин так же, как и второй группе, затем проводили инъекцию изопротеренола так же, как третьей группе.

Выделение митохондрий мозга крыс. Мозг извлекали в течение 20–26 с и оставляли в физиологическом растворе в течение 5 мин. Несинаптические митохондрии мозга крысы (ММК) выделяли методом, описанным в работе [22] и модифицированным в нашей лаборатории [23]. После охлаждения мозг измельчали и помещали в раствор, содержащий 320 мМ сахарозы, 0.5 мМ ЭДТА, 0.5 мМ ЭГТА, 0.02% бычьего сывороточ-

ного альбумина (фракция V, не содержащая жирных кислот) и 10 mM трис-HCl, pH 7.4 и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в соотношении 1:10. Гомогенат центрифугировали при 2000 g в течение 3 мин. Процедуру повторяли дважды и осадок удаляли. Супернатант центрифугировали при 12500 g в течение 10 мин. Осадок промывали в градиенте Перколла (3–10–15–24%) при 31300 g в течение 10 мин. Полученный осадок несиноптических митохондрий (нижний слой) суспендировали в среде выделения без ЭДТА, ЭГТА и альбумина и центрифугировали при 11500 g в течение 10 мин. Осадки ресуспендировали в том же буфере. Все манипуляции проводили при 4°C. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (Bio Rad Protein assay, Bio-Rad, Германия), она составляла 30–35 мг/мл.

Измерение митохондриальных функций. Скорости потребления O_2 при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР и скорость входа Ca^{2+} в митохондрии измеряли в термостатируемой ячейке, в которую вмонтированы O_2 -электрод Кларка (Clark-type electrode) и Ca^{2+} -селективный электрод [10, 24]. Митохондрии инкубировали в среде, содержащей 10 mM трис-HCl-буфере, pH 7.4, содержащем 120 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4 . Глутамат (5 mM) и малат (5 mM) использовали в качестве дыхательных субстратов. Концентрация митохондриального белка в среде составляла 1 мг/мл. Ca^{2+} добавляли последовательно, каждая добавка составляла 25 нмоль на 1 мг белка. Скорости потребления O_2 при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР считали как число атомов нг-О, потребляемых митохондриями в минуту на мг белка. Все измерения проводили при открытой ячейке.

Нативный электрофорез и измерение активности комплексов электрон-транспортной цепи (I, IV) и АТФ-синтазы. Электрофорез в неденатурирующих условиях выполняли, как описано в работе [25]. Изолированные ММК суспендировали в буфере, содержащем 0.75 M аминокaproновой кислоты, 50 mM бис-трис/HCl, pH 7.0, и 10% додецилмальтозида, суспензию держали на льду в течение 20 мин. После 10-минутного центрифугирования при 10000 g в супернатант добавляли 5%-й Serva Blue G, растворенный в 1 M аминокaproновой кислоте. Образцы наносили на градиентный (3–13%) гель с нагрузкой 70 мкг образца на дорожку. Калибровочный набор NMW для нативного электрофореза (Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве молекулярных маркеров. Активность комплексов I, IV и V в геле определяли, как описано ранее [26]. Для измерения активности комплекса I гель помещали в буфер, содержащий 100 mM трис-HCl, pH 7.4, 0.14 mM НАДН, 1 мг/мл NBT (нитросинего тетразолия хлорид) в

течение ~10–30 мин. Для выявления активности комплекса IV гель окрашивали в течение 1 ч буфером, содержащим 10 mM KH_2PO_4 (pH 7.4), 1 мг/мл 3,3'-диаминобензидина и 0.2 мг цитохрома c. Для определения активности комплекса V гель окрашивали в течение 16 ч буфером, содержащим 10 mM АТФ, 35 mM трис-HCl, 270 mM глицина, 14 mM $MgSO_4$, 0.2% $Pb(NO_3)_2$. После инкубации в соответствующих субстратах реакции останавливали 10%-й уксусной кислотой, гели промывали водой и сканировали.

Электрофорез и вестерн-блоттинг. Аликвоты митохондриальной суспензии (2 мг/мл) из каждой экспериментальной группы переносили в пробирки (типа «Эппендорф») и солибилизировали в буфере Лэммли (Bio-Rad, США). Образцы митохондриального белка (20 мкг) наносили на каждую дорожку и разделяли методом электрофореза (12.5%-й гель) в денатурирующих условиях. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) осуществляли методом вестерн-блоттинга. Полученные мембраны окрашивали антителами к DRP1 (Elabscience, США), митофузину 2 (Elabscience, США), OPA1 (Cloud-Clone Corp., США), PTEN-индуцированной киназе 1 (PINK1, Cusabio, США) и прохибитину 2 (Cusabio, США). Транслоказу внешней мембраны (Cell Signaling, США) и цитохром c-оксидазу использовали для нормирования белка.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали среднее значение $\pm$ стандартное отклонение не менее чем четырех независимых экспериментов. Статистическую значимость различий между парами средних значений оценивали с помощью критерия Стьюдента–Ньюмена–Кеулса. Различие считалось достоверным при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сначала мы изучили влияние астаксантина, изопротеренола и совместное действие астаксантина и изопротеренола на изменение скоростей дыхательных активностей, скорости входа Ca^{2+} ($V_{Ca^{2+}}^{in}$) в митохондрии и пороговой концентрации Ca^{2+} (концентрация Ca^{2+} , при которой происходит открытие мРТР) в ММК (рис. 1). Видно, что в присутствии астаксантина (рис. 1б) количество добавок Ca^{2+} (5 добавок) не отличалось от контроля (рис. 1а), тогда как в присутствии изопротеренола (4 добавки) количество добавок Ca^{2+} снижалось по сравнению с контролем. При совместном действии астаксантина и изопротеренола (рис. 1г), количество добавок не отличалось от контроля. При воздействии изопротеренола митохондрии мозга были более чувствитель-

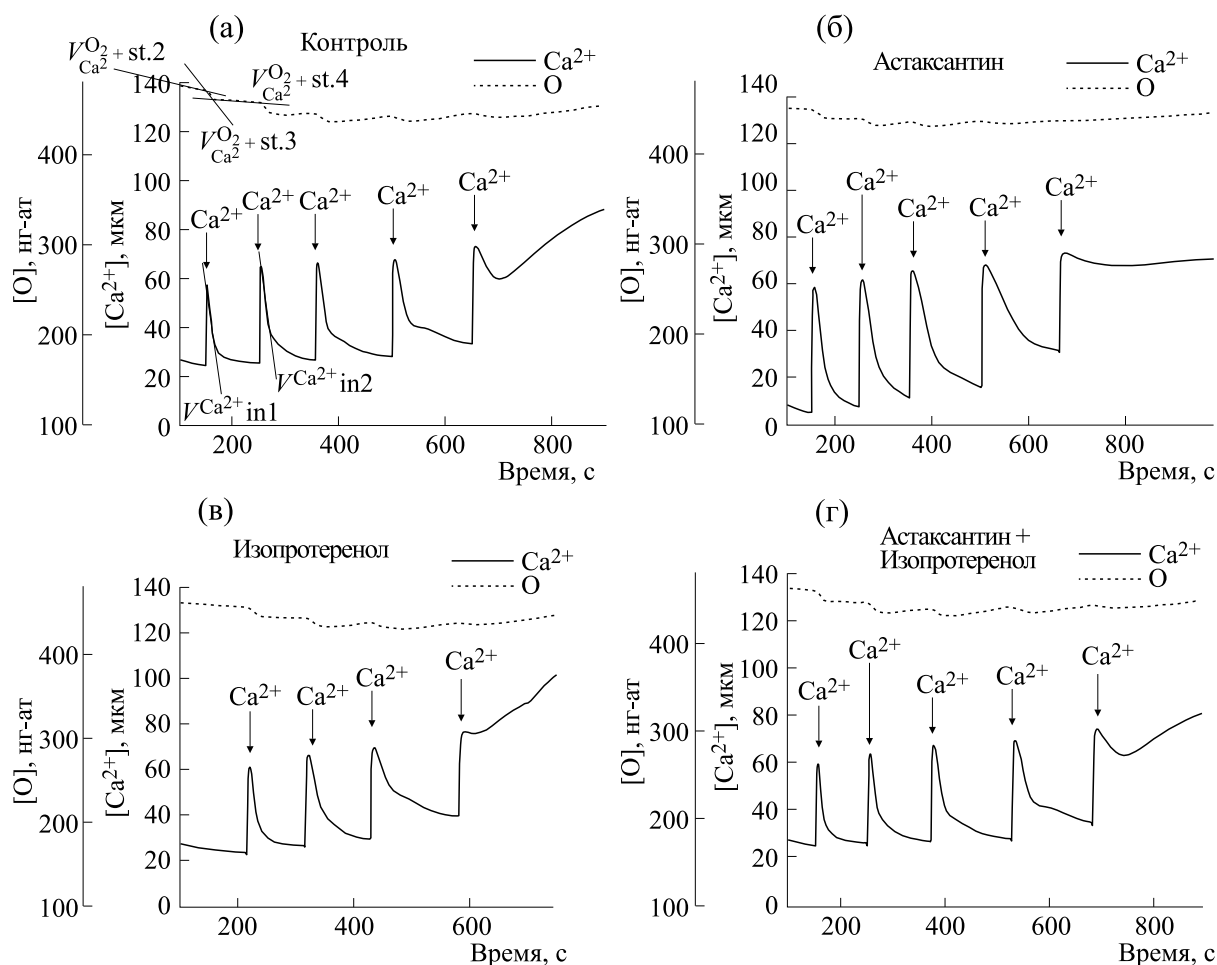


Рис. 1. Влияние астаксантина и изопротеренола на транспорт Ca^{2+} и потребление O_2 в митохондриях мозга крыс: (а) — контроль, (б) — в присутствии астаксантина, (в) — в присутствии изопротеренола, (г) — совместное действие астаксантина и изопротеренола. По оси абсцисс — время после добавления ММК, стрелки показывают время добавления Ca^{2+} (25 мкМ). Данные представлены как среднее значение ($\pm SD$) из пяти независимых экспериментов.

ны к Ca^{2+} , тогда как астаксантин способствовал устойчивости митохондрий к формированию МРТР.

На рис. 2 показаны количественные характеристики скоростей входа Ca^{2+} после первой ($V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in.1}}$) и второй ($V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in.2}}$) добавок, дыхательных активностей при Ca^{2+} -индуцированном открытии МРТР и значение пороговой концентрации Ca^{2+} в наших экспериментальных условиях. Как видно на рис. 2а, величина $V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in.1}}$ в присутствии астаксантина и при комбинированном воздействии астаксантина и изопротеренола не изменялась по сравнению с контролем и снижалась в присутствии изопротеренола на 36% по сравнению с контролем и на 26% по сравнению с астаксантином и изопротеренолом при их комбинированном воздействии. Аналогичный эффект на-

блюдался при подсчете $V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in.2}}$ (рис. 2б). Изопротеренол снижал этот параметр на 40% по сравнению с контролем и на 36% по сравнению с астаксантином и изопротеренолом при их комбинированном воздействии. Снижение скорости входа Ca^{2+} в присутствии изопротеренола говорит о том, что митохондрии более чувствительны к Ca^{2+} , тогда как в присутствии астаксантина ММК из группы 4 более устойчивы к индукторному воздействию Ca^{2+} , несмотря на добавление изопротеренола. Этот эффект подтверждается при измерении пороговой концентрации Ca^{2+} (рис. 2в). Пороговая $[\text{Ca}^{2+}]$ в присутствии изопротеренола уменьшалась на 38% по сравнению с контролем и на 30% по сравнению с совместным действием астаксантина и изопротеренола. На рис. 2г показано изменение скорости потребления O_2 в состоянии 2 ($V_{\text{O}_2}^{\text{st.2}}$). Как видно на

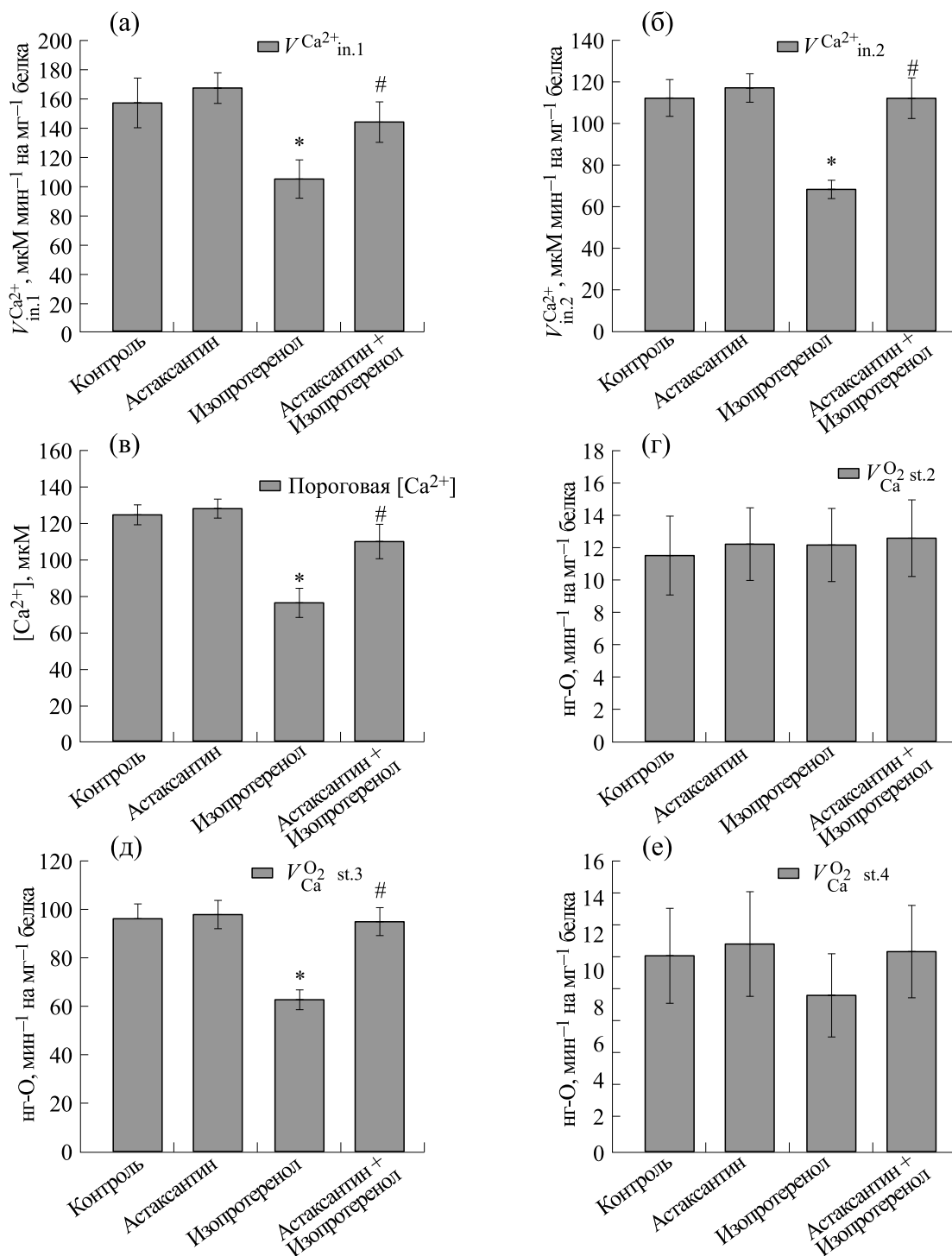


Рис. 2. Количественные характеристики эффектов астаксантина и изопротеренола на транспорт Ca^{2+} и потребление O_2 в митохондриях мозга крыс: (а) — изменение скорости входа Ca^{2+} после первой добавки Ca^{2+} ($V_{Ca^{2+} in.1}$), (б) — изменение скорости входа Ca^{2+} после второй добавки Ca^{2+} ($V_{Ca^{2+} in.2}$), (в) — изменение пороговой концентрации Ca^{2+} , (г) — изменение скорости потребления O_2 в состоянии 2 ($V_{O_2 Ca^{2+} st.2}$); (д) — изменение скорости потребления O_2 в состоянии 3 ($V_{O_2 Ca^{2+} st.3}$); (е) — изменение потребления O_2 в состоянии 4 ($V_{O_2 Ca^{2+} st.4}$). Все измерения проведены в открытой ячейке. Данные представлены как среднее значение ($\pm SD$) из пяти независимых экспериментов. * — Значимое изменение по сравнению с контролем, $p < 0.05$; # — значимое изменение по сравнению с изопротеренолом, $p < 0.05$.

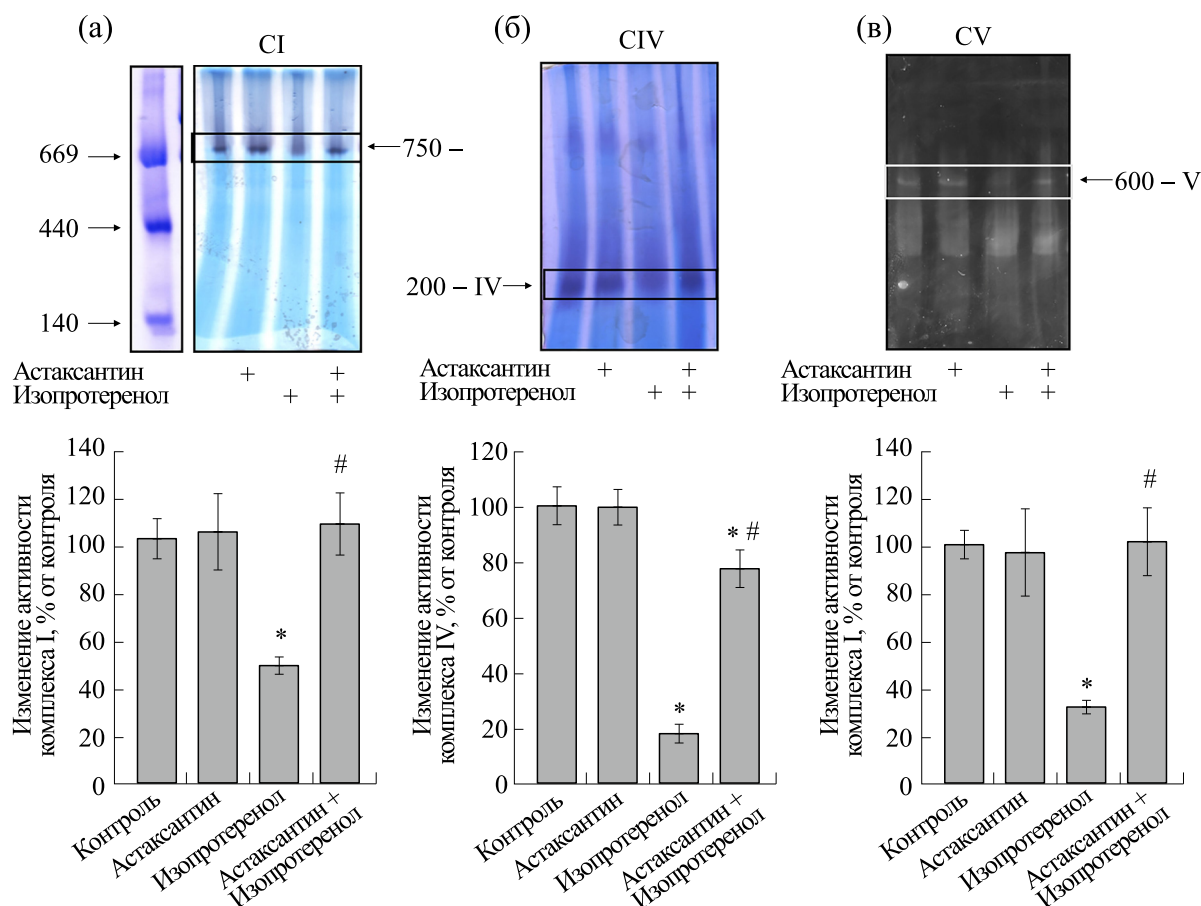


Рис. 3. Влияние астаксантина на активность комплексов I, IV и V дыхательной цепи при изопротеренол-индуцированной митохондриальной дисфункции. (а) — Вверху гель, окрашенный буфером для определения активности CI, содержащий 100 мМ трис-HCl, pH 7.4, 0.14 мМ NADH, 1 мг/мл NBT; внизу диаграмма, количественно отражающая изменения активности CI. (б) — Вверху гель, окрашенный буфером для определения активности CIV, содержащий 10 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), 1 мг/мл DAB и 0.2 мг цитохрома c; внизу диаграмма, количественно отражающая изменения активности CIV. (в) — Вверху гель, окрашенный буфером для определения активности CV (10 мМ АТФ, 35 мМ трис-HCl, 270 мМ глицин, 14 мМ MgSO_4 , 0.2% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), внизу диаграмма, количественно отражающая изменения активности CV. Данные представлены как среднее значение ($\pm SD$) из четырех независимых экспериментов. * — Значимое изменение по сравнению с контролем, $p < 0.05$; # — значимое изменение по сравнению с изопротеренолом, $p < 0.05$.

этом рисунке, во всех условиях изменения не происходили. Добавление Ca^{2+} (первый импульс) приводило к повышению потребления O_2 в состоянии 3 ($\text{I}\text{O}_{\text{Ca}}^{\text{st.3}}$), причем в присутствии астаксантина величина $\text{I}\text{O}_{\text{Ca}}^{\text{st.3}}$ не отличалась от контроля, тогда как изопротеренол снижал $\text{I}\text{O}_{\text{Ca}}^{\text{st.3}}$ на 35% по сравнению с контролем (рис. 2д). При совместном воздействии астаксантина и изопротеренола $\text{I}\text{O}_{\text{Ca}}^{\text{st.3}}$ не отличалась от контроля, однако повышалась на 30% по сравнению с изопротеренолом (рис. 2е).

На следующем этапе нашего исследования мы измерили активность комплексов I, IV и V дыхательной цепи в геле после нативного электрофореза в наших экспериментальных условиях

(рис. 3). На рис. 3а показаны изменения активности NADH-убихинон-оксидоредуктазы комплекса I. Из рисунка видно, что введение астаксантина не изменяло активность NADH-убихинон-оксидоредуктазы комплекса I, в то время как изопротеренол снижал ее активность на 40% по сравнению с контролем. Совместное действие астаксантина и изопротеренола не изменяло активность CI по сравнению с контролем, но приводило к увеличению на 40% по сравнению с изопротеренолом. Изменения в активности цитохром c-оксидазы комплекса IV показаны на рис. 3б. Хроническое введение астаксантина не изменяло активность цитохром c-оксидазы комплекса IV, в то время как изопротеренол снижал ее активность в ММК на 70% по сравнению с контролем. Совместное действие астаксантина и

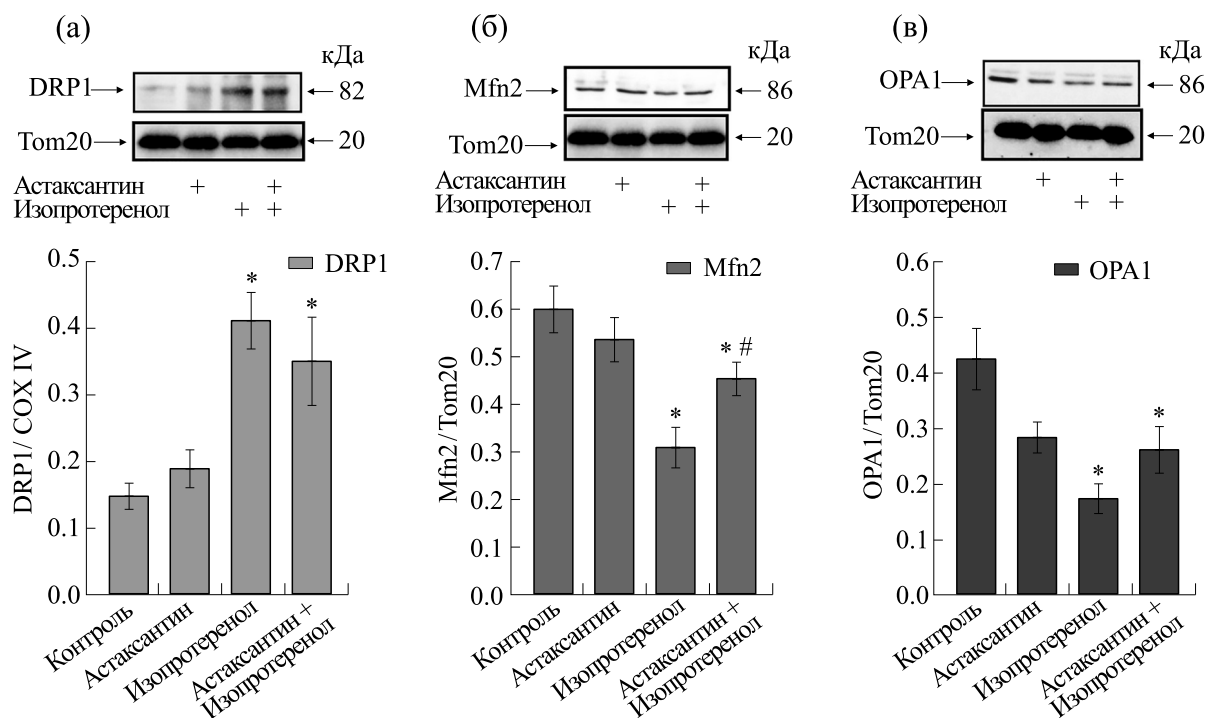


Рис. 4. Влияние астаксантина и изопротеренола на изменение содержания белков, участвующих в слиянии и делении митохондрий при изопротеренол-индуцированном повреждении. Транслоказу внешней мембраны использовали как контроль белковой нагрузки. (а) — Вверху иммуноокрашивание антителами к DRP1, внизу количественные характеристики, отражающие соотношение оптической плотности DRP1 к транслоказе внешней мембраны. (б) — Вверху иммуноокрашивание антителами к митофузину 2; внизу количественные характеристики, отражающие соотношение оптической плотности митофузина 2 к транслоказе внешней мембраны. (в) — Вверху иммуноокрашивание антителами к белку OPA1; внизу количественные характеристики, отражающие соотношение оптической плотности белка OPA1 к транслоказе внешней мембраны. Данные представлены как среднее значение ($\pm$ SD) из четырех независимых экспериментов. * — Значимое изменение по сравнению с контролем, $p < 0.05$; # — значимое изменение по сравнению с изопротеренолом, $p < 0.05$.

изопротеренола снижало активность цитохром *c*-оксидазы комплекса IV на 20% по сравнению с контролем и повышало на 47% по сравнению с изопротеренолом. Изменение активности АТФ-синтазы показано на рис. 3в. Астаксантин не изменял активность АТФ-синтазы в ММК, однако изопротеренол снижал активность АТФ-синтазы на 60% по сравнению с контролем. При совместном действии астаксантина и изопротеренола активность АТФ-синтазы не отличалась от контроля, но увеличивалась на 60% по сравнению с изопротеренолом. Астаксантин отменял эффект изопротеренола, и активность всех исследуемых комплексов повышалась.

Митохондрии млекопитающих образуют высокодинамическую ретикулярную сеть, в которой постоянно происходят события слияния и деления, при этом баланс этих двух событий влияет на контроль качества митохондрий. Слияние (fusion) опосредуется митофузином 1, митофузином 2 и белком OPA1, которые играют роль в слиянии внешней и внутренней мембран митохондрий соответственно. Родственный динамину белок 1 (DRP1) необходим для деления (fission) и

регулируется посредством фосфорилирования с помощью PKA и Cdk1/циклина B [14, 15]. Мы исследовали изменение содержания белков, участвующих в делении (DRP1) и слиянии (митофузин 2 и белок OPA1) митохондрий в наших экспериментальных условиях (рис. 4). Как видно на этом рисунке, изопротеренол повышал содержание DRP1 в 2.7 раза в ММК по сравнению с контролем, тогда как при совместном действии астаксантина и изопротеренола, уровень DRP1 повышался в два раза по сравнению с контролем (рис. 4а). Уровни митофузина 2 (рис. 4б) и белка OPA1 (рис. 4в) снижались при действии изопротеренола в два и три раза соответственно по сравнению с контролем. Астаксантин отменял эффект изопротеренола, при этом содержание митофузина 2 повышалось в два раза по сравнению с действием изопротеренола, а экспрессия белка OPA1 — на 35%.

Слияние (fusion) способствует смешению митохондрий и обеспечивает целостность и однородность митохондриальной сети, защищает от потери митохондриальной ДНК (мтДНК) и поддерживает оптимальную биоэнергетическую ак-

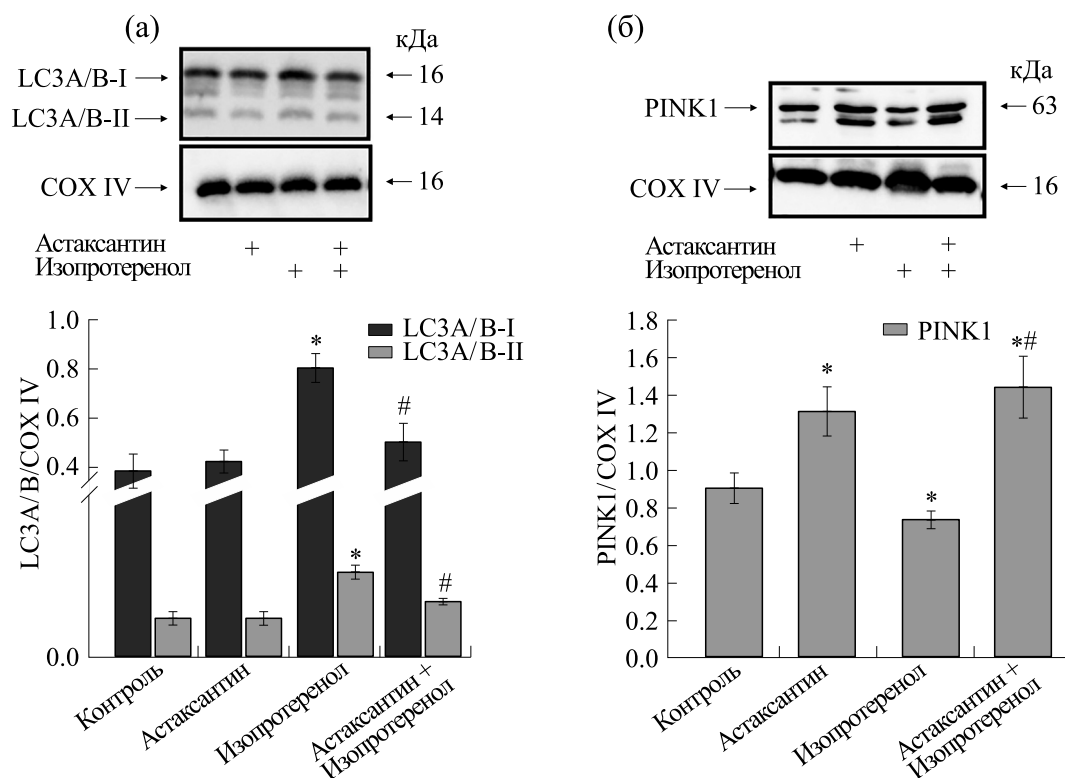


Рис. 5. Влияние астаксантина и изопротеренола на изменение содержания LC3A/B (I, II) и PINK1. Цитохром *c*-оксидаза использовалась как контроль белковой нагрузки. (а) — Вверху иммуноокрашивание антителами к LC3A/B (I, II), внизу количественные характеристики, отражающие соотношение оптической плотности LC3A/B (I, II) к цитохром *c*-оксидазе. (б) — Вверху иммуноокрашивание антителами к PINK1; внизу количественные характеристики, отражающие соотношение оптической плотности PINK1 к цитохром *c*-оксидазе. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD четырех независимых экспериментов. * — Значимое изменение по сравнению с контролем, $p < 0.05$; # — значимое изменение по сравнению с изопротеренолом, $p < 0.05$.

тивность. С другой стороны, деление (fission) способствует распространению и наследованию митохондрий и помогает в изоляции дисфункциональных (поврежденных) митохондрий из интактной сети и их избирательном удалении с помощью митофагии [27]. Митофагия относится к процессу селективного удаления клетками поврежденных митохондрий посредством аутофагии, что играет важную роль в «контроле качества» митохондрий и выживании клеток. Мы проанализировали влияние астаксантина на изменение маркеров аутофагии LC3A/B (I, II) и митофагии PINK1 в митохондриях мозга у крыс с изопротеренол-индуцированной митохондриальной дисфункцией (рис. 5). На рис. 5а и 5б в верхней части показан вестерн-блот белков LC3A/B (I, II) и PINK1, в нижней части — результаты денситометрического анализа. Астаксантин не изменял содержание LC3A/B (I, II), но повышал PINK1 на 40% по сравнению с контролем. Действие изопротеренола повышало содержание LC3A/B (I) и LC3A/B (II) в два раза и снижало PINK1 на 20% по сравнению с контролем. При совместном действии астаксантина и изопротеренола уровни

LC3A/B (I) и LC3A/B (II) не изменялись по сравнению с контролем и снижались на 40 и 35% соответственно по сравнению с действием изопротеренола. В этих условиях содержание PINK1 увеличивалось на 40% по сравнению с контролем и в два раза по сравнению с одним изопротеренолом.

У млекопитающих было охарактеризовано несколько рецепторов митофагии, одним из них является прохибитин 2 — белок, который имеет решающее значение в ориентировании митохондрий на аутофагическую деградацию [28]. На рис. 6 показано изменение прохибитина 2 в ММК в наших экспериментальных условиях. Содержание прохибитина 2 в ММК, изолированных из группы 2, не изменилось, тогда как при действии изопротеренола уменьшалось на 30% по сравнению с контролем. При хроническом введении астаксантина с последующей инъекцией изопротеренола уровень прохибитина 2 не изменялся по сравнению с контролем и повышался на 26% по сравнению с одним изопротеренолом.

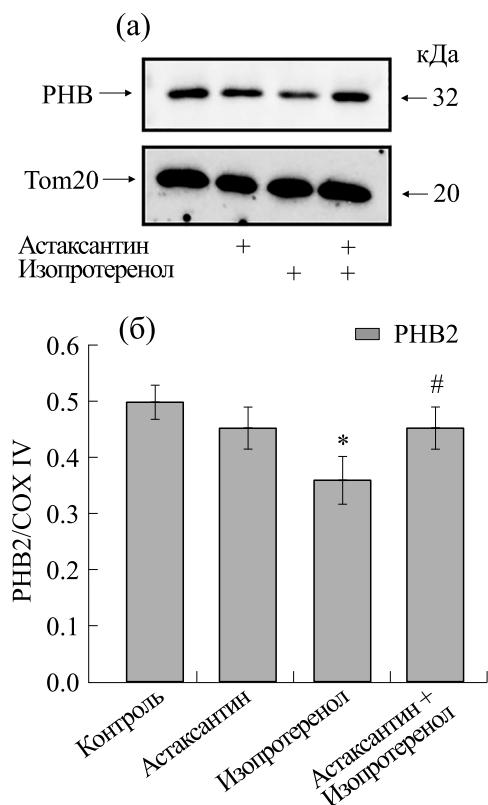


Рис. 6. Влияние астаксантина на изменение содержания прохибитина 2 при изопротеренол-индуцированной митохондриальной дисфункции. Цитохром с-оксидазу использовали как контроль белковой нагрузки. (а) – иммуноокрашивание антителами к прохибитину 2; (б) – количественная характеристика, отражающая соотношение оптической плотности прохибитина 2 к цитохром с-оксидазе. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD четырех независимых экспериментов. * – $p < 0.05$ значимое изменение по сравнению с контролем, # – $p < 0.05$ значимое изменение по сравнению с изопротеренолом.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании мы изучили влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий головного мозга у крыс с изопротеренол-индуцированной митохондриальной дисфункцией. Изопротеренол используется в качестве модели сердечной недостаточности [13], признанной в международном научном сообществе. Ранее мы показали, что содержание таких белков, как аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, тропонин I и миоглобин, после введения изопротеренола снижалось в тканевых лизатах сердца крыс, тогда как астаксантин увеличивал уровень этих ферментов до контрольных значений [29]. Более того, при гистологическом анализе криосрезов левого желудочка сердца крысы после введения изопротеренола были выявлены признаки фиброподобных повреждений в миокарде (средняя

зона), участки сращения набухших мышечных волокон и гипертрофия миокарда. Астаксантин снижал как дегенерацию и постишемический отек мышечных волокон сердца, так и степень фиброподобного поражения миокарда, вызванной изопротеренолом [10].

Взаимодействие между нейровоспалением и сердечно-сосудистыми заболеваниями в последнее время стало предметом исследований. Нейровоспаление может быть как причиной, так и следствием сердечно-сосудистых заболеваний [30]. Более того, известно, что при неврологических повреждениях происходит активация микроглии – процесса, при котором первоначально увеличивается тело клетки [31]. В наших недавних исследованиях мы наблюдали, что количество клеток на единицу площади не изменилось во всех экспериментальных группах, однако мы заметили значительное увеличение площади MIP-областей (maximum intensity projection, проекция максимальной интенсивности), что свидетельствует об увеличении размера Iba-1-позитивных клеток микроглии. Размеры клеток микроглии значимо увеличивались у крыс после инъекции изопротеренола, а при совместном действии астаксантина и изопротеренола не отличались от контрольной группы [32]. Исходя из ранее полученных результатов, инъекция изопротеренола приводила к повреждениям как сердечной, так и мозговой тканей, в то время как астаксантин отменял действие изопротеренола, что указывает на его протекторный эффект.

Поскольку большинство важных компонентов митохондриальной электронно-транспортной цепи расположены во внутренней митохондриальной мембране, а астаксантин достаточно легко проникает через клеточную мембрану, достигая субклеточных структур, в частности митохондрий, то он способен защищать митохондриальные мембраны от окислительного повреждения [33]. Согласно результатам, полученным в настоящем исследовании, астаксантин улучшал функциональное состояние ММК, при изопротеренол-индуцированной митохондриальной дисфункции. При этом скорость входа Ca^{2+} , пороговая концентрация Ca^{2+} и активность комплексов I, IV и V дыхательной цепи повышались. Исходя из того, что Ca^{2+} считается индуктором открытия поры неспецифической проницаемости, открытие которой приводит к запуску апоптотического каскада и впоследствии к гибели клетки [34], можно заключить, что при хроническом введении астаксантина ММК были более устойчивы к формированию мРТР.

Известно, что открытие мРТР изменяет проницаемость внутренней мембраны митохондрий, что приводит к падению мембранного потенциала и деполяризации мембраны [35]. Слияние ми-

тохондрий происходит преимущественно между интактными митохондриями (с более высоким мембранным потенциалом), т.е. в процессе слияния участвуют неповрежденные митохондрии. Однако при митохондриальной дисфункции может формироваться субпопуляция неслитых митохондрий [36]. При введении изопротеренола ММК были более чувствительны к Ca^{2+} , что приводило к индукции мРТР, при этом содержание митофузина 2 и белка OPA1, ответственных за слияние соответственно внешней и внутренней мембраны митохондрий [37], снижалось, что подтверждает ранее высказанное предположение, что открытие мРТР ингибирует слияние митохондрий [38]. Напротив, введение астаксантина приводило к тому, что ММК были более устойчивыми к открытию мРТР и содержание белков увеличивалось.

Нарушения, дефекты или дисбаланс в механизмах деления и слияния способствуют митохондриальной дисфункции, которая связана со многими острыми и хроническими неврологическими расстройствами, включая инсульт, черепно-мозговую травму [39]. Повышенная экспрессия DRP1 приводит к усиленному делению и образованию митохондриальных фрагментаций, что способствует гибели нейронов после острых и хронических поражений центральной нервной системы [39, 40], однако в мозге ингибирование DRP1-зависимого деления митохондрий обеспечивает нейропротекцию [41]. В настоящем исследовании изопротеренол снижал функциональное состояние ММК при этом деление митохондрий усиливалось, а слияние снижалось, что могло привести к накоплению дисфункциональных митохондрий. Дисфункциональные митохондрии могут потерять способность к слиянию путем инактивации механизмов слияния или активации механизмов деления, чтобы предотвратить повторное включение поврежденных митохондрий в здоровую митохондриальную сеть [42]. Известно, что в условиях стресса FUNDC1, BNIP3 и NIX рекрутируют аутофагосомы в митохондрии путем прямого взаимодействия с LC3 через его домены LIR. Накопленные дисфункциональные митохондрии могут быть удалены посредством аутофагии и митофагии [43]. Мы наблюдали, что уровни маркеров аутофагии повышались при изопротеренол-индуцированном повреждении митохондрий, однако уровень маркера митофагии PINK1 при этом снижался. При совместном применении астаксантина и изопротеренола аутофагия уменьшалась, в то время как митофагия возрастала. Вероятно, в этих условиях соотношение слияния и деления восстанавливалось, уровень PINK1 повышался, поврежденные митохондрии удалялись с помощью митофагии, количество функциональных ММК повышалось, что улучшало их функциональное состояние.

Известно, что прохибитин 2 считается распространенным белком, локализованным во внутренней мембране митохондрий и играющий ключевую роль в гомеостазе клеточного энергетического метаболизма [44]. Прохибитин 2 имеет решающую роль для структурной и функциональной целостности митохондрий, модуляции митохондриальной динамики, митофагии и так называемого «контроля качества» митохондрий [28, 45]. Более того, прохибитин 2 имеет решающее значение в деградации митохондрий при аутофагии [43]. Снижение прохибитина 2 активирует резидентную протеазу во внутренней митохондриальной мембране, что приводит к расщеплению PINK1, что в конечном счете ингибирует митофагию [45]. Снижение прохибитина 2 под действием изопротеренола в ММК способствовало снижению PINK1 и, следовательно, замедлению митофагии, в то время как астаксантин восстанавливал прохибитин 2 до контрольного уровня, что приводило к повышению содержания PINK1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы изучили влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга, изменение слияния/деления митохондрий и митофагию при изопротеренол-индуцированном повреждении. Изопротеренол снижал дыхательный контроль, емкость Ca^{2+} и увеличивал скорость митохондриального набухания, что говорит о повышении проницаемости митохондриальной мембраны в присутствии изопротеренола в ММК, в то время как введение астаксантина улучшало эти параметры, несмотря на инъекцию изопротеренола. Изопротеренол усиливал деление митохондрий и ингибировал слияние как внешних, так и внутренних митохондриальных мембран, при этом митофагия замедлялась. Эти события, вероятно, происходят из-за того, что в митохондриях снижается содержание прохибитина 2 — белка, рассматриваемого как рецептор митофагии [43]. Поврежденные митохондрии не удаляются митофагией, накапливаются в митохондриальной сети, и функции митохондрий нарушаются (снижается дыхательный контроль и активность комплексов (I, IV и V) дыхательной цепи, митохондрии становятся более чувствительны к открытию мРТР, ускоряется набухание митохондрий). Астаксантин увеличивает содержание прохибитина 2, что, в свою очередь, приводит к регулированию баланса деления/слияния и митофагии, восстанавливая целостность митохондриальной сети. При этом улучшается функциональное состояние митохондрий, которые становятся более устойчивыми к открытию мРТР (повышается дыхательный контроль, емкость Ca^{2+} и активность комплексов дыхательной

цепи, что приводит к замедлению открытия мРПР и ингибированию набухания митохондрий). Использование астаксантина в терапии может быть перспективным подходом для профилактики и лечения как сердечно-сосудистых заболеваний, так и мозговых нарушений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01025-23-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с Положением о проведении исследований на экспериментальных животных (Приказ Минздрава России № 755 от 12 августа 1997 г.). Протокол одобрен Комиссией по биологической безопасности и этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (протокол № 14/2023 от 8 февраля 2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Havakuk O., King K. S., Grazette L., Yoon A. J., Fong M., Bregman N., Elkayam U., and Kloner R. A. Heart Failure-Induced Brain Injury. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **69**, 1609–1616 (2017). DOI: 10.1016/j.jacc.2017.01.022
2. Mueller K., Thiel F., Beutner F., Teren A., Frisch S., Ballarini T., Moller H. E., Ihle K., Thiery J., Schuler G., Villringer A., and Schroeter M. L. Brain Damage With Heart Failure: Cardiac Biomarker Alterations and Gray Matter Decline. *Circ. Res.*, **126**, 750–764 (2020). DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315813
3. Rezin G. T., Amboni G., Zugno A. I., Quevedo J., and Streck E. L. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem. Res.*, **34**, 1021–1029 (2009). DOI: 10.1007/s11064-008-9865-8
4. Bhatti J. S., Bhatti G. K., and Reddy P. H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders – A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.*, **1863**, 1066–1077 (2017). DOI: 10.1016/j.bba-dis.2016.11.010
5. Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem. Soc. Symp.*, **61**, 73–101 (1995). DOI: 10.1042/bss0610073
6. Regnier P., Bastias J., Rodriguez-Ruiz V., Caballero-Casero N., Caballo C., Sicilia D., Fuentes A., Maire M., Crepin M., Letourneur D., Gueguen V., Rubio S., and Pavon-Djavid G. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity. *Mar. Drugs*, **13**, 2857–2874 (2015). DOI: 10.3390/md13052857
7. Higuera-Ciupara I., Felix-Valenzuela L., and Goy-coolea F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **46**, 185–196 (2006). DOI: 10.1080/10408690590957188
8. Kim S. H. and Kim H. Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction – A Mini-Review. *Nutrients*, **10** (9), 1137 (2018). DOI: 10.3390/nu10091137
9. Baburina Y., Krestinin R., Odinkova I., Sotnikova L., Kruglov A., and Krestinina O. Astaxanthin Inhibits Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Rat Heart Mitochondria. *Antioxidants (Basel)*, **8**, 576 (2019). DOI: 10.3390/antiox8120576
10. Krestinin R., Baburina Y., Odinkova I., Kruglov A., Fadeeva I., Zvyagina A., Sotnikova L., and Krestinina O. Isoproterenol-Induced Permeability Transition Pore-Related Dysfunction of Heart Mitochondria Is Attenuated by Astaxanthin. *Biomedicines*, **8** (10), 437 (2020). DOI: 10.3390/biomedicines8100437
11. Krestinina O., Baburina Y., Krestinin R., Odinkova I., Fadeeva I., and Sotnikova L. Astaxanthin Prevents Mitochondrial Impairment Induced by Isoproterenol in Isolated Rat Heart Mitochondria. *Antioxidants (Basel)*, **9**, 262 (2020). DOI: 10.3390/antiox9030262
12. Galasso C., Orefice I., Pellone P., Cirino P., Miele R., Ianora A., Brunet C., and Sansone C. On the Neuroprotective Role of Astaxanthin: New Perspectives? *Mar. Drugs*, **16**, 247 (2018). DOI: 10.3390/md16080247
13. Akila P., Asaikumar L., and Vennila L. Chlorogenic acid ameliorates isoproterenol-induced myocardial injury in rats by stabilizing mitochondrial and lysosomal enzymes. *Biomed. Pharmacother.*, **85**, 582–591 (2017). DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.067
14. Twig G. and Shirihai O. S. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal.*, **14**, 1939–1951 (2011). DOI: 10.1089/ars.2010.3779
15. Cribbs J. T. and Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.*, **8**, 939–944 (2007). DOI: 10.1038/sj.embor.7401062
16. Zhao X. Y., Lu M. H., Yuan D. J., Xu D. E., Yao P. P., Ji W. L., Chen H., Liu W. L., Yan C. X., Xia Y. Y., Li S., Tao J., and Ma Q. H. Mitochondrial Dysfunction in Neural Injury. *Front. Neurosci.*, **13**, 30 (2019). DOI: 10.3389/fnins.2019.00030
17. Taylor R. and Goldman S. J. Mitophagy and disease: new avenues for pharmacological intervention. *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 2056–2073 (2011). DOI: 10.2174/138161211796904768
18. Ding W. X. and Yin X. M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem.*, **393**, 547–564 (2012). DOI: 10.1515/hsz-2012-0119
19. Jin M., Liu X., and Klionsky D. J. SnapShot: Selective autophagy. *Cell*, **152**, 368–368 (2013). e362, DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.004

20. Mijaljica D., Prescott M., and Devenish R. *Mitophagy: An Overview*. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, Ed. by M. A. Hayat (Acad. Press, 2014), pp. 103–116. DOI: 10.1016/B978-0-12-405528-5.00005-5
21. Ambati R. R., Phang S. M., Ravi S., and Aswathanarayana R. G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. *Mar. Drugs*, **12**, 128–152 (2014). DOI: 10.3390/md12010128
22. Sims N. R. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.*, **55**, 698–707 (1990).
23. Baburina Y. L., Gordeeva A. E., Moshkov D. A., Krestinina O. V., Azarashvili A. A., Odinkova I. V., and Azarashvili T. S. Interaction of myelin basic protein and 2',3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase with mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 555–565 (2014). DOI: 10.1134/S0006297914060091
24. Azarashvili T., Grachev D., Krestinina O., Evtodienko Y., Yurkov I., Papadopoulos V., and Reiser G. The peripheral-type benzodiazepine receptor is involved in control of Ca^{2+} -induced permeability transition pore opening in rat brain mitochondria. *Cell Calcium*, **42**, 27–39 (2007). DOI: 10.1016/j.cecc.2006.11.004
25. Baburina Y., Azarashvili T., Grachev D., Krestinina O., Galvita A., Stricker R., and Reiser G. Mitochondrial 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) interacts with mPTP modulators and functional complexes (I-V) coupled with release of apoptotic factors. *Neurochem. Int.*, **90**, 46–55 (2015). DOI: 10.1016/j.neuint.2015.07.012
26. Jha P., Wang X., and Auwerx J. Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE). *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, **6**, 1–14 (2016). DOI: 10.1002/9780470942390.mo150182
27. Escobar-Henriques M. and Anton F. Mechanistic perspective of mitochondrial fusion: tubulation vs. fragmentation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 162–175 (2013). DOI: 10.1016/j.bbamer.2012.07.016
28. Wei Y., Chiang W. C., Sumpter R., Jr., Mishra P., and Levine B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell*, **168**, 224–238.E1–E6 (2017). DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.042
29. Baburina Y., Krestinin R., Odinkova I., Fadeeva I., Sotnikova L., and Krestinina O. The Identification of Prohibitin in the Rat Heart Mitochondria in Heart Failure. *Biomedicines*, **9** (12), 1793 (2021). DOI: 10.3390/biomedicines9121793
30. Richards E. M., Li J., Stevens B. R., Pepine C. J., and Raizada M. K. Gut Microbiome and Neuroinflammation in Hypertension. *Circ. Res.*, **130**, 401–417 (2022). DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319816
31. Kettenmann H., Hanisch U. K., Noda M., and Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.*, **91**, 461–553 (2011). DOI: 10.1152/physrev.00011.2010
32. Baburina Y., Krestinin R., Fedorov D., Odinkova I., Pershina E., Sotnikova L., and Krestinina O. The Improvement of Functional State of Brain Mitochondria with Astaxanthin in Rats after Heart Failure. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 31 (2022). DOI: 10.3390/ijms24010031
33. Nishida Y., Nawaz A., Hecht K., and Tobe K. Astaxanthin as a Novel Mitochondrial Regulator: A New Aspect of Carotenoids, beyond Antioxidants. *Nutrients*, **14**, 107 (2021). DOI: 10.3390/nu14010107
34. Kinnally K. W. and Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis*, **12**, 857–868 (2007). DOI: 10.1007/s10495-007-0722-z
35. Kwong J. Q. and Molkentin J. D. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.*, **21**, 206–214 (2015). DOI: 10.1016/j.cmet.2014.12.001
36. Twig G., Elorza A., Molina A. J., Mohamed H., Wikstrom J. D., Walzer G., Stiles L., Haigh S. E., Katz S., Las G., Alroy J., Wu M., Py B. F., Yuan J., Deeney J. T., Corkey B. E., and Shirihai O. S. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.*, **27**, 433–446 (2008). DOI: 10.1038/sj.emboj.7601963
37. Hom J. and Sheu S. S. Morphological dynamics of mitochondria—a special emphasis on cardiac muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **46**, 811–820 (2009). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.023
38. Gazaryan I. G. and Brown A. M. Intersection between mitochondrial permeability pores and mitochondrial fusion/fission. *Neurochem. Res.*, **32**, 917–929 (2007). DOI: 10.1007/s11064-006-9252-2
39. Burte F., Carelli V., Chinnery P. F., and Yu-Wai-Man P. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.*, **11**, 11–24 (2015). DOI: 10.1038/nrneurol.2014.228
40. Reddy P. H., Reddy T. P., Manczak M., Calkins M. J., Shirendeb U., and Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.*, **67**, 103–118 (2011). DOI: 10.1016/j.brainresrev.2010.11.004
41. Cui M., Ding H., Chen F., Zhao Y., Yang Q., and Dong Q. Mdivi-1 Protects Against Ischemic Brain Injury via Elevating Extracellular Adenosine in a cAMP/CREB-CD39-Dependent Manner. *Mol. Neurobiol.*, **53**, 240–253 (2016). DOI: 10.1007/s12035-014-9002-4
42. Youle R. J. and van der Bliek A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, **337**, 1062–1065 (2012). DOI: 10.1126/science.1219855
43. Li W., He P., Huang Y., Li Y. F., Lu J., Li M., Kurihara H., Luo Z., Meng T., Onishi M., Ma C., Ji-ang L., Hu Y., Gong Q., Zhu D., Xu Y., Liu R., Liu L., Yi C., Zhu Y., Ma N., Okamoto K., Xie Z., Liu J., He R.-R., and Feng D. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances. *Theranostics*, **11**, 222–256 (2021). DOI: 10.7150/thno.49860
44. Tatsuta T., Model K., and Langer T. Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mi-

- tochondria. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 248–259 (2005). DOI: 10.1091/mbc.e04-09-0807
45. Yan C., Gong L., Chen L., Xu M., Abou-Hamdan H., Tang M., Desaubry L., and Song Z. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis. *Autophagy*, **16**, 419–434 (2020). DOI: 10.1080/15548627.2019.1628520

Astaxanthin Prevents Dysregulation of Mitochondrial Dynamics in Rat Brain Mitochondria Induced under Isoproterenol-Induced Injury

R.R. Krestinin*, Yu.L. Baburina*, I.V. Odinkova*, L.D. Sotnikova*, and O.V. Krestinina*

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

Mitochondria are involved in the development of diseases with different etiologies. The use of drugs which can enhance the functional state of mitochondria may turn into a promising therapeutic approach to diseases with different etiologies. Astaxanthin, a keto-carotenoid (xanthophyll) predominantly of marine origin, shows both lipophilic and hydrophilic properties and can penetrate the cell membrane to localize to mitochondria where it prevents mitochondrial dysfunction. This study examined the effect of astaxanthin on the functional state of rat brain mitochondria, investigated the changes in mitochondrial dynamics and mitophagy under isoproterenol-induced injury. In the presence of astaxanthin, mitochondria were more resistant to Ca^{2+} -induced opening of a nonspecific pore, and the activity of complexes I, IV and V of the respiratory chain increased. Moreover, the presence of astaxanthin led to altered mitochondrial fission and fusion as well as mitophagy, in isoproterenol-induced mitochondrial dysfunction. This presumably increased the quantity of rat brain mitochondria and enhanced their functional state. Astaxanthin can be considered as a mitochondria-targeted agent in therapy in pathological conditions associated with oxidative damage and mitochondrial dysfunction caused by acute heart failure. Astaxanthin as a dietary supplement has the potential to provide antioxidant protection to cells in cardiovascular disease.

Keywords: astaxanthin, isoproterenol-induced mitochondrial dysfunction, mitophagy, mitochondrial dynamics

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ ПОЛИАКРИЛАТА СЕРЕБРА

© 2024 г. Л.А. Островская*,*, Д.Б. Корман*, Е.И. Некрасова*, А.К. Чигасова*,
Н.В. Блюхтерова*, В.А. Рыкова*, М.М. Фомина*, Ю.А. Хоченкова**, К.А. Абзаева***

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

**Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ,
Каширское шоссе, 24, Москва, 115478, Россия

***Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН,
Институтская ул., 3, Новосибирск, 630090, Россия

#E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 25.07.2023 г.

После доработки 25.07.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Полиакрилат серебра (аргакрил) обладает противоопухолевой активностью на моделях солидных опухолей мышей *in vivo* и цитотоксическим действием на клетки опухолей человека *in vitro*. Аргакрил усиливает противоопухолевый эффект цисплатина (карцинома легких Льюис мышей) и не проявляет перекрестной резистентности с цисплатином и доксорубицином (рак молочной железы человека MCF-7). Молекулярный механизм действия аргакрила связан с индукцией односторонних разрывов ДНК при отсутствии образования сшивок в молекуле ДНК.

Ключевые слова: полиакрилаты серебра и золота, аргакрил, аурумакрил, противоопухолевая активность, цитотоксический эффект.

DOI: 10.31857/S0006302924010104, EDN: RBTTUF

Как показали исследования последних десятилетий, соединения, содержащие благородные металлы — золото и серебро, — обладают значительной биологической, в том числе антибактериальной, гемостатической, цитотоксической и противоопухолевой активностью, что указывает на перспективность их изучения в качестве потенциальных антимикробных, гемостатических и противоопухолевых средств [1].

В результате проведенных нами исследований впервые было показано, что золото- и серебросодержащие полимеры на основе полиакриловой кислоты проявляют значимый цитостатический и противоопухолевый эффект, что позволило отобрать для углубленного изучения в качестве потенциальных цитостатиков полиакрилаты, содержащие золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил) [2–6].

Необходимо отметить, что аурумакрил и аргакрил являются первыми и пока единственными полимерными соединениями среди изученных золото- и серебросодержащих веществ, способных в определенных условиях формировать нано-

размерные частицы драгоценных металлов в полимерной матрице, что, вероятно, вносит вклад в особенности метаболизма этих препаратов в физиологических условиях [7].

Согласно современным представлениям, полимерные комплексы, которые содержат в своем составе ионогенные группы и наночастицы, обладают способностью к комплементарным конформационным превращениям и кооперативному связыванию, а также к невалентным взаимодействиям с биологическими объектами, что определяет многообразие их практически значимых свойств, в том числе широкий спектр фармакологической активности. При этом отмечается, что природа содержащегося в полимере металла оказывает весьма существенное влияние на чувствительность опухолевых клеток различного генеза к изучавшимся препаратам.

В связи с этим уместно отметить, что при исследовании механизма действия нанокомпозитов на основе золота и серебра в качестве гемостатиков было показано, что в условиях *in vivo* природа металлов определяет кинетическую устойчивость комплексов. Так, полимер, который содержит химически инертный атом золота, обладающего

Сокращение: в/б — внутрибрюшинно.

низкой аффинностью к кислороду, проявляет большую гемостатическую активность по сравнению с полимером, содержащим более реакционноспособные наночастицы серебра [1, 7].

Ранее нами были представлены обобщенные результаты доклинического изучения противоопухолевой, цитотоксической активности и механизма действия препарата, содержащего золото, — аурумакрил (полиакрилат золота) [3].

В настоящей работе обобщены данные по экспериментальному исследованию противоопухолевого, цитостатического эффектов и механизма действия полимера, содержащего другой благородный металл — серебро, — препарата аргакрила (полиакрилата серебра).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Аргакрил представляет собой неполную серебряную соль полиакриловой кислоты с содержанием серебра 8.03%. Отвечает общей формуле $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAg}-)_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимера составляет 100–300 кДа. Инфракрасные спектры препарата содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 см^{-1} . Субстанция препарата представляет собой стекловидные пластинки серебристого цвета, хорошо растворимые в воде [1].

Аргакрил в условиях *in vivo* применяли в виде водных растворов внутрибрюшинно (в/б) многократно, ежедневно, начиная со следующих суток после перевивки опухоли, в суточных дозах 1, 2 и 6 мг/кг. Оценка цитотоксического эффекта аргакрила *in vitro* проведена при его применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 0.002 до 2.000 мг/мл (2–2000 мкг/мл).

Использованные в исследовании конвенционные препараты цисплатин (Teva, Израиль) и доксорубин (Pfizer, США) применяли *in vitro* в концентрациях, изменяющихся в диапазоне 0.122–500 мкг/мл и 0.007–1000 мкг/мл соответственно. Цисплатин в опытах *in vivo* вводили в суточной дозе 1 мг/мл в/б на протяжении 4 либо 8 суток.

Лабораторные животные. Эксперименты проведены на инбредных линейных мышах BDF₁ — гибридах первого поколения $f_1(\text{C}_{57}\text{Bl}/6 \times \text{DBA}_2)$, а также мышах линии Balb/c, массой 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России».

Модели опухолей животных. В качестве опухолевых тест-систем служили перевиваемые солидные опухоли мышей — карцинома легких Льюис, аденокарцинома Ca-755 (мыши BDF₁), аденокарцинома Акатол (мыши Balb/c). Перевивку опухо-

лей осуществляли в соответствии со стандартной методикой под кожу правого бока мышей измельченными фрагментами опухолевой ткани, содержащейся в 0.3 мл физиологического раствора хлористого натрия [8, 9].

Оценка противоопухолевого эффекта *in vivo*. Показателями ростингибирующего эффекта препарата служили различия в кинетике роста опухолей и средней продолжительности жизни у леченных (Т) и контрольных (С) животных. Коэффициент торможения роста опухоли (*TPO*, %) определялся из соотношения $TPO = (P_C - P_T)/P_C$, где P_C и P_T — средняя масса опухолей мышей в группах контрольных и леченных животных. Изменение средней продолжительности жизни ($\Delta\tau$, %) определялось как $\Delta\tau = (\tau_C - \tau_T)/\tau_C$, где τ_C и τ_T — средняя продолжительность жизни мышей в группах контрольных и леченных животных [8, 9].

Культуры клеток. Для оценки цитотоксического эффекта аргакрила в отношении клеток опухолей человека использованы клеточные культуры рака легкого А-549, рака толстой кишки НСТ116, меланомы Mel Me, рецептор-положительной карциномы молочной железы MCF-7, в том числе вариантов культуры MCF-7 с приобретенной резистентностью к цисплатину MCF-7/CP и доксорубину MCF-7/ADR, полученные из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Оценка антиметастатического эффекта *in vivo*. Исследование влияния аргакрила на процесс метастазирования первичной опухоли проведено на модели карциномы легких Льюис мышей в сравнительных экспериментах с использованием содержащего золото препарата — аурумакрила.

Карцинома легких Льюис является, как известно, одной из основных экспериментальных моделей для изучения антиметастатического действия противоопухолевых препаратов, поскольку при ее развитии рост первичной опухоли, перевитой подкожно или внутримышечно, сопровождается образованием метастазов в легких. Образовавшиеся метастазы можно регистрировать визуально в виде колоний опухолевых клеток в легких начиная с 16–18 суток после перевивки опухоли [10].

Подсчет колоний опухолевых клеток в легких проводился под лупой после фиксации легочной ткани по Буэну (насыщенный раствор пикриновой кислоты — 15 г, формалин — 5 г, уксусная кислота — 1 г) с последующим промыванием в 70–80% этаноле.

Показатель антиметастатического эффекта — коэффициент торможения роста метастазов (*TRM*, %) — определяется из соотношения $TRM = (K_C - K_T)/K_C$ %, где K_C и K_T — число колоний

опухолевых клеток в легких у контрольных и леченных животных соответственно [10].

Влияние аргакрила и аурумакрила на развитие процесса метастазирования в легкие перевитой подкожно карциномы Льюис исследовано при введении препаратов в/б пятикратно начиная со следующих суток после перевивки опухоли в суточных дозах 2 и 20 мг/кг соответственно.

Оценка цитотоксического эффекта *in vitro*. Цитотоксичность аргакрила оценивалась путем определения доли выживших по сравнению с контролем клеток с использованием стандартного МТТ-теста, основанного на сравнительном спектрофотометрическом определении оптической плотности раствора формазана в группах клеток, подвергавшихся воздействию препарата, и в контроле в соответствии с ранее описанной методикой [6].

Результаты экспериментов представлены в виде кривых «доза–эффект», характеризующих изменение доли погибших клеток в зависимости от концентрации препаратов через 24 ч инкубирования и позволяющих определить показатель цитотоксичности IC_{50} (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток) в отношении изучавшихся клеточных культур.

Наряду с МТТ-тестом для оценки цитотоксичности аргакрила в ряде экспериментов был применен метод определения гибели клеток с применением йодистого пропидия, описанный нами ранее [11].

Для оценки жизнеспособности клеток использовали йодистый пропидий из коммерческого набора Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4 (Invitrogen, США).

В исследуемые временные точки (через 1, 6 и 24 ч после воздействия аргакрила) клетки дважды промывали раствором Хенкса и снимали их с поверхности чашек 0,25% раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия). Затем к 1 мл клеточной суспензии в растворе Хенкса добавляли 1 мкл раствора йодистого пропидия из упомянутого коммерческого набора. Клетки инкубировали 20 мин при 4°C, ресуспендировали и помещали в камеру Горяева для подсчета погибших клеток. Подсчет клеток в апоптозе 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 пропидия (возбуждение на 540–580 нм и эмиссия на 600–660 нм). Анализировали по 600 клеток для каждой точки.

Анализ одонитевых разрывов ДНК. Для анализа индуцированных аргакрилом одонитевых разрывов ДНК использовали метод электрофоре-

за единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет) [12].

Суспензию контрольных или обработанных аргакрилом клеток смешивали с 1% 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 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 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 последующей нейтрализацией (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 (Nikon, Япония), оснащенным видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab, США).

Статистический анализ результатов. Статистическую обработку полученных *in vivo* данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0 и Statistica 8.0. Результаты представлены как среднее из 12 индивидуальных измерений для каждого экспериментального животного. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия признаются достоверными при условии, что вычисленные значения *t* превышают значения критерия Стьюдента $t_{0,1}$ для определенных уровней значимости ($p \leq 0,01$) при заданном числе степеней свободы f [9].

Статистическая обработка результатов, полученных *in vitro*, проведена с помощью программы Statistica 7.0. Результаты экспериментов представлены в виде средних значений для пяти независимых измерений с учетом стандартной ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное исследование аргакрила включало оценку противоопухолевой активности препарата на моделях солидных опухолей мышей *in vivo*, определение цитотоксического эффекта в отношении клеток опухолей человека *in vitro*, изу-

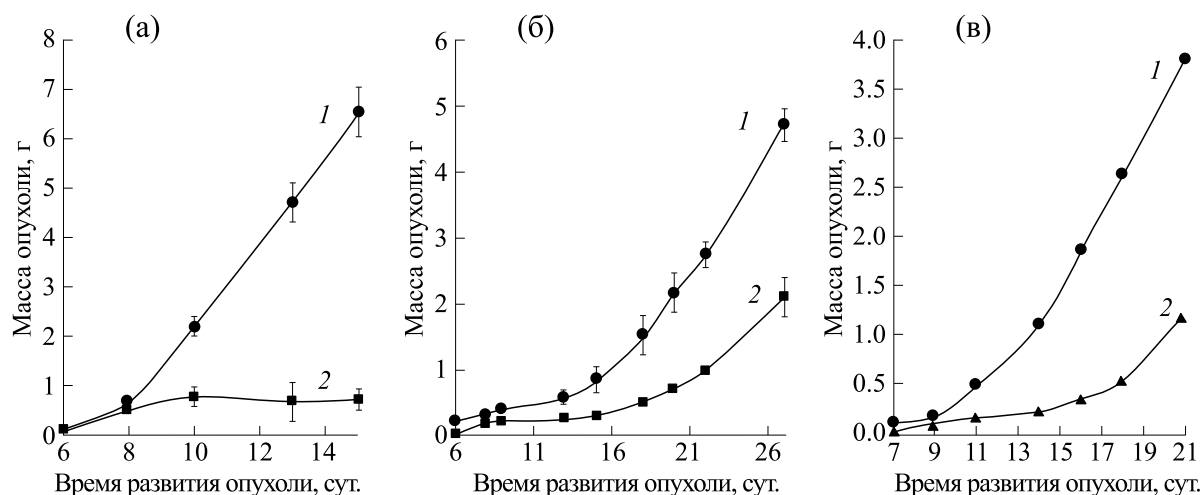


Рис. 1. Противоопухолевая активность аргакрила на моделях карциномы легких Льюис (а), аденокарциномы Акатол (б) и аденокарциномы Са-755 (в): 1 – контроль, 2 – аргакрил 2.0 мг/кг/сутки в/б с 1-х по 5-е сутки после перевивки опухоли (в случае аденокарциномы Са-755 – 6 мг/кг/сутки с 1-х по 9-е сутки).

чение некоторых аспектов механизма действия аргакрила.

Противоопухолевая активность аргакрила на моделях солидных опухолей мышей *in vivo*. Противоопухолевая активность аргакрила изучена на моделях солидных опухолей мышей: карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755 – при ежедневном многократном в/б введении препарата.

Как видно из данных, представленных на рис. 1 и в табл. 1, препарат проявляет существенный противоопухолевый эффект в отношении солидных опухолей мышей, вызывая торможение роста опухолей на 55–90% по сравнению с контролем. Наиболее высокой чувствительностью к действию аргакрила обладает карцинома легких Льюис, развитие которой препарат ингибирует на 90% (рис. 1, табл. 1).

Средняя продолжительность жизни животных с карциномой Льюис увеличивается под влиянием препарата на 46% по сравнению с контролем

(25.0 ± 2.8 суток в контроле, 34.5 ± 4.6 суток при воздействии аргакрила).

Отметим, что аргакрил обладает некоторым антиметастатическим эффектом, вызывая торможение образования колоний опухолевых клеток в легких, формирующихся при развитии карциномы Льюис, на 26% по сравнению с контролем при оценке эффекта на 23 сутки развития опухоли (рис. 2, табл. 2).

Представляется уместным упомянуть о том, что аргакрил обладает несколько менее выраженным антиметастатическим эффектом, чем препарат, содержащий золото (аурумакрил), применение которого приводит к торможению образования колоний в легких на 50% по сравнению с контролем (рис. 2, табл. 2).

Эффективность сочетанного применения аргакрила и цисплатина *in vivo*. Проведено сравнительное изучение эффективности применения аргакрила и цисплатина при индивидуальном и совместном введении на модели карциномы легких

Таблица 1. Противоопухолевая активность аргакрила на моделях солидных опухолей мышей

Штамм опухоли	Доза (мг/кг/сутки) и режим введения	Время оценки эффекта (сутки)	Средняя масса опухоли, г		Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %)
			леченные животные	контрольные животные	
Карцинома Льюис	2.0 (1–5 сутки)	15	0.7 ± 0.1	6.5 ± 0.4	90
Акатол	2.0 (1–5 сутки)	27	2.1 ± 0.2	4.7 ± 0.6	55
Акатол	2.0 (1–5 сутки)	27	2.1 ± 0.2	4.7 ± 0.6	70

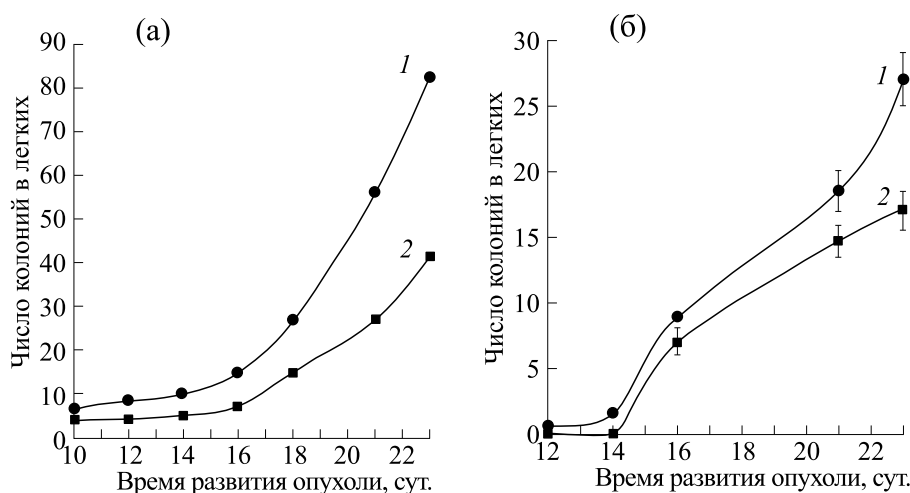


Рис. 2. Влияние полиакрилатов золота (а) и серебра (б) на образование колоний опухолевых клеток в легких при развитии карциномы легких Льюис: (а) — аурумакрил 20 мг/кг/сутки в/б; (б) — аргакрил 2 мг/кг/сутки в/б; 1 — контроль, 2 — препарат. Введение препаратов с 1-х по 5-е сутки после перевивки опухоли.

Льюис. Аргакрил и цисплатин в монорежиме вводились в/б с первых по восьмые сутки после перевивки опухоли в суточных дозах 1 мг/кг. При совместном применении препараты вводились последовательно — цисплатин с первых по четвертые сутки и затем аргакрил с пятых по восьмые сутки.

Как видно по данным, представленным на рис. 3 и в табл. 3, аргакрил и цисплатин при индивидуальном применении ингибируют развитие опухоли на 72 и 86% соответственно.

Совместное применение препаратов в последовательности цисплатин-аргакрил приводит к полному ингибированию развития карциномы Льюис на протяжении 60 суток после перевивки опухоли (рис. 3, табл. 3).

Таким образом, можно полагать, что при совместном последовательном применении цисплатина и аргакрила наблюдается синергетический эффект усиления противоопухолевого действия препаратов, используемых в комбинации, выражающийся в полном и длительном (более 60 суток) ингибировании опухолевого роста.

Цитотоксический эффект аргакрила в отношении клеток опухолей человека *in vitro*. Влияние аргакрила на выживаемость клеток опухолей человека различной природы (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A-549, рак толстой кишки HCT116, меланома Mel Me) характеризуют данные, полученные в экспериментах с применением МТТ-теста при инкубировании клеток с пре-

Таблица 2. Влияние аурумакрила и аргакрила на образование метастазов в легких при развитии карциномы легких Льюис

Препарат	Среднее число колоний опухолевых клеток в легких мышей		Торможение развития метастазов в легкие, %*	Препарат	Среднее число колоний опухолевых клеток в легких мышей
	Леченные мыши	Контрольные мыши			Леченные мыши
Аурумакрил 20 мг/кг/сутки	42.5 ± 2.8	82.5 ± 4.7	50	Аурумакрил 20 мг/кг/сутки	42.5 ± 2.8
Аргакрил 2 мг/кг/сутки	17.0 ± 1.7	23.0 ± 1.8	26	Аргакрил 2 мг/кг/сутки	17.0 ± 1.7

Примечание. Введение препаратов проводили в/б с 1-х по 5-е сутки. * — Оценка эффекта на 23-е сутки развития опухоли.

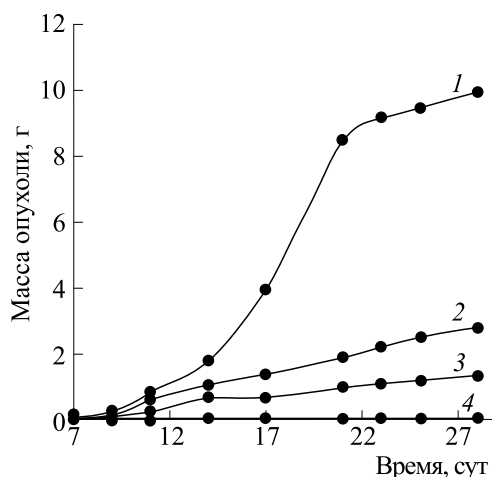


Рис. 3. Влияние аргакрила и цисплатина на развитие карциномы легких Льюис при индивидуальном и совместном применении препаратов: 1 — контроль; 2 — аргакрил 1 мг/кг с 1-х по 8-е сутки в/б; 3 — цисплатин 1 мг/кг с 1-х по 8-е сутки в/б; 4 — цисплатин 1 мг/кг с 1-х по 4-е сутки + аргакрил 1 мг/кг с 5-х по 8-е сутки в/б.

паратом на протяжении 24 ч и представленные на рис. 4.

Как видно по представленным данным, аргакрил обладает дозозависимым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации препарата и типа опухоли.

Препарат вызывают практически полную (94–96%) гибель опухолевых клеток при применении в концентрациях, равных 0.1–0.4 мг/мл, весьма далеких от максимальной концентрации аргакрила, составлявшей 2.0 мг/мл, и изменяющихся

в этих пределах в зависимости от линии опухолевых клеток (рис. 4).

Значения показателя IC_{50} варьируют в пределах от 25 до 180 мкг/мл для аргакрила, изменяясь в зависимости от типа опухолей (табл. 4).

Учитывая, что аргакрил является полимером на основе полиакриловой кислоты с массовым содержанием металла в количестве 8%, а противоопухолевый эффект такого рода соединений связывают в основном с действием образующихся наночастиц благородных металлов, уместно характеризовать цитотоксическую активность аргакрила значениями показателя IC_{50} в пересчете на содержание серебра, которые приведены в таблице 4 [4, 7, 9].

Основываясь на величине значений показателя IC_{50} , позволяющего дифференцировать опухоли различной природы по чувствительности к испытанному препарату, возможно охарактеризовать предполагаемый спектр его цитотоксического действия.

Как видно, в соответствии с показателем цитотоксичности IC_{50} чувствительность культур опухолевых клеток к препарату снижается в следующем ряду: рак молочной железы MCF-7, рак легкого A-549, меланома Mel Me, рак толстой кишки HCT116. При этом очевидно, что наибольшую чувствительность к действию аргакрила проявляют клетки рака молочной железы MCF-7, для которых IC_{50} составляет 2 мкг/мл (табл. 4).

С целью более детального изучения закономерностей гибели клеток рака молочной железы MCF-7 под влиянием аргакрила было предпринято изучение цитотоксического эффекта препарата в зависимости от примененных концентраций и сроков его инкубирования с клетками в

Таблица 3. Эффективность аргакрила и цисплатина при индивидуальном и совместном применении на модели карциномы легких Льюис мышей

Препарат	Суточная доза (мг/кг) и режим введения	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %	СПЖ мышей, сутки	Увеличение СПЖ, %
Аргакрил	1.0 (1–8-е сутки)	2.80 ± 0.8	72	36.5 ± 2.3	34
Цисплатин	1.0 (1–8-е сутки)	1.37 ± 0.5	86	42.6 ± 2.8	56
Цисплатин + Аргакрил	1.0 (1–4-е сутки) + 1.0 (5–8-е сутки)	0	100	>60	>120 (без опухолей)

Примечание. Оценка эффекта на 28-е сутки развития опухоли.

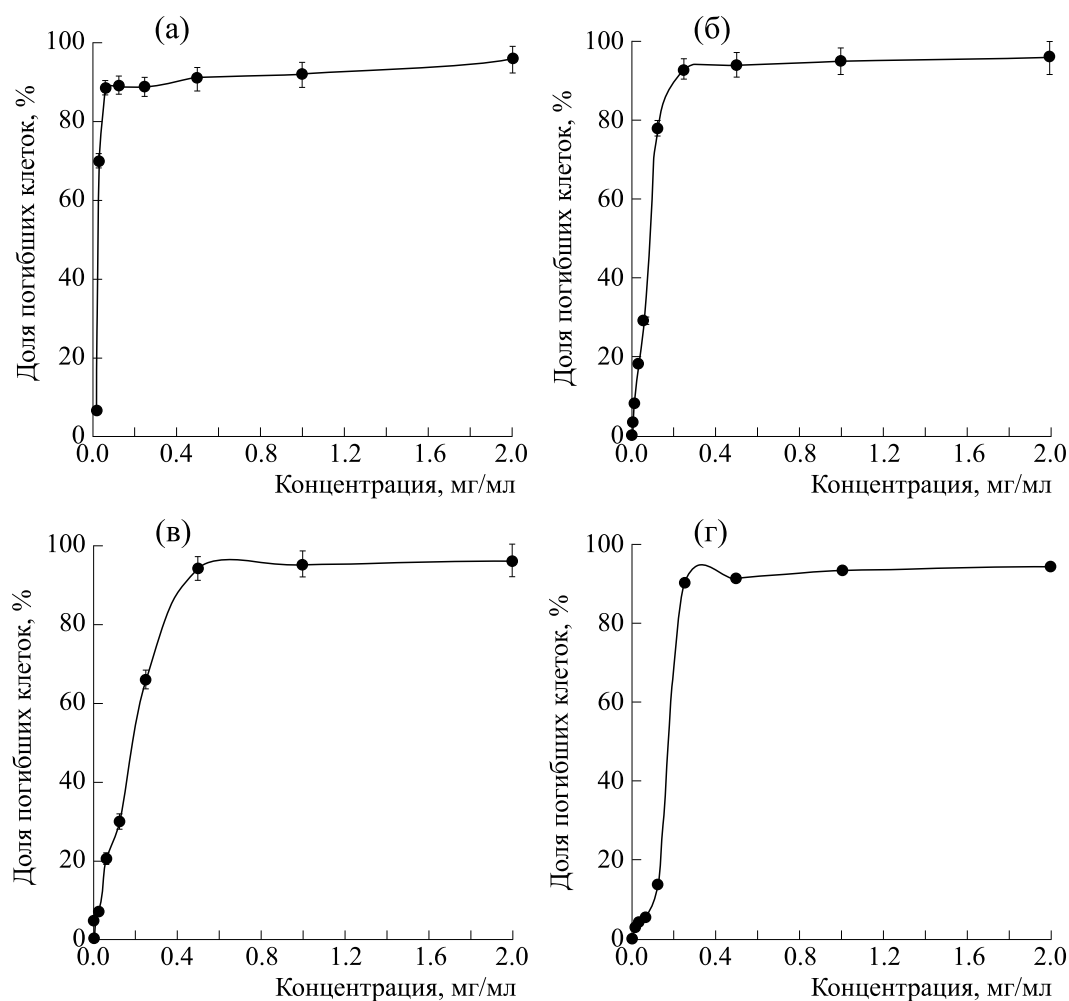


Рис. 4. Изменение доли погибших клеток в культурах опухолевых клеток человека в зависимости от концентрации аргакрила (24 ч инкубирования): (а) – рак молочной железы MCF-7, (б) – рак легкого A-549, (в) – рак толстой кишки HCT116, (г) – меланома Mel Me.

Таблица 4. Значения показателя IC_{50} аргакрила для ряда опухолевых клеток человека, культивируемых *in vitro*

Культура клеток опухоли человека	IC_{50} , мкг/мл
Рак молочной железы MCF-7	25 (2,0)
Рак легкого A549	80 (6,4)
Меланома Mel Me	180 (14,4)
Рак толстой кишки HCT116	180 (14,4)

Примечание. Время инкубирования 24 ч, в скобках указаны значения концентраций IC_{50} для аргакрила в пересчете на содержание серебра в препарате.

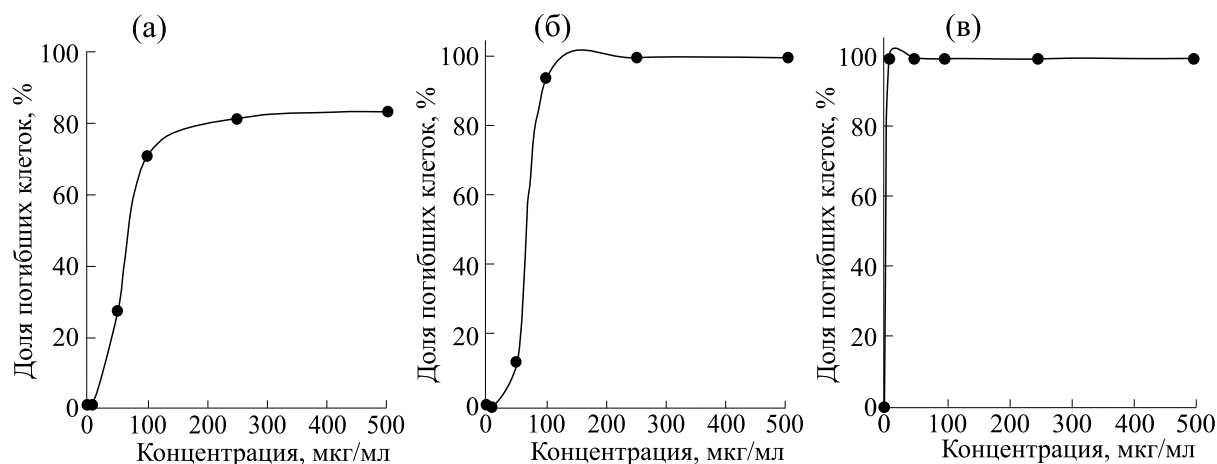


Рис. 5. Концентрационные зависимости гибели клеток линии MCF-7 под влиянием аргакрила для различных времен инкубации с препаратом: (а) – 1 ч, (б) – 6 ч, (в) – 24 ч. По оси абсцисс – концентрация аргакрила, мкг/мл, по оси ординат – доля погибших клеток, %.

экспериментах с использованием йодистого пропидия.

Кривые, характеризующие изменения доли погибших клеток в зависимости от концентрации аргакрила для разных сроков воздействия препарата, представлены на рис. 5.

Как видно, при воздействии препарата в течение 1 ч максимальная гибель клеток составляет 85% при применении препарата в максимальной из изученных концентраций, равной 500 мкг/мл (рис. 5а).

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 10 мкг/мл соответственно (рис. 5б,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. 6.

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.

Показатель IC_{50} , характеризующий 50% гибель 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. 5 и 6).

Сопоставляя данные по характеристике цитотоксического эффекта аргакрила в отношении клеток рака молочной железы человека линии MCF-7, полученные в экспериментах с использованием различных методов для подсчета погибших клеток, следует отметить, что показатель IC_{50} , характеризующий гибель 50% клеток при инкубировании с препаратом в течение 24 ч, составляет 2.0 и 0.8 мкг/мл (в пересчете на содержание серебра) для опытов, проведенных с применением МТТ-теста и йодистого пропидия соответственно.

Таким образом, оба метода, примененных для оценки влияния аргакрила на жизнеспособность клеток, свидетельствуют о высокой цитотоксической активности препарата в отношении клеток опухолей человека.

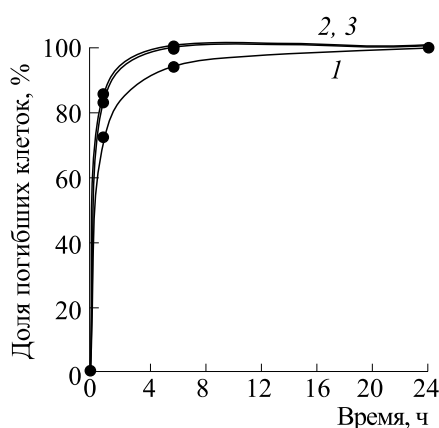


Рис. 6. Изменение доли погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аргакрила в различных концентрациях: 1 – 100 мкг/мл; 2 – 250 мкг/мл; 3 – 500 мкг/мл. По оси абсцисс – время инкубирования клеток с аргакрилом, ч; по оси ординат – доля погибших клеток, %.

Таблица 5. Показатели цитотоксического эффекта препаратов в отношении культуры клеток рака молочной железы человека, обладающих чувствительностью (MCF-7) и резистентностью к действию цисплатина (MCF-7/CP) и доксорубина (MCF-7/ADR)

Препарат	Линия клеток	Диапазон концентраций, мкг/мл	IC_{50} , мкг/мл*	IC_{96} , мкг/мл*
Цисплатин	MCF-7	0.122–500	2.0	250
	MCF-7/CP	1.953–500	20	500
	MCF-7/ADR	0.976–500	7.0	500
Доксорубин	MCF-7	0.007–1000	0.12	500
	MCF-7/CP	0.061–1000	5.0	1000
	MCF-7/ADR	0.122–500	5.0	500
Аргакрил	MCF-7	7.812–2000	50 (4.0)	500 (40)
	MCF-7/CP	1.953–2000	40 (3.2)	1000 (160)
	MCF-7/ADR	0.976–2000	40 (3.2)	500 (40)

Примечание. В скобках указаны значения концентраций IC_{50} и IC_{96} аргакрила в пересчете на содержание серебра.

Цитотоксичность аргакрила в отношении чувствительных и резистентных к цисплатину и доксорубину опухолевых клеток. Проведено исследование наличия перекрестной резистентности между аргакрилом и широко применяемыми в клинической практике противоопухолевыми препаратами цисплатин и доксорубин.

В данном разделе работы представлены результаты изучения цитотоксической активности аргакрила на чувствительном (MCF-7) и резистентных к цисплатину (MCF-7/CP) и доксорубину (MCF-7/ADR) вариантах культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7 с параллельной оценкой цитотоксичности для этих линий клеток препаратов цисплатина и доксорубина [13].

Исходная культура клеток MCF-7 обладает высокой чувствительностью к цисплатину и особенно к доксорубину, о чем свидетельствуют значения коэффициента IC_{50} , равные 2.00 и 0.12 мкг/мл соответственно (табл. 5).

Развитие резистентности клеток к указанным препаратам подтверждается существенным снижением их цитотоксического эффекта в отношении исходно чувствительной культуры.

Так, показатель IC_{50} цисплатина в отношении резистентной к ней культуры клеток MCF-7/CP составляет 20 мкг/мл, увеличиваясь в 10 раз по сравнению с исходным значением, равным 2.0 мкг/мл для культуры MCF-7 (табл. 5).

Для доксорубина коэффициент IC_{50} в отношении резистентной к нему культуры клеток MCF-7/ADR составляет 5.0 мкг/мл, увеличиваясь более чем в 40 раз по сравнению с исходным значением, равным 0.12 мкг/мл для культуры MCF-7 (табл. 5).

Необходимо отметить, что линии клеток с приобретенной резистентностью к цисплатину и доксорубину, обладают перекрестной устойчивостью к действию этих препаратов.

Цитотоксичность цисплатины по отношению к резистентным к доксорубину клеткам MCF-7/ADR снижается в 3.5 раза: значения коэффициента IC_{50} составляют 7 и 2 мкг/мл для культур MCF-7/ADR и MCF-7, соответственно (табл. 5).

Цитотоксичность доксорубина по отношению к резистентным к цисплатину клеткам MCF-7/CP снижается более чем в 40 раз по сравнению с его активностью в отношении исходных клеток MCF-7: значения коэффициента IC_{50} составляют 5.00 и 0.12 мкг/мл соответственно (табл. 5).

Результаты изучения цитотоксической активности аргакрила в отношении исходной культуры клеток MCF-7 и сублиний, резистентных к цисплатину MCF-7/CP и доксорубину MCF-7/ADR, представлены в виде зависимостей «концентрация–эффект» на рис. 7 и в табл. 5.

Как видно по представленным данным, аргакрил так же, как цисплатин и доксорубин, обладает дозозависимым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации вещества.

Аргакрил, подобно цисплатину и доксорубину, вызывает гибель до 96% опухолевых клеток при применении в сопоставимых концентрациях. Так, показатель IC_{96} (минимальная концентрация вещества, вызывающая максимальную гибель клеток) в отношении клеток MCF-7 составляет 500 мкг/мл для аргакрила, доксорубина и

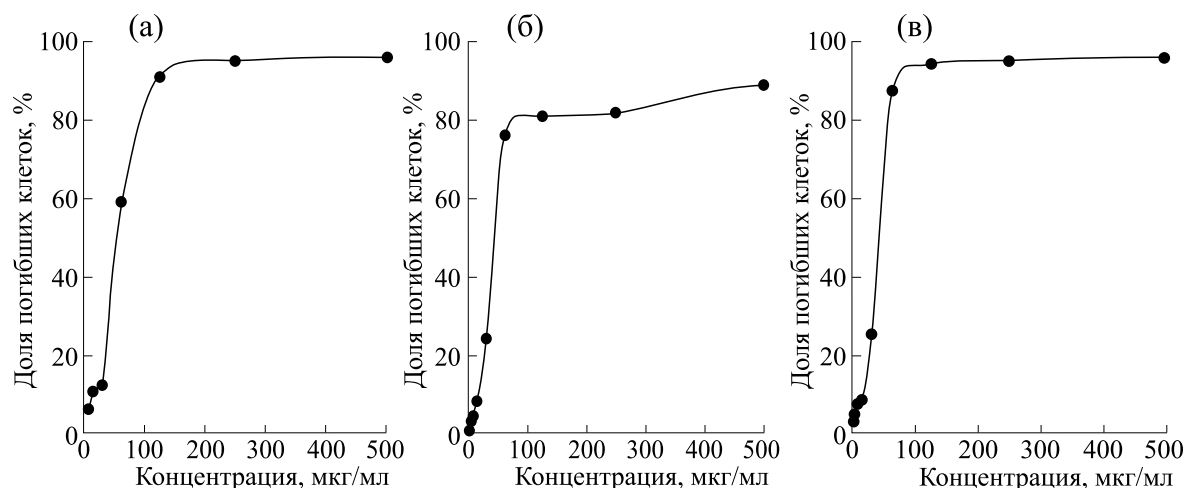


Рис. 7. Цитотоксический эффект аргакрила в отношении чувствительных и резистентных к цисплатину и доксорубину клеток культуры MCF-7: (а) — исходная линия клеток MCF-7, (б) — резистентная к цисплатину линия клеток MCF-7/CP, (в) — резистентная к доксорубину линия клеток MCF-7/ADR. По оси абсцисс — концентрация препарата, мкг/мл; по оси ординат — доля погибших клеток, %.

250 мкг/мл для цисплатина. В отношении клеток MCF-7/CP, резистентных к действию цисплатина, показатель IC_{96} составляет 1000 мкг/мл для аргакрила и доксорубина и 500 мкг/мл для цисплатина. Клетки MCF-7/ADR, резистентные к доксорубину, практически полностью (96%) погибают при воздействии изученных препаратов в концентрации 500 мкг/мл (рис. 7, табл. 5).

Характеризуя цитотоксический эффект аргакрила отметим, что значения коэффициента IC_{50} составляют 50 мкг/мл в отношении чувствительных клеток MCF-7 и 40 мкг/мл в отношении резистентных клеток MCF-7/CP и MCF-7/ADR (рис. 7, табл. 5).

Для удобства сравнения активности препаратов значения IC_{50} для аргакрила в пересчете на содержание металла, наряду с аналогичными по-

казателями для цисплатина и доксорубина, представлены в табл. 6.

Сопоставление активности препаратов в соответствии со значениями критерия оценки цитотоксического эффекта IC_{50} в отношении изученных моделей чувствительных и резистентных опухолевых клеток позволяет сделать следующие выводы (табл. 6).

В отношении чувствительных клеток линии MCF-7 эффективность препаратов снижается в ряду: доксорубин — цисплатин — аргакрил.

В отношении клеток, резистентных к действию цисплатина MCF-7/CP и доксорубина MCF-7/ADR, активность препаратов убывает в следующей последовательности: аргакрил — доксорубин — цисплатин.

Рассматривая действие аргакрила необходимо отметить как принципиально важный результат,

Таблица 6. Значения показателя IC_{50} аргакрила (в пересчете на содержание металла), цисплатина и доксорубина в отношении чувствительных (MCF-7) и резистентных (MCF-7/CP, MCF-7/ADR) клеток культуры рака молочной железы человека

Препарат	Культура клеток		
	MCF-7	MCF-7/CP	MCF-7/ADR
	IC_{50} , мкг/мл		
Аргакрил	4.0	3.2	3.2
Доксорубин	0.12	5.0	5.0
Цисплатин	2.0	20.0	7.0

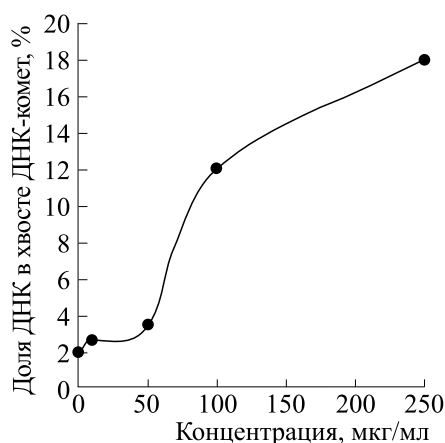


Рис. 8. Влияние аргакрила на образование одонитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках линии MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аргакрила при инкубации клеток с препаратом в течение 24 ч.

полученный в данном исследовании, сохранение практически одинаковой цитотоксической активности препарата в отношении чувствительных и резистентных к действию цисплатина и доксорубина клеток: IC_{50} составляет 4.0 и 3.2 мкг/мл соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что резистентные к цисплатину и доксорубину клетки рака молочной железы человека сохраняют в полной мере чувствительность к цитотоксическому действию аргакрила (табл. 6).

Иными словами, в результате проведенных исследований обнаружено отсутствие перекрестной резистентности у аргакрила с цисплатином и с доксорубином на модели культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7.

Влияние аргакрила 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 [14].

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 аргакрила индуцировать разрывы ДНК и образование ДНК-сшивок в опухолевых клетках (культура клеток карциномы молочной железы человека MCF-7).

Влияние аргакрила на образование одонитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7 характеризуют данные, представленные на рис. 8.

Как видно по представленным данным, доля клеток в хвосте ДНК-комет увеличивается под влиянием аргакрила, примененного в концентрации 100 мкг/мл, более чем в 6 раз, а под воздействием препарата в концентрации 250 мкг/мл — в 9 раз по сравнению с контролем (контрольное значение показателя составляет 1.88%) при инкубации с клетками в течение 24 ч (рис. 8).

Таким образом, очевидно, что аргакрил через 24 ч воздействия, примененный в концентрациях 100 и 250 мкг/мл, индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 одонитевых разрывов ДНК, число которых возрастает в 6 и 9 раз соответственно по сравнению со спонтанным уровнем, наблюдаемым в контроле.

Сопоставляя данные по способности индуцировать образование одонитевых разрывов ДНК препаратами, содержащими серебро и золото, отметим, что аурумакрил (1000 мкг/мл) также индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 одонитевых разрывов ДНК, число которых возрастает в 3.0–4.5 раза по сравнению со спонтанным уровнем разрывов ДНК, наблюдаемых в контроле уже через 1 ч инкубации и сохраняется на протяжении 24 ч культивирования клеток [12].

При этом следует отметить, что аргакрил вызывает в два раза более значительные повреждения структуры ДНК в виде одонитевых разрывов при применении в концентрации в 10 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 серебра и золота, содержащихся в исследуемых препаратах, с биомакромолекулами.

Ранее было показано, что молекулярный механизм действия аурумакрила на опухолевые клетки связан не только с индукцией одонитевых разрывов, но и образованием сшивок в молекуле ДНК [12].

Проведенное нами экспериментальное исследование показало, что при воздействии аргакрила не зафиксировано образование сшивок в молекуле ДНК опухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя результаты проведенного исследования аргакрила отметим следующие экспериментально установленные факты:

– аргакрил обладает противоопухолевой активностью, вызывая ингибирование солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Ca-755) на 55–90% *in vivo*;

– аргакрил обладает дозо- и экспозиционно-зависимым цитотоксическим действием на клетки опухолей человека (рак молочной железы MCF-7, рак легкого A-549, рака толстой кишки HCT116, меланома Mel Me) *in vitro*: IC_{50} препарата колеблется в диапазоне от 2 до 14 мкг/мл, изменяясь в зависимости от типа опухолевых клеток;

– аргакрил усиливает противоопухолевый эффект цисплатина (карцинома легких Льюис) и не проявляет перекрестной резистентности с цисплатином и доксорубицином (рак молочной железы MCF-7);

– молекулярный механизм действия аргакрила связан с индукцией одонитевых разрывов ДНК, при отсутствии образования сшивок в молекуле ДНК (рак молочной железы MCF-7), что указывает на возможные различия в механизме действия аргакрила и аурумакрила.

В заключение отметим, что обнаруженная значительная цитотоксическая и противоопухолевая активность полиакрилатов как золота, так и серебра, отсутствие перекрестной резистентности между этими препаратами и цитостатиками цисплатином и доксорубицином в совокупности с данными об определенных различиях в механизме действия аурумакрила и аргакрила являются экспериментально установленными фактами, свидетельствующими о целесообразности дальнейшего доклинического изучения этих соединений, содержащих оба благородных металла – золото и серебро.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальные работы, проводимые с привлечением лабораторных животных, выполняются в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, которые регламентированы специальными правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS, 123), Страсбург, 1986), а также биоэтическими нормативами, приводимыми в руководствах Guide for care and use of laboratory animals (ILAR publication, National Academy Press, 1996),

Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval, 2nd ed. (Ed. by B.A. Teicher and P.A. Andrews) (Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004, p. 450), и согласованными с Этическим комитетом при ПИМУ Минздрава России (правила № 51 СП 2.2.1.3218-14 от 29.08.2014).

Исполнитель работы ИБХФ РАН включен в Перечень организаций и учреждений, осуществляющих проведение доклинических исследований лекарственных средств, на основании решения МЗ РФ (Разрешение МЗ РФ № 01-45122/06 от 21.09.2006 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Островская Л. А. и Корман Д. Б. *Золото и серебро в экспериментальной терапии опухолей* (Практическая медицина, М., 2023).
2. Ostrovskaya L. A., Voronkov M. G., Korman D. B., Fomina M. M., Bluhterova N. V., Rikova V. A., Abzaeva K. A., and Zhilitskaya L. V. Experimental Study of the Antitumor Activity of Polymetalacrylates against Animal Transplantable Tumors. *J. Cancer Therapy*, **1** (2), 59 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.12010
3. Островская Л. А., Корман Д. Б., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А., Чигасова А. К., Некрасова Е. И., Абзаева К. А., Рябая О. О. и Бурмий Ж. П. Полиакрилат золота: экспериментальное изучение противоопухолевой активности. *Рос. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 74 (2020). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-74-85
4. Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Островская Л. А., Рябая О. О., Блюхтерова Н. В. и Абзаева К. А. Цитотоксическое действие полиакрилата золота (аурумакрил) на фибробласты кожи человека. *Биофизика*, **65** (6), 1093–1098 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920060071
5. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А., Хоченкова Ю. А. и Абзаева К. А. Противоопухолевый и цитотоксический эффект полиакрилатов благородных металлов. *Биофизика*, **66** (5), 978–984 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
6. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Блюхтерова Н. В., Хоченкова Ю. А. и Абзаева К. А. Чувствительность опухолевых и нормальных клеток человека к полиакрилатам благородных металлов. *Биофизика*, **67** (1), 82–87 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
7. Abzaeva K. A., Zhilitskaya L. V., Belozerskaya G. G., and Ostrovskaya L. A. Effect of the metal nature on homeostatic activity of water-soluble gold and silver nanocomposites. *Russ. Chem. Bull.*, **66**, 2314–2316 (2017), DOI: 10.1007/s11172-017-2021-3
8. Трещалина Е. М. *Коллекция опухолевых штаммов животных* (Практическая медицина, М., 2022).
9. Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К., Андропова Н. В. и Гарин А. М. Методические ре-

- комендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 640–654.
10. Mayo J. G. Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemother. Rep.* 2, 3 (1), 325–330 (1972).
11. Чигасова А. К., Островская Л. А. и Корман Д. Б., Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на опухолевые клетки. *Биофизика*, 67 (6), 1185–1191 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922060151, EDN: LKVLQG
12. Чигасова А. К., Островская Л. А. и Корман Д. Б., Индукция повреждений структуры ДНК опухолевых клеток полиакрилатом золота. *Биофизика*, 68 (1), 11–19 (2023). DOI: 10.1134/S0006350923010050
13. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Хоченкова Ю. А., Блюхтерова Н. В. и Абзаева К. А. Полиакрилаты благородных металлов — цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, резистентных к цисплатине и доксорубину. *Биофизика*, 67 (5), 951–959 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050118, EDN: JIVBD
14. Корман Д. Б., *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).

Antitumor and Cytotoxic Effects of Silver Polyacrylate

**L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman*, E.I. Nekrasova*, A.K. Chigasova*, N.V. Bluhterova*,
V.A. Rikova*, M.M. Fomina*, Yu.A. Khochenkova**, and K.A. Abzaeva*****

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

**N.N. Blokhin National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia

***V.V. Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Novosibirsk, 630090 Russia

Silver polyacrylate (argacryl) exerts antitumor activity against murine solid tumors in vivo and exhibits cytotoxic effects on human tumor cells in vitro. Argacryl enhances the antitumor effect of cisplatin (a murine Lewis lung carcinoma cell line) and does not show cross-resistance to cisplatin and doxorubicin (MCF-7, human breast cancer cells). The molecular mechanism of action of argacryl is associated with the induction of DNA single-strand breaks in the absence of cross-linking in the DNA molecule.

Keywords: polyacrylates of silver and gold, argacryl, aurumacryl, antitumor activity, cytotoxic effect

ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ В КОРНЕОБИТАЕМОЙ СРЕДЕ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ САЛАТА

© 2024 г. Т.Э. Кулешова*, #, З.А. Гасиева*, Д.В. Русаков*, А.С. Галушко*, Г.Г. Панова*

*Агрофизический научно-исследовательский институт, Гражданский просп., 14, Санкт-Петербург, 195220, Россия

#E-mail: www.piter.ru@bk.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 03.09.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

Биоэлектрохимические системы на основе электроактивных процессов в корнеобитаемой среде растений являются перспективным направлением совмещенного производства зеленой электроэнергии и растительной продукции. В работе исследованы динамики формирования разности потенциалов в корнеобитаемой среде, индексы диффузного отражения листьев, параметры флуоресценции, морфометрические и биохимические характеристики салата сортов Китайский курчавый, Китайский красно-зеленый, Балет, Кокарда, Меркурий, Дубрава, Робин и гибрида F₁ Solos. Максимальная разность потенциалов – 430 мВ была характерна для сорта Меркурий, а минимальная – 352 мВ – для сорта Китайский курчавый. По сумме параметров, в дополнение к электрическим, включающих морфометрические, биохимические и фотосинтетические характеристики, лучшим был салат сорта Балет. В перспективе на основе полученных данных возможно создание агрофитоценозов, включающих растения, способные к высокой и стабильной генерации электроэнергии наряду с большой продуктивностью и хорошим качеством получаемой растительной продукции за счет эффективного усвоения и преобразования энергии света.

Ключевые слова: биоэлектрохимическая система, растительно-микробный топливный элемент, интенсивная светокультура, активность фотосинтетического аппарата, растительная продукция.

DOI: 10.31857/S0006302924010113, EDN: RARLXW

В настоящее время остро стоит проблема истощаемости основных видов ресурсов – энергетических и продовольственных. Возобновляемая энергия рассматривается как один из способов облегчения топливных потребностей будущего, преодоления кризиса глобального потепления и снижения выбросов углекислого газа, а использование альтернативных гибридных энергоресурсов совмещенного назначения позволяет эффективно сочетать производственные процессы.

Преобразование энергии с помощью живых организмов рассматривается как устойчивый источник зеленой энергетики будущего [1]. Одними из наиболее распространенных биоэнергетических устройств являются микробные топливные элементы, преобразующие энергию химических связей органических веществ в электричество посредством экзоэлектрогенных бактерий. Основной принцип работы таких элементов заключается в генерации электронов и протонов в анодной камере при окислении органических веществ микроорганизмами, электроны транспортируют-

ся по внешней электрической цепи к их акцепторам (например, кислороду, нитрату) в катодной камере, а протоны переносятся в катодную камеру через сепаратор (например, ионообменную мембрану) или электролит [2]. Микробные топливные элементы имеют потенциал применения для производства электроэнергии и биоремедиации сточных вод [3]. В то же время одним из развивающихся направлений является применение биотехнологических устройств в сельском хозяйстве для совмещенного получения электроэнергии и растительной продукции [4].

Биоэлектрохимические системы на основе электроактивных процессов в корнеобитаемой среде растений и сопутствующих им микроорганизмов, называемые также растительно-микробными топливными элементами, представляют собой модифицированные элементы, в которых субстратом для электроактивных бактерий выступают ризодепозиты [5]. Эти элементы продемонстрировали большой потенциал не только в производстве зеленого электричества, например для электропитания беспроводных датчиков для фи-

Сокращения: ФС II – фотосистема II.

томониторинга [4], но и в эффективном удалении углекислого газа [6].

Считается, что электрический заряд в растительно-микробных топливных элементах создается в основном в процессе метаболизма электроактивных бактерий, а его разделение реализуется в первую очередь за счет наличия градиента окислительно-восстановительного потенциала в среде. В связи с этим в большинстве таких элементов используются водные растения [6], так как при этом катод располагается в верхнем слое воды водоемов, а анод в твердой корнеобитаемой среде. В последнее время также разрабатываются биоэлектрохимические системы на основе гидропонных систем выращивания [7].

Между тем известно, что и сами растения способны к электрогенезу. Возникновение разности потенциалов в живых системах обусловлено комплексом физико-химических процессов, обеспечивающих поддержание неравномерного распределения ионов на клеточном, тканевом и организменном уровнях. В процессе развития растений вдоль всего организма возникает градиент электрического потенциала, обусловленный диффузией ионов, концентрационными эффектами и различиями в интенсивностях биохимических процессов. Показано, что электрические сигналы участвуют во многих процессах в жизни растений [8], включая дыхание [9], поглощение воды [10], движение листьев [11] и реакцию на биотический стресс [12].

Между различными участками растительных тканей существуют метаболические потенциалы — градиенты электрических потенциалов, отражающие различный уровень обмена веществ на этих участках [13]. Метаболические потенциалы обусловлены различной интенсивностью физиологических процессов, обычно участок с более интенсивным обменом становится более электроотрицательным по отношению к окружающим тканям. Также в растениях возникают потенциалы покоя, которые могут достигать больших значений (160–180 мВ) и включают в себя диффузионную компоненту, связанную с градиентами концентраций потенциалопределяющих ионов и коэффициентами проницаемости их через плазматическую мембрану, и метаболическую компоненту, генерация которой осуществляется работой транспортной АТФазы (H^+ –АТФаза) [14]. Потенциалы покоя выполняют энергетическую, регуляторную, защитную функции и участвуют в процессах морфогенеза [14]. Сигнальную роль выполняет потенциал действия [15]. Ионный механизм генерации потенциала действия заключается в следующем: восходящая фаза деполяризации связана с возникновением входящего в цитозоль клеток потока Ca^{2+} и выходящего потока Cl^- , а нисходящая фаза реполяризации с

выходящим из клеток потоком ионов K^+ [16, 17]. Также в генерации потенциала действия у растений принимают участие электрогенные ионные насосы [16, 18]. Генерация потенциала действия сопряжена со значительными ионными сдвигами (до десятков миллимоль) [16] и с проходящим изменением активности АТФ-зависимого протонного электронного насоса плазматической мембраны [19].

Градиенты биоэлектрического потенциала растений являются следствием различий в интенсивности процессов роста, фотосинтеза, дыхательного обмена, ионного транспорта и некоторых других процессов и отражают различия между потенциалами покоя клеток [13]. Изменение метаболических потенциалов в ответ на различные внешние воздействия, включая условия освещения, влажности, температуры, выступает как перспективный инструмент для выявления стрессовых состояний растений на ранних стадиях [20]. Установлено, что свет инициирует электрофизиологический ответ, в частности облучение растений сои при 450 ± 50 , 670 и 730 нм индуцирует потенциалы действия с длительностью 0.3 мс и амплитудой ~60 мВ [21]. А при повреждении тканей растения у вертикально ориентированных корней отмечалось усиление электрического тока, выходящего из зоны корневых волосков и входящего в зону растяжения, с $1\text{--}2\text{ мкА/см}^2$ до 10 мкА/см^2 [22].

Таким образом, растения, способные к биоэлектрогенезу в процессе развития, и электроактивные бактерии, обитающие в корнеобитаемой среде, являются новым перспективным регенеративным природным энергоресурсом, снижающим ущерб окружающей среде и позволяющим эффективно совмещать производственные процессы. Производительность биоэлектрохимических систем на основе электрогенных процессов в системе «корнеобитаемая среда–растения», наряду с конфигурацией устройства [23] и используемыми электродами [24], зависит от целого ряда факторов, включая вид растения — его генетически обусловленный потенциал, способность к ризоосаждению [25], свойств корнеобитаемой [26] и световой [27] сред, наличие микроорганизмов и их электроактивность [28]. Хотя возможность практического использования биоэнергетических ресурсов уже показана во многих исследованиях [29–31], тем не менее промышленное масштабное применение пока отсутствует [32], так как, наряду с экономической эффективностью, еще предстоит раскрыть природу электрогенеза, включая его зависимость от генетически обусловленных физиологических особенностей растений и их состояния на протяжении развития.

Цель данного исследования заключалась в изучении динамики формирования разности по-

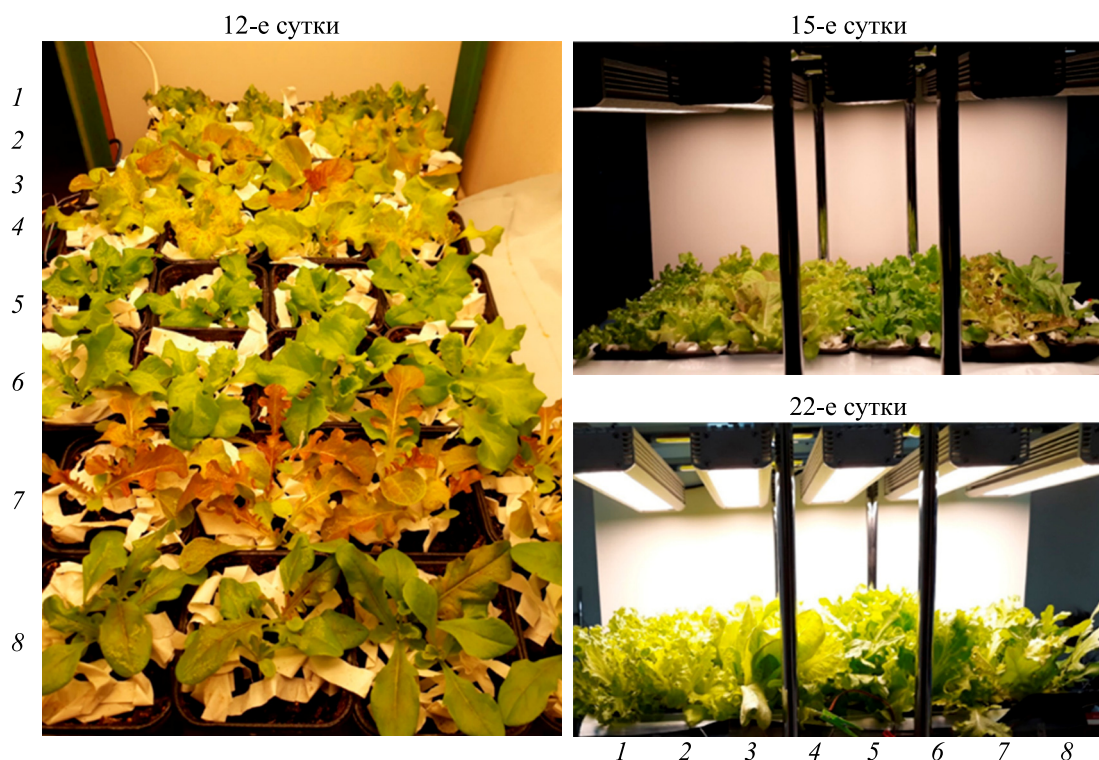


Рис. 1. Общий вид биоэлектрохимических систем на основе различных растений салата: 1 – гибрида F₁ Solos и сортов: 2 – Китайский курчавый, 3 – Китайский красно-зеленый, 4 – Меркурий, 5 – Дубрава, 6 – Балет, 7 – Робин, 8 – Кокарда в вегетационно-облучательной установке «Экофил» на 12-е, 15-е и 22-е сутки вегетационного периода.

тенциалов в корнеобитаемой среде биоэлектрохимических систем на основе различных сортов салата, отличающихся активностью фотосинтетических процессов в листьях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения листового салата (*Lactuca sativa* L.). Для выбора растений, наиболее перспективных с точки зрения получения электроэнергии в ходе их выращивания, было проведено исследование электрофизиологических свойств у ряда представителей листового салата, различающихся эффективностью работы фотосинтетического аппарата: гибрид F₁ Solos, сорт Китайский курчавый, сорт Китайский красно-зеленый, сорт Балет, сорт Кокарда (коллекция ФИЦ ВИР, Санкт-Петербург), сорт Меркурий (Компания «Гавриш», Москва), сорт Дубрава (ООО «Флагман», Ростовская обл.), сорт Робин (АО «Сортсеменовощ», Санкт-Петербург).

Растения выращивали в регулируемых условиях интенсивной светокультуры на биополитоне Агрофизического НИИ в вегетационно-облучательной установке «Экофил» [33]. Источником света служили разработанные нами светодиодные светильники со спектральным составом в видимой области, приближенным к

естественному свету, величина плотности фотосинтетического потока фотонов составляла 180 ± 20 мкмоль/(м²·с), продолжительность светового периода – 14 ч в сутки. Температура воздуха поддерживалась в пределах 20–22°C днем и 18–20°C ночью, относительная влажность воздуха – 65–70%. В качестве корнеобитаемой среды использовали торфяной грунт «АгроБалт С» (ООО «Пиндstrup», Санкт-Петербург).

Биоэлектрохимическая ячейка представляла собой емкость объемом 440 см³. Измерение электрических характеристик осуществляли путем размещения биосовместимых коррозионостойких электродов размером 60 × 60 мм в корнеобитаемой среде, что обеспечивало поверхностный электрический контакт с корневой системой и прикорневой зоной [34]. Нижний электрод располагался на расстоянии 30 мм от дна емкости и был выполнен из графитового войлока толщиной 5 мм. Верхний электрод из сетки из нержавеющей стали с размером ячейки 8 × 8 мм размещался на расстоянии 30 мм от нижнего электрода и был электроотрицателен по отношению к нему. Мониторинг изменения разности потенциалов проводили с помощью аппаратной платформы Arduino каждые 15 мин в течение всего вегетационно-

го периода. Вид экспериментальной установки представлен на рис. 1.

Различия в фотосинтетической активности растений салата оценивали по индексам диффузного отражения листовой пластинки, определяющих содержание хлорофилла, содержание антоцианов, меру рассеяния света листом, и по параметрам флуоресценции, которые регистрировали на 14-е, 21-е и 28-е сутки вегетационного периода.

Спектры отраженной от поверхности листьев радиации регистрировали неинвазивным способом с помощью миниатюрной оптоволоконной спектрометрической системы (Ocean Optics, США), которая обеспечивает оптическое разрешение 0.065 нм в диапазоне от 400 до 1100 нм с шагом 0.3 нм. Для регистрации спектров датчик располагали в средней части листовой пластинки, избегая попадания на центральную жилку. В среднем для каждого варианта регистрировали 10–15 спектров. По полученным спектрам отражения рассчитывали следующие параметры, коррелирующие с фотосинтетической активностью и отражающие физиологическое состояние растений [35]:

– индекс отражения хлорофилла $ChlRI = (R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705} - 2R_{445})$, где R_{750} , R_{705} , R_{445} – интенсивность отражения света от листовой поверхности на длинах волн 750, 705 и 445 нм соответственно;

– индекс отражения антоцианов $ARI = R_{750} \times (1/R_{550} - 1/R_{700}) + C_1$, где R_{750} , R_{550} , R_{700} – интенсивность отражения света от листовой поверхности на длинах волн 750, 550 и 700 нм соответственно, $C_1 = 0.4$ – константа, подобранная экспериментально [35];

– индекс интенсивности рассеяния света R_{800} , обусловленной структурными особенностями листьев и определяемый как интенсивность отражения на длине волны 800 нм.

Параметры флуоресценции фотосистемы II (ФС II) листьев исследуемых салатов регистрировали с помощью анализатора эффективности фотосинтеза – импульсного портативного флуориметра MINI-PAM-II (Walz, Германия) в соответствии со стандартной методикой [36]. Уровень минимальной (возбуждается светом с очень низкой интенсивностью) и максимальной (возбуждается насыщающим световым импульсом) флуоресценции определяли после экспозиции листьев в течение 30 мин в темноте. С использованием специального программного обеспечения WinControl-3 рассчитывали следующие параметры флуоресценции:

– максимальный фотохимический квантовый выход $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, где F_o – уровень ми-

нимальной флуоресценции, F_m – уровень максимальной флуоресценции;

– эффективный фотохимический или реальный квантовый выход $Y(II) = (F_m - F_t)/F_m$, где F_m – максимальный выход флуоресценции адаптированного к свету образца, индуцируется насыщающим импульсом, временно закрывающим все реакционные центры ФС II, F_t – мгновенный или стационарный уровень флуоресценции адаптированного к свету образца, измеренному прямо перед насыщающим импульсом.

Уборку растений осуществляли на 28-е сутки от посева семян. При уборке учитывали сырую массу и высоту растений. Биохимический состав получаемой растительной продукции определяли титро-, фото- и ионометрическими методами в аккредитованной Испытательной лаборатории Агрофизического НИИ в соответствии с требованиями нормативных документов.

Вегетационный опыт проводили дважды, с четырехкратной повторностью исследуемых вариантов в каждом эксперименте. Статистическую обработку данных проводили с применением программ Excel 2010 и Statistica 8.0. Определяли средние значения изучаемых показателей, доверительные интервалы. Достоверность различий между вариантами оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим подсчетом рангового критерия Дункана. Различия между вариантами считали достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее в работе [37] нами была показана роль растений в формировании электрогенных реакций в корнеобитаемой среде – были измерены разности потенциалов в биоэлектрохимической системе, содержащей питательный раствор без растений (контроль) и с растениями на примере салата сорта Тайфун. На начальном этапе эксперимента в питательном растворе наблюдалась генерация разности потенциалов порядка 70–100 мВ, по-видимому, являющейся следствием различий в концентрациях составляющих компонентов питательного раствора на верхнем и нижнем электродах. Можно сказать, что питательный раствор выступает аналогом электролита в гальваническом элементе. С течением времени напряжение в контрольной ячейке спадало, скорее всего, вследствие выравнивания концентраций. При выращивании растений разность потенциалов, наоборот, увеличивалась до ~200 мВ и была стабильна на протяжении всего вегетационного периода. Вероятно, увеличение напряжения в биоэлектрохимической системе при размещении в ней растительных объектов было связано с развитием корневой системы, жизнедеятельностью

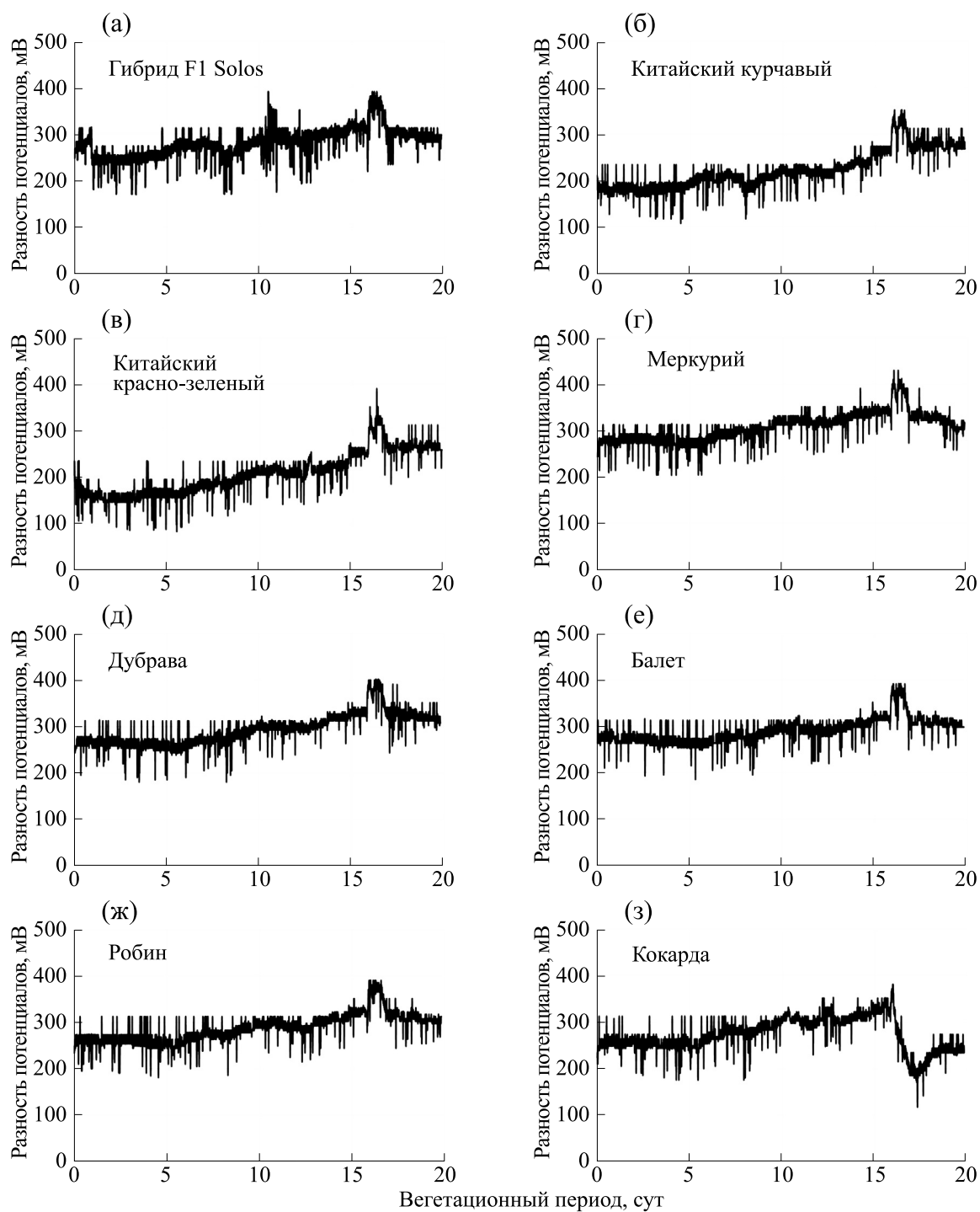


Рис. 2. Динамика разности потенциалов, формируемой в корнеобитаемой среде, при выращивании растений салата: (а) гибрида F₁ Solos, (б) сорта Китайский курчавый, (в) сорта Китайский красно-зеленый, (г) сорта Меркурий, (д) сорта Дубрава, (е) сорта Балет, (ж) сорта Робин, (з) сорта Кокарда.

сопутствующих микроорганизмов, транспортом минеральных веществ и, как следствие, усилением диффузионных процессов.

Для сравнения электрических параметров различных растений салата и выбора сорта, наиболее

перспективного с точки зрения продуктивности и получения электроэнергии, была изучена динамика разности потенциалов, формируемых в корнеобитаемой среде в процессе роста растительных культур (рис. 2). Изменение разности потенциалов в процессе вегетационного периода для

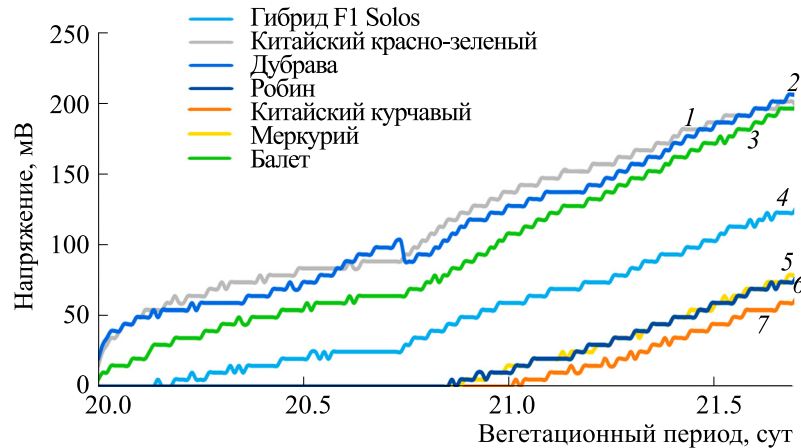


Рис. 3. Динамика зарядки ионистора емкостью 0.1 Ф от биоэлектрохимических систем на основе различных салатов: 1 — сорта Китайский красно-зеленый, 2 — сорта Дубрава, 3 — сорта Балет, 4 — гибрида F₁ Solos, 5 — сорта Робин, 6 — сорта Меркурий, 7 — сорта Китайский курчавый.

исследованных растений салата оказалось схожим — наблюдалась равномерная генерация ~200 мВ в течение 10 суток, после чего происходил плавный рост до 300 мВ и более к 15-м суткам и затем стабилизация.

В целом по величине генерируемого в системе «корнеобитаемая среда—растения» напряжения салаты можно расположить в следующем порядке (от наибольшего среднего значения к меньшему): сорт Меркурий (306 мВ) > сорт Дубрава (291 мВ) > сорт Балет (289 мВ) > сорт Робин (286 мВ) > гибрид F₁ Solos (281 мВ) > сорт Кокарда (272 мВ) > сорт Китайский курчавый (221 мВ) > сорт Китайский красно-зеленый (206 мВ).

Максимальная разность потенциалов (430 мВ) была также характерна для сорта Меркурий, а минимальная (352 мВ) — для сорта Китайский курчавый.

Полученные значения напряжений в биоэлектрохимических системах на основе различных салатов были зарегистрированы без внешней нагрузки в электрической цепи, то есть фактически они соответствуют нормальному состоянию, когда растения не отдают электрический ток потребителю. Для выявления возможностей накопления и использования электроэнергии, генерируемой в системе «корнеобитаемая среда—растения», к каждой биоэлектрохимической системе был параллельно подключен ионистор емкостью 0.1 Ф. Динамика накопления заряда ионистора представлена на рис. 3. Напряжение ионисторов, подключенных к биоэлектрохимическим системам на основе салатов сортов Робин, Меркурий и Китайский курчавый, по сравнению с сортами Китайский красно-зеленый, Дубрава и Балет, было ниже почти на 130 мВ, а по сравнению с гибридом F₁ Solos — на 50 мВ.

По накопленной на ионисторе (или отданной растениями) энергии через 40 ч зарядки в пересчете на 1 м² зоны роста в биоэлектрохимической системе салаты расположились в следующем порядке: сорт Дубрава (0.58 Дж) ≥ сорт Китайский красно-зеленый (0.56 Дж) ≥ сорт Балет (0.53 Дж) > гибрид F₁ Solos (0.21 Дж) > сорт Меркурий (0.08 Дж) ≥ сорт Робин (0.07 Дж) ≥ сорт Китайский курчавый (0.05 Дж).

При этом увеличение напряжения на ионисторе за час, то есть скорость зарядки, в период с 21-х по 22-е сутки вегетационного периода составило: сорт Балет (5.3 мВ/ч) ≥ сорт Дубрава (5.0 мВ/ч) > сорт Меркурий (4.3 мВ/ч) > сорт Китайский красно-зеленый (3.9 мВ/ч) = гибрид F₁ Solos (3.9 мВ/ч) = сорт Робин (3.9 мВ/ч) ≥ сорт Китайский курчавый (3.5 мВ/ч).

В ходе проведения эксперимента состояние растений дополнительно оценивали по изменению пропускания света листовой поверхностью по методике, описанной в работе [38]. Этот параметр отрицательно коррелирует с интенсивностью поглощения света листовой пластинкой — чем больше ее пропускающая способность, тем меньше световой энергии она поглощает. Было отмечено, что динамика пропускания света листом коррелирует с изменением разности потенциалов в корнеобитаемой среде в ходе вегетации — при уменьшении интенсивности пропускания, то есть увеличении поглощения света листом, росла и величина напряжения биоэлектрохимической ячейки (рис. 4). Так, например, коэффициент корреляции r между динамикой пропускания света листом и изменением напряжения в биоэлектрохимической системе на основе салата сорта Меркурий составил $r = -0.77$ в световой период. Критерий существенности ко-

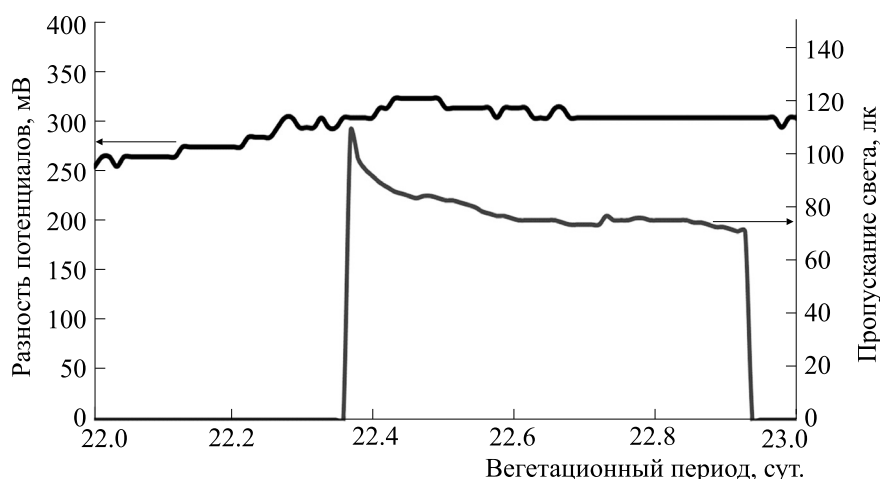


Рис. 4. Динамика пропускания света листом и разности потенциалов, формируемой в корнеобитаемой среде салата сорта Меркурий.

эфицента корреляции t_r составил 8.63, что значительно выше теоретического ($t_{0.05} = 2.01$), из чего следует, что полученный коэффициент корреляции существенен.

Для выявления фактора, связанного с интенсивностью электрогенных свойств растений, были измерены показатели преобразования и усвоения энергии света листьями растений — индексы диффузного отражения и параметры флуоресценции в процессе вегетации.

На рис. 5 представлены полученные индексы, отражающие содержание хлорофиллов и антоцианов в исследуемых салатах. Коэффициент корреляции r между индексами отражения, характеризующими содержание пигментов, и их количеством, определенным с помощью биохимического анализа, составил $r = 0,7$ для хлорофилла на 28-е сутки вегетации и $r = 0,8$ для антоцианов на 14-е сутки вегетации. Критерий существенности коэффициента корреляции t_r составил 2.40 для хлорофилла и 2.87 для антоцианов при $t_{0.05} = 2.45$, что говорит о существенной корреляции только между индексом ARI и количеством антоцианов.

Индекс хлорофилла $ChlRI$ может служить характеристикой емкости фотосинтетического аппарата и потенциальной способности растения к поглощению энергии света. Увеличение значений индекса хлорофилла $ChlRI$ в большинстве случаев сопровождается ростом эффективности превращения энергии света в фотохимических процессах фотосинтеза. Наибольшее содержание хлорофилла зафиксировано для сортов Дубрава, Балет и Кокарда. Также можно отметить тенденцию уменьшения содержания хлорофилла в листьях в течение вегетационного периода для ги-

брида F_1 Solos и сортов Меркурий, Дубрава и Робин.

Избыточное накопление антоцианов может свидетельствовать о наличии окислительного стресса [39]. Большие величины индекса антоцианов ARI , характерные для гибрида F_1 Solos, связаны, возможно, с присутствием абиотического стресса у растений. Меньшие же величины индекса антоцианов ARI , отмечаемые для сортов Китайский курчавый, Дубрава, Балет и Кокарда, могут говорить о большей эффективности фотосинтетических процессов в этих салатах. Интересно отметить, что только для сорта Дубрава наблюдается увеличение индекса антоцианов ARI со временем.

Полученные данные свидетельствуют о сильной обратной корреляции индекса антоцианов ARI в опыте к индексу хлорофилла $ChlRI$, где она составила $r = -0.72$ ($t_r = 2.55 > t_{0.05} = 2.45$, коэффициент существенен) на 14-е сутки вегетации и $r = -0,66$ ($t_r = 2.32 < t_{0.05} = 2.45$, коэффициент не существен) на 21-е сутки. Однако на 28-е сутки эксперимента корреляция индексов снижается до $r = -0.19$ ($t_r = 0.48 > t_{0.05} = 2.45$, коэффициент не существен).

Исходя из вышеописанных результатов в отношении наибольшего содержания фотосинтетических пигментов можно выделить сорта Дубрава, Балет и Кокарда.

На рис. 6 приведены индексы интенсивности рассеяния света R_{800} для исследуемых растений салата. Наибольшая величина этого индекса, указывающая на неэффективное использование энергии приходящего на листа света, характерна для гибрида F_1 Solos на ранних стадиях, что коррелирует с высокой величиной индекса ARI и

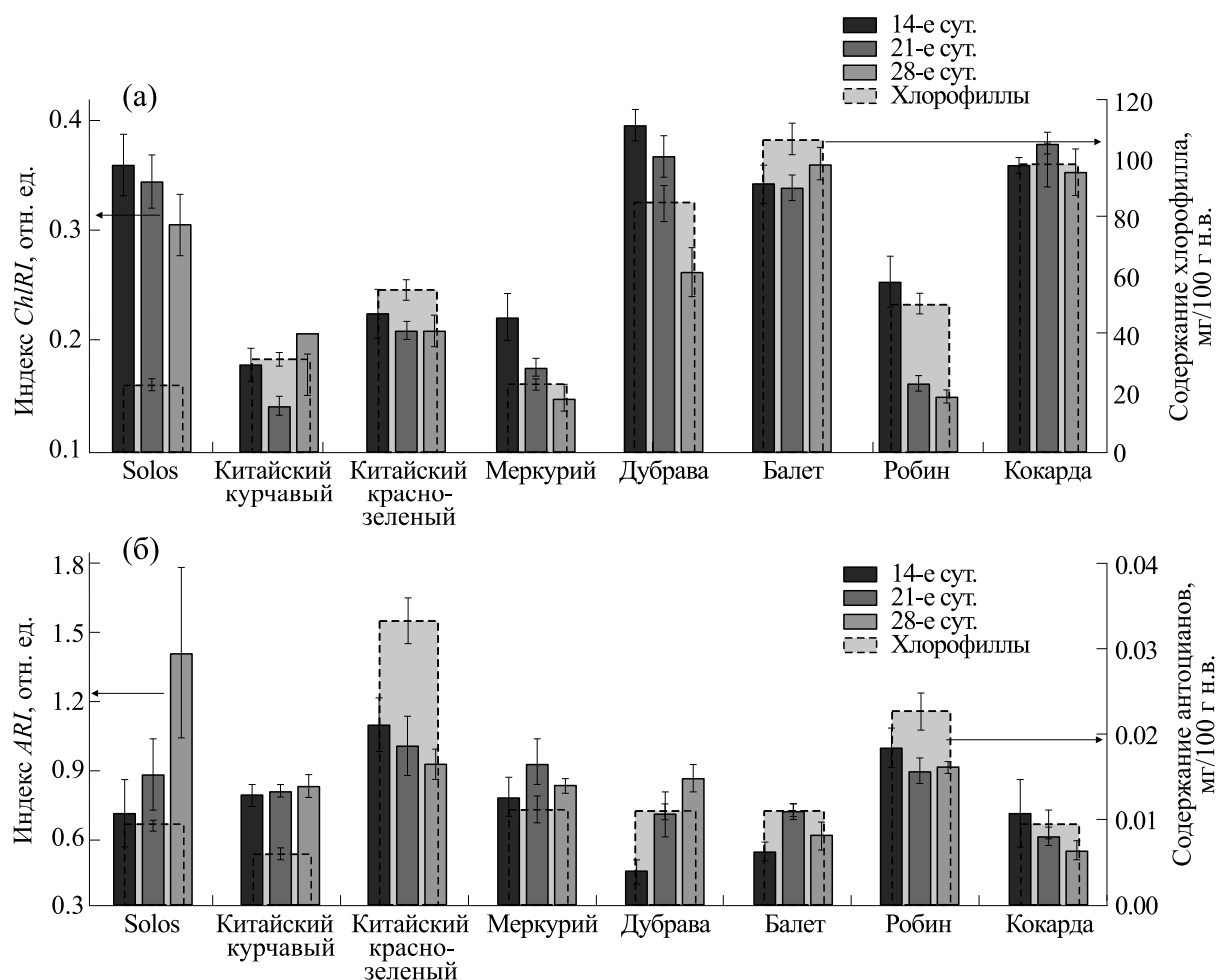


Рис. 5. Индексы диффузного отражения листьев, определяющие содержание хлорофилла $ChlRI$ (а) и содержание антоцианов ARI (б), и пигментный состав листьев для растений салата гибрида F_1 Solos и сортов Китайский курчавый, Китайский красно-зеленый, Меркурий, Дубрава, Балет, Робин, Кокарда, выращиваемых в биоэлектрохимических системах на 14-е, 21-е и 28-е сутки вегетационного периода.

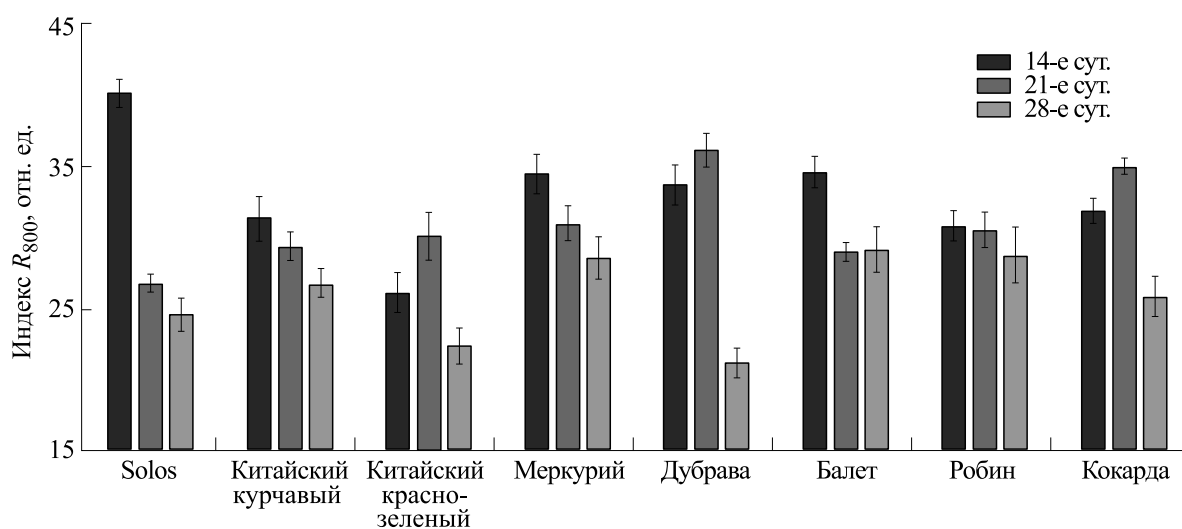


Рис. 6. Мера рассеяния света листом R_{800} для растений салата гибрида F_1 Solos и сортов Китайский курчавый, Китайский красно-зеленый, Меркурий, Дубрава, Балет, Робин, Кокарда, выращиваемых в биоэлектрохимических системах на 14-е, 21-е и 28-е сутки вегетационного периода.

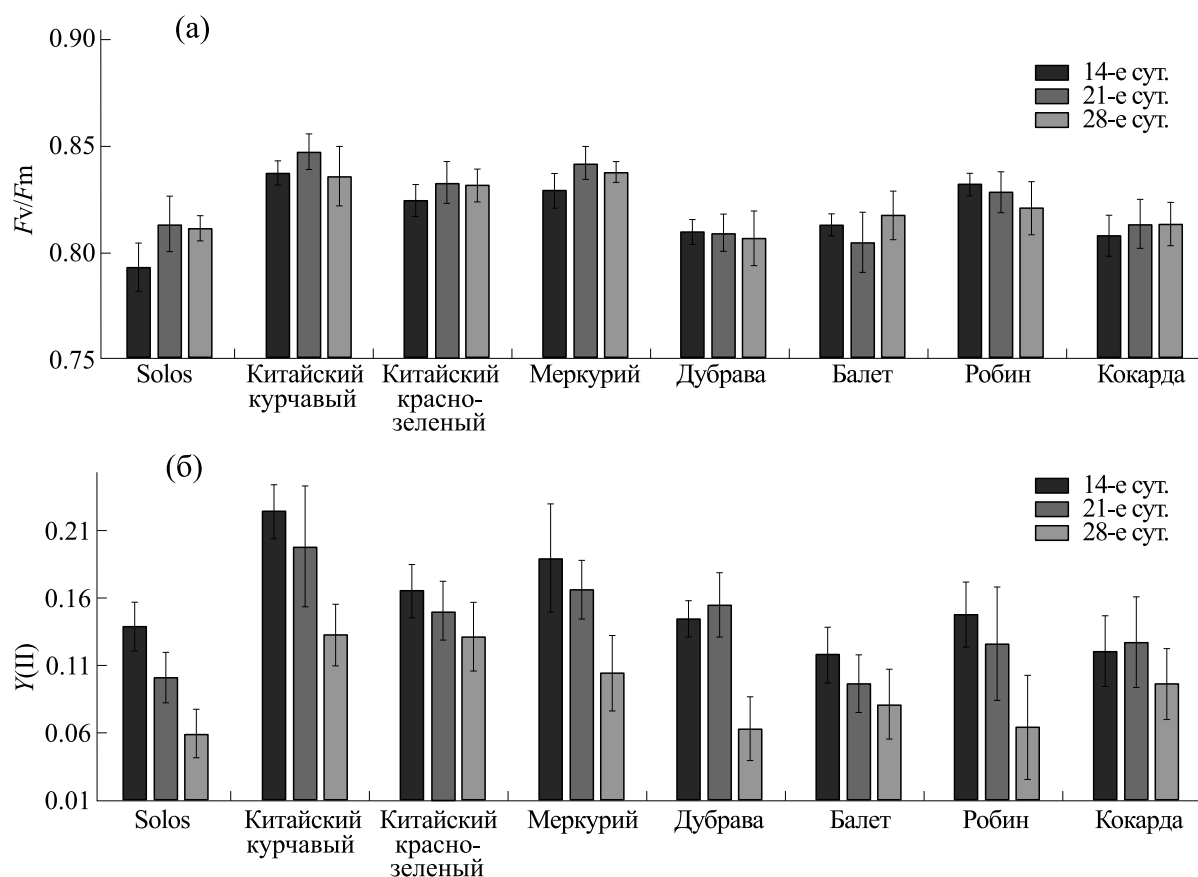


Рис. 7. Параметры флуоресценции: (а) — максимальный квантовый выход F_v/F_m , (б) — реальный квантовый выход $Y(II)$ для растений салата гибрида F_1 Solos и сортов Китайский курчавый, Китайский красно-зеленый, Меркурий, Дубрава, Балет, Робин, Кокарда, выращиваемых в биоэлектрохимических системах, на 14-е, 21-е и 28-е сутки вегетационного периода.

подтверждает предположение о его меньшей приспособленности к условиям интенсивной светокультуры. В целом значения между вариантами отличаются незначительно: различия составляют 16–35% на 14-е сутки вегетации, 7–23% на 21-е сутки и 5–26% на 28-е сутки вегетации. Возможно, это связано со схожими механизмами защиты фотосинтетического аппарата от света высокой интенсивности путем его рассеивания в одинаковых условиях выращивания в интенсивной светокультуре. Интересно отметить снижение рассеяния света R_{800} для гибрида F_1 Solos и сорта Дубрава к концу вегетационного периода почти в два раза.

Также было проведено измерение флуоресценции хлорофилла, полученные параметры различных растений салата представлены на рис. 7. Квантовый выход фотосинтеза характеризует эффективность использования растением света при фотосинтезе, а флуоресценция хлорофилла предоставляет информацию о том, как световая энергия, поглощенная хлорофиллом, влияет на степень использования энергии ФС II. Наиболь-

ший максимальный квантовый выход F_v/F_m , отражающий потенциальный квантовый выход ФС II, был характерен для сортов Китайский курчавый, Китайский красно-зеленый, Меркурий и Робин, а наибольший реальный квантовый выход $Y(II)$ — для сортов Китайский курчавый и Меркурий. Для всех вариантов исследованных растений значение $Y(II)$ снижалось к концу вегетационного периода.

По окончании вегетационного периода были измерены масса надземной части, высота растений и их биохимический состав.

В табл. 1 приводится сравнение морфометрических характеристик растений салата и электрических показателей биоэлектрохимической системы. По выходу растительной продукции с одной биоэлектрохимической ячейки салаты расположились в следующем порядке: сорт Балет (113.1 г) > сорт Кокарда (82.0 г) > сорт Меркурий (71.0 г) > сорт Китайский красно-зеленый (58.0 г) > сорт Робин (54.6 г) > сорт Китайский курчавый (48.1 г) > сорт гибрид f_1 Solos (47.8 г) > > сорт Дубрава (42.6 г).

Таблица 1. Электрические и морфометрические характеристики различных сортов салата при их выращивании в биоэлектрохимической системе

Сорт салата	Среднее значение разности потенциалов в системе «корнеобитаемая среда–растения», мВ	Максимальное значение разности потенциалов в системе «корнеобитаемая среда–растения», мВ	Масса надземной части растений в одной ячейке, г	Высота растений, см
Solos F1	281 ± 32 ^a	391	47.8 ± 6.6 ^{ef}	19.7 ± 1.0 ^d
Китайский курчавый	221 ± 42 ^b	352	48.1 ± 7.5 ^{ef}	23.1 ± 2.0 ^c
Китайский красно-зеленый	206 ± 47 ^b	391	58.0 ± 6.3 ^d	29.9 ± 2.2 ^b
Меркурий	306 ± 32 ^a	430	71.0 ± 9.3 ^c	24.0 ± 1.7 ^c
Дубрава	291 ± 35 ^a	400	42.6 ± 8.3 ^f	33.1 ± 1.4 ^a
Балет	289 ± 27 ^a	391	113.1 ± 15.8 ^a	31.7 ± 2.1 ^{ab}
Робин	286 ± 31 ^a	391	54.6 ± 4.6 ^{de}	29.9 ± 1.9 ^b
Кокарда	272 ± 37 ^a	381	82.0 ± 7.4 ^b	32.5 ± 1.8 ^a

Примечание. Данные с одинаковыми буквами (a–f) по столбцам статистически не различаются при $p \leq 0.05$ (критерий Дункана).

Однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверные различия в генерируемой в корнеобитаемой среде разности потенциалов, массе и высоте растений в биоэлектрохимических системах на основе различных сортов салата. Так, в вариантах с сортами Китайский курчавый и Китайский красно-зеленый наблюдались достоверные отличия от остальных исследованных вариантов по величине напряжения. Следует отметить, что салат сорта Дубрава при высоких значениях генерации тока показал наименьшие значения массы надземной части растений, что, по-видимому, связано с генетически обусловленными особенностями данного сорта.

В табл. 2 описаны полученные биохимические показатели, характеризующие качество растительной продукции. Можно отметить большее накопление сухого вещества в салатах сортов Китайский красно-зеленый, Дубрава и Балет относительно такового в остальных исследованных сортах и гибриде. Наиболее низкое содержание нитратов наблюдалось в растениях салата сорта Меркурий, высокое – в растениях сорта Кокарда. При этом по содержанию нитратов в растительной продукции она полностью соответствовала санитарно-гигиеническим требованиям Российской Федерации [40]. Наибольшее количество сахаров было присуще сорту Балет, а витамина С – сорту Кокарда. Для салата гибрида F₁ Solos и сорта Китайский курчавый характерно повышенное содержание сырой золы, а также железа, меди и цинка, для сортов Меркурий и Китайский красно-зеленый – марганца, для сорта Балет – кальция.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основе полученных данных были сформированы представления об электрогенных процессах, протекающих в системе «корнеобитаемая среда–растения» различных растений салата. На ранних этапах наблюдаемая в корнеобитаемой среде генерация разности потенциалов связана со свойствами питательной среды, которая выступает аналогом электролита. Со временем в системе без растений напряжение снижается вследствие выравнивания концентраций ионов на электродах. В биоэлектрохимической системе, содержащей вегетирующие растения, наоборот, с ростом растений наблюдается увеличение разности потенциалов, вероятно, связанное с развитием корневой системы и жизнедеятельностью сопутствующих микроорганизмов.

Для улучшения выходных электрических характеристик было проведено измерение электрогенных свойств корнеобитаемой среды различных салатов, отличающихся интенсивностью фотосинтетических процессов в листьях. Из исследованных вариантов с точки зрения генерации наибольшей разности потенциалов в системе «корнеобитаемая среда–растения» можно выделить салат сорта Меркурий: максимальное напряжение в биоэлектрохимической системе на его основе достигало 430 мВ, а среднее значение составило 306 мВ. При этом накопленная энергия была больше при использовании в качестве энергоресурса биоэлектрохимической системы на основе салата сорта Дубрава: энергия ионистора после 40 ч зарядки составила 0.58 Дж в пересчете на 1 м² зоны роста. Полученные данные по электри-

Таблица 2. Биохимические показатели различных сортов салата при их выращивании в биоэлектрохимической системе

Показатели	Сорт салата							
	F1 Solos	Китайский курчавый	Китайский красно-зеленый	Меркурий	Дубрава	Балет	Робин	Кокарда
Влажность, %	95.7	95.7	94.0	95.0	93.9	94.2	94.9	94.9
Сухое вещество, %	4.3	4.3	6.0	5.1	6.1	5.8	5.2	5.1
Сырая зола, % а.с.в.	25.3	23.1	22.4	21.6	22.1	21.6	19.8	21.4
Сумма сахаров, % а.с.в.	5.1	5.6	8.0	7.1	7.5	12.0	10.7	7.2
Витамин С, мг/100 г н.в.	7.0	11.0	10.8	8.4	11.2	8.8	9.7	12.3
Нитраты, мг/кг н.в.	1362	1256	1204	920	1590	1650	1256	1906
Азот, % а.с.в.	3.6	3.5	4.0	3.7	3.9	3.7	3.9	4.2
Фосфор, % а.с.в.	0.8	0.9	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.7
Калий, % а.с.в.	10.7	9.5	9.0	7.8	9.2	7.5	8.3	8.0
Кальций, % а.с.в.	2.2	2.2	2.2	2.3	1.9	2.9	1.9	1.9
Магний, % а.с.в.	0.4	0.4	0.6	0.5	0.5	0.6	0.5	0.6
Железо, мг/кг а.с.в.	132.1	132.8	108.1	98.9	97.9	84.2	106.2	129.5
Медь, мг/кг а.с.в.	6.0	3.6	3.0	2.8	2.4	2.0	2.1	2.3
Цинк, мг/кг а.с.в.	20.9	17.7	14.1	14.1	13.4	12.0	13.2	13.8
Марганец, мг/кг а.с.в.	38.9	44.9	51.2	54.6	42.4	41.0	38.2	41.9

Примечание. а.с.в. – Абсолютно сухое вещество, н.в. – натуральная влажность.

ческим характеристикам напрямую не коррелировали с продуктивностью растительных культур, наибольшая масса надземной части одной ячейки (113 г) была характерна для салата сорта Балет.

Для выявления наиболее перспективных для использования в биоэлектрохимических системах растений с точки зрения комплексности присутствующих им электрических, фотосинтетических, морфометрических и биохимических характеристик была проведена сортировка исследованных салатов по измеренным параметрам (табл. 3). В первой строке приведены растения с более высокими значениями оцениваемых характеристик, им присваивается 8 баллов за каждый пункт, а в последней строке представлены салаты с наименьшими величинами полученных показателей, им дается 1 балл. На основе этого для каждого образца была рассчитана сумма баллов рейтинга: сорт Балет набрал 60 баллов, сорт Китайский красно-зеленый – 56 баллов, сорт Дубрава – 55 баллов, сорт Кокарда – 55 баллов, сорт Меркурий – 49 баллов, сорт Робин – 42 балла, сорт Китайский курчавый – 42 балла, гибрид F₁ Solos – 36 баллов. Таким образом, можно выделить сорт Балет как отличающийся наилучшим комплексом и электрических, и морфологических, и биохимических, и фотосинтетических характеристик.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований получено, что лучшими электрогенными свойствами в системе «корнеобитаемая среда–растения» обладают салаты сорта Меркурий и Дубрава. Однако по сумме параметров, в дополнении к электрическим, включающих морфометрические, биохимические и фотосинтетические характеристики, можно выделить салат сорта Балет.

В перспективе на основе полученных данных возможно создание высокоэффективных многофункциональных агрофитоценозов, включающих растения, способные к высокой и стабильной генерации электроэнергии и растений с высокой реализацией потенциала продуктивности, формирующих высококачественную растительную продукцию за счет эффективного усвоения и преобразования энергии света.

Показанная возможность использования электрогенеза в системе «корнеобитаемая среда–растения» в качестве нового зеленого источника электроэнергии имеет большой потенциал использования, в первую очередь, в сельском хозяйстве для обеспечения электропитанием маломощных устройств мониторинга состояния окружающей среды и параметров растений, а также частичного электроснабжения устройств поддержки жизнедеятельности растений в искусственных агроэкосистемах.

Таблица 3. Сортировка исследованных растений салата по убыванию: разности потенциалов, формируемой в корнеобитаемой среде, генерируемой биоэлектрохимической системой энергии, продуктивности растительной продукции, сухого вещества, суммы сахаров, витамина С, индекса хлорофилла *ChlRI*, максимального квантового выхода F_V/F_M , реального квантового выхода $Y(II)$, и увеличению: индекса антоцианов *ARI*, меры рассеяния света листом R_{800}

Балл	По средней разности потенциалов ↑	По генерируемой энергии ↑	По продуктивности растительной продукции ↑	По сухому веществу ↑	По сумме сахаров ↑	По витамину С ↑	По индексу <i>ChlRI</i> на 28-е сутки ↑	По индексу <i>ARI</i> на 28-е сутки ↓	По индексу R_{800} на 28-е сутки ↓	По F_V/F_M на 28-е сутки ↑	По $Y(II)$ на 28-е сутки ↑
8	Меркурий	Дубрава	Балет	Балет	Кит. кр-зел.	Дубрава	Балет	Кокарда	Дубрава	Меркурий	Кит. курчавый
7	Дубрава	Кит. кр-зел.	Кокарда	Робин	Кокарда	Solos	Кокарда	Балет	Кит. кр-зел.	Кит. курчавый	Кит. кр-зел.
6	Балет	Балет	Меркурий	Кит. кр-зел.	Дубрава	Кокарда	Solos	Меркурий	Solos	Кит. кр-зел.	Меркурий
5	Робин	Solos	Кит. кр-зел.	Дубрава	Кит. курчавый	Балет	Дубрава	Кит. курчавый	Кокарда	Робин	Кокарда
4	Solos	Меркурий	Робин	Кокарда	Робин	Робин	Кит. кр-зел.	Дубрава	Кит. курчавый	Балет	Балет
3	Кокарда	Робин	Кит. курчавый	Меркурий	Балет	Кит. кр-зел.	Кит. курчавый	Робин	Меркурий	Кокарда	Робин
2	Кит. курчавый	Кит. курчавый	Solos	Кит. курчавый	Меркурий	Меркурий	Робин	Кит. кр-зел.	Робин	Solos	Дубрава
1	Кит. кр-зел.	Нет данных (Кокарда)	Дубрава	Solos	Solos	Кит. курчавый	Меркурий	Solos	Балет	Дубрава	Solos

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sayed E. T., Abdelkareem M. A., Obaideen K., Elsaied K., Wilberforce T., Maghrabie H. M., and Olabi A. G. Progress in plant-based bioelectrochemical systems and their connection with sustainable development goals. *Carbon Resources Conversion*, **4**, 169–183 (2021). DOI: 10.1016/j.crcon.2021.04.004

2. Logan B. E. *Microbial fuel cell* (John Wiley & Sons, 2008).

3. Pant D., Singh A., Van Bogaert G., Olsen S. I., Nigam P. S., Diels L., and Vanbroekhoven K. Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy produc-

tion and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. *RSC Advances*, **2** (4), 1248–1263 (2012). DOI: 10.1039/C1RA00839K

4. Li X., Abu-Reesh I. M., and He Z. Development of bioelectrochemical systems to promote sustainable agriculture. *Agriculture*, **5** (3), 367–388 (2015). DOI: 10.3390/agriculture5030367

5. Strik D. P., Hamelers H. V. M., Snel J. F., and Buisman C. J. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int. J. Energy Res.*, **32** (9), 870–876 (2008). DOI: 10.1002/er.1397

6. Gul M. M. and Ahmad K. S. Bioelectrochemical systems: sustainable bio-energy powerhouses. *Biosensors and Bioelectronics*, **142**, 111576 (2019). DOI: 10.1016/j.bios.2019.111576

7. Wang S., Adekunle A., and Raghavan V. Exploring the integration of bioelectrochemical systems and hydroponics: Possibilities, challenges, and innovations, *J. Cleaner Prod.*, **366**, 132855 (2022). DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.132855

8. Yan X., Wang Z., Huang L., Wang C., Hou R., Xu Z., and Qiao X. Research progress on electrical signals in

- higher plants, *Progr. Natural Sci.* **19** (5), 531 (2009). DOI: 10.1016/j.pnsc.2008.08.009
9. Dziubinska H., Trebacz K., and Zawadski T. The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiologia Plantarum*, **75**, 417–423 (1989). DOI:10.1111/J.1399-3054.1989.TB04648.X
 10. Davies E., Zawadzki T., and Witters D. Electrical activity and signal transmission in plants: how do plants know. In: *Plant signaling, plasma membrane and change of state*, Ed. by C. Penel and H. Greppin (University of Geneva Press, Geneva, Switzerland), pp. 119–137 (1991).
 11. Pickard B. G. Action potentials in higher plants. *Botan. Rev.*, **39**, 172–201 (1973).
 12. Maffei M. and Bossi S. Electrophysiology and plant responses to biotic stress. In: *Plant electrophysiology: theory and methods*, Ed. by A. G. Volkov (Springer, Berlin, Heidelberg, 2006), pp. 461–481. DOI: 10.1007/978-3-540-37843-3_20
 13. Медведев С. С. *Электрофизиология растений* (Изд-во СПбГУ., СПб., 1998).
 14. Опритов В. А. Проблемы и перспективы изучения биоэлектrogenеза у высших растений. *Вестн. Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского* (Материалы выездной сессии ОФР РАН по проблемам биоэлектrogenеза и адаптации у растений (2000 г.), б/н, 7–10 (2001).
 15. Пятингин С. С. Распространяющиеся электрические сигналы в растениях. *Цитология*, **50** (2), 154–159 (2008).
 16. Опритов В. А., Пятингин С. С. и Ретивин В. Г. *Биоэлектrogenез у высших растений* (Наука, М., 1991).
 17. Tazawa M. and Shimmen T. How characean cells have contributed to the progress of plant membrane biophysics. *Functional Plant Biol.*, **28** (7), 523–529 (2001). DOI: 10.1071/PP01027
 18. Fromm J. and Spanswick R. Characteristics of action potentials in willow (*Salix viminalis* L.). *J. Exp. Botany*, **44** (7), 1119–1125 (1993). DOI: 10.1093/jxb/44.7.1119
 19. Пятингин С. С., Воденев В. А. и Опритов В. А. Сопряжение генерации потенциала действия в клетках растений с метаболизмом: современное понимание проблемы. *Успехи соврем. биологии*, **125** (5), 520–528 (2005).
 20. Oyarce P. and Gurovich L. Electrical signals in avocado trees: Responses to light and water availability conditions. *Plant Signaling & Behavior*, **5** (1), 34–41 (2010). DOI: 10.4161/psb.5.1.10157
 21. Volkov A. G., Dunkley T. C., Morgan S. A., Ruff II D., Boyce Y. L., and Labady A. J. Bioelectrochemical signaling in green plants induced by photosensory systems. *Bioelectrochemistry*, **63** (1–2), 91–94 (2004). DOI: 10.1016/j.bioelechem.2003.09.025
 22. Bentrup F.-W. Cellular polarity. In *Cellular Interactions*, Ed. by H. F. Linskens and J. Heslop-Harrison (Springer-Verlag, Berlin, 1984), pp. 473–490.
 23. Kabutey F. T., Zhao Q., Wei L., Ding J., Antwi P., Quashie F. K., and Wang W. An overview of plant microbial fuel cells (PMFCs): Configurations and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **110**, 402–414 (2019). DOI: 10.1016/j.rser.2019.05.016
 24. Choudhury P., Prasad Uday U. S., Bandyopadhyay T. K., Ray R. N., and Bhunia B. Performance improvement of microbial fuel cell (MFC) using suitable electrode and Bioengineered organisms: A review. *Bioengineered*, **8** (5), 471–487 (2017). DOI: 10.1080/21655979.2016.1267883
 25. Sarma P. J. and Mohanty K. *Epipremnum aureum* and *Dracaena braunii* as indoor plants for enhanced bio-electricity generation in a plant microbial fuel cell with electrochemically modified carbon fiber brush anode. *J. Biosci. Bioeng.*, **126**, 404–410 (2018). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.03.009
 26. Regmi R., Nitisoravut R., and Ketchaimongkol J. A decade of plant-assisted microbial fuel cells: looking back and moving forward. *Biofuels*, **9**, 605–612 (2018). DOI: 10.1080/17597269.2018.1432272
 27. Kaku N., Yonezawa N., Kodama Y., and Watanabe K. Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**, 43–49 (2008). DOI: 10.1007/s00253-008-1410-9
 28. Sudirjo E., Buisman C. J., and Strik D. P. Activated carbon mixed with marine sediment is suitable as bio-anode material for *Spartina anglica* sediment/plant microbial fuel cell: plant growth, electricity generation, and spatial microbial community diversity. *Water*, **11** (9), 1810 (2019). DOI: 10.3390/w11091810
 29. Apollon W., Kamaraj S. K., Silos-Espino H., Perales-Segovia C., Valera-Montero L. L., Maldonado-Ruelas V. A., Vazquez-Gutierrez M. A., Ortiz-Medina R. A., Flores-Benitez S., and Gomez-Leyva J. F. Impact of *Opuntia* species plant bio-battery in a semi-arid environment: demonstration of their applications. *Appl. Energy*, **279**, 115788 (2020). DOI: 10.1016/j.apenergy.2020.115788
 30. Schievano A., Colombo A., Grattieri M., Trasatti S. P., Liberale A., Tremolada P., Pino C., and Cristiani P. Floating microbial fuel cells as energy harvesters for signal transmission from natural water bodies. *J. Power Sources*, **340**, 80–88 (2017). DOI: 10.1016/j.jpowsour.2016.11.037
 31. Osorio-de-la-Rosa E., Vazquez-Castillo J., Castillo-Atoche A., Heredia-Lozano J., Castillo-Atoche A., Becerra-Núñez G., and Barbosa, R. Arrays of plant microbial fuel cells for implementing self-sustainable wireless sensor networks. *IEEE Sensors J.*, **21** (2), 1965–1974 (2021). DOI: 10.1109/JSEN.2020.3019986
 32. Jung S., Lee J., Park Y. K., and Kwon E. E. Bioelectrochemical systems for a circular bioeconomy. *Bioresour. Technol.*, **300**, 122748 (2020). DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122748
 33. Панова Г. Г., Удалова О. Р., Канаш Е. В., Галушко А. С., Кочетов А. А., Прияткин Н. С., Архипов М. В. и Черноусов И. Н. Основы физического моделирования «идеальных» агроэкосистем. *Журн. техн. физики*, **90** (10), 1633–1639 (2020). DOI: 10.21883/JTF.2020.10.49792.429-19

34. Кулешова Т. Э., Бушлякова А. В. и Галль Н. Р. Непинвазивное измерение биоэлектрических потенциалов растений. *Письма в Журн. техн. физики*, **45** (5), 6–8 (2019). DOI: 10.21883/PJTF.2019.05.47387.17541
35. Чесноков Ю. В., Канаш Е. В., Мирская Г. В., Кочерина Н. В., Русаков Д. В., Ловассер У. и Бёрнер А. Картирование QTL индексов диффузного отражения листьев яровой гексаплоидной пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Физиология растений*, **66** (1), 46–57 (2019).
36. *MINI-РАМ-II. Руководство по автономному использованию, Edition 3* (Heinz Walz GmbH, 2018).
37. Кулешова Т. Э., Панова Г. Г., Галль Н. Р. и Галущко А. С. Концентрационный элемент на основе электрогенных процессов в корнеобитаемой среде. *Письма в Журн. техн. физики*, **48** (8), 29–32 (2022). DOI: 10.21883/PJTF.2022.08.52363.19066
38. Кулешова Т. Э., Галль Н. Р., Удалова О. Р. и Панова Г. Г. Многофункциональный комплекс датчиков для фитомониторинга в условиях интенсивной светокультуры. *Агрофизика*, **4**, 33–39 (2020). DOI: 10.25695/AGRPH.2020.04.06
39. Kovinich N., Kayanja G., Chanoca A., Riedl K., Otegui M. S., and Grotewold E. Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in Arabidopsis. *Planta*, **240**, 931–940 (2014). DOI: 10.1007/s00425-014-2079-1
40. *Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов*. СанПиН 2.3.2.1078-01", 06.11.2001.

Electrogenesis in the Root Environment of Various Lettuce Varieties

T.E. Kuleshova*, Z.A. Gasieva*, D.V. Rusakov*, A.S. Galushko*, and G.G. Panova*

**Agrophysical Research Institute, Grazhdanskiy prosp. 14, Saint-Petersburg, 195220 Russia*

Bioelectrochemical systems based on electroactive processes in the root environment of plants are a promising direction for the combined production of green electricity and plant products. This work aimed to investigate the dynamics of the potential differences formation in the root environment, diffuse reflectance indices of leaves, fluorescence parameters, morphometric and biochemical characteristics of the lettuce varieties (Chinese curly, Chinese red-green, Ballet, Cockarde, Mercury, Dubrava, Robin) and Solos F1 hybrid. A maximum potential difference of 430 mV was observed for the Mercury variety, and a minimum potential difference of 352 mV was determined for the Chinese curly variety. Analysis of measurements taken including morphometric, biochemical and photosynthetic characteristics in addition to electrical parameters revealed that the Ballet lettuce variety showed the best parameters among other lettuce varieties under study. It is evident based on the data obtained that it is possible to create agrophytocenoses that include plants capable of high and stable electricity generation along with high productivity and good quality of the resulting plant products due to the effective absorption and conversion of light energy.

Keywords: bioelectrochemical system, plant-microbial fuel cell, artificial light culture, activity of the photosynthetic apparatus, plant products

НИЗКОЧАСТОТНЫЕ КОЛЕБАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОРГАНИЗМА

© 2024 г. О.В. Гришин*, **, В.Г. Гришин***, #

*Новосибирский государственный медицинский университет, Красный просп., 52, Новосибирск, 630091, Россия

**Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

***Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий,
просп. Академика Лаврентьева, 6, Новосибирск, 630090, Россия

#E-mail: victor.grishin.nsk@gmail.com

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 01.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

В ряде наших исследований было показано, что низкочастотные колебания функциональных показателей системы транспорта кислорода носят устойчивый характер и синхронизированы между собой. В литературе представлено большое количество примеров низкочастотных колебаний различных функциональных показателей, которые прямо или косвенно связаны с энергетическим метаболизмом. Параллельно уже более 40 лет изучаются искусственно вызванные затухающие и постоянные спонтанные колебания показателей энергизации в митохондриях в том же низкочастотном диапазоне. Целью настоящего обзора было рассмотреть возможную связь между колебаниями функциональных показателей системы транспорта кислорода и функциональных показателей митохондрий в общем для них очень низкочастотном диапазоне (0.003–0.030 Гц). Мы полагаем, что для всех этих колебаний общим источником является периодическая динамика «энергизации» в митохондриях, объединенных в митохондриальные сети. Процесс генерации этих колебаний протекает в две фазы. В первую фазу вход Ca^{2+} в митохондрии превышает выход и способствует усилению активности окислительного фосфорилирования. Во вторую фазу выход Ca^{2+} из митохондрий превалирует над входом и сопровождается торможением окислительного фосфорилирования. Колебания носят постоянный спонтанный характер и основаны на «автокаталитической» регуляции по принципу обратной связи. Инерционность процессов полного цикла (первой и второй фаз) продолжительностью 1–3 мин может быть обусловлена емкостью фосфатного буфера митохондрий. Структурной основой для синхронизации колебаний на тканевом уровне могут быть митохондриальные сети возбудимых тканей. Синхронизация на уровне организма между митохондриальными колебаниями и колебаниями показателей, связанных с энергетическим метаболизмом, может осуществляться посредством системы туннельных нанотрубок.

Ключевые слова: VLF-колебания, система транспорта кислорода, система клеточного дыхания, митохондрии, ионы кальция, мембранный потенциал митохондрий, окислительное фосфорилирование, митохондриальные сети, митохондриальные колебания.

DOI: 10.31857/S0006302924010124, EDN: QZPBDT

Система дыхания обеспечивает транспорт кислорода из атмосферного воздуха до митохондрий [1]. В настоящее время накоплен большой

объем данных об устойчивых медленных колебаниях функциональных показателей в различных звеньях системы транспорта кислорода, обеспечивающих энергетический метаболизм. Известно, что в основе устойчивых колебаний функциональных показателей лежат регуляторные процессы, удерживающие контролируемые параметры в определенных границах. Амплитуда колебаний будет зависеть от верхних и нижних границ физиологических «уставок» [2] контролируемого параметра, а периодичность колебаний (продолжительность цикла) — от инерционности

Сокращения: VLF — очень низкая частота (very low frequency), IP3R — инозитол-3-фосфатные рецепторы, MCU — митохондриальный унипортер кальция (mitochondrial calcium uniporter), mPTP — митохондриальная Ca^{2+} -зависимая пора (mitochondrial permeability transition pore), NCLX — митохондриальный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, PMPT — митохондриальная пальмитат/ Ca^{2+} -зависимая пора (palmitate/ Ca^{2+} -induced permeability transition pore), ОФ — окислительное фосфорилирование, АФК — активные формы кислорода, TNT — туннельные нанотрубки.

процесса отклонения в этих физиологических границах. Помимо этого, условием устойчивости колебаний является постоянный источник энергии.

При наличии нескольких контуров обратной связи регуляторных процессов можно наблюдать сложный колебательный процесс одновременно в нескольких частотных диапазонах. При этом генератор колебаний может транслировать свое «влияние» на другие, связанные с ним, периодические процессы. Примером может служить центральный регулятор дыхания, колебания которого определяются границами напряжения CO_2 и pH, а механизмом синхронизации с сердечным ритмом — изменение внутригрудного давления, действующего на пейсмейкер синоатриального узла. В результате формируется высокочастотные колебания сердечного ритма.

При анализе вариабельности сердечного ритма принято выделять три основных волновых пика [3]: очень низкочастотный (VLF — very low frequency) в диапазоне от 0.003 до 0.040 Гц, низкочастотный (LF — low frequency) — от 0.04 до 0.15 Гц и высокочастотный (HF — high frequency) — от 0.15 до 0.4 Гц. Диапазоны HF и LF имеют функциональное обоснование и уже используются в диагностике сердечной патологии.

Загадочным до сих пор остается VLF-диапазон, который принято называть «метаболическим» на том основании, что VLF-колебания согласуются по частоте с регуляторными ритмами гипоталамуса и эндокринной системы. Однако совпадение частот не может служить указанием на локализацию генератора колебаний. Помимо гипоталамуса и эндокринной системы VLF-биоритмы были выявлены на всех уровнях организма человека и экспериментальных животных — на субклеточном в митохондриях [4] и клеточном в эндотелиоцитах [5], на системном уровне — колебания сердечного ритма и показателей легочной вентиляции [6]. На уровне организма низкочастотные колебания наблюдаются в скорости потребления кислорода [7] и температуре тела [8].

Таким образом, VLF-колебания проявляются почти на всех уровнях организма, причем каждый из осциллирующих показателей косвенно или напрямую связан с дыханием и энергетическим метаболизмом. В этом плане название «метаболический» вполне уместно как наиболее универсальное. Однако до настоящего времени остаются неизвестными ни локализация, ни механизм генерации этих колебаний, ни их энергетический источник, ни способы их синхронизации в организме. В связи с этим важно хотя бы теоретически определить наиболее вероятного претендента на роль такого генератора. В этом плане особый интерес представляют осцилляторные процессы в митохондриях.

Феномен осцилляторной динамики функциональных показателей митохондрий, как сложной диссипативной системы, был теоретически предсказан и экспериментально продемонстрирован в клетках сердца [9]. Колебания энергетических процессов, наблюдаемые *in vivo*, например, в мышечной ткани, стали связывать с осцилляторными процессами в митохондриях [4]. Было также установлено, что митохондрии в клетках функционируют не как отдельные органеллы или «внутриклеточная энергетическая единица» [10, 11], а как единая митохондриальная сеть. В 2001 г. В.П. Скулачев выдвинул гипотезу о том, что митохондрии существуют в двух взаимопревращающихся формах; как небольшие изолированные частицы, так и протяженные нити, сети или кластеры, связанные межмитохондриальными соединениями [12]. В работе [13] на основе экспериментов с кардиомиоцитами и математическом моделировании было впервые показано, что сердечные митохондрии ведут себя как сеть связанных осцилляторов как в физиологических, так и в патофизиологических условиях. Позже был открыт феномен межклеточных взаимодействий через туннельные нанотрубочки, наполненные митохондриями [14]. Целью настоящего обзора было рассмотреть низкочастотную периодическую активность митохондрий как вероятный источник колебаний функциональных показателей системы транспорта кислорода.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА КОЛЕБАНИЙ

Учитывая тот факт, что одним из фундаментальных свойств организма является функционирование систем в определенных ритмах, в этом обзоре будут представлены методы анализа временных рядов, позволяющие извлечь информацию о колебательных процессах, отражающихся в вариабельности физиологических показателей. Термин «временной ряд» означает набор измерений одной переменной. При одновременном измерении нескольких переменных используется термин многомерный временной ряд.

Специфичность биологических сигналов требует применения разнообразных методов анализа. Общий подход заключается в использовании одномерных методов [15, 16]. Существуют примеры многомерных исследований. Однако они в основном сосредоточены на анализе взаимодействия между двумя системами, например, такими как циркуляторная и респираторная системы, [17–19] или анализе различий между вариабельностью сердечного ритма и артериального давления [20], пульсоксиметрии и электроэнцефалографии [21, 22].

СПЕКТР МОЩНОСТИ

Существует несколько методов для извлечения спектра мощности сигнала или преобразования частоты. В клинических исследованиях применяются метод Блэкмена—Таки [21], метод Уэлша [23], метод Бурга [24, 25], метод Юле—Уокера [26], метод Ломба—Скаргла [27] и многомерное преобразование [28, 29]. Применение этих методов при извлечении энергетического спектра зависит от характера изучаемого набора данных. Например, метод Ломба—Скаргла является единственным, предназначенным для создания энергетического спектра неэквидистантных временных рядов, как в случае анализа RR-интервалов, когда следует избегать интерполяции.

Частотно-временной метод. Обычно методы оценки спектра мощности предполагают наличие стационарности в исследуемых сигналах, подразумевая, что их свойства не изменяются со временем. Чтобы распространить этот анализ на нестационарные сигналы, были предложены методы преобразования во времени. Классический подход включает оконный анализ временного ряда, то есть разделение временных рядов на несколько сегментов, также называемых окнами. Для каждого окна спектр мощности вычисляется с использованием выше приведенных преобразований частоты. Стандартом является быстрое оконное преобразование Фурье [30]. Поскольку этот метод страдает от компромисса между частотным и временным разрешением, можно использовать преобразование Вигнера—Вилля [31], основанное на Фурье-преобразовании мгновенной автокорреляции сигнала, или вейвлет-преобразование [32, 33], основанное на корреляции в разных масштабах времени между данными и опорным сигналом, называемом базовым вейвлетом. Метод преобразования Вигнера—Вилля способен обеспечить наилучшее временное и частотное разрешение по сравнению с другими методами, но очень чувствителен к шуму, практически всегда присутствующему в биологических сигналах. Метод вейвлет-преобразования был разработан для обеспечения высокого частотного разрешения на низких частотах и высокого временного разрешения на высоких частотах.

Ритмометрический анализ. Ритмометрический анализ моделирует изменения внутри временного ряда как набор косинусных функций со связанными частотами [34, 35]. Основное отличие этого метода от частотного анализа состоит в том, что учитываются только отдельные частоты. При этом в модели присутствуют дополнительные члены, учитывающие вариабельность частотных компонентов внутри модели. Такой подход может быть использован не только для объяснения изменений характеристик во времени, но также для создания детерминированной версии исход-

ного временного ряда, который проще анализировать из-за отсутствия шума. Ритмометрический анализ применяется для исследования многочасовых профилей показателей артериального давления у детей с психосоматической патологией [36] и для оценки церебральной гемодинамики плода при плацентарной недостаточности [37].

Цикличность (Turns count). Характеристика цикличности показывает, сколько раз сигнал находился выше или ниже определенного порогового значения в определенном временном интервале ряда. Эта характеристика может быть применена только при исследовании конкретных свойств сигналов. Порог может быть как фиксированным, так и адаптивным. Адаптивный порог с использованием стандартного отклонения анализируемого сигнала используется для классификации виброарthroграфических данных при различных патологиях коленного сустава [38]. Метод цикличности применяется для анализа колебаний ритма ходьбы при боковом амиотрофическом склерозе [39].

Операторы энергии. В рамках этого метода используются различные характеристики, объединяющие информацию о нескольких точках временного ряда с нелинейными процессами. Характеристиками этого типа являются операторы Плоткина и Свами (Plotkin—Swamy), а также оператор Тигера (Teager). Последний оператор является частным случаем первого, он более чувствителен к шуму, но математически связан с энергией синусоидальной волны. Операторы Плоткина и Свами используются для сегментации и выделения характеристик сигналов электроэнцефалограммы [40], а оператор Тигера для обнаружения пиков для оценки сердечного ритма плода по фонокардиографическим сигналам [41].

Частотные и частотно-временные характеристики. Частотные характеристики могут быть извлечены из любого преобразования частоты. Стандартный подход состоит в том, чтобы разделить спектр на несколько частотных диапазонов и вычислить центральную частоту в каждом диапазоне, т.е. пик в спектре мощности [3]. Некоторые работы не следуют руководящим принципам, предпочитая другие полосы [42]. Характеристики включают мощность в диапазонах низких и высоких частот и их соотношение [3]. Эти типы характеристик являются одними из наиболее используемых, и их применение включает среди прочего оценку риска инфаркта миокарда и диабетических невропатий [43], характеристику вариабельности сердечного ритма во время гемодиализа [21], оценку сократимости сердца [44], классификации сердечной смертности [24].

Таким образом, физиологические временные ряды представляют собой сложные объекты, характеризующиеся множеством свойств, некото-

рые из которых часто переплетаются, например, посредством сочетания стохастичности и детерминизма. Это требует использования широкого набора методов, способных максимально точно описать исследуемый временной ряд.

VLF-ОСЦИЛЛЯЦИИ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ И СЕРДЕЧНОГО РИТМА

Впервые подобный ритм был описан в 1964 г. Л. Гудманом при пятичасовом исследовании вентиляции легких и показателей газообмена у здоровых [45]. Через 10 лет в других исследованиях низкочастотная вариабельность показателей внешнего дыхания и частоты сердечных сокращений была обнаружена у здоровых добровольцев при двухчасовом мониторинге [46]. Попытку объяснить низкочастотную вариабельность вентиляции предпринял в 1991 г. М. Модарресзаде. Он считал, что непрерывные случайные нарушения в системе контроля углекислого газа могут приводить к нерегулярному и периодическому дыханию [47]. Было высказано предположение, что это реакция хеморефлекса на спонтанные изменения в системе внешнего дыхания [48]. Однако, если сравнивать инерционность хеморефлекса с VLF-периодом (одна-три минуты), с этим трудно согласиться. Любой, кто попробует задержать дыхание, уже через 15 с почувствует дискомфорт и необходимость сделать вдох, что является проявлением хеморефлекса. Инерция хеморефлекса значительно короче по времени и не укладывается в VLF-период. Подтверждением служат исследования с возвратным дыханием, при котором вентиляторная реакция у человека появляется уже через 5–10 с [49].

В наших исследованиях мы неоднократно наблюдали колебания функциональных показателей различных звеньев транспорта кислорода (вентиляции легких, легочного газообмена и частоты сердечных сокращений) в одном и том же VLF-диапазоне. Осцилляторный феномен не зависел от метода регистрации показателей [6] и сохранялся при физической нагрузке [50]. От способа регистрации зависела только выраженность «шумовой» составляющей вариабельности, которая, однако, не могла «поглотить» VLF-колебания ключевых показателей системы транспорта кислорода.

Предположение о том, что источником VLF-колебаний является гипоталамус или дыхательный центр пока не находит подтверждения, так как нет (или до сих пор не известен) механизма центральной генерации VLF-колебаний. Некоторые модели центрального регулятора дыхания предполагают, что каждая фаза дыхания генерируется отдельным центром в мозговом веществе. Комплекс *preBötzing* (*preBötC*) генерирует вдох, постинспираторный комплекс (*PiCo*) генерирует

постинспирацию, а латеральная парафациальная область (PFL) генерирует активный выдох [51]. Каждый генератор связан возбуждающими и тормозными связями. Однако этот ритмогенный треугольник генерирует только HF-колебания, соответствующие частоте дыхания. Генератор VLF-колебаний сердечного ритма, показателей легочной вентиляции и газообмена остается до сих пор неизвестным.

VLF-КОЛЕБАНИЯ ТЕПЛОПРОДУКЦИИ И КРОВОТОКА

Низкочастотные колебания тепловой мощности тела человека с периодами 2 и 7 мин были зарегистрированы еще в начале 60-х годов прошлого столетия [52]. Подобные колебания наблюдаются с помощью инфракрасной камеры [53]. На фоне стохастических изменений, связанных с физической активностью, VLF-колебания температуры кожи имеют четко выраженный низкочастотный спектр с пиками в пределах от 0.01 до 0.04 Гц [8].

На значение VLF-колебаний обратили внимание в клинической практике. У пациентов с доказанным сепсисом и шоком показатели низкочастотных колебаний температуры, оцениваемые вейвлет-анализом и по степени энтропии, существенно отличались от тех же показателей у больных с системным воспалением без признаков сепсиса [54]. По мнению исследователей, это связано с нарушением периферического кровотока, так как низкочастотные колебания температуры в VLF-диапазоне коррелируют с «биохимическими процессами на уровне эндотелия».

VLF-колебания локального кровотока хорошо определяются с помощью лазерной доплеровской флоуметрии и в ряде работ трактуются как «эндотелиальные» [55, 56]. В этом диапазоне наблюдались достоверные изменения при введении «эндотелий-активных» соединений, например ацетилхолина [57]. Предположение о том, что «эндотелиальные» колебания являются следствием локальной регуляции кровотока, обусловленной колебаниями эндотелиальной концентрации оксида азота (NO), оставляет открытым вопрос о механизме генерации этих колебаний. Еще более серьезное возражение против «эндотелиальной» природы колебаний, связанной с локальной регуляцией микроциркуляции, обусловлено самой «локальностью», которая зависит от множества факторов внешних воздействий.

Колебания оксигенации в мышце бедра здорового человека обнаружены на частоте 0.0117 ± 0.0042 Гц для состояния покоя и 0.0169 ± 0.0076 Гц при физической нагрузке [58]. Подобное смещение спектров при нагрузке в область с более высокой частотой согласуется с на-

шими данными [50]. Методом кросс-спектрального анализа был также установлен пик колебаний кожного кровотока, который был согласован с колебаниями оксигенации миоглобина и гемоглобина в мышце бедра [59].

У ряда исследователей в отношении природы VLF-колебаний показателей микроциркуляции и локального кровотока сложилось мнение, что они отражают особенности регуляторной функции симпатической нервной системы. Считается, что «симпатические нервы ритмично разряжаются, так что все иннервированные кровеносные сосуды находятся в состоянии непрерывного сокращения и расслабления вследствие симпатической и эндотелий опосредованной метаболической активности» [60]. Однако механизм генерации «симпатической регуляции колебаний периферического кровотока» в VLF-диапазоне не известен.

НИЗКОЧАСТОТНЫЕ КОЛЕБАНИЯ НА КЛЕТОЧНОМ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ УРОВНЯХ

Впервые VLF-колебания в клетках были обнаружены у показателей потока ионов и объема митохондрий в 60-х годах в нескольких лабораториях [10]. Митохондриальные колебания, запускаемые двухвалентными катионами, обычно индуцировались усилением катионного цикла (например, при добавлении валиномицина) в изолированных возбужденных митохондриях. Они всегда принимали форму затухающих синусоидальных колебаний с относительно большой амплитудой [61].

Прямое измерение концентрации Ca^{2+} в гепатоцитах при введении вазопрессина и ангиотензина-II показало, что динамика свободного Ca^{2+} представляет серию переходных процессов с интервалами 0.3–4.0 мин в зависимости от концентрации вводимого агониста [62]. Наряду с колебаниями Ca^{2+} были установлены и другие изменения, включая колебания мембранного потенциала, а также синхронизацию колебаний с соседними клетками [63]. Временно появляющиеся осцилляции концентрации Ca^{2+} были зарегистрированы у целого ряда невозбудимых клеток: при стимуляции адренорецепторов, мускариновых рецепторов бета-клеток поджелудочной железы [64], вазопрессиновых и ангиотензиновых рецепторов в клетках печени [65], гистаминовых рецепторов эндотелиоцитов, в астроцитах гиппокампа [66], холецистокининовых рецепторов в клетках поджелудочной железы (подробнее в обзоре [67]). Во всех случаях периодичность колебательных процессов находилась в пределах от 50 до 180 с, то есть в VLF-диапазоне.

Обсуждая природу генерации этих колебаний, исследователи пришли к выводу, что частотно-модулирующая сигнальная система имеет внутриклеточный механизм, который сопровождается колебаниями мембранного потенциала клетки и связан с отношением ионов Na^+/H^+ или $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Было также установлено, что гипотетический «пейсмейкер» колебаний связан непосредственно с внутриклеточным Ca^{2+} , для которого в клетке должен существовать некий накопитель [68]. Позже стало ясно, что таким накопителем являются эндоплазматический ретикулум и митохондрии, точнее, митохондриальная сеть клетки.

Последующие исследования показали, что колебания были связаны с митохондриальными окислительно-восстановительными переходными процессами и волнами деполяризации трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), что определило направление многих исследований в область митохондриальных механизмов [69]. Участие митохондрий в поглощении Ca^{2+} лучше проявлялось в возбудимых клетках, когда сразу после периода возбуждения свободный Ca^{2+} выводится из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум, а затем в митохондрии через инозитол-3-фосфатные рецепторы (IP3R). Способность к поглощению Ca^{2+} у митохондрий довольно высокая, что было неоднократно экспериментально доказано [70]. Тогда же в 90-е годы было установлено, что поглощение Ca^{2+} вызывает в митохондриях временное снижение $\Delta\Psi_m$ и приводит к активации клеточного дыхания, которое затем сменяется торможением и снова активацией и т.д.

Современные методы флуоресценции позволяют регистрировать спонтанные VLF-колебания в клетках как постоянно существующий феномен, а не только в ответ на действие агонистов. Спонтанные колебания уровня Ca^{2+} в диапазоне 0.005–0.010 Гц были установлены в процессе ангиогенеза *in vivo* [71]. Они наблюдались в мигрирующих клетках, отпочковывающихся от прорастающего сосуда. Помимо колебаний Ca^{2+} в том же диапазоне были обнаружены колебания уровня NO , играющего центральную роль в регуляции тонуса сосудов и, соответственно, локального кровотока. Колебания в том же диапазоне наблюдали *in vivo* в показателях микроциркуляции с помощью метода доплеровской флоуметрии [72]. Авторы полагали, что модулятором колебаний микроциркуляции является динамика Ca^{2+} в эндотелиоцитах. Важно отметить, что амплитуда спонтанных постоянных колебаний во всех случаях была в несколько раз меньше амплитуды колебаний, вызванных действием агонистов [5]. С другой стороны, один и тот же VLF-диапазон как искусственно вызванных, так и спонтанных колебаний указывает на то, что здесь возможно

имеет место общая природа инерционности циклического процесса. В митохондриях такая инерционность может определяться емкостью фосфатного буфера.

БИОФИЗИКА МИТОХОНДРИЙ В НОРМЕ

Экспериментальные условия измерений параметров биоэнергетики часто оказывают экстремальное или повреждающее воздействие на объект исследования — митохондрии [70]. Несмотря на колоссальное количество работ в области митохондриологии, исследований, раскрывающих функциональные механизмы биоэнергетики в норме, крайне мало. Нередко отдельно взятые результаты экспериментальных исследований могут противоречить друг другу, но при выстраивании во временном континууме «противоречия» могут оказаться фазами следующих друг за другом процессов. Примером может служить роль концентрации свободного кальция в митохондриях ($[Ca^{2+}]_m$) в отношении окислительного фосфорилирования (ОФ).

Активирующее действие притока Ca^{2+} в митохондриях на окислительное фосфорилирование. Исследователи сходятся во мнении, что Ca^{2+} играет центральную роль в метаболической регуляции цикла трикарбоновых кислот и ОФ в целом. Из цитоплазмы клетки Ca^{2+} проникает в эндоплазматический ретикулум через кальциевый насос саркоплазматического ретикулума (SERCA — sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase), выходит через IP3R, проникает в митохондрии через потенциалзависимые каналы (VDAC — voltage-dependent anion channel), расположенные во внешней мембране (рис. 1). Далее через внутреннюю мембрану митохондрий кальций проникает в матрикс посредством унипортера (MCU — mitochondrial calcium uniporter), который обеспечивает приток Ca^{2+} в митохондрии [73]. Поток кальция в митохондриях усиливается при возбуждении клеток. Это согласуется с тем, что свободный Ca^{2+} участвует в регуляции нескольких митохондриальных дегидрогеназ и регулирует тем самым дыхательную активность митохондрий в соответствии с меняющимися потребностями в АТФ. Поступление Ca^{2+} в митохондрии оказывает активирующее действие на весь каскад ОФ: стимулируется выработка АТФ посредством активации F1Fo-АТФ-синтазы и поток электронов через комплекс III, а также комплекс V (АТФ-синтаза) и транслоказа для АТФ/АДФ-обмена [74].

Активирующая роль кальция функционально логична, прежде всего, для возбудимых клеток, потенциал действия которых связан, с одной стороны, с увеличением потребности в АТФ, с другой — с входом кальция в клетку. Конечным эффектом активации цикла трикарбоновых кислот

является усиление синтеза субстратов ОФ (NADH и FADH), усиление активности дыхательной цепи и последующее увеличение прокачки H^+ [73]. Чем выше функциональная активность и интенсивнее поглощение АТФ, тем больше Ca^{2+} поступает в митохондрии, причем в обмен на H^+ в соотношении 1:3 [70]. В работе [74] показано, что Ca^{2+} увеличивает максимальную скорость ОФ и что этот эффект является результатом «распределенной активации реакций внутри сети окислительного фосфорилирования». При этом через Ca^{2+} может регулироваться система клеточной антиоксидантной защиты на ранней стадии индуцированного кальцием открытия поры переходной проницаемости (mPTP — mitochondrial permeability transition pore) [75].

Механизмы выхода Ca^{2+} из митохондрий. Митохондрия является главным депо Ca^{2+} в клетке. Значительная часть исследований подтверждает способность митохондрий к колоссальному накоплению Ca^{2+} в матриксе при сохранении его низких значений в пределах 1–3 мкМ за счет секвестрации фосфатами. Здесь возникает вопрос, на какое время хватит емкости фосфатного буфера митохондрий, чтобы удерживать $[Ca^{2+}]_m$ в физиологически допустимых пределах? Гомеостаз митохондриального Ca^{2+} определяется соотношением поступления/оттока, а также его секвестрацией в виде квазинерастворимого фосфата [70]. При этом концентрация свободного Ca^{2+} может увеличиваться за счет диссоциации его фосфатных осадков при снижении pH, что тесно связано с энергизацией митохондрий и скоростью ОФ [76]. Если предположить, что время «наполнения» фосфатного буфера, то есть инерционность сохранения низкой концентрации кальция в митохондриях, составляет от 1 до 3 мин, то это могло бы объяснить длительность цикла низкочастотных колебаний.

Около 20 лет назад сформировалось убеждение, что митохондрии служат основным компартментом для сброса Ca^{2+} в возбудимых клетках [77]. В рамках «накопительной» гипотезы, в которой большое значение придается патологическому открытию mPTP, существует мнение, что митохондрии вместе с эндоплазматическим ретикулумом служат «буфером гомеостатирования концентрации кальция в цитозоле», то есть резервуаром для аккумуляции Ca^{2+} , а его сигнальная функция ускорения ОФ представляется дополнительным «бонусом» [78].

Однако позже стало ясно, что функциональный смысл входа и выхода Ca^{2+} из митохондрий в возбудимых клетках заключается в управлении энергетической активностью (энергизацией) митохондрий в соответствии с сокращением миофибрилл. При ускоренном поступлении Ca^{2+} в

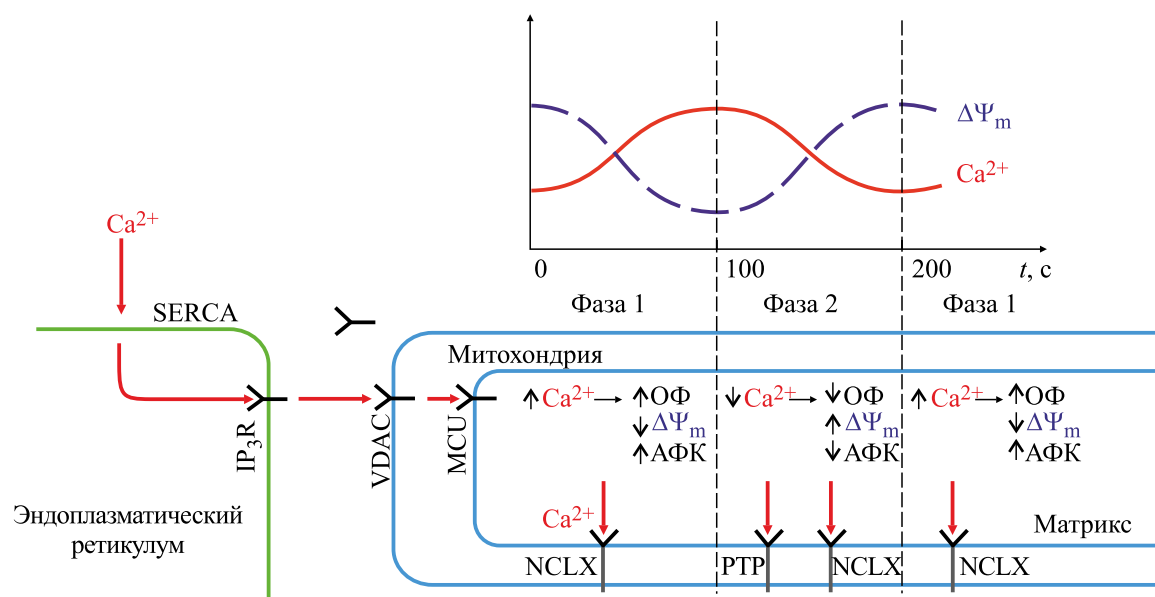


Рис. 1. Схема фазовых переходов митохондриальных колебаний в возбудимых клетках: Ca^{2+} — свободные ионы кальция, SERCA — ионный канал для импорта кальция из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум, IP_3R — инозитол-3-фосфатные рецептор, MCU — митохондриальный кальциевый унипортер, mPTP — митохондриальная Ca^{2+} -зависимая пора, NCLX — Na^+ -зависимый обменник $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -экспорта Ca^{2+} из митохондрий, АФК — активные формы кислорода, ОФ — окислительное фосфорилирование, $\Delta\Psi_m$ — разность мембранного потенциала митохондрий.

митохондрии ускоряются процессы ОФ. При этом одновременно ионы Ca^{2+} выходят из митохондрий через обменник $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX) — электрогенный антипортер — в обмен на Na^+ в соотношении 1:3. «Пропускная способность» канала зависит от нескольких факторов и может изменяться в рамках нормальной физиологической активности [79]. Считается, что преобладающим механизмом оттока Ca^{2+} в возбудимых клетках, таких как сердце, мозг и скелетные мышцы, является NCLX. Ионы Na^+ , импортируемые в митохондрии в обмен на Ca^{2+} , впоследствии обмениваются на H^+ через антипортер Na^+/H^+ [80]. На примере кардиомиоцитов показано, как NCLX эффективно выводит Ca^{2+} из митохондрий в цитозоль, тем самым регулируя автоматизм сокращений. Альтернативный механизм выхода Ca^{2+} через $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник является электронейтральным транспортером [81]. В одной из работ показана роль митохондриального пальмитата/ Ca^{2+} , индуцирующего короткоживущие липидные поры (PA-mPT), функционирующие в колебательном режиме в диапазоне VLF [82]. В отличие от mPTP, эти поры могут индуцироваться более низкими концентрациями ионов кальция в митохондриальном матриксе в условиях, близких к физиологическим.

Кроме того, функциональный выход Ca^{2+} из митохондрий возможен также через временное раскрытие mPTP и определяется свободной кон-

центрацией Ca^{2+} в матриксе. Считается, что «физиологическое мерцание» mPTP является механизмом высвобождения Ca^{2+} из митохондрий и служит физиологическим предохранительным клапаном для предотвращения перегрузки митохондрий ионами кальция [73]. Экспериментально созданная перегрузка кальцием приводит к неконтролируемому «открытию» mPTP, что ведет к апоптозу или трансформации митохондрий. Экспериментально создаваемый патологический избыток Ca^{2+} приводит к качественно новому функционально-структурному состоянию митохондрий, которое выключает ее из активного «производства» АТФ. Повышение рН матрикса также открывает mPTP [83] и, таким образом, ускоряет отток ионов Ca^{2+} в соответствии с их электрохимическим потенциалом. Здесь речь идет не о патологическом открытии mPTP, а о некоторых кратковременных переходных состояниях.

Ca^{2+} и механизмы торможения окислительного фосфорилирования. Мышечная ткань способна увеличивать потребление кислорода более чем в 100 раз от состояния покоя до максимальной аэробной нагрузки, при этом содержание свободной АТФ в цитозоле миоцитов имеет лишь небольшую тенденцию к снижению [84]. Такая способность к изменению функциональной активности возбудимых клеток должна быть обеспечена надежным механизмом управления

всеми процессами, связанными с ОФ и наработкой АТФ. Наиболее вероятно, что спонтанные колебания Ca^{2+} и $\Delta\Psi_m$ являются отражением этой подстройки. Трудно не согласиться с Е.Е. Сельковым, считавшим, что «энергетический метаболизм может чередоваться между двумя стабильными стационарными состояниями посредством гистерезисных переходов, показывая, что автокаталитическая природа энергетического метаболизма может играть ключевую роль для генерации автоколебаний при производстве энергии» [9]. В работе [4] высказано подобное мнение — «динамическое управление может проявляться в виде колебаний, которые повышают термодинамическую эффективность». В таком случае уровень $[\text{Ca}^{2+}]_m$ должен быть ассоциирован не только с активацией, но и с процессами торможения ОФ.

Известно, что поступление Ca^{2+} в митохондрии увеличивает скорость синтеза АТФ [85]. Однако эта зависимость не может быть линейной, так как приток Ca^{2+} обеспечивается $\Delta\Psi_m$, снижение которого с какого-то момента приведет к торможению всей цепочки ОФ вследствие падения энергизации митохондрий. С этим согласуется тот факт, что приток Ca^{2+} в митохондрии ассоциируется с усилением образования активных форм кислорода (АФК), что может ингибировать путь электронов внутри комплекса I, а также стимулировать активность синтазы оксида азота с образованием NO, что будет приводить к ингибированию комплекса IV [86]. И по другим данным приток Ca^{2+} увеличивает генерацию NO•, который, как было показано, ингибирует комплекс IV, что, в свою очередь, приводит к образованию АФК в участке комплекса III [73].

Между двумя крайними состояниями — активирующей функцией притока Ca^{2+} в отношении ОФ, с одной стороны, и патологической перегрузкой кальцием с катастрофическим открытием mPTP, с другой, несомненно, существует некий физиологический диапазон. Превышение его верхней границы снижает скорость поступления Ca^{2+} в митохондрии и ускоряет его выведение через NCLX, RA-mPT, mPTP и, возможно, другие, неизвестные пока механизмы удаления кальция из матрикса. Ключевым параметром авторегуляции может быть не скорость поступления/удаления Ca^{2+} , а целый ряд других взаимозависимых по принципу обратной связи процессов, которые и будут обеспечивать гомеостаз Ca^{2+} в некоторых физиологических границах [61].

Еще в 90-е годы прошлого века было замечено, что у процесса ускорения ОФ через Ca^{2+} есть ограничение. Увеличение синтеза АТФ, которому соответствует повышенный выход H^+ , приво-

дит к ощелачиванию митохондриального матрикса [87]. В свою очередь, активация mPTP также вызывает торможение дыхания [88], что способствует, наоборот, уже подкислению матрикса, которое инактивирует mPTP. При этом электронейтральный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортер NCLX, который работает в обоих направлениях в зависимости от величины $\Delta\Psi_m$ и концентрации ионов натрия в цитозоле, будет функционировать циклически в унисон с вышеперечисленными механизмами. Эта цикличность наблюдается и в отношении фосфатов кальция. Так, при поглощении Ca^{2+} митохондриями, когда снижается $\Delta\Psi_m$, одновременно в матрикс переносится H_3PO_4 за счет энергии разности pH по обе стороны мембраны митохондрий (ΔpH). В результате образуются различные фосфаты кальция, растворимость которых зависит от циклически изменяющегося pH матрикса [70].

МОДЕЛИ СПОНТАННЫХ КОЛЕБАНИЙ В МИТОХОНДРИЯХ

Впервые математическую модель с экспериментальным обоснованием представил В.А. Селиванов с соавторами [89]. В ней имеются два противоположно направленных потока Ca^{2+} . Поток, направленный внутрь митохондрий, осуществляется через VDAC-каналы на внешней мембране и далее через унипортер MCU на внутренней мембране. Обратный поток идет постоянно через NCLX, а также в результате периодической «работы» mPTP. Оба канала выводят кальций через внутреннюю и внешнюю мембраны митохондрий. Модель учитывала зависимость потока Ca^{2+} через MCU от митохондриального «дыхания» и пассивных потоков H^+ , скорости потребления кислорода, перемещения слабых кислот через митохондриальную мембрану и $\Delta\Psi_m$. В рамках этой модели были экспериментально установлены два ключевых фактора обратной связи, обеспечивающих VLF-колебательный процесс: зависимость открытия и закрытия mPTP от pH матрикса и относительное замедление интенсивности дыхания, следующее за открытием mPTP. Авторы считали, что механизм, лежащий в основе организации цитозольных Ca^{2+} -сигналов, является автокаталитическим. Он реализуется через Ca^{2+} -активируемые каналы эндоплазматического ретикула и имеющие с ним контакт митохондрии, которые поглощают часть Ca^{2+} . Приток Ca^{2+} в митохондрии выполняет сигнальную роль, повышая активность «дыхательных» ферментов и синтез АТФ. Противоположный притоку процесс митохондриального выхода Ca^{2+} также «подчиняется правилам автокаталитики», и зависит от временного открытия mPTP [89].

В последующих моделях митохондрии рассматриваются как организованная сеть осцилляторов, где АФК действуют как синхронизаторы энергетического статуса всей популяции митохондрий [90]. Альтернативные модели предполагают, что митохондриальные колебания обусловлены экстрамитохондриальными колебаниями рН и тесно связаны с колебаниями $\Delta\Psi_m$ (см. обзор [4]).

В одной из моделей в качестве генератора рассматривались IP3R эндоплазматического ретикула, поскольку эти рецепторы двухфазно регулируются ионами Ca^{2+} . Однако период колебаний в таком случае будет определяться инерционностью, то есть временем, затрачиваемым IP3R на восстановление после Ca^{2+} -индуцированного ингибирования [91]. По экспериментальным оценкам эта инерционность составляет меньше 10 с [92]. Не обнаружив достаточных доказательств того, что генерация колебаний обусловлена свойствами IP3R, и других претендентов на роль генератора, ряд исследователей стал склоняться к стохастической природе спонтанной VLF-динамики кальция [91].

Были предложены физиологическая и патологическая модели митохондриальных осцилляторов на примере кардиомиоцитов [61]. Физиологическая область характеризуется малоамплитудными спонтанными и постоянными колебаниями $\Delta\Psi_m$. Определяющую роль в этих колебаниях играют MCU и NCLX, а не mPTP. При этом отмечается коллективное поведение митохондриальной сети, которое представляет собой статистически фрактальный процесс. При метаболическом стрессе, когда нарушается баланс между образованием и удалением АФК, митохондриальная сеть по всей клетке переходит на один низкочастотный высокоамплитудный колебательный режим. Метаболический стресс подталкивает систему к точке бифуркации с выходом в состояние вынужденных колебаний, что, как предполагают авторы, связано с механизмами развития аритмий.

В математической модели, отражающей аккумуляцию и высвобождение кальция митохондриями, колебания концентрации кальция носят «квазипериодический» характер [78]. Модель разрабатывалась в парадигме, что митохондрии служат буфером для гомеостатирования кальция. Расчеты показали, что при значительном увеличении $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле и высокой частоте внешнего раздражения основным буфером «гомеостатирования» Ca^{2+} в цитозоле выступают митохондрии, а при небольшом увеличении концентрации кальция в цитозоле или низкой частоте раздражения — эндоплазматический ретикулум.

В одной из последних моделей представлен циклический механизм митохондриального осциллятора, состоящий из четырех этапов [93]. Сначала происходит увеличение притока Ca^{2+} (этап 1). Это увеличивает выработку АФК в матриксе (этап 2). Высокий уровень $[\text{Ca}^{2+}]_m$ и АФК активируют (временно открывают) mPTP с низкой проводимостью (этап 3). Из-за перераспределения ионов митохондрии подвергаются кратковременной деполяризации (мерцание $\Delta\Psi_m$), что способствует дополнительной генерации АФК (этап 4), которые сенсibiliзируют IP3R к высвобождению Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула, что приводит к поглощению Ca^{2+} митохондриями через MCU и VDAC-каналы и генерации следующего пика $[\text{Ca}^{2+}]_m$ (этап 1). В модели отсутствует роль канала NCLX, имеющего в норме гораздо более высокую экспортную способность Ca^{2+} , однако сохранена циклическая роль Ca^{2+} в отношении ОФ, что является принципиальным для любой осцилляторной модели энергизации митохондрий.

ГЕНЕРАТОР VLF-КОЛЕБАНИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИТОХОНДРИЙ

Циклические модели осцилляторных процессов в митохондриях в той или иной степени приближаются к вопросу о «первичном» генераторе. В этом плане было предложено несколько гипотез для объяснения колебаний в энергетическом метаболизме митохондрий [4]. Первоначально было высказано предположение, что митохондриальные колебания могут происходить от гликолитических колебаний. Однако позже стали отдавать предпочтение колебаниям Ca^{2+} , АФК и связанному с ними $\Delta\Psi_m$. Существует достаточно данных о двух противоположно направленных потоках Ca^{2+} , которые идут одновременно. При этом сначала доминирует накопление Ca^{2+} с повышением энергизации митохондрий, а потом доминирует освобождение митохондрий от Ca^{2+} на фоне торможения ОФ. Таким образом, ситуация меняется маятникообразно в зависимости от ряда взаимосвязанных параметров: $\Delta\Psi_m$, ΔpH , [АФК], АТФ/АДФ, [НАДН⁺]. Какой из этих параметров является определяющим, выступающим в роли «первоначального генератора», остается неизвестным.

В нашей гипотезе генератором VLF-колебаний функциональных показателей в возбудимых клетках является $\Delta\Psi_m$ и связанная с ней ΔpH . Выбор основан на том, что их изменения, в отличие от параметров концентрации, могут распространяться мгновенно по всей митохондриальной сети, а также потому что напрямую определяют скорость образования АТФ. Эти же

показатели энергизации будут определять уровень Ca^{2+} , который, в свою очередь, тесно связан с другими динамическими параметрами ОФ, включая АФК и рН.

Энергизация митохондрий, обозначенная Митчеллом как $\Delta\mu$, определяется формулой

$$\Delta\mu = \Delta\Psi_m - \Delta\mu_{\text{pH}},$$

где $\Delta\Psi_m$ — разность электрических потенциалов, а $\Delta\mu_{\text{pH}}$ — разность рН по обе стороны мембраны [70].

Теоретически механизм генерации колебаний на основе обратной связи можно представить следующим образом (рис. 1). В возбудимых клетках поступление Ca^{2+} в митохондрии в первую фазу превышает его отток и приводит к активации всех ключевых процессов ОФ (рис. 1). Активируются кальций-зависимые белки, в частности АТФ/АДФ-антипортер и пируват-дегидрогеназный комплекс. По мере входа Ca^{2+} в митохондрии за счет разности потенциалов $\Delta\Psi_m$ накопление и секвестрация кальция сопровождаются снижением $\Delta\Psi_m$ и увеличением $\Delta\mu_{\text{pH}}$, что приводит к увеличению уровня АФК. Сначала снижение $\Delta\Psi_m$ ингибирует отток Ca^{2+} через NCLX [79], который аллостерически регулируется $\Delta\Psi_m$ [94]. Такой режим регуляции способствует накоплению и секвестрации Ca^{2+} .

Дальнейшее снижение энергизации митохондрий, вызванное входом Ca^{2+} в митохондрии, приводит к накоплению АФК и торможению ОФ. Момент между активацией и торможением ОФ означает начало второй фазы, которая характеризуется реактивацией NCLX и усилением оттока Ca^{2+} . Синхронно открываются короткоживущие липидные поры (РА-mPT) и/или временно открывается канал mPTP. В результате отток Ca^{2+} из матрикса превышает его поступление. Общее содержание Ca^{2+} уменьшается, соответственно, разгружается фосфатный буфер. При этом происходит восстановление $\Delta\Psi_m$. Постепенное повышение $\Delta\Psi_m$ в конце второй фазы приведет к закрытию пор РА-mPT, закрытию канала mPTP и торможению выхода Ca^{2+} через NCLX [73]. Это будет означать возвращение в состояние первой фазы. Теперь условия снова будут способствовать активирующему действию Ca^{2+} на цепь переноса электронов.

Продолжительность цикла (первой-второй фаз) в рамках данной гипотезы митохондриальных VLF-колебаний может быть обусловлена емкостью фосфатного буфера. Обе фазы теоретически согласуются с процессом «насыщения» и «освобождения» фосфатного буфера с возможностью перехода кальция из активного состояния (Ca^{2+}) в нейтральное состояние фосфатов [70] и наоборот в зависимости от рН матрикса. Инерци-

онность циклического процесса (время полного цикла) в VLF-диапазоне неоднократно продемонстрирована в различных экспериментальных исследованиях. При этом все основные функциональные показатели осциллируют синхронно [82].

МЕХАНИЗМЫ СИНХРОНИЗАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ VLF-КОЛЕБАНИЙ

Митохондриальные сети. Принято считать, что митохондрии способны существовать как дискретные структуры, а также образовывать сложные сети в зависимости от типа ткани [82]. Считается, что в большинстве клеток митохондрии образуют разветвленные сети канальцев. Эти трубчатые сети подвергаются постоянной перестройке как по структуре, так и по положению. Митохондриальные сети обеспечивают множество сложных форм поведения, включая скоординированные колебания энергетических состояний в масштабах всей клетки, а также фазовый переход (деполяризацию) в ответ на окислительный стресс [95]. Существует мнение, что митохондрии вместе с ядром и другими органеллами составляют митохондриальную систему обработки информации (MIPS) [96].

Взаимосвязь митохондрий проявляется, в частности, в том, что фокальное возбуждение небольшой части митохондриальной сети взрослого кардиомиоцита может вызывать автономные VLF-колебания $\Delta\Psi_m$ и окислительно-восстановительного потенциала митохондрий во всей клетке [97]. С этим согласуется тот факт, что Ca^{2+} -осцилляции в одной клетке «вызывают» подобные осцилляции в соседних клетках, причем с той же частотой, что и в клетке, инициировавшей этот процесс [98]. Кальциевая волна распространяется со скоростью 100 мкм/с. В распространении Ca^{2+} -волны участвуют межклеточные контакты — щелевидные соединения. Они обладают высокой ионной проводимостью, поэтому превращают цитоплазму контактирующих клеток в единое пространство, благодаря чему достигается ионное, электрическое и гуморальное сопряжение [98].

Общим между спонтанными и вызванными колебаниями является периодичность в пределах VLF диапазона и перечень флюктуирующих показателей — Ca^{2+} , АФК, $\Delta\Psi_m$, НАДН [99]. На этом основании был сделан вывод о том, что «физико-химически связанные митохондрии проявляют самоорганизованную динамическую связь, ведущую к синхронизированным колебаниям». Таким образом, в возбудимых тканях митохондрии функционируют как организованная сеть осцилляторов [100].

Синхронизирующий механизм, в частности, был продемонстрирован в виде скоординированной деполяризации мембранного потенциала по всей клетке скелетных мышц [101]. При этом было показано, что мембранная проводимость в митохондриях является доминирующим путем распределения энергии в скелетных мышцах. Это объясняет согласованное сокращение огромных, в сравнении с отдельным миоцитом, масс мышечных тканей при физических нагрузках. Можно предположить, что функциональный смысл объединения митохондрий в единую энергетическую сеть заключается в адекватном перераспределении синтеза АТФ путем поддержания $\Delta\Psi$ и Δp (энергизации митохондрий) на одном уровне. В этом случае VLF-колебания будут синхронизированы на уровне митохондриальных сетей возбудимых тканей.

Синхронизация VLF-колебаний на уровне организма. При рассмотрении феномена VLF-колебаний различных функциональных показателей обращает внимание тот факт, что все они напрямую или косвенно связаны с энергетическим метаболизмом. На уровне всего организма речь может идти о VLF-колебаниях теплового потока, сердечного ритма, синхронизированного с VLF-колебаниями показателей легочного газообмена и вентиляции. На тканевом уровне — это VLF-колебания локального кровотока и показателей эндотелиальной функции кровеносных сосудов (подробно изложено в разделах «VLF-осцилляции внешнего дыхания и сердечного ритма» и «VLF-колебания теплопродукции и кровотока»).

Если предположить, что источником всех подобного рода VLF-колебаний служат колебания энергизации митохондриальных сетей, то возникает вопрос о структурной основе подобного функционального объединения. Для этого может служить система нанотрубчатых межклеточных соединений или система туннельных нанотрубок (TNT). Они представляют собой открытые мембранные каналы между клетками, обеспечивающие непрерывность мембраны между соединенными клетками. Диаметр структур составляет 50–200 нм, длина — до 1 мм. Они обеспечивают различные типы межклеточной коммуникации: от обмена различными сигнальными переносчиками и органеллами до передачи электрических сигналов на большие расстояния [102].

Открытие TNT положило начало концепции суперклеточности (super-cellularity). Такое взаимодействие позволяет быстро сбалансировать метаболические потребности, питательные вещества, нуклеиновые кислоты, а также факторы стресса и органеллы за счет обмена на большие расстояния между клетками, которые не находятся в непосредственном контакте. Несмотря на выявленную возможность TNT обеспечивать вза-

имодействие между клетками, пока считается, что TNT редко встречаются во взрослом организме [103].

Наряду с этим существует гипотеза о том, что митохондрии внутри TNT обеспечивают дальний обмен энергией и сигналами между клетками [14]. На культурах клеток экспериментально установлено, что межклеточные электрические сигналы передаются по TNT с высокой скоростью (примерно 1–2 м/с) [104]. Было также показано, что TNT, содержащие митохондрии, обнаружены между макрофагами печени, кардиомиоцитами и кардиофибробластами [105]. Имеются данные о присутствии TNT между типами клеток различного происхождения *in vitro*, а именно эпителиальными, эндотелиальными, мезенхимальными, нейрональными, мышечными и иммунными [106].

Фундаментальное свойство митохондрий заключается в создании сильных электрических полей со слабо меняющейся напряженностью, зависящей от непрерывных спонтанных вариаций $\Delta\Psi$. Это постоянные спонтанные «флуктуации митохондриального потенциала» или «митохондриальные мерцания» в VLF-диапазоне соответствуют нормальному функционированию митохондрий и «отражают чередование активного и неактивного состояний окислительного фосфорилирования» [107, 108]. По мнению автора работы [14], внутри TNT функционируют митохондриальные сети, которые объединяют отдельные органы и даже организм в целом. Связь осуществляется путем электрической передачи зарядов (как электрический кабель) и/или путем передачи электромагнитного излучения (как оптоволоконный кабель). Таким образом, в организме, возможно, имеется структурная основа для синхронизации митохондриальных колебаний в VLF-диапазоне на уровне всего организма посредством нанотрубчатых межклеточных соединений, содержащих межсистемные митохондриальные сети.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

VLF-биоритмы различных показателей системы транспорта кислорода и энергетического метаболизма проявляются у млекопитающих на всех уровнях организма. Мы полагаем, что наиболее вероятным источником VLF-колебаний с периодом от 0.003–0.040 Гц являются колебания параметров «энергизации» в митохондриях, объединенных в митохондриальные сети. Анализ литературы относительно феномена VLF-колебаний указывает на его универсальность и позволяет представить процесс генерации этих колебаний, протекающий в митохондриях в две фазы. В первую фазу вход Ca^{2+} в митохондрии превышает выход и соответствует усилению активности ОФ.

Во вторую фазу выход Ca^{2+} превалирует над входом и сопровождается торможением ОФ. Можно предполагать несколько контуров обратной связи. Например, контур авторегуляции мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) и контур концентрации активных форм кислорода. В рамках представленной гипотезы инерционность процессов полного цикла (первой и второй фаз) обусловлена емкостью фосфатного буфера митохондриальных сетей. Структурной основой для синхронизации митохондриальных колебаний в VLF-диапазоне на уровне всего организма являются митохондриальные сети и нанотрубчатые межклеточные соединения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках базового проекта фундаментальных исследований РАН IV 35.2.6 (№ АААА-А21-121011990040-8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Treacher D. F. and Leach R. M., Oxygen transport-1. Basic principles. *BMJ*, **317** (7168), 1302–1306 (1998). DOI: 10.1136/bmj.317.7168.1302
2. Бреслав И. С. и Ноздрачев А. Д., Регуляция дыхания: висцеральная и поведенческая составляющие. *Успехи физиол. наук*, **38** (2), 26–45 (2007).
3. *Стандарты ОС и Э. Вариабельность сердечного ритма* (1999).
4. Iotti S., Borsari M., and Bendahan D., Oscillations in energy metabolism, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797** (8), 1353–1361 (2010). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.02.019
5. Серов Д. А., Танканаг А. В. и Асташев М. Е., Синхронизация низкочастотных колебаний $[\text{Ca}^{2+}]$ в культивируемых эндотелиоцитах мыши, в сб. статей Междунар. конф. «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (2021), сс. 250–258.
6. Гришин В. Г., Гришин О. В., Гулятьева В. В., Зинченко М. И. и Урюмцев Д. Ю., Низкочастотные колебания показателей системы транспорта кислорода у человека в покое. *Российский физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **105** (9), 1154–1162 (2019).
7. Гришин О. В., Гришин В. Г. и Коваленко Ю. В., Вариабельность легочного газообмена и дыхательного ритма. *Физиология человека*, **38** (2), 87–93 (2012).
8. Сагулова З. Ш., Тлеулова М. Б. и Ташенов К. Т., Особенности изменения биоритмов температуры тела крыс в онтогенезе. *Сер. биологическая и медицинская*, № 2, 109–112 (2014).
9. Sel'kov E. E., Stabilization of Energy Charge, Generation of Oscillations and Multiple Steady States in Energy Metabolism as a Result of Purely Stoichiometric Regulation. *Eur. J. Biochem.*, **59**, 151–157 (1975).
10. Chance B. and Yoshioka T., Sustained oscillations of ionic constituents of mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 451–465 (1966).
11. Saks V. A., Kaambre T., Sikk P., Eimre M., Orlova E., Paju K., Piirsoo A., Appaix F., Kay L., Regitz-Zagrosek V., Fleck E., and Seppet E., Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem. J.*, **356**, 643–657 (2001).
12. Skulachev V. P., Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.*, **26** (1), 23–29 (2001). DOI: 10.1016/s0968-0004(00)01735-7
13. Aon M. A., Cortassa S., and O'Rourke B., The fundamental organization of cardiac mitochondria as a network of coupled oscillators. *Biophys J.*, **91** (11), 4317–4327 (2006). DOI: 10.1529/biophysj.106.087817
14. Scholkmann F., Long range physical cell-to-cell signaling via mitochondria inside membrane nano tubes: a hypothesis. *Theor. Biol. Med. Model.*, **13** (1), 16 (2016). DOI: 10.1186/s12976-016-0042-5
15. Huikuri H. V., Perkiömäki J. S., Maestri R., and Pinna G. D. P., Clinical impact of evaluation of cardiovascular control by novel methods of heart rate dynamics. *Philos. Trans. Roy. Soc. A.P. Math., Phys. Eng. Sci.*, **367**, 1223–1238 (2009).
16. Voss A., Schulz S., Schroeder R., Baumert M., and Caminal P. P., Methods derived from nonlinear dynamics for analysing heart rate variability. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, **367**, 277–296 (2009).
17. Aletti F., Bassani T., Lucini D., Pagani M., and Baselli G. P., Multivariate decomposition of arterial blood pressure variability for the assessment of arterial control of circulation. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **56**, 1781–1790 (2009).
18. Migeotte P. F. and Verbandt Y. P., A novel algorithm for the heart rate variability analysis of short-term recordings: polar representation of respiratory sinus arrhythmia. *Comput. Biomed. Res.*, **32**, 56–66 (1999).
19. Colombo J., Shoemaker W. C., Belzberg H., Hatzakis G., Fathizadeh P., and Demetriades D. P., Noninvasive monitoring of the autonomic nervous system and hemodynamics of patients with blunt and penetrating trauma. *J. Trauma*, **65**, 1364–1373 (2008).
20. Nozawa M., Yana K., Kaeriyama K., Mizuta H., and Ono T. P., Spontaneous variability analysis for characterizing cardiovascular responses to water ingestion. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, **2009**, 1816–1819 (2009).
21. Javed F., Middleton P. M., Malouf P., Chan G. S. H., Savkin A. V., Lovell N. H., Steel E., and Mackie J. P., Frequency spectrum analysis of finger photoplethys-

- mographic waveform variability during haemodialysis. *Physiol. Meas.*, **31**, 1203–1216 (2010).
22. Jurysta F., Lanquart J.-P., Sputaels V., Dumont M., Migeotte P.-F., Leistedt S., Linkowski P., and van de Borne P. P., The impact of chronic primary insomnia on the heart rate-EEG variability link. *Clin. Neurophysiol.*, **120**, 1054–1060 (2009).
 23. Mendonca G. V., Fernhall B., Heffernan K. S., and Pereira F. D. P., Spectral methods of heart rate variability analysis during dynamic exercise. *Clin. Auton. Res.*, **19**, 237–245 (2009).
 24. Liu C., Liu C., Li L., Zhang Q., and Li B. P., Systolic and Diastolic Time Interval Variability Analysis and Their Relations with Heart Rate Variability. In: *3rd Int. Conf. on Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE, 2009)*, 1–4.
 25. Valencia J. F., Vallverdú M., Schroeder R., Voss A., Vázquez R., Bayés de Luna A., and Caminal P. P., Complexity of the short-term heart-rate variability. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, **28**, 72–78 (2009).
 26. Sadiq I. and Khan S. A. P. Fuzzification of the Analysis of Heart Rate Variability Using ECG in Time, Frequency and Statistical Domains. In: *Int. Conf. on Computer Engineering and Applications* (Los Alamitos, CA, USA. IEEE Computer Society, 2010), V. 1, P. 481–485.
 27. Laguna P., Moody G. B., and Mark R. G. P. Power spectral density of unevenly sampled data by least-square analysis. P. performance and application to heart rate signals. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **45**, 698–715 (1998).
 28. Muthuraman M., Galka A., Deuschl G., Heute U., and Raethjen J. P. Dynamical correlation of non-stationary signals in time domain – A comparative study. *Biomed. Signal Processing and Control*, **5**, 205–213 (2010).
 29. Mitra P. P. and Pesaran B. P. Analysis of Dynamic Brain Imaging Data. *Biophys. J.*, **76**, 691–708 (1999).
 30. Martinmaki K., Rusko H., Saalasti S., and Kettunen J. P. Ability of short-time Fourier transform method to detect transient changes in vagal effects on hearts. P. a pharmacological blocking study. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H2582–2589 (2006).
 31. Shafqat K., Pal S. K., Kumari S., and Kyriacou P. A. P. Time-frequency analysis of HRV data from locally anesthetized patients. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, **2009**, 1824–1827 (2009).
 32. Ivanov P. C., Rosenblum M. G., Peng C. K., Mietus J., Havlin S., Stanley H. E., and Goldberger A. L. P. Scaling behaviour of heartbeat intervals obtained by wavelet-based time-series analysis. *Nature*, **383**, 323–327 (1996).
 33. Torrence C. and Compo G. P. A practical guide to wavelet analysis. *Bull. Am. Meteorolog. Soc.*, **79**, 61–78 (1998).
 34. Fernández J. R., Hermida R. C., and Mojón A. P. Chronobiological analysis techniques. Application to blood pressure. *Philos. Transact. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, **367**, 431–445 (2009).
 35. Goya-Esteban R., Mora-Jiménez I., Rojo-Álvarez J. L., Barquero-Pérez O., Pastor-Pérez F., Manzano-Martínez S., Pascual-Figal D., and García-Alberola A. P. Heart Rate Variability on 7-Day Holter Monitoring Using a Bootstrap Rhythmometric Procedure. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **57**, 1366–1376 (2010).
 36. Митиш М. Д., Сюткина Е. В., Яцык Г. В. и Брызгунов И. П. Мониторирование артериального давления у детей с психосоматической патологией (сообщение II. Ритмометрический анализ 48-часовых профилей показателей артериального давления). *Вопр. соврем. педиатрии*, **3** (5), 36–41 (2004).
 37. Липатов И. С. Оценка церебральной гемодинамики плода при плацентарной недостаточности с учетом его суточного биоритмостаза. *Рос. вестн. акушера-гинеколога*, **15** (4), 42–48 (2015). DOI: 10.17116/rosakush201515442-48
 38. Rangayyan R. M. and Wu Y. P. Analysis of vibroarthrographic signals with features related to signal variability and radialbasis functions. *Ann. Biomed. Eng.*, **37**, 156–163 (2009).
 39. Wu Y. and Krishnan S. Computer-aided analysis of gait rhythm fluctuations in amyotrophic lateral sclerosis. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **47**, 1165–1171 (2009).
 40. Agarwal R., Gotman J., Flanagan D., and Rosenblatt B. P. Automatic EEG analysis during long-term monitoring in the ICU. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **107**, 44–58 (1998).
 41. Ruffo M., Cesarelli M., Romano M., Bifulco P., and Fratini A. P. An algorithm for FHR estimation from foetal phonocardiographic signals. *Biomedical Signal Processing and Control*, **5**, 131–141 (2010).
 42. Gamero L. G., Vila J., and Palacios F., Wavelet transform analysis of heart rate variability during myocardial ischaemia. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **40**, 72–78 (2002).
 43. Gang Y. and Malik M. P. Heart Rate Variability. Measurements and Risk Stratification. In: *Electrical Diseases of the Heart* (2008), pp. 365–378. DOI: 10.1007/978-1-84628-854-8_25
 44. Patangay A., Zhang Y., and Lewicke A. P. Measures of cardiac contractility variability during ischemia. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, 2009, 4198–4201 (2009).
 45. Goodman L. Oscillatory Behavior of Ventilation in Resting Man. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* (Volume: BME-11, Issue 3, 1964), pp. 1–12.
 46. Hlastala P., Wranne B., and Lenfant C. J. Cyclical variations in FRC and other respiratory variables in resting man. *J. Appl. Physiol.*, **34** (5), 670–676 (1973).
 47. Modarreszadeh M. *Systems analysis of breath-to-breath ventilatory variations in man: role of co2 feedback* (diss. DDP, Case Western Reserve University, 1991), p. 194.
 48. Van den Aardweg J. G. and Karemaker J. M. Influence of chemoreflexes on respiratory variability in healthy subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **165** (8), 1041–1047 (2002).
 49. Yamashiro S. M., Kato T., and Matsumoto T. Altered chemosensitivity to CO₂ during exercise. *Physiol. Rep.* **9** (11), e14882 (2021). DOI: 10.14814/phy2.14882

50. Гришин В. Г., Гришин О. В., Никульцев В. С., Гуляева В. В., Зинченко М. И. и Урюмцев Д. Ю. Частотно-временной анализ колебаний показателя внешнего дыхания и сердечного ритма человека при физической нагрузке. *Биофизика*, **67** (4), 755–762 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922040147
51. Ramirez J. M. and Baertsch N. A. The Dynamic Basis of Respiratory Rhythm Generation: One Breath at a Time. *Annu. Rev. Neurosci.*, **41**, 475–499 (2018). DOI: 10.1146/annurev-neuro-080317-061756
52. Iberall A. S. Human body as an inconstant heat source and its relations to clothes insulation. Part 2 – Experimental Investigation Into Dynamics of the Source. *J. Fluids Eng.*, **82** (1), 96–102 (1960). DOI: 10.1115/1.3662562 (P1), DOI: 10.1115/1.3662494 (P2)
53. Сагайдачный А. А. Методы тепловизионного анализа пространственно-временной динамики температуры тела человека и их использование в диагностике. Автореферат дисс. ... канд. физ.-мат. наук (Саратовский гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 2010).
54. Papaioanno V. E., Chouvarda I. G., Maglaveras N. K., and Pneumatikos I. A. Temperature variability analysis using wavelets and multiscale entropy in patients with systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit. Care*, **16**, R51, (2012). <http://ccforum.com/content/16/2/R51>
55. Tikhonova I. V., Tankanag A. V., and Chemeris N. K. Time-amplitude analysis of skin blood flow oscillations during the post-occlusive reactive hyperemia in human. *Microvasc. Res.*, **80** (1), 58–64 (2010). DOI: 10.1016/j.mvr.2010.03.010
56. Kvandal P., Landsverk S. A., Bernjak A., Stefanovska A., Kvernmo H. D., and Kirkeboen K. A. Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvasc. Res.*, **72** (3), 120–127 (2006). DOI: 10.1016/j.mvr.2006.05.006
57. Kvernmo H. D., Stefanovska A., Kirkeboen K. A., and Kvernebo K. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. *Microvasc. Res.*, **57** (3), 298–309 (1999). DOI: 10.1006/mvre.1998.2139
58. Yano T., Lian C. S., Arimitsu T., Yamanaka R., Afroundeh R., Shirakawa K., and Yunoki T. Oscillation of oxygenation in skeletal muscle at rest and in light exercise. *Acta Physiol. Hung.*, **100** (3), 312–320 (2013). DOI: 10.1556/APhysiol.100.2013.007
59. Yano T., Lian C. S., Afroundeh R., Shirakawa K., and Yunoki T. Comparison of oscillations of skin blood flow and deoxygenation in vastus lateralis in light exercise. *Biol. Sport.*, **31** (1), 15–20 (2014). DOI: 10.5604/20831862.1083274
60. Söderström T., Stefanovska A., Veber M., and Svensson H. Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284** (5), H1638–H1646 (2003). DOI: 10.1152/ajpheart.00826.2000
61. Aon M. A., Cortassa S., and O'Rourke B. Mitochondrial oscillations in physiology and pathophysiology. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **641**, 98–117 (2008). DOI: 10.1007/978-0-387-09794-7_8
62. Woods N. M., Cuthbertson K. S. R., and Cobbold P. H. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature*, **319**, 600–602 (1986).
63. Jacob R. Calcium oscillations in endothelial cells. *Cell Calcium*, **12** (2–3), 127–134 (1991). DOI: 10.1016/0143-4160(91)90014-6
64. Prentki M., Glennon M., Thomas A. P., Morris R. L., Matschinsky F. M., and Corkey B. E. Cell-specific patterns of oscillating free Ca^{2+} in carbamylcholine-stimulated insulinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **263** (23), 11044–11047 (1988).
65. Rooney T. A., Sass E. J., and Thomas A. P. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **264** (29), 17131–17141 (1989).
66. Cornell-Bell A. H., Finkbeiner S. M., Cooper M. S., and Smith S. J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, **247** (4941), 470–473 (1990). DOI: 10.1126/science.1967852
67. Berridge M. J. Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.*, **265** (17), 9583–9586 (1990). [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)38704-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)38704-6/pdf)
68. Jacob R., Merritt J. E., Hallam T. J., and Rink T. J. Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells. *Nature*, **335** (6185), 40–45 (1988). DOI: 10.1038/335040a0
69. Romashko D. N., Marban E., and O'Rourke B. Subcellular metabolic transients and mitochondrial redox waves in heart cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** (4), 1618–1623 (1998). DOI: 10.1073/pnas.95.4.1618
70. Панов А. В. и Жолобак Н. М. *Функциональная биоэнергетика и механизмы старения организма человека*, под ред. С. И. Колесникова (ГЭОТАР-Медиа, М., 2023). DOI: 10.33029/9704-7524-9-БИО-2023-1-3722020
71. Yokota Y., Nakajima H., Wakayama Y., Muto A., Kawakami K., Fukuhara S., Mochizuki N. Endothelial Ca^{2+} oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity *in vivo*. *Elife*, **4**, e08817 (2015). DOI: 10.7554/eLife.08817
72. Серов Д. А. *Осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{NO}]_i$ в эндотелиоцитах как источник низкочастотных колебаний кожной микроциркуляции*. Автореферат дисс. ... канд. биол. наук (ИБК РАН, Пушкино, 2022).
73. Feissner R. F., Skalska J., Gaum W. E., and Sheu Sh.-Sh. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. *Front. Biosci.*, **14**, 1197–1218 (2009). DOI: 10.2741/3303
74. Glancy B., Willis W. T., Chess D. J., and Balaban R. S., Effect of Calcium on the Oxidative Phosphorylation Cascade in Skeletal Muscle Mitochondria. *Biochemistry*, **52**, 16, 2793–2809 (2013). DOI: 10.1021/bi3015983

75. Yan Y., Wei C. L., Zhang W. R., Cheng H. P., and Liu J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin.*, **27** (7), 821–826 (2006).
76. Lu X., Ginsburg K. S., Kettlewell S., Bossuyt J., Smith G. L., and Bers D. M. Measuring local gradients of intramitochondrial $[Ca^{2+}]$ in cardiac myocytes during sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release. *Circ. Res.*, **112**, 424–431 (2013). DOI: 10.1161/CIRCRESA-HA.111.300501
77. Mironov S. L. and Richter D. W. Oscillations and hypoxic changes of mitochondrial variables in neurons of the brainstem respiratory centre of mice. *J. Physiol.*, **533** (Pt 1), 227–236 (2001). DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.0227b.x
78. Зацепин Е. Н. и Дробот С. В. Модель метаболических механизмов аккумуляции кальция в митохондриях живой клетки, *Докл. БГУИР*, № 7 (117), 148–150 (2018).
79. Kostic M., Katoshevski T., and Sekler I., Allosteric regulation of NCLX by mitochondrial membrane potential links the metabolic state and Ca^{2+} signaling in mitochondria, *Cell Rep.*, **25**, 3465–3475, (2018). DOI: 10.1016/j.celrep.2018.11.084
80. Pfeiffer D. R., Gunter T. E., Eliseev R., Broekemeier K. M., and Gunter K. K. Release of Ca^{2+} from mitochondria via the saturable mechanisms and the permeability transition. *IUBMB Life*, **52** (3–5), 205–212 (2001).
81. Takeuchi A., Kim B., and Matsuoka S. The mitochondrial Na^{+} - Ca^{2+} exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes. *Sci. Rep.*, **3**, 2766 (2013). DOI: 10.1038/srep02766
82. Belosludtseva N. V., Pavlik L. L., Belosludtsev K. N., Saris N. L., Shigaeva M. I., and Mironova G. D. The Short-Term Opening of Cyclosporin A-Independent Palmitate/ Sr^{2+} -Induced Pore Can Underlie Ion Efflux in the Oscillatory Mode of Functioning of Rat Liver Mitochondria. *Membranes* (Basel), **12** (7), 667 (2022). DOI: 10.3390/membranes12070667
83. Zoratti M. and Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1241** (2), 139–176 (1995). DOI: 10.1016/0304-4157(95)00003-a
84. Weibel E. R. and Hoppeler H. Exercise-induced maximal metabolic rate scales with muscle aerobic capacity. *J. Exp. Biol.*, **208**, 1635–1644 (2005).
85. Magnus G. and Keizer J. Model of beta-cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. II. Mitochondrial variables. *Am. J. Physiol.*, **274** (4), C1174–C1184 (1998). DOI: 10.1152/ajpcell.1998.274.4.C1174
86. Perez-Campo R., Lopez-Torres M., Cadenas S., Rojas C., and Barja G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. (B)*, **168** (3), 149–158 (1998).
87. Gunter T. E., Gunter K. K., Sheu S. S., and Gavin C. E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.*, **267** (2, Pt 1), C313–C339 (1994). DOI: 10.1152/ajpcell.1994.267.2.C313
88. Evtodienko Y. V., Teplova V., Khawaja J., and Saris N. E. The $Ca(2+)$ -induced permeability transition pore is involved in $Ca(2+)$ -induced mitochondrial oscillations. A study on permeabilised Ehrlich ascites tumour cells. *Cell Calcium*, **15** (2), 143–152 (1994). DOI: 10.1016/0143-4160(94)90053-1
89. Selivanov V. A., Ichas F., Holmuhamedov E. L., Jouaville L. S., Evtodienko I. V., and Mazat J. P. A model of mitochondrial $Ca(2+)$ -induced Ca^{2+} release simulating the Ca^{2+} oscillations and spikes generated by mitochondria. *Biophys. Chem.*, **72** (1–2), 111–121 (1998). DOI: 10.1016/s0301-4622(98)00127-6
90. Cortassa S., Aon M. A., Winslow R. L., and O'Rourke B. A mitochondrial oscillator dependent on reactive oxygen species. *Biophys. J.*, **87** (3), 2060–2073 (2004). DOI: 10.1529/biophysj.104.041749
91. Dupont G., Combettes L., Bird G. S., and Putney J. W. Calcium oscillations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3** (3), a004226 (2011). DOI: 10.1101/cshperspect.a004226
92. Finch E. A., Turner T. J., and Goldin S. M. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science*, **252** (5004), 443–446 (1991). DOI: 10.1126/science.2017683
93. Patel A., Simkulet M., Maity S., Venkatesan M., Matzavinos A., Madesh M., and Alevriadou B. R. The mitochondrial Ca^{2+} uniporter channel synergizes with fluid shear stress to induce mitochondrial Ca^{2+} oscillations. *Sci. Rep.*, **12** (1), 21161 (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-25583-7
94. Katoshevski T., Ben-Kasus Nissim T., and Sekler I. Recent studies on NCLX in health and diseases. *Cell Calcium*, **94**, 102345 (2021). DOI: 10.1016/j.ceca.2020.102345
95. Zamponi N., Zamponi E., Cannas S. A., Billoni O. V., Helguera P. R., and Chialvo D. R. Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics. *Sci. Rep.*, **8** (1), 363 (2018). DOI: 10.1038/s41598-017-18351-5
96. Kurz F. T., Derungs T., Aon M. A., O'Rourke B., and Armoundas A. A. Mitochondrial networks in cardiac myocytes reveal dynamic coupling behavior. *Biophys. J.*, **108** (8), 1922–1933 (2015). DOI: 10.1016/j.bpj.2015.01.040
97. Aon M. A., Cortassa S., Marban E., and O'Rourke B. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **278** (45), 44735–44744 (2003).
98. Заводник И. Б. Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация, *Биомедицинская химия*, **62** (3), 311–317 (2016).
99. Kurz F. T., Derungs T., Aon M. A., O'Rourke B., and Armoundas A. A. Mitochondrial networks in cardiac myocytes reveal dynamic coupling behavior. *Biophys. J.*, **108** (8), 1922–1933 (2015). DOI: 10.1016/j.bpj.2015.01.040
100. Aon M. A., Cortassa S., and O'Rourke B. The fundamental organization of cardiac mitochondria as a net-

- work of coupled oscillators. *Biophys. J.*, **91**, 4317–4327 (2006).
101. Glancy B., Hartnell L. M., Malide D., Yu. Z. X., Combs C. A., and Connelly P. S. Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle. *Nature*, **523** (7562), 617–620 (2015). DOI: 10.1038/nature14614
 102. Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P., and Gerdes H. H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, **303**, 1007–1010 (2004).
 103. Zurzolo C. Tunneling nanotubes: Reshaping connectivity. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **71**, 139–147 (2021). DOI: 10.1016/j.ceb.2021.03.003
 104. Wang X., Veruki M. L., Bukoreshtliev N. V., Hartveit E., and Gerdes H.-H. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** (40), 17194–17199 (2010). DOI: 10.1073/pnas.1006785107
 105. Önfelt B., Nedvetzki S., Benninger R. K. P., Purbhoo M. A., Sowinski S., Hume A. N., Seabra M. C., Neil M. A. A., French P. M. W., and Davis D. M. Structurally distinct membrane nano-tubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J. Immunol.*, **177** (12), 8476–8483 (2006).
 106. Yamashita Y. M., Inaba M., and Buszczak M. Specialized intercellular communications via cytonemes and nanotubes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **34**, 59–84 (2018).
 107. Buckman J. F. and Reynolds I. J. Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in cultured neurons. *J. Neurosci.*, **21** (14), 5054–5065 (2001). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-14-05054.2001
 108. Vergun O., Votyakova T. V., and Reynolds I. J. Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in single isolated brain mitochondria. *Biophys. J.*, **85** (5), 3358–3366 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74755-9

Low-frequency Oscillations of Functional Indicators of the Body

O.V. Grishin*, ** and V.G. Grishin***

*Novosibirsk State Medical University, Krasny prosp. 52, Novosibirsk, 630091 Russia

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

***Federal Research Center for Information and Computational Technologies, prosp. Akademika Lavrentieva 6, Novosibirsk, 630090 Russia

A number of our studies have shown that low-frequency (LF) oscillations in the functional parameters of the oxygen transport system are stable and synchronized with one another. The literature presents a large number of examples of LF oscillations in various functional parameters that are directly or indirectly related to energy metabolism. In parallel, artificially induced damped and constant spontaneous oscillations related to energy produced by the mitochondria over a range of LF frequencies have been studied for more than 40 years. A parameter study is therefore needed to find the connection between the oscillation amplitudes and the physical characteristics both of the oxygen transport system and mitochondria that operate on common LF range (0.003–0.03 Hz). We believe the nature of all these oscillation amplitudes to be affected by the periodic dynamics of energy dissipation in mitochondria that form an interconnected network. The process of creating these oscillations occurs in two phases. In the 1st phase, the amount of Ca^{2+} entering the mitochondria exceeds the amount of Ca^{2+} released by mitochondria thereby promoting an increase in oxidative phosphorylation efficiency. In the 2nd phase, Ca^{2+} efflux from mitochondria prevails over Ca^{2+} influx and is accompanied by inhibition of oxidative phosphorylation. The oscillations remain stable and spontaneous and arise from an “autocatalytic” interaction based on feedback mechanisms. The inertia of the processes of a full cycle (1st and 2nd phases) that lasts 1–3 minutes may be due to the capacity of the phosphate buffer of mitochondria. The structural basis for synchronizing oscillations at the tissue level may be mitochondrial networks of excitable tissues. Synchronization at the organism level between mitochondrial oscillations and fluctuations in parameters associated with energy metabolism can be achieved through a system of tunnel nanotubes.

Keywords: LF oscillations, oxygen transport system, cellular respiration, mitochondria, calcium ions, mitochondrial membrane potential, oxidative phosphorylation, mitochondrial networks, mitochondrial oscillations

ОСОБЕННОСТИ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ МИОНЕВРАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧИ НА ФОНЕ КАПСАИЦИНА

© 2024 г. А.Е. Хайруллин*, **, #, М.А. Мухамедьяров*, Р.Д. Мухамедзянов*, Н.М. Каштанова*,
Е.Н. Животова*, Г.Г. Сучкова*, А.Р. Шайхутдинова*, А.А. Еремеев**, С.Н. Гришин*

*Казанский государственный медицинский университет, ул. Бутлерова, 49, Казань, 420012, Россия

**Казанский федеральный университет, Кремлевская ул., 18, Казань, 420008, Россия

#E-mail: khajrulli@ya.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 15.01.2024 г.

Принята к публикации 26.01.2024 г.

Исследована проблема мионевральной передачи в присутствии «интегратора боли и термочувствительности» — капсаицина. Проверено действие известных модуляторов синаптической передачи — пуринов (АТФ и аденозина) на фоне капсаицина. После выдерживания нервно-мышечного препарата лягушки в перфузирующем растворе, содержащем капсаицин, ингибиторные эффекты обоих пуринов оказались значительно снижены. Нивелирование капсаицином депрессорного действия аденозина связано с ингибированием непосредственно A_1 -сигнализации, так как агонист A_{2A} -рецепторов CGS21680 проявил выраженное, почти полностью скрытое в контроле, потенцирующее действие на фоне капсаицина. Мы предполагаем, что известное нейропротекторное действие капсаицина в первую очередь связано с устранением ингибирования эндогенными пуринами вызванного квантового выхода нейротрансммиттера.

Ключевые слова: капсаицин, АТФ, аденозин, нервно-мышечный синапс, калиевые каналы A -типа, вызванная квантовая секреция.

DOI: 10.31857/S0006302924010135, EDN: QZLTZG

Капсаицин (ванилиламид 8-метил-6-ноненовой кислоты) — алкалоид, содержащийся в различных видах стручкового перца *Capsicum*, тмина, чеснока и проч. [1]. Рецептор капсаицина (так называемый «ваниллоидный», TRPV1) представляет собой неселективный катионный канал, структурно родственный членам семейства ионных каналов TRP [2]. Он воспринимается звеном механизма, который регулирует сигнальные функции рецепторов при развитии воспалительных реакций, генерации боли, терморегуляции и прочих функций, в которые вовлечены TRPV1-рецепторы.

Ваниллоидные рецепторы рассматриваются как «интеграторы химических и физических составляющих болевых стимулов» [3], в том числе опосредованных пуриновой сигнализацией [4]. Что характерно, внутриклеточный АТФ увеличивает активность ионных каналов, активируемых капсаицином, путем взаимодействия с нуклеотид-связывающими доменами в ооцитах [5].

Отмечена полимодальность TRPV1-рецептора, приводящая к тому, что он способен реагировать не только на аппликацию отдельных агонистов, но и на их комбинации. В результате, как правило, возникает взаимная потенциация ответов, к примеру, при различных сочетаниях действия капсаицина, производных арахидоновой кислоты, рН, а также таких физических воздействий, как изменение температуры, мембранного потенциала или давления [1–3]. Интересно, что большинство перечисленных факторов (а именно производные арахидоновой кислоты, изменение температуры, мембранного потенциала и пр.) также определяют эффективность пуринергической сигнализации [6, 7]. Особо отметим, что именно за P2Y-рецепторами АТФ закреплен статус температурозависимых [8–10]. Но при этом и у TRPV1 повышение температуры смещает их потенциалозависимость в сторону деполяризации [11]. На этом фоне ничего неожиданного в том, что обнаружена ваниллоидная и P2-рецепторная конвергентная синаптическая активность в центральной нервной системе [12, 13].

Сокращение: ТКП — токи концевой пластинки.

В настоящее время в связи с широким внедрением в фармакологическую практику местных анальгезирующих средств на основе капсаицина повышенное внимание уделяется вскрытию механизмов его способности купировать боль, обеспечивая ослабление болевой сигнализации на периферии. В связи со всем этим мы провели представляемое вашему вниманию исследование перекрестных эффектов пуринов и капсаицина в мионевральных синапсах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка рабочего раствора капсаицина. Капсаицин принадлежит к фармакологической группе «Раздражающие средства природного происхождения» [14]. Для приготовления используемого в эксперименте рабочего раствора капсаицина мы проводили ряд процедур.

Вскрытие упаковки и взятие навески проводили в вентилируемом помещении в вытяжном шкафу. У совершающего вскрытие упаковки и взвешивание был надет респиратор. Осуществлялся непрерывный медицинский контроль. После завершения всех необходимых действий проводили стандартные реабилитационные процедуры, предусмотренные для лиц, имевших контакт с раздражающими средствами.

Методика электрофизиологического эксперимента. Эксперименты по регистрации токов концевой пластинки (ТКП) проводили *in vitro* на препарате *n. iohannis — m. sartorius Rana ridibunda*. Декапитацию осуществляли под эфирным наркозом. Сухожилие дистального конца мышцы брали на лигатуру, мышцу отсепаровывали до места вхождения в нее нерва. После вскрытия брюшной полости седалищный нерв брали на лигатуру у места вхождения в спинной мозг и выделяли до места вхождения в мышцу. Для предотвращения сокращений мышцы поперечно рассекли ее волокна.

Непрямое раздражение нерва проводили серебряными электродами в отдельной герметической увлажненной камере, изолированной от ванночки, в которую помещали мышечный препарат. Герметизацию отсека с нервом осуществляли тонкой пластиной, покрытой слоем вазелина. Электростимуляцию нерва для регистрации токов концевой пластинки осуществляли прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0.2–0.4 мс с частотой 0.03 Гц.

Вызванную квантовую секрецию оценивали по амплитудно-временным параметрам вызванных ТКП, которые отводились потенциальными и токовым микроэлектродами в области концевой пластинки мышечного волокна. Оценку результатов — накопления и усреднения ТКП — осуществляли с помощью персонального компьюте-

ра с периодом опроса 5–20 мкс на точку. Расчет параметров спада токов концевой пластинки проводили при помощи программного обеспечения Origin. Мышечный препарат перфузировали со скоростью 2 мл/мин раствором Рингера, в который апплицировали растворы АТФ, аденозина, CGS21680 и капсаицина (Sigma, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривали как значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Базовые эффекты пуринов. Вначале мы оценивали действие экзогенного аденозина на характеристики многоквантовых токов концевой пластинки. При фиксации потенциала на уровне -40 мВ средняя амплитуда многоквантовых токов концевой пластинки составила 137 ± 24 нА ($n = 28$). Спад токов описывался одной экспонентой с постоянной времени спада 1.42 ± 0.11 мс ($n = 28$). Добавление аденозина в микромолярных концентрациях вызывало снижение амплитуды токов концевой пластинки. При использовании аденозина в концентрации 100 мкМ снижение амплитуды токов происходило до $70.1 \pm 1.2\%$ ($n = 28$, $p < 0.001$) (рис. 1). Экзогенный аденозин не влиял существенно на время роста и постоянную времени спада токов. Эффект аденозина на амплитуду токов был обратим, после отмывания раствором Рингера амплитуда сигнала восстанавливалась до исходных величин ($n = 28$, $p > 0.05$).

После аппликации АТФ наблюдалось снижение амплитуды многоквантовых ТКП. Так, АТФ в концентрации 100 мкМ к 15-й минуте снижала амплитуду ТКП до $66.2 \pm 1.0\%$ ($n = 28$, $p < 0.001$) от контрольного значения (рис. 1).

Как для АТФ, так и для аденозина падение амплитуды было обратимым при отмывке физиологическим раствором.

Эффекты пуринов на фоне капсаицина. В следующих сериях экспериментов мы проверяли базовые эффекты пуринов на фоне эффективной концентрации капсаицина, которая составляет 10 нМ [15].

После получасового выдерживания нервно-мышечного препарата в перфузирующем растворе, содержащем капсаицин, амплитуда ТКП незначительно увеличивалась (до $104.9 \pm 3.5\%$, $n = 16$) (рис. 1). На этом фоне ингибиторные эф-

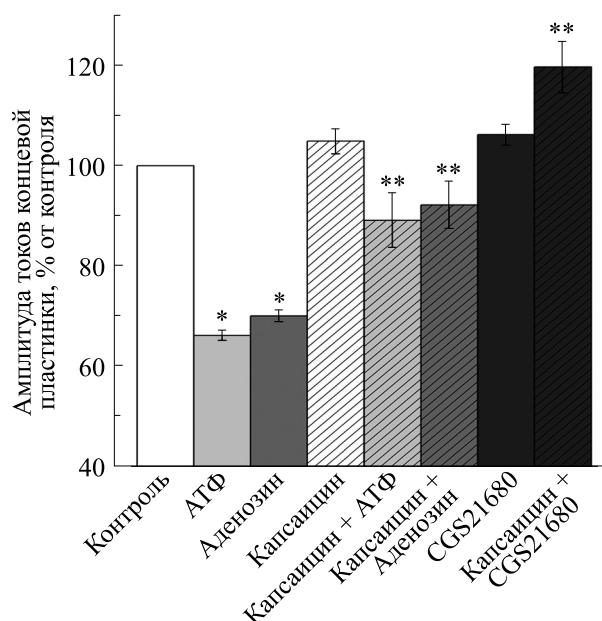


Рис. 1. Влияние капсаицина и агонистов пуриновых рецепторов на амплитуду многоквантовых токов концевой пластинки мионеврального препарата *m. sartorius* озерной лягушки. Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ** — $p < 0.05$ по сравнению с базовыми эффектами АТФ, аденозина или CGS21680.

фекты обоих пуринов оказались значительно снижены. Так, после 15 мин аппликации 100 мкМ АТФ в этих условиях наблюдалось снижение амплитуды ТКП только лишь до $89.1 \pm 5.4\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$).

Аденозин на фоне 10 нМ капсаицина снижал амплитуду ТКП до $92.2 \pm 4.7\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$) (рис. 1). В этих модифицированных условиях отмывка от пуринов полностью реализовывалась.

Эксперименты с CGS21680. Наконец, решая вопрос, через какие из двух задействованных в норме пресинаптических аденозиновых рецепторных путей (A_1 или A_2) [16] задействованы в наблюдаемом на фоне капсаицина снижении эффекта аденозина, мы провели анализ вещества, мобилизирующего активность рецепторов аденозина в присутствии капсаицина.

Для этого было изучено действие агониста одного из подтипов (A_{2A}) аденозиновых рецепторов CGS21680 (N6-замещенный аналог NECA) [17]. В отличие от аденозина, CGS21680 в концентрации 10 нМ не только не подавлял амплитуду ТКП, но даже вызывал ее небольшое повышение — до $106.9 \pm 2.1\%$ от контроля ($n = 5$) (рис. 1).

На пресинаптической мембране существуют A_1 - и A_2 -типы аденозиновых рецепторов, причем активация первых приводит к ингибированию

амплитуды ТКП, в то время как активация вторых — к противоположному эффекту [16]. Если отмеченное нами ранее нивелирование капсаицином депрессорного действия аденозина связано с ингибированием непосредственно A_1 -сигнализации, то эффект CGS21680 должен соответственно модифицироваться на фоне капсаицина.

Чтобы проверить это, в следующей серии экспериментов мы апплицировали 10 нМ CGS21680 в присутствии 10 нМ капсаицина. В этом случае под действием CGS21680 амплитуда ТКП увеличивалась уже до $119.7 \pm 5.2\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$) (рис. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Капсаицин является мощный модулятором клеточной активности и межклеточных взаимодействий [1]. Отмечено его разноплановое влияние на активность Ca^{2+} -каналов L-, N- и T-типа [18, 19]. Не участвует ли кальциевая компонента в обнаруженном модулировании базового эффекта аденозина на фоне капсаицина? Но это противоречило бы литературным данным, которые подчеркивают кальций-независимость синаптических эффектов этого пурина [7, 8].

Как известно, капсаицин — блокатор быстрых K^+ -каналов А-типа [20–22]. Так, было обнаружено обратимое дозозависимое ингибирование капсаицином тока через данный подтип калиевых ионных каналов в чувствительном ганглии тройничного нерва крыс [21]. А-тип калиевых каналов — это калиевые каналы, которые активируются деполяризацией, особенно после периода гиперполяризации, и затем быстро инактивируются, обычно в пределах 1–100 мс. Токи, соответствующие этому типу каналов, впервые были выделены авторами работы [23], которые назвали их А-токами. Калиевые А-каналы функционируют в различных нейронах, регулируя пачечную ритмическую активность, определяют задержку спайков и в некоторых случаях участвуют в реполяризации мембраны после потенциала действия. Ранее мы показали, что во многих тканях аденозиновые P_1 -рецепторы сопряжены с K^+ -каналами [7]. Более того, было найдено, что пресинаптическое действие аденозина на функциональное состояние скелетных мышц, складывающееся из активации аденозиновых A_1 -рецепторов, сопряженных с А-типом калиевых каналов, и A_{2A} -рецепторов, приводит к результирующему ингибиторному эффекту на амплитуду токов концевой пластинки и силу сокращения [7, 8].

В представляемых нами в этой статье данных показано (рис. 2), что нивелирование капсаицином депрессорного действия аденозина связано с

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., and Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389** (6653), 816–824 (1997). DOI: 10.1038/39807
2. Caterina M. J., Rosen T. A., Tominaga M., Brake A. J., and Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, **398**, 436–441 (1999). DOI: 10.1038/18906
3. Золотарев В. А. и Ноздрачев А. Д. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва. *Росс. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **87** (2), 182–204 (2001).
4. Burnstock G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.*, **2**, Art. 2398212818817494 (2018). DOI: 10.1177/2398212818817494
5. Kwak J., Wang M. H., Hwang S. W., Kim T. Y., Lee S. Y., and Oh U. *J. Neurosci.*, **20** (22), 8298–8304 (2000). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-22-08298.2000
6. Burnstock G. Introduction to Purinergic Signalling in the Brain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1202**, 1–12 (2020). DOI: 10.1007/978-3-030-30651-9_1
7. Ziganshin A. U., Khairullin A. E., Hoyle C. H. V., and Grishin S. N. Modulatory Roles of ATP and Adenosine in Cholinergic Neuromuscular Transmission. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6423 (2020). DOI: 10.3390/ijms21176423
8. Burnstock G., Arnett T. R., and Orriss I. R. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal.*, **9** (4), 541–572 (2013). DOI: 10.1007/s11302-013-9381-4
9. Khairullin A. E., Ziganshin A. U., and Grishin S. N. The Influence of Hypothermia on Purinergic Synaptic Modulation in the Rat Diaphragm. *Biophysics*, **65** (5), 858–862 (2020). DOI: 10.1134/S0006350920050085
10. Khairullin A. E., Teplov A. Y., Grishin S. N., Farkhutdinov A. M., Ziganshin A. U. The Thermal Sensitivity of Purinergic Modulation of Contractile Activity of Locomotor and Respiratory Muscles in Mice. *Biophysics*, **64** (5), 812–817 (2019). DOI: 10.1134/S0006350919050075
11. Voets T., Droogmans G., Wissenbach U., Janssens A., Flockerzi V., and Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, **430** (7001), 748–754 (2004). DOI: 10.1038/nature02732
12. Jin Y. H., Bailey T. W., Li B. Y., Schild J. H., and Andresen M. C. Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *J. Neurosci.*, **24** (20), 4709–4717 (2004). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0753-04.2004
13. Nakatsuka T., Furue H., Yoshimura M., and Gu J. G. Activation of central terminal vanilloid receptor-1 receptors and alpha beta-methylene-ATP-sensitive P2X receptors reveals a converged synaptic activity onto the deep dorsal horn neurons of the spinal cord. *J. Neurosci.*, **22** (4), 1228–1237 (2002). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-04-01228.2002
14. Fattori V., Hohmann M. S. N., Rossaneis A. C., Pinho-Ribeiro F. A., and Verri W. A. Capsaicin: Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses. *Molecules*, **21**, 844. (2016). DOI: 10.3390/molecules21070844
15. Thyagarajan B., Potian J. G., Baskaran P., and McArdle J. J. Capsaicin modulates acetylcholine release at the myoneural junction. *Eur. J. Pharmacol.*, **744**, 211–219 (2014). DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.09.044
16. Correia-de-Sá P., Timóteo M. A., and Ribeiro J. A. Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J. Neurophysiol.*, **76** (6), 3910–3919 (1996). DOI: 10.1152/jn.1996.76.6.3910
17. Burnstock G., Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64** (12), 1471–1483 (2007). DOI: 10.1007/s00018-007-6497-0
18. Hagenacker T., Splettstoesser F., Greffrath W., Treede R. D., and Büsselberg D. Capsaicin differentially modulates voltage-activated calcium channel currents in dorsal root ganglion neurones of rats. *Brain Res.*, **1062** (1–2), 74–85 (2005). DOI: 10.1016/j.brainres.2005.09.033
19. Hagenacker T. and Büsselberg D. Modulation of intracellular calcium influences capsaicin-induced currents of TRPV-1 and voltage-activated channel currents in nociceptive neurones. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, **12** (4), 277–284 (2007). DOI: 10.1111/j.1529-8027.2007.00149.x
20. Shimizu T., Majima T., Suzuki T., Shimizu N., Wada N., Kadekawa K., Takai S., Takaoka E., Kwon J., Kanai A. J., de Groat W. C., Tyagi P., Saito M., and Yoshimura N. Nerve growth factor-dependent hyperexcitability of capsaicin-sensitive bladder afferent neurones in mice with spinal cord injury. *Exp. Physiol.*, **103** (6), 896–904 (2018). DOI: 10.1113/EP086951
21. Yang R., Xiong Z., Liu C., and Liu L. Inhibitory effects of capsaicin on voltage-gated potassium channels by TRPV1-independent pathway. *Cell Mol. Neurobiol.*, **34** (4), 565–576 (2014). DOI: 10.1007/s10571-014-0041-1
22. Kuenzi F. M. and Dale N. Effect of capsaicin and analogues on potassium and calcium currents and vanilloid receptors in *Xenopus* embryo spinal neurones. *Br. J. Pharmacol.*, **119** (1), 81–90 (1996). DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15680.x
23. Connor J. A. and Stevens C. F. Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated

- neurone soma. *J. Physiol.*, **213**, 31–53 (1971). DOI: 10.1113/jphysiol.1971.sp009366
24. Khairullin A. E., Grishin S. N., and Ziganshin A. U. Presynaptic Purinergic Modulation of the Rat Neuro-Muscular Transmission. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **45**, 8492–8501 (2023). DOI: 10.3390/cimb45100535
25. Prescott E. D. and Julius D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, **300** (5623), 1284–1288 (2003). DOI: 10.1126/science.1083646
26. Kim J. A., Kang Y. S., and Lee Y. S. A phospholipase C-dependent intracellular Ca^{2+} release pathway mediates the capsaicin-induced apoptosis in HepG2 human hepatoma cells. *Arch. Pharm. Res.*, **28** (1), 73–80 (2005). DOI: 10.1007/BF02975139
27. Thyagarajan B., Krivitskaya N., Potian J. G., Hognason K., Garcia C. C., McArdle J. J., Capsaicin protects mouse neuromuscular junctions from the neuroparalytic effects of botulinum neurotoxin *a*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **331**, 361–371 (2009). DOI: 10.1124/jpet.109.156901

Peculiarities of Purinergic Modulation of Myoneural Transmission in Presence of Capsaicin

A.E. Khairullin*, **, M.A. Mukhamedyarov*, R.D. Mukhamedzyanov*, N.M. Kashtanova*, E.N. Zhivotova*, G.G. Suchkova*, A.R. Shaikhutdinova*, A.A. Ereemeev*, and S.N. Grishin*

*Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

**Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

This study aimed to investigate myoneural transmission in the presence of capsaicin that acts as an “integrator of painful stimuli and causes heat sensation”. The effects of purines such as ATP and adenosine that participate in synaptic transmission in presence of capsaicin have been explored. When the muscle-nerve preparation of frog was perfused with solution containing capsaicin, the inhibitory effects of both purines were significantly reduced. A reduction of the depressant effects of adenosine is associated with the inhibition of A_1 signaling, since the A_{2A} receptor agonist CGS21680 showed pronounced, almost completely hidden in the control, potentiating effect in presence of capsaicin. Our findings suggest that the known neuroprotective effect of capsaicin is primarily due to elimination of inhibition by endogenous purines of the induced quantum output of the neurotransmitter.

Keywords: capsaicin, ATP, adenosine, neuromuscular synapse, A-type potassium channels, induced quantum secretion

СОДЕРЖАНИЕ МОНООКСИДА АЗОТА И МЕДИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РЕПЕРФУЗИЕЙ

© 2024 г. Х.Л. Гайнутдинов*, **, В.В. Андрианов*, **, Г.Г. Яфарова*, **, Л.В. Базан*, Т.Х. Богодвид**, ***, В.С. Июдин*, Т.А. Филипович****, Ю.Г. Шанько****, Ю.П. Токальчик****, В.А. Кульчицкий****

*Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН, Сибирский тракт, 10/7, Казань, Республика Татарстан, 420029, Россия

**Казанский (Приволжский) федеральный университет, Кремлевская ул., 18, Казань, 420008, Россия

***Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма, Деревня Универсиады, 35, Казань, 420010, Россия

****Центр мозга Института физиологии НАН Беларуси, Академическая ул., 28, Минск, 220072 Беларусь

E-mail: kh_gainutdinov@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 24.03.2023 г.

Принята к публикации 04.12.2023 г.

Для определения содержания оксида азота (NO) и меди в гиппокампе здоровых крыс и крыс после моделирования ишемии использован метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса. Моделирование ишемии осуществляли как перевязкой сонных артерий, так и перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови. Методом ЭПР-спектроскопии регистрировали сигналы от комплексов (DETC)₂-Fe²⁺-NO и Cu(DETC)₂. Установлено достоверное снижение продукции NO в гиппокампе в среднем на 28% через сутки после моделирования ишемического инсульта, вызванного перевязкой сонных артерий, и на 56% при перевязке сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови. Содержание меди в гиппокампе через сутки после моделирования ишемии перевязкой сонных артерий достоверно снизилось в среднем на 20%, после перевязки сонных артерий с забором крови наблюдалась тенденция к снижению содержания меди, однако вследствие большого разброса значений достоверность изменений отсутствовала. Таким образом, гипоксия головного мозга, вызываемая перевязкой сонных артерий, сопровождается снижением продукции NO в гиппокампе, а также признаками ослабления антиоксидантной системы, что дополнительно ухудшает функциональное состояние системы гомеостазиса.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс, спиновая ловушка, оксид азота, медь, гиппокамп, ишемия, гипоксия.

DOI: 10.31857/S0006302924010146, EDN: QWHFIP

Монооксид азота (NO) является одной из ключевых сигнальных молекул, которые регулируют физиологические функции организма, включая нервную систему [1–3]. Исследования роли NO в жизнедеятельности организмов начались вскоре после обнаружения регуляции NO нормального сосудистого тонуса, как медиатора вазодилатации [4, 5]. Поскольку NO является химически вы-

сокореактивным свободным радикалом, способным выступать в роли как окислителя, так и восстановителя [6, 7], то возникает предположение об его многообразных эффектах в биологических тканях. Продemonстрировано, что NO участвует в различных функциях нервной системы, вовлекается в процессы нейромодуляции, выполняет функцию нейротрансмиттера, регулирует пролиферацию и дифференциацию нервных клеток [3, 8]. Показано, что функционирование системы NO нарушается при гипоксии и ишемии мозга, церебральная ишемия сопровождается множественными и разнонаправленными изменениями содержания NO в мозге и в передаче сигналов [9–

Сокращения: NO – монооксид азота, NOS – NO-синтаза, nNOS – нейрональная NO-синтаза, eNOS – эндотелиальная NO-синтаза, iNOS – индуцибельная NO-синтаза, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат.

11]. Таким образом, уточнение закономерностей изменений содержания NO в мозге при ишемических процессах в головном мозге является актуальным. Имеющиеся противоречивые сведения позволяют утверждать, что нет единого мнения о роли эндогенного NO в процессах, протекающих при повреждениях нервной системы [12].

Одной из причин такой ситуации является разнообразие источников NO. NO, самая маленькая из известных сигнальных молекул, продуцируется тремя изоформами NO-синтазы (NOS). Нейрональная NOS (nNOS) конститутивно экспрессируется в центральных и периферических нейронах, эндотелиальная NOS (eNOS) в основном экспрессируется в эндотелиальных клетках, а индуцибельная NOS (iNOS) способна экспрессироваться во многих типах клеток. Все они используют L-аргинин и молекулярный кислород в качестве субстратов и требуют несколько кофакторов, все NOS связывают кальмодулин и содержат гем [13]. В образовании NO участвуют не только NOS, но и нитритредуктазные системы, которые связаны с гемсодержащими белками, способными в дезокси-форме восстанавливать нитриты в NO [14, 15]. Также показано, что экзогенный низкомолекулярный динитрозильный комплекс железа с тиолсодержащими лигандами обладает широким спектром биологической активности, которая имитирует активность эндогенного NO [16]. Доказано, что функционирование NO в организме человека и животных обеспечивается его включением в динитрозильные комплексы железа, которые являются «рабочими формами» эндогенного NO, ответственного за его функционирование в качестве универсального регулятора основных метаболических процессов [17, 18].

Другой причиной противоречивых результатов является техническая сложность контроля уровня NO, поскольку NO образуется в процессе быстрых химических реакций с вовлечением широкого спектра молекул и посредников, среди которых металлы, тиолы, свободные радикалы, аминокислоты, кальций, кислород. Существует множество методов измерения продукции NO в биологических системах, но прецизионная оценка как стационарной концентрации NO, так и скорости ее генерации в биологических системах является сложной задачей вследствие невысоких активностей NOS и малого времени полужизни NO [19]. Одним из наиболее эффективных методов обнаружения и количественного определения NO в биологических тканях является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [20, 21]. Это произошло благодаря методике, разработанной профессором А.Ф. Ваниным с сотрудниками [20, 22], в которой они использовали метод спинового захвата.

Важно отметить, что NO при взаимодействии с супероксидом (O_2^-) образует сильный окислитель пероксинитрит ($ONOO^-$) [9]. Основной клеточной защитой от супероксида и пероксинитрита является группа оксидоредуктаз, известных как супероксиддисмутазы, которые катализируют расщепление O_2^- на кислород и H_2O_2 [23]. Дисмутирование супероксида с помощью цитозольного фермента Cu,Zn-супероксиддисмутазы является первичной и основной защитой от процессов свободнорадикального окисления.

Авторами предпринята попытка детализации некоторых биофизических закономерностей образования монооксида азота при ишемии головного мозга. Целью данной работы было исследование методом ЭПР-спектроскопии с применением спиновых ловушек интенсивности продукции NO и содержания меди (как показателя супероксиддисмутазы) в гиппокампе крыс вследствие экспериментального ишемического повреждения мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование ишемического инсульта у крыс. Животных содержали в стандартных условиях вивария (с поддержанием 12/12-часового ритма освещения и темноты, температуры воздуха 23°C и стабильной приточно-вытяжной вентиляцией) при свободном доступе к воде и пище (*ad libitum*) и одинаковом рационе питания в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Эксперименты проводили в светлое время суток на четырехнедельных самцах белых крыс (исходная масса 139–145 г). Животные были разделены на 3 группы (все группы по 10 особей в каждой). Первая группа («Контроль») – интактные крысы, не подвергавшиеся никаким воздействиям. Вторая группа («Ишемия 1») – наркотизированные крысы, подвергавшиеся 10-минутному нарушению кровотока путем аккуратного отделения блуждающего нерва от сонных артерий и перевязки шелковой нитью 4.0 обеих сонных артерий на уровне голосовых связок. Третья группа («Ишемия 2») – крысы, подвергавшиеся 10-минутному нарушению кровотока путем аналогичного отделения блуждающих нервов от сонных артерий и последующей перевязки обеих сонных артерий на уровне голосовых связок и взятию через две минуты из левой общей сонной артерии ретроградное введение 3 мл крови) [24–26]. Был применен следующий протокол экспериментов: в контрольной группе крысы находились в клетке в предоперационном помещении и не подвергались никаким воздействиям. Во второй группе («Ишемия 1») осуществляли под наркозом перевязку обеих сонных артерий на уровне голосовых связок путем наложения лигатур на 10 мин и за-

тем завершали обтурацию общих сонных артерий путем снятия лигатур через 10 мин после блокады кровотока. В третьей группе («Ишемия 2»), как и в группе «Ишемия 1», осуществляли перевязку обеих сонных артерий и взятие через 2 мин после начала обтурации из левой общей сонной артерии 3 мл крови. Все операционные процедуры проводили на наркотизированных животных (55.6 мг/кг кетамина, 5.5 мг/кг ксилазина, 1.1 мг/кг ацепромазина, внутривенно) [26, 27]. Через 24 ч от начала ишемии (ишемии-реперфузии) вводили компоненты спиновой ловушки (см. ниже). Смертность крыс после этих операций отсутствовала.

Подготовка образцов для измерения ЭПР-спектров. При подготовке образцов для измерения ЭПР-спектров авторы опирались на методику спиновых ловушек, предложенную профессором А.Ф.Ваниным с сотрудниками [20], с использованием комплекса Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом — $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}$ [28, 29]. Как и ранее, ДЭТК-Na вводили внутривенно в дозе 500 мг/кг в 2.5 мл воды [30]. Смесь растворов сульфата железа ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma, США) в дозе 37.5 мг/кг и цитрата натрия в дозе 187.5 мг/кг (в объеме 1 мл воды на 300 г массы животного), приготовленную непосредственно перед введением, вводили подкожно в 3 точки — правое и левое бедра и ретроахиллярную часть межлопаточной области. В смеси сульфата железа и цитрата натрия образуется цитрат железа. ДЭТК-Na и цитрат железа распределяются по организму и при взаимодействии образуют нерастворимый в воде комплекс ДЭТК-Fe^{2+} [20]. Комплекс спиновой ловушки с NO характеризуется легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g -фактора, равным 2.038, и триплетной сверхтонкой структурой. Кроме того, спиновая ловушка взаимодействует с Cu, образуя комплекс $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$, который также может быть зарегистрирован методом ЭПР-спектроскопии [31].

Через 30 мин после введения компонента спиновой ловушки осуществляли забор тканей гиппокампа (один образец массой порядка 100 мг). Выбранные участки немедленно замораживали при температуре жидкого азота и транспортировали из Минска в Казань в пластиковых контейнерах с сухим льдом для измерений методом ЭПР-спектроскопии. Комплекс спиновой ловушки с NO ($(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$) в таком состоянии хорошо сохраняется, сигнал от комплекса не изменяется не менее месяца.

Измерения ЭПР-спектров. Измерения спектров комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ и $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$ проводили на спектрометрах фирмы Брукер X диапазона (9.50 ГГц) EMX/plus с температурной

приставкой ER 4112HV и ER 200 SRC при модуляции магнитного поля 100 кГц, амплитуды модуляции 2 Гс, мощности СВЧ-излучения 30 мВт, временной константе 200 мс и температуре 77°K в пальчиковом сосуде Дьюара фирмы Bruker (США). Амплитуда модуляции, усиление и мощность СВЧ во всех экспериментах подбирались с условием отсутствия перемодуляции и насыщения сигнала ЭПР и сохранялись одинаковыми на протяжении всех измерений. Масса образцов составляла около 100 мг. Амплитуду спектров ЭПР всегда нормировали на вес образца (подробности методики измерений сигналов ЭПР описаны нами ранее [32]).

Статистическая обработка результата. Результат представлен в виде $M \pm m$ (среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего). Статистическую обработку данных проводили с применением t -критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом ЭПР-спектроскопии проведено исследование интенсивности продукции монооксида азота и содержания меди в гиппокампе при моделировании ишемии в модели неполной глобальной ишемии с перевязкой 2 сонных артерий на 10 мин у крыс двух групп («Ишемия 1» и «Ишемия 2»). В группе «Ишемия 1» моделировали ишемию головного мозга путем перевязки двух сонных артерий на 10 мин, а в группе «Ишемия 2» моделировали ишемию в модели реперфузии (помимо обтурации общих сонных артерий на 10 мин осуществляли взятие из общей сонной артерии 3 мл крови) длительностью 1 сутки после осуществления неполной глобальной ишемии с перевязкой двух сонных артерий на 10 мин. Сопоставляли полученные данные в группах «Ишемия 1» и «Ишемия 2» с данными контрольной группы крыс, которые не подвергались гипоксическим воздействиям и находились на стандартном рационе в виварии.

На рис. 1а показан спектр ЭПР гиппокампа контрольной крысы и крысы после моделирования ишемии, вызванной перевязкой на 10 мин обеих сонных артерий (группа «Ишемия 1»). На этом спектре виден характерный триплетный сигнал от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ со значением g -фактора, равным 2.038 [28]. Кроме того, в этой же области присутствует сигнал от комплекса $(\text{ДЭТК})_2\text{-Cu}$. На рис. 1б представлены спектры ЭПР тканей гиппокампа здоровой (контрольной) крысы, а также крысы через сутки после моделирования ишемии, вызванной перевязкой сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови (модель «Ишемия 2») Сплошной линией представлен спектр образца,

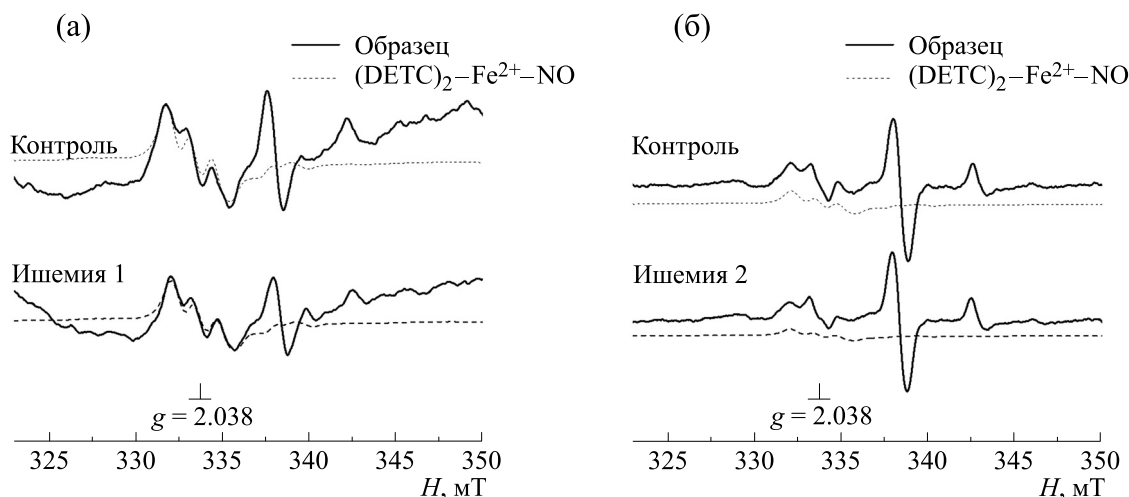


Рис. 1. Примеры спектров ЭПР гиппокампа контрольных крыс, крыс, подвергавшихся 10-минутному нарушению кровотока путем перевязки обеих сонных артерий («Ишемия 1»), и крыс, подвергавшихся 10-минутному нарушению кровотока путем перевязки обеих сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови («Ишемия 2»).

прерывистой линией — сигнал от оксида азота, связанного со спиновой ловушкой, в составе спектра комплекса $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Относительное изменение количества NO-содержащего комплекса и комплекса $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$ оценивали по интегральной интенсивности сигнала от этих комплексов.

На рис. 2а приведены статистические данные по изменению интегральной интенсивности сигналов $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ в спектрах исследованных образцов биологических тканей. Результаты анализа демонстрируют достоверное ($p < 0.05$) снижение продукции NO после моделирования

ишемии в гиппокампе («Ишемия 1»), вызванной перевязкой сонных артерий (в среднем на 28%), и более выраженное снижение продукции NO (в среднем на 56%) при перевязке сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови («Ишемия 2»). На рис. 2б приведены статистические данные по интегральным интенсивностям сигнала $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$ в спектрах исследованных образцов. Результаты показывают, что содержание меди в гиппокампе через сутки у животных второй группы достоверно ($p < 0.05$) снижается в среднем на 20%, в третьей группе также наблюдалось уменьшение содержания меди, однако вследствие большого разброса значений из-

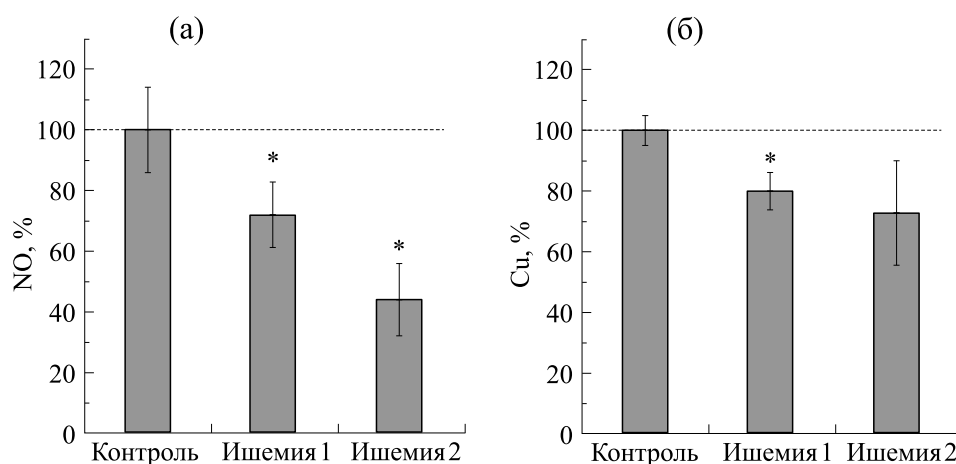


Рис. 2. Относительное содержание NO (а) и меди (б) (в % по отношению к контролю) в гиппокампе крыс, подвергавшихся 10-минутному нарушению кровотока путем перевязки обеих сонных артерий («Ишемия 1»), и крыс, подвергавшихся 10-минутному нарушению кровотока путем перевязки обеих сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови («Ишемия 2»); * — $p < 0.05$.

менение было статистически недостоверным. Таким образом, ишемия головного мозга, вызываемая перевязкой сонных артерий, сопровождается снижением продукции NO в гиппокампе, а также признаками ослабления антиоксидантной системы гиппокампа, что в совокупности дополнительно ухудшает функциональное состояние нервной системы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Инсульт мозга является ведущей причиной смерти и наиболее частой причиной инвалидности во всем мире [33, 34]. Известно, что гипоксия сопровождается нарушениями снабжения кислородом отделов мозга, что ведет к ишемии мозга, которая часто завершается ишемическим инсультом. С одной стороны, развитие ишемии мозга и последующее возникновение инсульта связывают с ослаблением церебрального кровотока, а также с нарушениями регуляции кровоснабжения тканей мозга системой NO [10, 35]. С другой стороны, гипоксия, возникшая в результате ишемического инсульта, сопровождается повреждением тканей мозга и нарушением его функций [36]. Ослабление снабжения кислородом отделов мозга возникает также при тромбировании сосуда или разрыве аневризмы, что часто завершается ишемическим или геморрагическим инсультом [37, 38]. В этих процессах гипоксии-ишемии роль NO по результатам исследований представляется противоречивой: NO способен выполнять как нейротоксические, так и нейропротекторные функции [12, 39–41].

Авторами методом ЭПР-спектроскопии проведено исследование интенсивности продукции монооксида азота и содержания меди (как показателя первой и третьей субъединиц супероксиддисмутазы) в гиппокампе крыс после моделирования ишемии головного мозга. В работе использован разработанный профессором А.В. Ваниным с сотрудниками [20, 28] метод, в котором применяется спиновая ловушка, представляющая нерастворимый в воде комплекс $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}$, который способен взаимодействовать с NO с образованием стабильного радикала $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$, регистрируемого методом ЭПР-спектроскопии. Типичные спектры ЭПР замороженных образцов (в нашем случае гиппокампа) представляют сигнал ЭПР с $g_{\perp} = 2,038$, $g_{\parallel} = 2,01$ и триплетной сверхтонкой структурой при $g_{\perp}$. Спектр соответствует типичному комплексу радикала NO с ловушкой DETC. На это указывают значение g-фактора сигнала ЭПР и расщепление вследствие взаимодействия с ядром азота. Значение g-фактора и константы сверхтонкого взаимодействия с азотом находятся в соответствии с данными, полученными в работах А.Ф. Ванина и др.

[20]. Ранее было найдено, что спиновая ловушка взаимодействует с Cu, образуя комплекс $\text{Cu}(\text{DETC})_2$, который также определяется методом ЭПР-спектроскопии [31]. Авторы продемонстрировали присутствие сигнала от меди в проведенных измерениях. Показано, что содержание меди, ассоциируемое с содержанием супероксиддисмутазы, в гиппокампе через сутки после моделирования ишемии либо снижалось, либо имело тенденцию к снижению. Данный результат свидетельствует о снижении эффективности антиоксидантной системы в данных моделях.

Полученные в проведенной работе результаты измерения содержания монооксида азота и меди демонстрируют, что гипоксия мозга сопровождается снижением продукции NO в гиппокампе, которое зависит от тяжести воздействия. При этом регистрируется достоверное снижение содержания меди либо тенденция к снижению. Этот результат позволяет считать, что моделируемая здесь гипоксия сопровождается не только снижением продукции NO, но и признаками ослабления антиоксидантной системы гиппокампа, что дополнительно ухудшает функциональное состояние системы.

В ишемии/реперфузионном повреждении головного мозга решающую роль играют окислительный стресс и воспаление. Окислительный стресс вызывается активными формами кислорода во время ишемии головного мозга и с большей вероятностью приводит к гибели клеток и в конечном счете к повреждению мозга после реперфузии [42]. Активация антиоксидантных ферментов является одним из путей защиты от высокотоксичных кислородных радикалов. Большинство из них связано с медь-содержащими ферментами [43, 44]. Это, прежде всего, Cu, Zn-супероксиддисмутаза и цитохром c-оксидаза [44–46]. Цитохром c-оксидаза — это фермент дыхательной цепи переноса электронов, которая катализирует перенос электронов с цитохрома c на кислород. Дисмутирование супероксида (O_2^-) с помощью цитозольного фермента супероксиддисмутазы является первичной и основной защитой от процессов свободнорадикального окисления [23]. Она играет важнейшую роль в антиоксидантной защите практически всех клеток, так или иначе находящихся в контакте с кислородом. Таким образом, баланс меди в нервной системе необходим для ее нормального функционирования.

Роль NO в развитии ишемии давно привлекает внимание исследователей. Так, при измерении активности NO-синтаз показано, что уже через 10 мин после начала ишемии мозга наблюдается увеличение активности нейрональной NOS [47], а затем начинается экспрессия индуцибельной NOS [48], селективное блокирование которой может являться нейропротекторным фактором

при ишемии [11]. Аналогичный результат усиления продукции NO в первые минуты был получен методом спектроскопии ЭПР [49]. Также показано двукратное увеличение продукции NO в полушариях мозга крысы в модели глобальной ишемии [46]. Были выявлены нейропротекторные свойства доноров NO после кратковременного и постоянного ишемического поражения [39, 51–53]. Авторами ранее на другой модели обнаружено снижение содержания NO после моделирования ишемического инсульта в ишемизированной части коры левого полушария крыс [32].

Гипоксический или ишемический стресс вызывает множество серьезных травм головного мозга, включая инсульт и неонатальную гипоксию ишемической энцефалопатии. Во время процессов гипоксии и ишемии головного мозга NO выполняет нейротоксическую либо нейропротекторную роль в зависимости от таких факторов, как изоформа NOS, тип клеток, с помощью которых вырабатывается NO, и временная стадия после начала гипоксически-ишемического повреждения головного мозга [35, 38, 54, 55]. NO обладает двойной идентичностью, включая нейропротекцию и нейротоксичность во время ишемии-реперфузии. Чрезмерная выработка NO может быть нейротоксичной, приводя к каскадным реакциям эксайтотоксичности, воспалению, апоптозу и ухудшению первичной травмы головного мозга. Напротив, NO, вырабатываемый эндотелиальными NOS, играет нейропротекторную роль, поддерживая мозговой кровоток и предотвращая повреждение нейронов, а также ингибируя адгезию тромбоцитов и лейкоцитов. Иногда индуцируемые NO-производные NOS и нейрональные NOS в отдельных областях мозга также могут играть нейропротекторную роль [34, 55].

Существует множество причин такого разнообразия функций NO. Во-первых, кроме синтеза NO-синтазами, как основного источника NO [3, 10], существует также нитроредуктазная компонента цикла NO, когда NO образуется из нитритов и нитратов [14, 38]. Во-вторых, существует значительное число депо для NO, которые взаимодействуют с комплексами, содержащими железо (например, гемовые структуры), с тиолами и другими соединениями [27, 56, 57]. Значительная роль NO во многих процессах, в том числе и в деятельности нервной системы, а также недостаточность сведений о количестве синтезируемого NO и его функциях при различных патологиях предопределяют значимость дальнейших исследований в данном направлении. Решение вопроса о динамике продукции NO в тканях при развитии различных процессов, включая патологические, представляется чрезвычайно актуальным и может способствовать выработке новых подходов к фармакологической коррекции возникающих нарушений в ткани мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом ЭПР-спектроскопии регистрировали сигналы от тройных комплексов (DETC)₂-Fe²⁺-NO и комплекса Cu(DETC)₂. Преимуществом применения данного метода является высокая чувствительность за счет применения спинных ловушек, что позволяет проводить измерения низких концентраций определяемых соединений. На основе прямых измерений методом ЭПР-спектроскопии показано достоверное снижение на 28% продукции NO в гиппокампе через сутки после моделирования ишемии перевязкой сонных артерий и на 56% в случае перевязки сонных артерий с последующим взятием из общей сонной артерии 3 мл крови. Содержание меди в гиппокампе через сутки после моделирования ишемии перевязкой сонных артерий достоверно снизилось на 20%, снижение содержания меди через сутки после перевязки сонных артерий с забором крови показало отсутствие достоверности при большем разбросе значений. Логично заключить, что применение метода ЭПР-спектроскопии позволило определить не только изменение продукции оксида азота в гиппокампе при моделировании ишемии головного мозга, но и в тех же тканях выявить признаки ослабления антиоксидантной системы по содержанию меди как показателя содержания супероксиддисмутазы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Моделирование ишемии проводили в Центре мозга (Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь), работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант № M23РНФ-067). Измерения спектров ЭПР образцов и их обработку проводили в КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН, работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-45-10004. Хранение образцов и часть обработки результатов проводили в КФУ за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета («Приоритет – 2030»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют 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 норма-

ми обращения с животными, регламентированными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей. Моделирование ишемии и ишемии-реперфузии проводили в Институте физиологии НАН Беларуси (г. Минск) в соответствии с утвержденным протоколом Комиссии по этике Института.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы — две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах. *Биохимия*, **63** (7), 924–938 (1998).
2. Ситдикова Г. Ф. и Зефилов А. Л. Газообразные посредники в нервной системе. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **92**, 872–882 (2006).
3. Steinert J. R., Chernova T., and Forsythe I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist*, **16** (4), 435–452 (2010). DOI: 10.1177/1073858410366481
4. Ignarro L. J., Cirino G., Casini A., and Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **34** (6), 879–886 (1999). DOI: 10.1097/00005344-199912000-00016
5. Lakomkin V. L., Vanin A. F., Timoshin A. A., Kapelko V. I., and Chazov E. I. Long-lasting hypotensive action of stable preparations of dinitrosyl-iron complexes with thiolcontaining ligands in conscious normotensive and hypertensive rats. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **16** (4), 413–418 (2007).
6. Thomas D. D., Ridnour L. A., Isenberg J. S., Flores-Santana W., Switzer C. H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolocci N., Ambs S., Colton C. A., Harris C. C., Roberts D. D., and Wink D. A. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, **45** 18–31 (2008).
7. Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a base for new-generation drugs (Review). *Open Conf. Proc. J.*, **4** 31–37 (2013).
8. Hardingham N., Dachtler J., and Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 190 (2013). DOI: 10.3389/fnecel.2013.00190
9. Pacher P., Beckman J. S., and Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, **87**, 315–427 (2007).
10. Terpolilli N. A., Moskowitz M. A., and Plesnila N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **32** (7), 1332–1346 (2012).
11. Bolanos J. P. and Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim. Biophys. Acta*, **1411** (2–3), 415–436 (1999).
12. Calabrese V., Cornelius C., Rizzarelli E., Owen J. B., Dinkova-Kostova A. T., and Butterfield D. A. Nitric oxide in cell survival: a janus molecule. *Antioxidants and Redox Signaling*, **11**, 2717–2739 (2009).
13. Forstermann U. and Sessa W. C., Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.*, **33** 829–837 (2012). DOI: 10.1093/eurheartj/ehs304
14. Реутов В. П., Охотин В. Е., Шуклин А. В., Сорокина Е. Г., Косицын Н. С. и Гурин В. Н. Оксид азота и цикл в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты. *Успехи физиол. наук*, **38** (4), 39–58 (2007).
15. Sparacino-Watkins C. E., Tejero J., Sun B., Gauthier M. C., Thomas J., Ragireddy V., Merchant B. A., Wang J., Azarov I., Basu P., and Gladwin M. T. Nitrite Reductase and Nitric-oxide Synthase Activity of the Mitochondrial Molybdopterin Enzymes mARC1 and mARC2. *J. Biol. Chem.*, **289** (15), 10345–10358 (2014). DOI: 10.1074/jbc.M114.555177
16. Borodulin R. R., Kubrina L. N., Mikoyan V. D., Poltorakov A. P., Shvydkiy V. O., Burbaev D. Sh., Serezhnikov V. A., Yakhontova E. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO-donors. *Nitric Oxide*, **29**, 4–16 (2013).
17. Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*, **54**, 15–29 (2016).
18. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут как доноры катионов нитрозония подавлять вирусные инфекции (гипотеза). *Биофизика*, **65** (4), 818–823 (2020).
19. Csonka C., Pali T., Bencsik P., Gorbe A., Ferdinandy P., and Csont T. Measurement of NO in biological samples. *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 1620–1632 (2015).
20. Vanin A. F., Huisman A., and Van Faassenm E. E. Iron Dithiocarbamate as Spin Trap for Nitric Oxide Detection: Pitfalls and Successes. *Methods Enzymol.*, **359**, 27–42 (2003).
21. Hogg N. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 122–129 (2010).
22. Vanin A. F., Mordvintcev P. I., and Kleschyov A. L. Appearance of nitrogen oxide in animal tissues in vivo. *Studia Biophysica*, **102**, 135–143 (1984).
23. Fukai T. and Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.*, **15** (6), 1583–1606 (2011). DOI: 10.1089/ars.2011.3999
24. Roch M., Messlinger K., Kulchitsky V. A., Tichonovich O. G., Azev O. A., and Koulchitsky S. V. Ongoing activity in trigeminal wide-dynamic range neurons is driven from the periphery. *Neuroscience*, **150** (3), 681–691 (2007).
25. Kulchitsky V., Semenik T., Kaliadzhich Z., Andrianova T., and Tsishkevich K., The analysis of chemosensitive structures contribution to obstructive sleep apnea development. *Clin. Neurophysiol.*, **125**, S330–S331 (2014). DOI: 10.1016/S1388-2457(14)51089-9
26. Shanko Y., Zamaro A., Takalchik S. Y., Koulchitsky S., Pashkevich S., Panahova E., Navitskaya V., Dosina M.,

- Denisov A., Bushuk S., and Kulchitsky V. Mechanisms of Neural Network Structures Recovery in Brain Trauma Biomed. *J. Sci. Tech. Res.*, **7** (5), MS.ID.001567 (2018).
27. Deryagin O. G., Gavrilova S. A., Gainutdinov Kh. L., Golubeva A. V., Andrianov V. V., Yafarova G. G., Buravkov S. V., and Koshelev V. B., Molecular bases of brain preconditioning. *Front. Neurosci.*, **11**, 427 (2017). DOI: 10.3389/fnins.2017.00427
 28. Микоян В. Д., Кубрина Л. Н. и Ванин А. Ф. Оксид азота образуется через L-аргинин зависимый путь в мозге мышей *in vivo*. Биофизика, **39**, 915–918 (1994).
 29. Гайнутдинов Х. Л., Андрианов В. В., Июдин В. С., Юртаева С. В., Яфарова Г. Г., Файзуллина Р. И. и Ситдииков Ф. Г. Исследование методом ЭПР спектроскопии интенсивности продукции оксида азота в организме крыс при гипокинезии. Биофизика, **58** (2), 276–280 (2013).
 30. Ismailova A. I., Gnezdilov O. I., Muranova L. N., Obnochny A. A., Andrianov V. V., Gainutdinov Kh. L., Nasyrova A. G., Nigmatullina R. R., Rahmatullina F. F., and Zefirov A. L. ESR Study of the Nitric Oxide Production in Tissues of Animals under the External Influence on the Functioning of the Cardiovascular and Nervous Systems. *Appl. Magn. Res.*, **28**, 421–430 (2005).
 31. van Faassen E. E., Koeners M. P., Joles J. A., and Vanin A. F. Detection of basal NO production in rat tissues using iron–dithiocarbamate complexes. *Nitric Oxide*, **18**, 279–286 (2008).
 32. Gainutdinov Kh. L., Gavrilova S. A., Iyudin V. S., Golubeva A. V., Davydova M. P., Jafarova G. G., Andrianov V. V., and Koshelev V. B. EPR study of the intensity of the nitric oxide production in rat brain after ischemic stroke. *Appl. Magn. Res.*, **40** (3), 267–278 (2011).
 33. Donnan G. A., Fisher M., Macleod M., and Davis S. M. Stroke. *Lancet*, **371**, 1612–1623 (2008). DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60694-7
 34. Wierónska J. M., Ciéslik P., and Kalinowski L. Nitric Oxide-Dependent Pathways as Critical Factors in the Consequences and Recovery after Brain Ischemic Hypoxia. *Biomolecules*, **11** (8), 1097 (2021). DOI: 10.3390/biom11081097
 35. Chen Z. Q., Mou R. T., Feng D. X., Wang Z., and Chen G. The role of nitric oxide in stroke. *Med. Gas. Res.*, **7** (3), 194–203 (2017).
 36. Doyle K. P., Simon R. P., and Stenzel-Poore M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, **55**, 310–318 (2008).
 37. Liu L. X., Yang Y. J., Jia Y. J. A model of hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rats. *Bull. Hunan Med. University*, **28** (2), 133–136 (2003).
 38. Garry P. S., Ezra M., Rowland M. J., Westbrook J., and Pattinson K. T. S. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment – From bench to bedside. *Experim. Neurol.*, **263**, 235–243 (2015).
 39. Godinez-Rubi M., Rojas-Mayorquin A. E., and Ortuño-Sahagun D. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, **2013**, 297357, (2013). DOI: 10.1155/2013/297357
 40. Дерягин О. Г., Гаврилова С. А., Буравков С. В., Андрианов В. В., Яфарова Г. Г., Гайнутдинов Х. Л. и Кошелев В. Б. Роль АТФ-чувствительных калиевых каналов и оксида азота в защитном эффекте preconditionирования мозга. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **116** (8), 17–23 (2016). DOI: 10.17116/jnevro20161168217-23
 41. Andrianov V. V., Pashkevich S. G., Yafarova G. G., Denisov A. A., Iyudin V. S., Bogodvid T. K., Dosina M. O., Kulchitsky V. A., and Gainutdinov Kh. L. Changes of nitric oxide content in the rat hippocampus, heart and liver in acute phase of ischemia. *Appl. Magn. Reson.*, **47** (9), 965–976 (2016).
 42. Wu L., Xiong X., Wu X., Ye Y., Jian Z., Zhi Z., and Gu L. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury. *Front. Mol. Neurosci.*, **13**, 28 (2020). DOI: 10.3389/fnmol.2020.00028
 43. Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Kozyreva T., Zovo K., and Palumaa P. Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature*, **465**, 645–648 (2010).
 44. Festa R. A. and Thiele D. J. Copper: an essential metal in biology. *Curr. Biol.*, **21** (21), R877–R883 (2011).
 45. Miller A.-F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.*, **586**, 585–595 (2012).
 46. Sheng Y., Abreu I. A., Cabelli D. E., Maroney M. J., Miller A.-F., Teixeira M., and Valentine J. S. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem. Rev.*, **114**, 3854–3918 (2014). DOI: 10.1021/cr4005296
 47. Samdani A. F., Dawson T. M., and Dawson V. L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*, **28**, 1283–1288 (1997).
 48. Iadecola C., Zhang F., Casey R., Nagayama M., and Ross M. E. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Neurosci.*, **17**, 9157–9164 (1997).
 49. Sato S., Tominaga T., Ohnishi T., and Ohnishi S. T., Electron paramagnetic resonance study on nitric oxide production during brain focal ischemia and reperfusion in the rat. *Brain Res.*, **647** (1), 91–96 (1994).
 50. Fadiukova O. E., Alekseev A. A., Bashkatova V. G., Tolordava I. A., Kuzenkov V. S., Mikoian V. D., Vanin A. F., Koshelev V. B., and Raevskii K. S. Semax prevents elevation of nitric oxide generation caused by incomplete global ischemia in the rat brain. *Eksp. Klin. Farmakol.*, **64** (2), 31–34 (2001).
 51. Willmot M., Gray L., Gibson C., Murphy S., and Bath P. M. A systematic review of nitric oxide donors and L-arginine in experimental stroke; effects on infarct size and cerebral blood flow. *Nitric Oxide*, **12**, 141–149 (2005).
 52. Jung K. H., Chu K., Ko S. Y., Lee S. T., Sinn D. I., Park D. K., Kim J. M., Song E. C., Kim M., and Roh J. K. Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury. *Stroke*, **37**, 2744–2750 (2006).

53. Evgenov O. V., Pacher P., Schmidt P. M., Haskó G., Harald H., Schmidt H. W., and Stasch J.-P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nature Rev. Drug Discov.*, **5**, 755–768 (2006). DOI: 10.1038/nrd2038
54. Prajapati K. D., Devarakonda C. B., Joshi A. R., Sharma S. S., and Roy N. Role of nitric oxide synthases in cerebral ischemia. *Curr. Res. Information Pharmaceut. Sci.* **11** (3), 50–56 (2011).
55. Haiting L., Jiao L., Fengyan Z., Huiqing W., Yi Q., De-zhi M., Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Rev. Neurosci.*, **26** (1), 105–117 (2015). DOI: 10.1515/revneuro-2014-0041
56. Yurtaeva S. V., Efimov V. N., Yafarova G. G., Ereemeev A. A., Iyudin V. S., Rodionov A. A., Gainutdinov Kh. L., and Yatsyk I. V. EPR Detection of Iron Storage in Rat Tissues After Simulated Microgravity Model. *Appl. Magn. Reson.*, **47** (6), 555–565 (2016).
57. Prusakov V. E., Maksimov Y. V., Burbaev D. Sh., Serezhnikov V. A., Borodulin R. R., Tkachev N. A., Mikoyan V. D., and Vanin A. F. EPR and mössbauer characteristics of aqueous solutions of ^{57}Fe -dinitrosyl iron complexes with glutathione and hydroxyl ligands. *Appl. Magn. Reson.*, **50** (7), 861–881 (2019).

Content of Nitrogen Monoxide and Copper in the Hippocampus of a Rat Model of Short-Term Cerebral Ischemia Followed by Reperfusion

Kh.L. Gainutdinov*, ******, **V.V. Andrianov***, ******, **G.G. Yafarova***, ******, **L.V. Bazan***, **T.K. Bogodvid****, *******, **V.S. Iyudin***, **T.A. Filipovich******, **Yu.G. Shanko******, **Yu.P. Tokalchik******, and **V.A. Kulchitsky******

**E.K. Zavoisky Kazan Physical-Technical Institute, Russian Academy of Sciences, Sibirsky tract 10/7, Kazan, Tatarstan, 420029 Russia*

***Kazan (Volga Region) Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia*

****Volga Region State University of Physical Culture, Sport and Tourism, Derevnaya Universiady 35, Kazan, 420010 Russia*

*****Brain Center, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Akademicheskaya ul. 28, Minsk, 220072 Belarus*

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was used to determine the content of nitric oxide (NO) and copper in the hippocampus of healthy rats and rat models of ischemia. The rat model of ischemia was established via both carotid arteries ligation and ligation of the carotid arteries with subsequent withdrawal of a 3 ml of blood from the common carotid artery. The EPR signals of the $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ and $\text{Cu}(\text{DETC})_2$ complexes were recorded. The NO level in the hippocampus showed a significantly drop by an average of 28% one day after modeling ischemic stroke caused by carotid artery ligation and by 56% in the rat model of ischemia established via ligation of the carotid arteries with subsequent withdrawal of a 3 ml of blood from the common carotid artery. The copper content decreased significantly in the hippocampus by an average of 20% one day after modeling ischemia by ligation of the carotid arteries and our findings indicate that the copper content tends to decrease in the rat model of ischemia established via ligation of the carotid arteries with subsequent withdrawal of blood. High variability couldn't tell us if there was a significant difference between groups, though. Thus, brain hypoxia of rats subjected to carotid arteries ligation is accompanied not only by a decrease in NO production in the hippocampus, but also by signs of a weakening of the antioxidant system, thus, worsening conditions for the maintenance of homeostasis.

Keywords: electron paramagnetic resonance, spin trap, nitric oxide, copper, hippocampus, ischemia, hypoxia

ФИЗИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ АРТЕРИАЛЬНОГО ТРОМБА КАК ПОРИСТОЙ СРЕДЫ

© 2024 г. Е.С. Бершадский*, **, Д.Ю. Нечипуренко*, ***, ****, #

*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
ул. Средняя Калитниковская, 30, Москва, 109029, Россия

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

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

****Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
имени Д. Рогачева, ул. Саморы Машела, 1, Москва, 117997, Россия

#E-mail: ne4ipur@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Образование гемостатического тромба является ключевым ответом системы гемостаза на широкий спектр возможных сосудистых повреждений. Основным механизмом роста тромба в условиях высоких скоростей сдвига являются адгезия и агрегация тромбоцитов. Известно, что артериальные тромбы обладают существенной пространственной гетерогенностью, которую связывают с неоднородностью распределения активаторов тромбоцитов в структуре тромба. Пространственно-временная динамика молекул-участников тромбообразования зависит от параметров переноса этих веществ в тромбе. Для исследования динамики формирования артериальных тромбов сегодня активно применяются континуальные модели, представляющие тромб как пористую среду. Однако при выборе параметров таких моделей исследователи сталкиваются с большой неопределенностью, вызванной противоречивыми экспериментальными данными. Данный обзор посвящен анализу литературных данных о физических параметрах артериального тромба как пористой среды. Особое внимание уделяется анализу параметров для внешней части тромба — так называемой оболочки, которая в целом характеризуется более высокими значениями пористости и проницаемости.

Ключевые слова: тромбоциты, артериальный тромбоз, проницаемость, пористость, поток плазмы, явления переноса.

DOI: 10.31857/S0006302924010157, EDN: QVGMHS

При повреждении сосудистой стенки в условиях артериальных скоростей сдвига происходит образование так называемого белого тромба — агрегата из тромбоцитов [1, 2]. Для исследования данного процесса активно применяется широкий арсенал методов — от животных моделей, позволяющих наблюдать процесс образования тромба в живом организме [3–5], до компьютерных моделей, при помощи которых можно анализировать различные сценарии данного процесса в зависимости от разнообразных параметров [6–10].

В течение последнего десятилетия было установлено, что артериальные тромбы, возникающие в ответ на непроницающие повреждения как микро-, так и макрососудов животных, характеризуются существенной гетерогенностью [11, 12], которую связывают с неоднородностью распределения ключевых молекул-активаторов тромбо-

цитов. Причины такой гетерогенности тромбов остаются предметом активных исследований, и для выяснения механизмов данного явления активно применяются компьютерные модели [13–16].

В работах группы Л. Брасса была сформирована парадигма ядра и оболочки (core-and-shell), предполагающая, что тромб состоит из двух существенно различных частей: ядра тромба (thrombus core), локализованного вблизи зоны повреждения сосуда, с плотно упакованными и сильно активированными тромбоцитами, и внешней части тромба — оболочки (thrombus shell), характеризующейся рыхло упакованными слабо активированными тромбоцитами [11].

Объем оболочки тромба, как правило, значительно превышает объем ядра, что делает анализ ее свойств и динамики особенно интересным для

понимания механизмов окклюзии, т.е. перекрытия тромбом просвета сосуда, приводящего к приостановке кровоснабжения соответствующих тканей. Тромбоциты оболочки имеют дискоидную форму [11]. Оболочка демонстрирует высокую динамичность, которую связывают со сравнительно низкой степенью активации интегринов [17, 18], низкой активностью тромбоина и, как следствие, минимальным количеством фибрина [11].

Одним из возможных механизмов резкого уменьшения активности тромбоина во внешних слоях тромба является сравнительно высокая скорость конвекционного переноса ввиду относительно высокой проницаемости рыхлой оболочки для потока плазмы. Так как прямой экспериментальный анализ пространственно-временной динамики активности тромбоина и других веществ в тромбе сталкивается с существенными техническими сложностями, для изучения этих процессов активно применяются теоретические подходы [15, 16, 18].

Пространственно-временная динамика концентрации молекул в тромбе зависит от скорости их образования, ингибирования, связывания с мембранами клеток, а также процессов переноса — диффузии и конвекции.

Диффузия и конвекция частиц в пористой среде имеют особенности, связанные с наличием в среде барьеров, непроницаемых для частиц (в случае тромба такими барьерами служат тромбоциты). При простейшем подходе для описания диффузии в уравнениях переноса можно использовать либо молекулярный коэффициент диффузии, либо «эффективный коэффициент диффузии», который зависит от молекулярного коэффициента диффузии, пористости и извилистости (tortuosity) траекторий частиц в пористой среде (см. формулу (46) в работе [19]). Одним из удобных параметров, характеризующих особенности переноса, является число Пекле, равное отношению конвекционного и диффузионного потоков вещества.

Исследования показывают, что при достаточном высоких числах Пекле (>1) начинает проявляться механизм «дисперсии»: огибая гранулы твердой фазы, частица эффективно диффундирует в направлении, параллельном и перпендикулярном потоку, с коэффициентом диффузии, зависящем от размера гранул и скорости потока [19].

В данном обзоре основное внимание уделяется вопросам определения параметров тромбов, которые влияют в первую очередь на скорость конвекционного переноса веществ, а именно пористости и проницаемости.

Так как в ядре тромба наблюдаются низкие значения пористости, а также может присутство-

вать существенное количество фибрина, конвекционный перенос в данной области тромба представляется существенно затрудненным. В данном обзоре мы будем акцентировать внимание на параметрах конвекционного транспорта во внешней части тромба, которая преимущественно состоит из дискоидных тромбоцитов и, возможно, характеризуется достаточно высокими значениями проницаемости для потока.

ЭЛЕМЕНТЫ ТЕОРИИ

С точки зрения гидродинамики, пористая среда характеризуется двумя ключевыми параметрами: пористостью и проницаемостью. Пористость среды — это отношение не занятого частицами среды объема среды к ее геометрическому объему. В случае тромба пористость будет равняться отношению объема, занятого плазмой крови, к объему всего тромба. Проницаемость среды — это мера способности среды пропускать жидкость. Среда с низкой проницаемостью оказывают большее гидродинамическое сопротивление потоку, и при фиксированном перепаде давления потоки жидкости в них медленнее, чем в средах с высокой проницаемостью. Для тромбов, которые растут в условиях примерно постоянного падения давления на краях сосуда [20], это означает, что чем выше проницаемость тромба, тем выше будет поток плазмы в нем, а значит, тем выше будет роль конвекции в переносе растворимых активаторов тромбоцитов, в первую очередь тромбоина, АДФ и тромбоксана А₂. Таким образом, проницаемость тромба может существенно влиять на процессы активации тромбоцитов и, как следствие, на процесс роста тромба. Именно эта связь делает выяснение реального значения проницаемости артериальных тромбов важной научной задачей.

В общем случае для пористых сред проницаемость зависит от пористости среды и формы частиц твердой фазы. Для описания зависимости между пористостью и коэффициентом проницаемости широко используется модель Козени—Кармана [21]. Современные экспериментальные исследования и сравнительные обзоры показывают, что эта модель дает адекватные предсказания проницаемости среды в широком диапазоне пористостей, размеров частиц и чисел Рейнольдса [22, 23].

Теоретическая связь между пористостью и проницаемостью тромбов. Уравнения Козени—Кармана. Уравнение Козени—Кармана использует приближение ламинарного потока внутри однородной пористой среды и представляет собой следующую связь между проницаемостью среды, ее пористостью и геометрией образующих ее частиц [21]:

Таблица 1. Расчет проницаемости оболочки тромба по модели Козени–Кармана как функции пористости (1)

Пористость	Проницаемость, мкм ²
0.8	0.369
0.7	0.110
0.6	0.039
0.5	0.0144
0.4	0.00512
0.3	0.00159
0.2	0.000360
0.1	0.0000356
Пористость	Проницаемость, мкм ²

Примечание. $D_p = 2.67$ мкм, $\Phi = 0.853$.

$$k = \Phi_s^2 \cdot \varepsilon^3 \cdot D_p^2 / (180 \cdot (1 - \varepsilon)^2), \quad (1)$$

где k – коэффициент проницаемости среды, Φ_s – сферичность частиц среды (отношение площади поверхности сферы того же объема к площади поверхности частицы среды [24]), ε – пористость среды, D_p – диаметр сферических частиц, равных по объему частицам среды.

Для частиц с формой сплюсненного эллипсоида, какими и являются неактивированные или слабо активированные тромбоциты в оболочке тромба, имеет место следующая формула для сферичности:

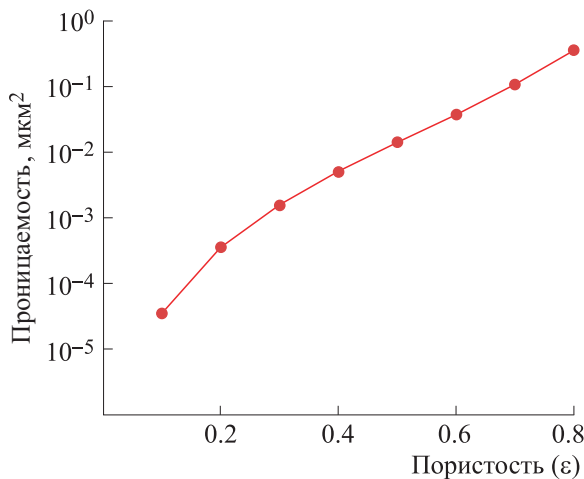


Рис. 1. Зависимость между проницаемостью и пористостью тромба. Проницаемость тромба рассчитывалась на основе пористости тромба при помощи модели Козени–Кармана по формуле (1). Параметры тромбоцитов указаны в тексте.

$$\Phi = 2 \cdot \frac{(a \cdot b^2)^{\frac{1}{3}}}{a + \ln \left(\left(a + (a^2 - b^2)^{\frac{1}{2}} \right) / b \right) \cdot \frac{b^2}{(a^2 - b^2)^{\frac{1}{2}}}}, \quad (2)$$

где a – большая полуось эллипсоида, b – малая полуось эллипсоида. Для тромбоцита человека можно положить $a = 1$, $b = 0.4$ [15]. Расчет по формуле (2) дает значение сферичности тромбоцита человека 0.853.

Для оценки «эффективного» диаметра тромбоцита человека D_p оценим объем человеческого тромбоцита в 10 фл [25]. Тогда $D_p = 2.67$ мкм.

Используя формулу (1) и оценки эффективного сферичности тромбоцита и его диаметра легко получить теоретическую оценку для проницаемости оболочки тромбоцитарного тромба в зависимости от ее пористости (табл. 1, рис. 1).

Таким образом, для описания проницаемости агрегата из эллипсоидных тромбоцитов необходимо знать пористость такого агрегата. Следует отметить, что теоретически такая пористость может лежать в достаточно широких диапазонах: известно, что так называемые случайные упаковки твердых эллипсоидных частиц равного размера могут иметь очень низкую пористость – вплоть до значений порядка 0.26 [26].

Также следует отметить, что применение уравнений (1) и (2) для реальных тромбоцитарных агрегатов подразумевает равный размер тромбоцитов и постоянные значения отношений их полуосей, что, безусловно, является достаточно грубым приближением. Таким образом, эффекты, связанные с достаточно широким распределением тромбоцитов по размерам, требуют дополнительного теоретического анализа.

Закон Дарси и уравнения Бринкмана. Для расчета потоков жидкости в пористых средах широко используются закон Дарси [27] и уравнения Бринкмана [28].

Для пористой среды цилиндрической формы закон Дарси утверждает, что объемный расход жидкости, текущей через среду Q , пропорционален градиенту давления в пористой среде и может быть вычислен по формуле:

$$Q = -k \cdot (A \cdot \Delta P) / (\eta \cdot L), \quad (3)$$

где k – проницаемость среды, η – вязкость жидкости, ΔP – падение давления на краях среды, L – длина цилиндра, A – поперечная площадь цилиндра. В случае окклюзивного или субокклюзивного (значительно перекрывающего поток в сосуде) тромба это выражение позволяет на основе данных о проницаемости тромба, его геометрии и перепаде давления грубо оценить как общий поток, так и характерную скорость плазмы, текущей через тромб.

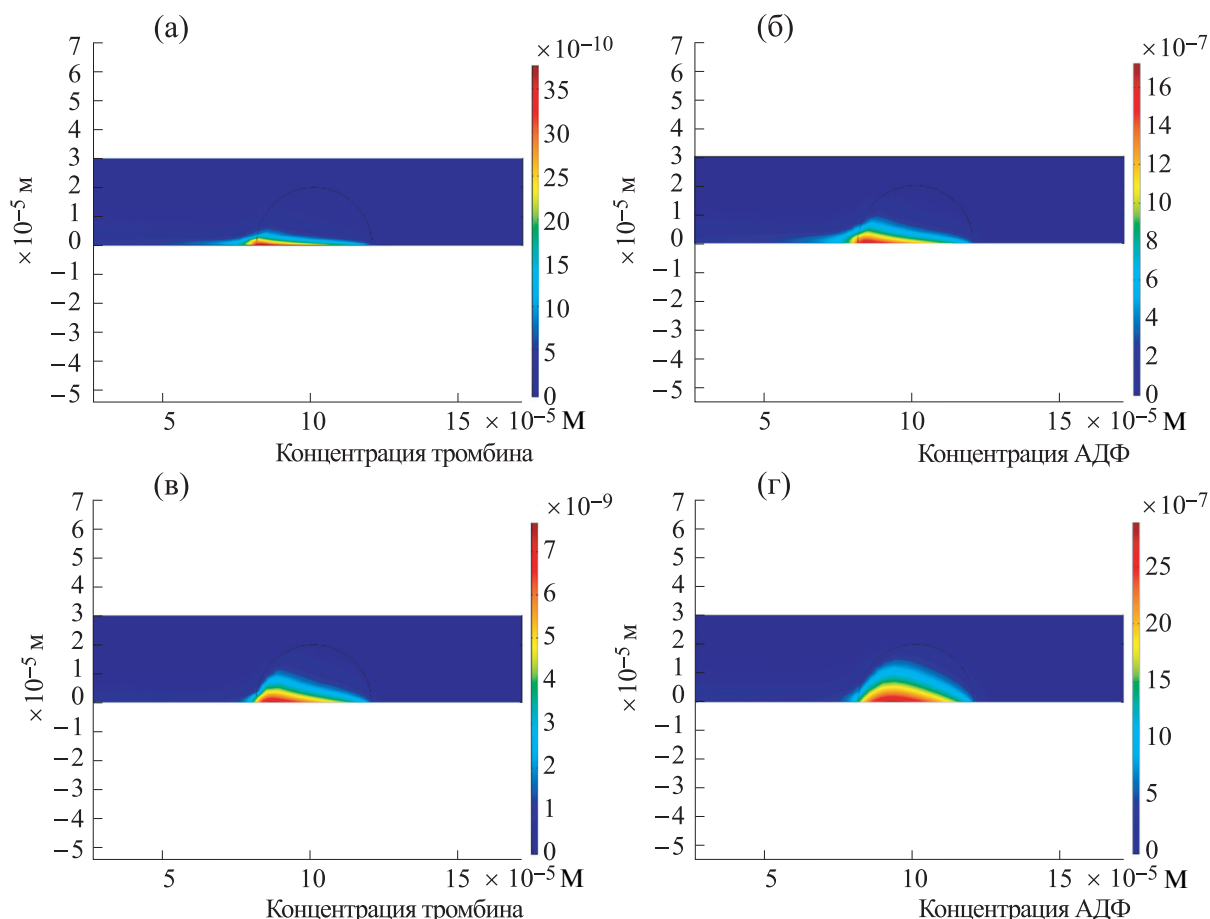


Рис. 2. Стационарные профили активаторов тромбоцитов внутри однородного тромба в двумерной модели сосуда. Поток крови направлен справа налево. Радиус тромба 20 мкм, диаметр сосуда 30 мкм. Постоянный поток АДФ и тромбина генерировался в зоне основания тромба. (а) — Профиль тромбина, пористость тромба 0.7; (б) — профиль АДФ, пористость тромба 0.7; (в) — профиль тромбина, пористость тромба 0.5; (г) — профиль АДФ, пористость тромба 0.5. Параметры расчета указаны в табл. 2.

В более сложных случаях для согласованного решения уравнений гидродинамики внутри пористой среды и вне ее (например, при анализе поля скоростей в случае наличия тромба, закрывающего часть просвета сосуда) широко используются уравнения Бринкмана [28].

Влияние пористости тромба на стационарное распределение концентрации веществ в тромбе. Влияют ли существенно пористость и проницаемость тромба на концентрации активаторов тромбоцитов (тромбина, АДФ, тромбоксана А2) внутри тромба? Чтобы проиллюстрировать чувствительность пространственного распределения тромбина и АДФ к параметрам тромба как пористой среды, мы смоделировали распространение тромбина и АДФ внутри тромба в двумерном случае в условиях постоянного потока каждого из этих двух активаторов из стенки сосуда. Мы использовали два значения пористости тромба: 0.7 (рис. 2а,б) и 0.5 (рис. 2в,г). Моделирование проводили в пакете программ Comsol Multiphysics 5.4

(параметры модели в табл. 2). Проницаемость тромба рассчитывали на основе значения его пористости с использованием уравнения Козени—Кармана по формуле (1). Результаты моделирования наглядно демонстрируют, что уменьшение пористости тромба с 0.7 до 0.5 приводит примерно к двукратному падению максимальной концентрации активаторов тромбоцитов (тромбина и АДФ) внутри тромба, которое достигается в основании тромба, и намного более существенным изменениям концентрации в верхних слоях тромба. В тромбе с пористостью 0.7 активаторы были локализованы существенно ближе к стенке сосуда по сравнению с тромбами с пористостью 0.5. В целом данные результаты наглядно иллюстрируют, что профили активаторов тромбоцитов крайне чувствительны к пористости тромба. Таким образом, для адекватного анализа происходящих в тромбе процессов необходимо иметь надежные данные о значениях его пористости и проницаемости.

Таблица 2. Параметры для модели расчета профилей концентрации тромбина и АДФ

Параметр	Значение	Источник
Диаметр сосуда	30 мкм	
Длина сосуда	2635 мкм	На основе [20]
Радиус тромба	20 мкм	
Перепад давления на длине сосуда	720 Па	
Пристеночная скорость сдвига	1000 с ⁻¹	
Вязкость цельной крови	0.0034 Па·с	[39]
Вязкость плазмы крови	0.00125 Па·с	[40]
Коэффициент диффузии АДФ	23.7·10 ⁻¹¹ м ² /с	[18]
Коэффициент диффузии тромбина	6.7·10 ⁻¹¹ м ² /с	[18]
Поток АДФ из стенки сосуда	0.06·10 ⁻⁶ моль/(м ² ·с)	
Поток тромбина из стенки сосуда	0.065·10 ⁻⁹ моль/(м ² ·с)	

МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ТРОМБА КАК ПОРИСТОЙ СРЕДЫ

Прямые измерения пористости тромбов *in vivo* при помощи конфокальной микроскопии. В ставшей классической работе команды Л. Брасса из Университета Пенсильвании проводились прижизненные эксперименты по исследованию пористости тромбов, растущих в артериолах мышцы кремастера у мышей [11]. Рост тромба достигался либо прокалыванием стенки сосуда острой стеклянной микропипеткой, либо в результате повреждения стенки сосуда лучом лазера. В случае обоих типов ранения в зоне повреждения вырастал тромб с выраженной гетерогенной структурой. Тромб состоял из двух заметно отличавшихся зон: зоны ядра с плотно упакованными необратимо активированными тромбоцитами и зоны оболочки тромба с рыхло упакованными, слабо активированными тромбоцитами.

Для измерений авторы воспользовались спин-диск конфокальной микроскопией — технологией, позволяющей сочетать возможность наблюдения тонких оптических срезов с высокой чувствительностью флуоресцентной микроскопии [29]. Для оценки пористости ядра и оболочки тромба авторы использовали флуоресцентно меченые молекулы альбумина и декстрана, поскольку эти крупные молекулы не проникают внутрь тромбоцитов. Основная часть измерений была проведена с использованием декстрана, так как он считается биологически инертным, использовался в качестве контрастного агента в экспериментах *in vivo* и доступен в виде молекул разных размеров [30]. Пористость тромба определяли на основе данных об интенсивности флюо-

ресценции в зоне тромба и интенсивности флуоресценции в потоке крови с использованием следующей формулы:

$$\varepsilon = (T_{\text{platelets}} - T_{\text{background}}) / (1.54 \cdot (T_{\text{lumen}} - T_{\text{background}})), \quad (4)$$

где ε — пористость зоны тромба, $T_{\text{platelets}}$ — средняя интенсивность флуоресценции в этой зоне, T_{lumen} — средняя интенсивность флуоресценции в просвете сосуда, $T_{\text{background}}$ — средняя интенсивность флуоресценции фона во внесосудистом пространстве, 1.54 — эмпирический коэффициент, связанный с наличием эритроцитов в кровотоке. Зоны ядра и оболочки тромба определяли на основе данных о флуоресценции флуоресцентно меченых антител к Р-селектину (зона ядра) и интегринам $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (зона всего тромба). Разность между зонами тромба и ядра определяла зону оболочки тромба.

Результатом работы стало получение оценок пористости ядра и оболочки тромба с использованием молекул декстрана с разной массой (3, 10 и 70 кДа) и гидродинамическим радиусом (1.5, 2.7 и 6.4 нм соответственно). Измерения с использованием каждой из молекулы декстрана дали примерно одинаковую оценку пористости оболочки тромба в диапазоне 0.65–0.75. Для ядра тромба оценки разнились: более тяжелые молекулы декстрана (70 кДа) хуже проникали в ядро тромба и давали значение пористости ядра около 0.3; более легкие декстраны (3 и 10 кДа) давали значение пористости ядра 0.4–0.45.

Измерения с использованием флуоресцентно меченых молекул альбумина (гидродинамиче-

ский радиус 3.5 нм) дали оценку пористости для ядра тромба 0.4, а для оболочки тромба — 0.7.

В целом эти опыты дали важные оценки пористости оболочки и ядра тромба, а также оценки возможности проникновения биомолекул разных размеров внутрь этих двух существенно различных зон тромба.

Анализ кинетики переноса веществ внутри тромба с использованием биосенсора. В следующей работе тех же авторов [13] были проведены исследования кинетики транспорта веществ в двух зонах тромба — в ядре и оболочке. Для анализа кинетики использовался биосенсор, который представлял собой меченые модифицированным флуоресцеином молекулы альбумина: сенсор приобретал способность к флуоресценции только в ответ на облучение ультрафиолетовым светом с длиной волны 405 нм. Флуоресценцию сенсора детектировали с использованием конфокального флуоресцентного микроскопа. Свечение имело место только в зоне тромба из-за быстрого сноса активированного сенсора потоком. Внутри тромба падение интенсивности флуоресценции также объяснялось сносом сенсора потоком плазмы, текущей через тромб. Таким образом, измеряя динамику флуоресценции сенсора в ядре тромба и оболочке тромба можно сделать оценки «времени жизни» сенсора в этих двух существенно различных зонах.

Оказалось, что в ядре тромба «время полураспада» (характерное время, за которое интенсивность флуоресценции сенсора падает в два раза) составляло 2.6 с, тогда как в оболочке это время составляло 1.2 с. Авторы делают вывод, что, во-первых, транспорт растворимых веществ в тромбе значительно затруднен, и, во-вторых, ядро и оболочка тромба различаются по кинетике транспорта: внутри зоны ядра тромба растворимые молекулы задерживаются дольше, чем в зоне оболочки тромба.

Легко видеть, что «время полураспада», определяющее характерное время жизни молекулы сенсора в ядре/оболочке тромба, сильно зависит от геометрии и размеров этих зон тромба, а не только от их проницаемостей для потока. В случае если транспорт сенсора в тромбе определяется конвекцией, «время полураспада» будет определяться отношением l/v , где l — длина зоны тромба, v — скорость потока плазмы в ней. Если же транспорт сенсора в тромбе определяется диффузией, то «время полураспада» будет определяться отношением x^2/D , где x — характерный размер тромба, D — коэффициент диффузии сенсора.

Можно ли по полученным данным о кинетике падения сигнала флуоресцентных молекул в микрососудистом тромбе оценить его параметры как пористой среды? Для решения этой задачи авто-

ры статьи используют несколько теоретических подходов, в том числе модель, в которой тромб рассматривается как непрерывная пористая среда. Калибровка модели по экспериментальным данным привела авторов к следующим значениям пористости и проницаемости оболочки тромба: 0.4 и 10^{-4} мкм² соответственно [14]. Следует отметить, что полученное значение пористости 0.4 существенно отличается от величины, которую те же авторы получили на основе анализа экспериментальных данных ранее [11], а также от того значения пористости, которое они получили другим методом в этой же самой работе [13] (рис. 4с в работе [13], пористость оболочки тромба 0.8).

Здесь следует отметить, что характерные времена падения сигнала флуоресценции, которые авторы использовали при калибровке модели, получены усреднением экспериментальных данных по первым трем минутам тромбообразования. Анализ экспериментального видео из работы [13] свидетельствует о том, что характерное время падения сигнала во внешних слоях тромба зависит от времени. Так, в случае, когда с момента повреждения прошло около одной минуты (к этому моменту тромб обычно достигает максимального размера), характерное время падения сигнала оказывается почти в два раза меньше усредненного по трем минутам и составляет около 0.6 с. Проведенный нами анализ свидетельствует о том, что такое характерное время падения сигнала в модели переноса сенсора в однородном тромбе постоянной пористости можно получить при пористости 0.5 (и проницаемости 0.0144 мкм²), которая уже существенно ближе к экспериментальным значениям [11].

Следует отметить, что причина такой зависимости параметров транспорта в оболочке тромба от времени неясна и может быть связана как с изменением параметров оболочки, так и параметров ядра тромба, что требует дополнительного экспериментального и теоретического анализа.

Измерения объема тромба и массы «сухого вещества» в тромбе *in vitro*. В работе [31] проводились эксперименты по исследованию характеристик тромбов, растущих в проточных камерах. Эксперименты ставились с антикоагулированной цитратом, рекальцифицированной цельной кровью. Кровь прокачивалась либо над поверхностью с иммобилизованным фибриллярным коллагеном, либо над поверхностью с иммобилизованными фибриллярным коллагеном и тканевым фактором. Перед сбором изображений образцы были фиксированы при помощи раствора параформальдегида. Для анализа характеристик тромба собирали две серии z -стэков с шагом 0.1 мкм. Для получения z -стэков светопольных изображений использовали конденсор с низкой числовой апертурой 0.1 и зеленый светофильтр. Для по-

лучения z -стэков DIC-изображений использовали конденсор с числовой апертурой 0.9.

Математическая обработка полученных изображений позволяла получать информацию о массе сухого вещества в тромбе и объеме тромбов.

Для получения информации о массе сухого вещества тромба обрабатывали z -стэки светопольных изображений [32]. Информация о массе сухого вещества клеток и тромбов может быть извлечена из данных о фазовых сдвигах световых волн, проходящих через образец [33]. В свою очередь, обычная светопольная микроскопия позволяет получать данные о фазовых сдвигах благодаря применению уравнения транспорта интенсивности (TIE — transport of intensity equation) [34].

Для получения информации об объемах тромбов использовали DIC-микроскопию с преобразованием Гильберта (HT-DIC-микроскопия) [35]. Преобразование Гильберта — это математическое преобразование, которое позволяет отделить образец от фона на DIC-изображениях. При помощи этой методики определялись границы образца на каждом z -стэке DIC-изображений. На основе этих данных рассчитывались площадь сечения образца, а суммирование данных по всему z -стэку позволяло получить объем тромба.

Основными результатами стали оценки массы так называемого сухого вещества в *in vitro* тромбе, объема тромба и средней плотности сухого вещества в тромбе (отношение массы сухого вещества к объему тромба). Плотность сухого вещества в тромбах, выращенных на фибриллярном коллагене, составила 0.03 пг/мкм^3 . Плотность сухого вещества в тромбах, выращенных на фибриллярном коллагене при высокой концентрации тканевого фактора (1 нМ), составила 0.07 пг/мкм^3 . Возможной причиной сильного возрастания плотности сухого вещества в тромбах, растущих на тканевом факторе, авторы называют увеличение количества фибрина в тромбе.

Легко видеть, что объемная доля тромбоцитов в тромбе без фибрина равна $1 - \epsilon$, где ϵ — пористость тромба. Плотность сухого вещества в таком тромбе составит

$$(1 - \epsilon) \cdot \rho = (1 - \epsilon) \cdot M/V, \quad (5)$$

где ρ — плотность сухого вещества в тромбоците, M — масса сухого вещества в тромбоците, V — объем тромбоцита. Подставляя в эту формулу массу сухого вещества в тромбоците ($1.9 \pm 0.14 \text{ пг}$ [36]) и средний объем тромбоцита человека (10 фл [25]), легко оценить, что пористость тромбов, выращенных на фибриллярном коллагене, составляла 0.84 ± 0.07 , что грубо соотносится с результатами, полученными *in vivo* [11].

Анализ характеристик пористых тромбов на основании данных сканирующей электронной микроскопии тромбов. В работе [15] проводились экспе-

рименты по исследованию характеристик тромбов, растущих в проточных камерах. Эксперименты ставили с антикоагулированной цитратом, цельной человеческой и мышьиной кровью при скоростях сдвига $100\text{--}1000 \text{ с}^{-1}$. Образцы тромбов фиксировали и подвергали сканирующей электронной микроскопии. Полученные в результате изображения бинаризовали и обрабатывали при помощи программного пакета Matlab. Математическая обработка позволяла получить оценки пористости тромбов и распределение зазоров между тромбоцитами (gap size distribution). Эти данные использовали для моделирования упаковки тромбоцитов в тромбе, после чего проводили расчет гидродинамики в тромбе и сосудах.

Основными результатами работы стали оценки пористости тромбов, теоретический расчет скоростей плазмы внутри тромбов и теоретический анализ распределения концентрации тромбина в тромбе. По результатам обработки электронно-микроскопических изображений пористость тромбов оказалась равной примерно 0.1 для тромбов, выращенных как на мышьиной, так и на человеческой крови. Для скорости плазмы внутри тромба было получено значение порядка 1 мкм/с , для скорости плазмы в просвете сосуда расчет дал 3 мм/с . При анализе концентрации тромбина внутри тромба на основании оценки числа Пекле был сделан вывод о доминирующей роли диффузии в транспорте тромбина внутри тромба.

Значение пористости тромба, полученное в данной статье, заметно отличается от значений, полученных в экспериментах на мышах *in vivo* [11]. Причина таких расхождений может быть как в артефактах фиксации тромбоцитов для электронной микроскопии, так и в особенностях математической обработки изображений. Следует также отметить, что в зависимости от условия проведения эксперимента тромбы, формируемые *in vitro*, могут существенно отличаться от наблюдаемых *in vivo*: в случае сильной активации тромбоцитов возможно существенное изменение их формы и уплотнение тромба за счет контракции. Анализ изображений тромбов, полученных в данной работе, свидетельствует об отсутствии оболочки у описанных авторами *in vitro* тромбов: тромбоциты во внешней части тромба явно имеют высокую степень активации, так как наблюдается множество псевдоподий и практически отсутствуют тромбоциты дискоидной формы, которые преимущественно наблюдаются в оболочке тромбов *in vivo*.

Измерения проницаемости и пористости тромбов на основании *in vitro* опытов в проточной камере и капиллярной трубке. В работе [37] проводились эксперименты по оценке проницаемости и пори-

стости тромбов, растущих в проточной камере или в капиллярной трубке в условиях стеноза. В экспериментах использовали цельную свиную кровь с добавлением гепарина; поверхность камер была покрыта фибриллярным коллагеном I типа. Кровь прокачивали через камеры в двух режимах — в условиях постоянного перепада давления и постоянного потока. Выраставшие тромбы перекрывали зону стеноза; когда достигалась окклюзия, проницаемость тромбов рассчитывалась на основе закона Дарси по формуле (3).

Результатами работы стали оценки значений проницаемости окклюзивных тромбов в проточных камерах и капиллярных трубках. В условиях постоянного перепада давления авторы получили значения проницаемости в проточной камере $0.5 \pm 0.46 \text{ мкм}^2$, а в капиллярной трубке $(9.4 \pm \pm 5.9) \cdot 10^{-2} \text{ мкм}^2$.

Следует отметить, что, исходя из модели Козени–Кармана, полученные данные соответствуют достаточно высоким значениям пористости тромбов (табл. 1).

Расчет пористости и проницаемости пористых сред на основе анализа изображений. Исходя из доступности микроскопических фотографий сечений тромбов, представляет интерес применение методов обработки изображений для анализа характеристик тромбов. Один из возможных методов такого анализа описан в работе [38]. Авторы вводят индикаторную функцию $f(x)$, такую что $f(x) = 1$, если точка x лежит внутри частицы пористой среды (например, внутри тромбоцита), и $f(x) = 0$ в обратном случае. При обработке изображения роль точек играют пиксели. Можно показать, что среднее значение функции $\langle f(x) \rangle = \varepsilon$, где ε — пористость среды (например, пористость тромба) [38]. Далее авторы вводят двухточечную корреляционную функцию

$$f_2(x, \vec{r}) = f(x) \cdot f(x + \vec{r}), \quad (6)$$

где $\vec{r}$ — произвольный вектор. Для изотропной среды среднее значение этой функции по координате x

$$S(\vec{r}) = \langle f_2(x, \vec{r}) \rangle \quad (7)$$

зависит только от модуля расстояния $r = |\vec{r}|$. Таким образом, получается функция $S(r)$, которая дает основную информацию о свойствах пористой среды. Можно показать, что $S(0) = \varepsilon$, $S(\infty) = \varepsilon^2$, где ε — пористость среды. Далее $S'(0) = -s/4$, где s — удельная поверхность пористой среды (площадь поверхности среды на единицу объема). Для оценки проницаемости на основе данных об удельной площади поверхности и пористости среды можно воспользоваться одной из формул Козени–Кармана

$$k = \varepsilon^2 / (2Fs^2), \quad (8)$$

где k — проницаемость пористой среды, s — удельная площадь поверхности, F — фактор формации (formation factor). Для оценки фактора формации можно воспользоваться формулой

$$F = \varepsilon^{-m}, \quad (9)$$

где m — константа, зависящая от формы частиц среды (для сферических частиц $m = 1.5$).

Для получения точных результатов требуется оптимальный выбор увеличения микроскопа. Сравнивая показания описанного метода с экспериментом, авторы показали, что для адекватной оценки пористости требуются изображения, содержащие 10–100 частиц пористой среды. Для адекватной оценки проницаемости требуются изображения с высоким увеличением, содержащие всего 1–3 частицы пористой среды.

Учитывая большое количество изображений срезов тромбов высокого разрешения, полученных в экспериментах *in vivo* при помощи электронной микроскопии, авторам представляется актуальным анализ таких снимков при помощи описанного выше подхода.

Измерение проницаемости тромбов с различным содержанием фибрина. Коронарные тромбы, извлекаемые у пациентов после инфаркта, имеют высокое (около 50%) содержание фибрина [41]. В работе [42] были проведены измерения проницаемости как фибриновых гелей с объемной долей фибриновых волокон в диапазоне 0.02–0.54, так и агрегатов тромбоцитов с высоким содержанием фибрина. Фибриновые гели получали путем добавления 10 нМ тромбина к растворам фибриногена в диапазоне концентраций 3–156 мг/мл. Агрегаты тромбоцитов с фибрином получали путем добавления 10 нМ тромбина к плазме крови с содержанием тромбоцитов в диапазоне $7 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^7$ клеток/мкл. Проницаемость гелей и агрегатов измеряли на основе измерения потока через них на основе закона Дарси (уравнение (3)).

Для теоретической оценки проницаемости фибриновых гелей использовали уравнение Дэвиса [43]

$$\frac{k}{a_f^2} = \left[16 \cdot \phi^{1.5} \cdot (1 + 56 \cdot \phi^3) \right]^{-1}, \quad (10)$$

где k — проницаемость геля, a_f — радиус фибринового волокна, ϕ — объемная доля волокон в геле.

Результаты измерений показали, что проницаемость фибриновых гелей изменяется на $\ln \ln$ порядка при изменении объемной доли фибрина с 0.02 до 0.54: от $120 \cdot 10^{-3}$ до $0.15 \cdot 10^{-3} \text{ мкм}^2$ соответственно. Результаты измерений были в хорошем согласии с теоретическим соотношением (10).

Для теоретической оценки проницаемости тромбов с фибрином использовался подход Этье-

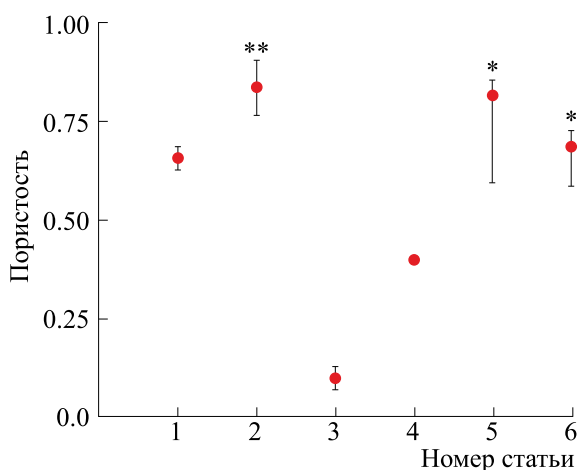


Рис. 3. Литературные данные по пористости тромбов. Номер источника на оси абсцисс соответствует номеру источника в табл. 3. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, за исключением точки № 4 (в соответствующей ей статье отсутствуют данные об ошибке); * — значения пористости пересчитаны на основе приведенных в статье данных о проницаемости тромбов по формуле (1), ** — значения пористости пересчитаны на основе приведенных в статье данных о плотности сухого вещества в тромбе по формуле (5).

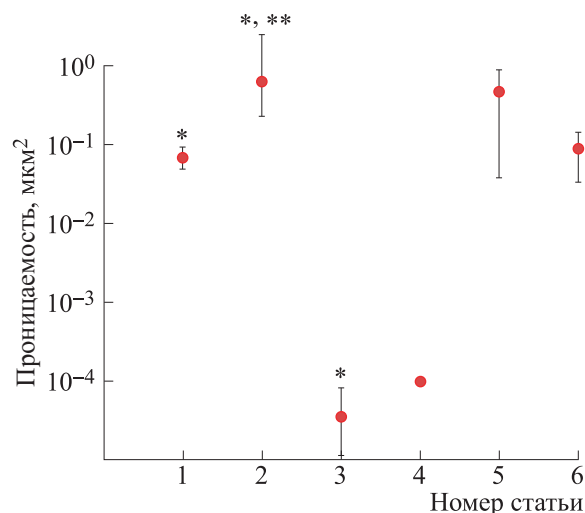


Рис. 4. Литературные данные по проницаемости тромбов. Номер источника на оси абсцисс соответствует номеру источника в табл. 4. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, за исключением точки № 4 (в соответствующей ей статье отсутствуют данные об ошибке); * — значения проницаемости пересчитаны на основе приведенных в статье данных о пористости тромбов по формуле (1), ** — значения проницаемости пересчитаны на основе приведенных в статье данных о плотности сухого вещества в тромбе по формуле (5).

ра [44]. В нем для расчета потока через среду с волокнами вместо уравнения Дарси используется уравнение Бринкмана следующего вида:

$$\mu \cdot \nabla^2 v - \mu \cdot \frac{v}{k_f} - \nabla P = 0, \quad (11)$$

где μ — вязкость жидкости, v — скорость жидкости, k_f — проницаемость фибринового геля, P — локальное давление.

Результаты измерений показали, что тромбы с фибрином с объемной долей тромбоцитов в диапазоне 0.01–0.61 и объемной долей волокон фибрина 0.03 имеют проницаемость $1.1 \cdot 10^{-2}$ – $1.5 \cdot 10^{-5}$ мкм². Результаты измерений были в хорошем соответствии с теоретическим расчетом на основе уравнения (11).

Результаты данной работы позволяют предположить, что как наличие фибрина, так и высокая плотность упаковки тромбоцитов в ядре тромба приводят к тому, что проницаемость данной области тромба на несколько порядков меньше, чем в его оболочке, что делает явления конвекционного транспорта пренебрежимо малыми по сравнению с диффузионным транспортом ($Pe < 1$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на наличие немалого пула экспериментальных данных, по-прежнему затруднитель-

но сделать однозначный вывод о вкладе конвекционного переноса во внешних слоях тромба на пространственно-временную динамику ключевых активаторов тромбоцитов. Для наглядного представления литературных данных мы постарались графически представить данные, касающиеся измеренных и оцененных значений пористости и проницаемости внешней части тромба (рис. 3 и 4, табл. 3 и 4). Легко увидеть, что наблюдаются значительный разброс данных по пористостям тромбов и еще более впечатляющий разброс данных по их проницаемостям (большую часть из которых мы пересчитали на основе измерений пористости по формуле (1)). Тем не менее большинство данных указывает на то, что значения пористости в оболочке тромба принимает значение более 0.5, а проницаемости — более 0.01 мкм². В случае артериальных скоростей сдвига такие параметры соответствуют достаточно высоким значениям скорости плазмы во внешних слоях тромба, оказывающим существенное влияние на распределение крупных молекул с относительно низким коэффициентом диффузии, таких как тромбин (рис. 2). Таким образом, на наш взгляд, имеющиеся данные, скорее, свидетельствуют о существенном влиянии потока на перенос тромбина в оболочке гетерогенного тромба; однако данный вывод, безусловно, является спекулятивным.

Таблица 3. Значения пористости оболочки тромба на основе анализа и обработки литературных данных

№	Пористость тромба	Вид	Примечания	Источник
1	0.66	<i>Homo sapiens</i>	<i>In vivo</i> , оболочка тромба	[11]
2	0.84**	<i>Homo sapiens</i>	<i>In vitro</i> , цитратная кровь	[31]
3	0.1	<i>Mus musculus</i> / <i>Homo sapiens</i>	<i>In vitro</i> , цитратная кровь	[15]
4	0.4	<i>Mus musculus</i>	<i>In vivo</i> , оболочка тромба	[13, 14]
5	0.82*	<i>Sus domesticus</i>	<i>In vitro</i> , проточная камера, цельная кровь с гепарином	[37]
6	0.69*	<i>Sus domesticus</i>	<i>In vitro</i> , капиллярная трубка, цельная кровь с гепарином	[37]

Примечание. * — Значения пористости пересчитаны на основе приведенных в статье данных о проницаемости тромбов по формуле (1), ** — значения пористости пересчитаны на основе приведенных в статье данных о плотности сухого вещества в тромбе по формуле (5).

Таблица 4. Значения проницаемости оболочки тромба на основе анализа и обработки литературных данных

№	Проницаемость тромба, мкм ₂	Вид	Примечания	Источник
1	0.0716*	<i>Homo sapiens</i>	<i>In vivo</i> , оболочка тромба	[11]
2	0.667*,**	<i>Homo sapiens</i>	<i>In vitro</i> , цитратная кровь	[31]
3	$3.558 \cdot 10^{-5}$ *	<i>Mus musculus</i> / <i>Homo sapiens</i>	<i>In vitro</i> , цитратная кровь	[15]
4	0.0001	<i>Mus musculus</i>	<i>In vivo</i> , оболочка тромба	[13, 14]
5	0.5	<i>Sus domesticus</i>	<i>In vitro</i> , проточная камера, цельная кровь с гепарином,	[37]
6	0.094	<i>Sus domesticus</i>	<i>In vitro</i> , капиллярная трубка, цельная кровь с гепарином	[37]

Примечание. * — Значения проницаемости пересчитаны на основе приведенных в статье данных о проницаемости тромбов по формуле (1), ** — значения проницаемости пересчитаны на основе приведенных в статье данных о плотности сухого вещества в тромбе по формуле (5).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-24-01028.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jackson S. P. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, **109** (12), 5087–5095 (2007).
2. Пантелеев М. А. и Свешникова А. Н. Тромбоциты и гемостаз. *Онкогематология*, **9** (2), 65–73 (2014).

3. Westrick R. J., Winn M. E., and Eitzman D. T. Murine models of vascular thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **27** (10), 2079–2093 (2007).
4. Sachs U. J. and Nieswandt B. *In vivo* thrombus formation in murine models. *Circ. Res.*, **100** (7), 979–991 (2007).
5. Furie B. and Furie B. C. Thrombus formation *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, **115** (12), 3355–3362 (2005).
6. Grande Gutierrez N., Mukherjee D., and Bark D., Jr. Decoding thrombosis through code: a review of computational models. *J. Thromb Haemost.*, **22** (1), 35–47 (2024). DOI: 10.1016/j.jtha.2023.08.021
7. Nechipurenko D. Y., Shibeko A. M., Sveshnikova A. N., and Panteleev M. A. In Silico Hemostasis Modeling and Prediction. *Hamostaseologie*, **40** (4), 524–535 (2020).
8. Panteleev M. A., Andreeva A. A., and Lobanov A. I. Differential Drug Target Selection in Blood Coagulation: What can we get from Computational Systems Biology Models? *Curr. Pharm. Des.*, **26** (18), 2109–2115 (2020).

9. Shibeko A. M. and Pantelev M. A. Untangling the complexity of blood coagulation network: use of computational modelling in pharmacology and diagnostics. *Brief Bioinform.*, **17** (3), 429–439 (2016).
10. Anand M., Pantelev M., and Ataulakhanov F. Computational models of hemostasis: Degrees of complexity. *Appl. Eng. Sci.*, **10**, 100103 (2022).
11. Stalker T. J., Traxler E. A., Wu J., Wannemacher K. M., Cermignano S. L., Voronov R., Diamond S. L., and Brass L. F. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood*, **121** (10), 1875–1885 (2013). DOI: 10.1182/blood-2012-09-457739
12. Welsh J. D., Poventud-Fuentes I., Sampietro S., Diamond S. L., Stalker T. J., and Brass L. F. Hierarchical organization of the hemostatic response to penetrating injuries in the mouse macrovasculature. *J. Thromb. Haemost.*, **15** (3), 526–537 (2017).
13. Welsh J. D., Stalker T. J., Voronov R., Muthard R. W., Tomaiuolo M., Diamond S. L., and Brass L. F. A systems approach to hemostasis: 1. The interdependence of thrombus architecture and agonist movements in the gaps between platelets. *Blood*, **124** (11), 1808–1815 (2014).
14. Tomaiuolo M., Stalker T. J., Welsh J. D., Diamond S. L., Sinno T., and Brass L. F. A systems approach to hemostasis: 2. Computational analysis of molecular transport in the thrombus microenvironment. *Blood*, **124** (11), 1816–1823 (2014).
15. Mirramezani M., Herbig B. A., Stalker T. J., Netter L., Cooper M., Weisel J. W., Diamond S. L., Sinno T., Brass L. F., Shadden S. C., and Tomaiuolo M. Platelet packing density is an independent regulator of the hemostatic response to injury. *J. Thromb. Haemost.*, **16** (5), 973–983 (2018). DOI: 10.1111/jth.13986
16. Xu S., Xu Z., Kim O. V., Litvinov R. I., Weisel J. W., and Alber M. Model predictions of deformation, embolization and permeability of partially obstructive blood clots under variable shear flow. *J. Roy. Soc. Interface*, **14** (136), 20170441 (2017).
17. Kaneva V. N., Dunster J. L., Volpert V., Ataulakhanov F., Pantelev M. A., and Nechipurenko D. Y. Modeling thrombus shell: linking adhesion receptor properties and macroscopic dynamics. *Biophys. J.*, **120** (2), 334–351 (2021).
18. Masalceva A. A., Kaneva V. N., Pantelev M. A., Ataulakhanov F., Volpert V., Afanasyev I., and Nechipurenko D. Y. Analysis of microvascular thrombus mechanobiology with a novel particle-based model. *J. Biomechanics*, **130**, 110801 (2022).
19. Tartakovsky D. M. and Dentz M. Diffusion in porous media: phenomena and mechanisms. *Transport in Porous Media*, **130**, 105–127 (2019).
20. Belyaev A. V., Pantelev M. A., and Ataulakhanov F. I. Threshold of microvascular occlusion: injury size defines the thrombosis scenario. *Biophys. J.*, **109** (2), 450–456 (2015).
21. Carman P. C. Fluid flow through a granular bed. *Trans. Inst. Chem. Eng. Lond.*, **15**, 150–156 (1937).
22. Urumović K. and Urumović Sr. K. The referential grain size and effective porosity in the Kozeny–Carman model. *Hydrol. Earth System Sci.*, **20** (5), 1669–1680 (2016).
23. Erdim E., Akgiray Ö., and Demir İ. A revisit of pressure drop-flow rate correlations for packed beds of spheres. *Powder Technol.*, **283**, 488–504 (2015).
24. Wadell H. Volume, shape, and roundness of quartz particles. *J. Geol.*, **43** (3), 250–280 (1935).
25. Giles C. The platelet count and mean platelet volume. *Br. J. Haematol.*, **48** (1), 31–37 (1981).
26. Donev A., Cisse I., Sachs D., Variano E. A., Stillinger F. H., Connelly R., Torquato S., and Chaikin P. M. Improving the density of jammed disordered packings using ellipsoids. *Science*, **303** (5660), 990–993 (2004). DOI: 10.1126/science.1093010
27. Darcy H. *Les fontaines publiques de la ville de Dijon: exposition et application des principes à suivre et des formules à employer dans les questions de distribution d'eau*, Ed. by V. Dalmont (Paris, 1856), vol. 1.
28. Brinkman H. C. A calculation of the viscous force exerted by a flowing fluid on a dense swarm of particles. *Flow, Turbulence and Combustion*, **1** (1), 27–34 (1949).
29. Thorn K. Spinning-disk confocal microscopy of yeast. *Methods Enzymol.*, **470**, 581–602 (2010).
30. Takizawa H., Nishimura S., Takayama N., Oda A., Nishikii H., Morita Y., Kakinuma S., Yamazaki S., Okamura S., Tamura N., Goto Sh., Sawaguchi A., Manabe I., Takatsu K., Nakauchi H., Takaki S., and Eto K. Lnk regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, **120** (1), 179–190 (2010). DOI: 10.1172/JCI139503
31. Baker-Groberg S. M., Phillips K. G., and McCarty O. J. Quantification of volume, mass, and density of thrombus formation using brightfield and differential interference contrast microscopy. *J. Biomed. Optics*, **18** (1), 016014 (2013).
32. Phillips K. G., Velasco C. R., Li J., Kolatkar A., Luttgen M., Bethel K., B. Duggan, P. Kuhn, and McCarty O. J. T. Optical quantification of cellular mass, volume, and density of circulating tumor cells identified in an ovarian cancer patient. *Front. Oncol.*, **2**, 72 (2012). DOI: 10.3389/fonc.2012.00072
33. Barer R. Interference microscopy and mass determination. *Nature*, **169**, 366–367 (1952).
34. Paganin D. and Nugent K. A. Noninterferometric phase imaging with partially coherent light. *Phys. Rev. Lett.*, **80**, 2586–2589 (1998).
35. Baker S. M., Phillips K. G., and McCarty O. J. Development of a label-free imaging technique for the quantification of thrombus formation. *Cell. Mol. Bioeng.*, **5**, 488–492 (2012).
36. Hartmann S., Krafft A., Huch R., and Breymann C. Effect of altitude on thrombopoietin and the platelet count in healthy volunteers. *Thromb. Haemost.*, **93** (1), 115–117 (2005).
37. Du J., Kim D., Alhawaal G., Ku D. N., and Fogelson A. L. Clot permeability, agonist transport,

- and platelet binding kinetics in arterial thrombosis. *Biophys. J.*, **119** (10), 2102–2115 (2020).
38. Blair S. C., Berge P. A., and Berryman J. G. Using two-point correlation functions to characterize microgeometry and estimate permeabilities of sandstones and porous glass. *J. Geophys. Res.: Solid Earth*, **101** (B9), 20359–20375 (1996).
 39. Ahmed M. U., Kaneva V., Loyau S., Nechipurenko D., Receveur N., Le Bris M., Janus-Bell E., Didelot M., Rauch A., Susen S., Chakfé N., Lanza F., Gardiner E. E., Andrews R. K., Panteleev M., Gachet Ch., Jandrot-Perrus M., and Mangin P. H. Pharmacological blockade of glycoprotein VI promotes thrombus disaggregation in the absence of thrombin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **40** (9), 2127–2142 (2020). DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314301
 40. Nader E., Skinner S., Romana M., Fort R., Lemonne N., Guillot N., Gauthier A., Antoine-Jonville S., Renoux C., Hardy-Dessources M.-D., Stauffer E., Joly Ph., Bertrand Y., and Connes P. Blood rheology: key parameters, impact on blood flow, role in sickle cell disease and effects of exercise. *Front. Physiol.*, **10**, 1329 (2019). DOI: 10.3389/fphys.2019.01329
 41. Silvain J., Collet J. P., Nagaswami C., Beygui F., Edmondson K. E., Bellemain-Appaix A., Cayla G., Pena A., Brugier D., Barthelemy O., Montalescot G., and Weisel J. W. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **57** (12), 1359–1367 (2011).
 42. Wufsus A. R., Macera N. E., and Neeves K. B. The hydraulic permeability of blood clots as a function of fibrin and platelet density. *Biophys. J.*, **104** (8), 1812–1823 (2013).
 43. Davies C. N. The separation of airborne dust and particles. *Inst. Mech. Eng. (Lond.)*, **B1**, 185–213 (1952).
 44. Ethier C. R. Flow through mixed fibrous porous materials. *J. AIChE*, **37**, 1227–1236 (1991).

Physical Parameters of Arterial Thrombus as a Porous Medium

E.S. Bershadsky*, ** and D.Yu. Nechipurenko*, ***, ****

*Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, ul. Srednyaya Kalitnikovskaya 30, Moscow, 109029 Russia

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

***Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

****Dmitry Rogachev National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, ul. Samory Mashela 1, Moscow, 117997 Russia

The formation of a hemostatic thrombus is a key response of the hemostasis system to a wide range of possible vessel injuries. The basic mechanism of thrombus formation at high shear rate is platelet adhesion and aggregation. It is known that arterial thrombi are spatially heterogeneous. Such heterogeneity is thought to be due to the heterogeneous distribution of the platelet activators inside the thrombus. Spatiotemporal dynamics of molecules, which are involved in thrombus formation, depends on rates at which the substrates are transported. To explore the dynamics of arterial thrombus formation, continuum models that represent the thrombus as a porous media are currently widely used. Still, choosing parameters for these models is complicated due to a high level of uncertainty in the published experimental data. This review is focused on the analyses of the literature data on physical parameters of the arterial thrombus as a porous medium. Special attention is paid to the parameters of the thrombus shell, which is generally characterized by the higher values of porosity and permeability.

Keywords: platelets, arterial thrombosis, permeability, porosity, blood plasma flow, transport phenomena

УДК 615.849.1

КОМПЛЕКСЫ ГАФНИЯ КАК ДОЗОПОВЫШАЮЩИЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ФОТОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ И КОНТРАСТНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ РАДИОЛОГИИ

© 2024 г. А.А. Липенгольц*, **, ***, В.А. Скрибицкий*, **, Ю.А. Финогенова*, ****, #,
А.Т. Шуляк***, *****, М.А. Абакумов*****, А.Ю. Быков***, Е.Ю. Григорьева*,
А.В. Смирнова*, *****, К.Е. Шпакова*, **, К.Ю. Жижин***, *****

*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина Минздрава России,
Каширское шоссе, 24, Москва, 115478, Россия

**Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Каширское шоссе, 31, Москва, 115409, Россия

***Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН,
Ленинский проспект, 31, Москва, 119991, Россия

****Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы,
ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198, Россия

*****МИРЭА — Российский технологический университет, проспект Вернадского, 78, Москва, 119454, Россия

*****Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава
России, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997, Россия

*****Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города
Москвы», Шоссе Энтузиастов, 86, Москва, 111123, Россия

#E-mail: b-f.finozenova@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.07.2023 г.

После доработки 26.09.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Гафний — химический элемент, являющийся перспективной основой рентгеноконтрастных средств и дозоповышающих агентов для лучевой терапии. В настоящее время отсутствуют препараты гафния, обладающие способностью к почечной экскреции из организма и пригодные для использования в лучевой терапии. В данной работе методами неорганической химии были синтезированы два комплекса гафния: с нитрилотриуксусной кислотой (Hf-NTA) и с 1,2-диаминоциклогексан-тетрауксусной кислотой (Hf-CDTA). Исследования токсичности полученных комплексов изучали на мышах линии C57Bl/6. Средняя летальная доза (LD_{50}) Hf-CDTA была оценена как 408 ± 64 мг Hf/кг, а Hf-NTA — менее 120 мг Hf/кг. Исследования биораспределения и контрастных свойств Hf-CDTA проводили *in vivo* методом микрокомпьютерной томографии на мышах линии C57Bl/6 с трансплантированной подкожной аденокарциномой молочной железы Ca755. Микрокомпьютерная томография мышей после внутривенного введения Hf-CDTA подтвердила контрастирующую способность и почечную экскрецию комплекса. Микрокомпьютерная томография области опухоли после однократного внутриопухолевого введения Hf-CDTA показала высокую концентрацию гафния и достаточно длительное удержание в опухоли для использования в лучевой терапии. Hf-CDTA продемонстрировал приемлемую токсичность и биораспределение у мышей с подкожными опухолями для биомедицинского применения в радиологии и лучевой терапии. Однако для применения в клинической практике состав Hf-CDTA должен быть улучшен с целью повышения растворимости в воде и снижения токсичности. Hf-NTA оказался непригоден для радиологического применения в связи с высокой токсичностью.

Ключевые слова: гафний, комплексы, токсичность, LD_{50} , визуализация, компьютерная томография, контрастное средство, фотонозахватная терапия.

DOI: 10.31857/S0006302924010163, **EDN:** QVANXR

Лучевая терапия — один из трех основных методов лечения злокачественных новообразований наряду с химиотерапией и хирургическим ле-

чением. В лучевой терапии активно применяются новые высокотехнологичные методы, такие как VMAT (volumetric modulated arc therapy), стерео-

Сокращения: ФЗТ — фотонозахватная терапия, ДПА — дозоповышающий агент, ФПД — фактор повышения дозы, NTA — нитрилотриуксусная кислота, Hf-CDTA — 1,2-диаминоциклогексан-тетрауксусная кислота, КТ — компьютерная томография, ЯМР — ядерная магнитно-резонансная спектроскопия.

таксическая лучевая терапия, терапия протонами и ионами углерода. Применение подобных инновационных методов значительно повысило эффективность лечения злокачественных новообразований, однако онкологические заболевания по-прежнему остаются серьезной медико-социальной проблемой и одной из ведущих причин смерти в мире.

Основным недостатком большинства видов дистанционной лучевой терапии является невозможность доставить тумороцидную дозу облучения за однократное облучение и необходимость фракционированного режима облучения. Для некоторых видов радиорезистентных опухолей (например, глиом) в принципе невозможно доставить необходимую для излечения пациента величину поглощенной дозы без повреждения окружающих здоровых тканей. Также при дистанционной лучевой терапии неизбежно поражение здоровых тканей вблизи злокачественного новообразования, связанное с необходимостью облучения возможных недиагностируемых опухолевых микроочагов вокруг опухоли.

Вышеописанные сложности отсутствуют в бинарных технологиях лучевой терапии, к которым относятся нейтронозахватная и фотонозахватная терапия (ФЗТ). Принцип бинарной лучевой терапии заключается в том, что для доставки необходимой дозы в объем опухоли используются два компонента: внешний источник ионизирующего излучения и препарат, содержащий дозоповышающий агент (ДПА) — химический элемент или изотоп, эффективно поглощающий данный используемый вид внешнего излучения. При взаимодействии ДПА с внешним излучением происходит локальное энерговыделение в области локализации препарата с ДПА в виде вторичного излучения и формирование поглощенной дозы. Благодаря фармакологическим свойствам препарат преимущественно накапливается в опухоли, обеспечивая существенно большее значение поглощенной дозы в опухоли (в 2–5 раз), чем в нормальных тканях. Препарат с ДПА не обладает собственным противоопухолевым действием и не оказывает токсического действия на организм, лишь взаимодействие внешнего ионизирующего излучения с ДПА создает необходимую поглощенную дозу в опухоли и обеспечивает терапевтический эффект. При этом величина и пространственное распределение поглощенной дозы в теле пациента определяются главным образом распределением препарата, содержащего ДПА [1–3].

При нейтронозахватной терапии в качестве внешнего излучения используются тепловые или эпитепловые нейтроны, а в качестве ДПА — стабильный изотоп бор-10 или гадолиний-157 [4]. Для ФЗТ используется рентгеновское излучение

и тяжелые элементы с $Z > 52$. С 2020 г. в Японии бор-нейтронозахватная терапия применяется в клинической практике как метод лечения неоперабельных, запущенных и рецидивирующих злокачественных опухолей головы и шеи, а также головного мозга. ФЗТ находится на фазе I клинических испытаний [5–7]. Основным ограничением к успешному применению ФЗТ для лечения злокачественных опухолей является отсутствие разрешенных опухолеспецифичных фармакологических субстанций, содержащих тяжелые элементы. Обнадешивающие результаты были получены при ФЗТ опухолей головного мозга с наночастицами золота и йодными рентгеноконтрастными средствами [8–10], но необходима разработка новых более эффективных препаратов для доставки ДПА в опухоли различной нозологии и локализации.

Фактор повышения дозы (ФПД) является ключевым понятием для ФЗТ, определяющим ее эффективность. ФПД определяется как отношение поглощенных доз в опухоли в присутствии и отсутствии ДПА:

$$\text{ФПД}(E, C, \psi) = \frac{D_{\text{ДПА}}(E, C, \psi)}{D_0(E, C, \psi)}, \quad (1)$$

где $D_{\text{ДПА}}$ — поглощенная доза в мишени, содержащей C ДПА мг/мл, облученной моноэнергетическим рентгеновским излучением с энергией E и флюенсом ψ ; D_0 — поглощенная доза в такой же мишени, не содержащей ДПА, облученной тем же рентгеновским пучком.

На рис. 1 представлены графики зависимости ФПД от энергии рентгеновского излучения для золота, йода и гафния, рассчитанные по массовому коэффициенту поглощения энергии [11]. Как

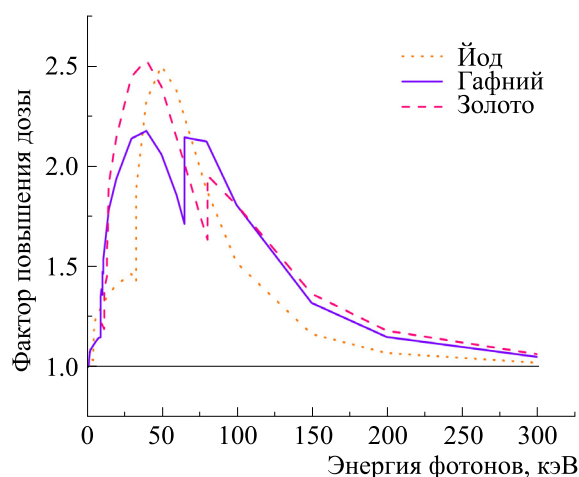


Рис. 1. Зависимость фактора повышения дозы от энергии рентгеновского излучения для йода (пунктирная линия), золота (штриховая линия), и гафния (сплошная линия).

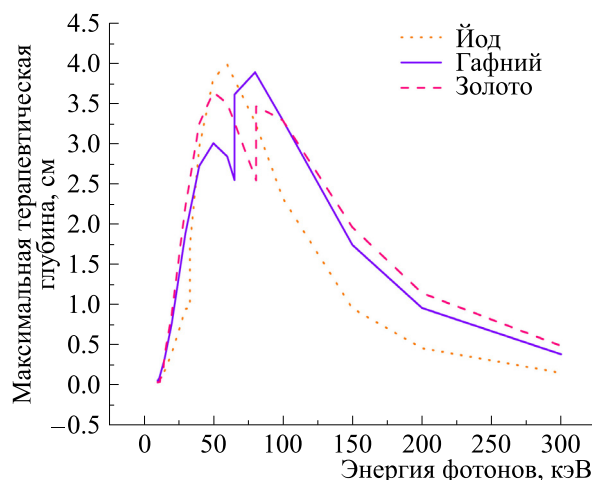


Рис. 2. Максимальная глубина, на которой доза в присутствии ДПА становится равной дозе на поверхности, в зависимости от энергии внешнего рентгеновского излучения, для различных ДПА: йода (пунктирная линия), золота (штриховая линия) и гафния (сплошная линия).

видно на графике, максимальное увеличение поглощенной дозы для всех трех элементов находится в диапазоне энергии фотонов от 20 до 60 кэВ. Однако фотоны данного энергетического диапазона существенно ослабляются в теле человека, поэтому такие пучки непригодны для лечения глубоко расположенных опухолей.

С целью определения оптимального диапазона энергии рентгеновского излучения для ФЗТ была рассчитана максимальная глубина, на которой поглощенная доза в присутствии ДПА становится равной дозе на поверхности (рис. 2). Как видно на графике, при энергии от 40 до 100 кэВ можно достичь глубины 3 см. Но для реализации ФЗТ с многопольным облучением предпочтительна более высокая энергия излучения. В диапазоне от 65 до 100 кэВ гафний обеспечивает ФПД выше, чем золото, а для фотонов с энергией выше 100 кэВ ФПД гафния сравним с золотом. Таким образом, гафний является перспективным дозоповышающим агентом для ФЗТ.

Единственный препарат на основе гафния, предназначенный для комбинированной лучевой терапии и одобренный для клинического применения, — NBTXR3 [12]. Этот препарат представляет собой наночастицы оксида гафния. Но вопрос о безопасности применения наночастиц в клинической практике окончательно не решен, и исследования токсикологических свойств наночастиц все еще продолжаются. По-прежнему актуальна разработка новых низкомолекулярных комплексов гафния, экскретируемых почками, для проведения радиобиологических исследований ФЗТ и в качестве основы для создания лекарственных средств с перспективой трансляции в клиническую лучевую терапию. В данной работе были синтезированы комплексы гафния с нитри-

лотриуксусной кислотой (Hf-NTA) и 1,2-диаминоциклогексан-тетрауксусной кислотой (Hf-CDTA). Для полученных комплексов были изучены острая токсичность *in vivo* и биораспределение методом компьютерной томографии (КТ). Структурные формулы соединений представлены на рис. 3 и 4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез и характеристика комплексов гафния. Подробное описание процессов синтеза и анализа комплексов гафния было опубликовано ранее [13].

Получение комплекса $Na_2[Hf(NTA)_2] \cdot 3H_2O$. Навеску нитрилотриуксусной кислоты (nitritotriacetic acid, NTA) с небольшим количеством гидроксида натрия растворяли в воде, после чего доводили значение pH раствора до 5.5 путем дополнительного добавления гидроксида натрия. После установления требуемого значения pH прибавляли навеску $HfOCl_2 \cdot 8H_2O$, при этом отмечалось небольшое помутнение. Раствор кипятили в течение 3 ч и упаривали до 30 мл. Охлажденный до комнатной температуры раствор центрифугировали при 3600 об/мин в течение 10 мин и декантировали. Полученный раствор упаривали до 10 мл и высаливали продукт добавлением этилового спирта. Полученные кристаллы промывали 95%-м этиловым спиртом, отфильтровывали и кипятили в спирте 30 мин. Суспензию охлаждали, осадок отфильтровывали и высушивали. В результате был получен комплекс Hf-NTA в виде белого кристаллического порошка.

Получение комплекса $[Hf-CDTA(H_2O)_2]$. Данный комплекс получали двумя разными способами.

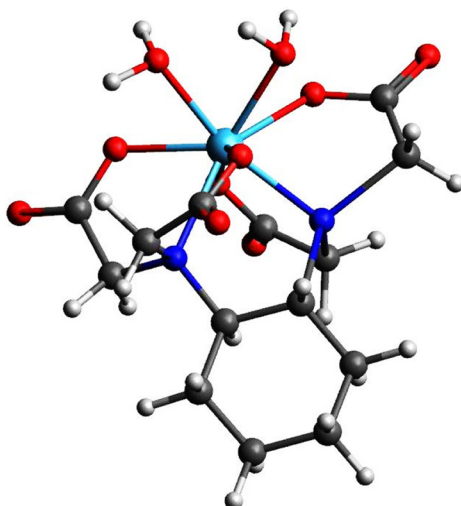


Рис. 3. Структурная формула комплекса Hf-CDTA. Бирюзовый — гафний, красный — кислород, светло-серый — водород, темно-серый — углерод, синий — азот.

Способ 1. Навеску 1,2-диаминоциклогексан-тетрауксусной кислоты (1,2-diaminocyclohexanetetraacetic acid, CDTA) с небольшим количеством гидроксида натрия растворяли в воде, pH получившегося раствора доводили до 3.5 путем добавления гидроксида натрия или соляной кислоты. После установления требуемого значения pH прибавляли навеску $\text{HfOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, при этом отмечалось небольшое помутнение. Раствор кипятили в течение 3 ч и упаривали до 30 мл. Охлажденный до комнатной температуры раствор центрифугировали при 3600 об/мин в течение 10 мин и декантировали. Полученный раствор упаривали до 10 мл и высаливали продукт добавлением ацетона. Перекристаллизовывали полученное соединение из 95% этилового спирта. В

результате был получен комплекс Hf-CDTA в виде белого кристаллического порошка.

Способ 2. Навески CDTA и HfBr_4 растворяли в воде, после чего доводили значение pH раствора до 7.0 путем добавления гидроксида натрия, при этом отмечалось помутнение. Затем раствор отфильтровывали через мембранный фильтр, кипятили в течение 3 ч и упаривали на роторном испарителе. Порошок тщательно промывали 90% этиловым спиртом. В результате был получен комплекс Hf-CDTA в виде белого кристаллического порошка.

Комплексы Hf-CDTA, полученные двумя разными методами, имели абсолютно идентичные физические, химические и фармакологические свойства, поэтому далее в тексте они упоминаются под единым названием Hf-CDTA.

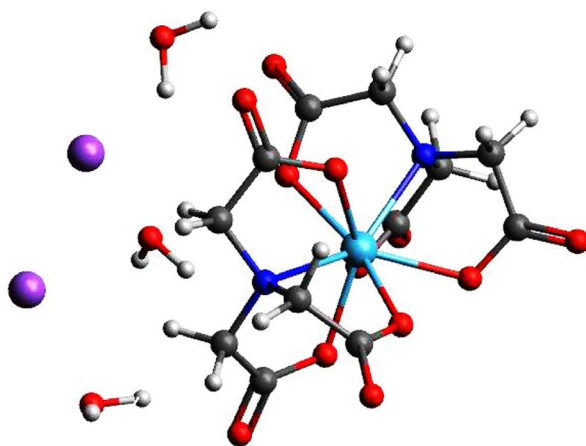


Рис. 4. Структурная формула комплекса Hf-NTA. Бирюзовый — гафний, красный — кислород, светло-серый — водород, темно-серый — углерод, синий — азот, пурпурный — натрий.

Характеристика комплексов. Полученные вещества Hf-NTA и Hf-CDTA были исследованы методами ядерной магнитно-резонансной спектроскопии (ЯМР), инфракрасной спектроскопии и рентгеноструктурного анализа.

Спектры ЯМР (^1H) растворов исследуемых веществ записывали на ЯМР-спектрометре Avance II-300 (Bruker, Германия) на частоте 300.21 МГц с внутренней стабилизацией по дейтерию, в качестве внешних стандартов использовали тетраметилсилан.

Инфракрасные спектры синтезированных соединений записывали на ИК-Фурье-спектрометре ИНФРАЛИОМ ФТ-02 (НПФ АП «Люмекс», Санкт-Петербург, Россия) в области 400–4000 см^{-1} с разрешением 1 см^{-1} ; образцы готовили в виде таблеток в KBr.

Рентгеноструктурный анализ соединений проводили на рентгеновском дифрактометре APEX-II CCD (Bruker, Германия), $\lambda_{\text{Mo}} = 0.71073 \text{ \AA}$.

Оценка острой токсичности комплексов гафния. Исследование острой токсичности синтезированных комплексов гафния при внутривенном введении проводили на мышах (самках) линии C57Bl/6 с массой тела 20–22 г. Исследуемые соединения Hf-NTA и Hf-CDTA разводили в 5%-м растворе глюкозы. Введенные дозы составили для Hf-NTA 112 и 269 мг Hf/кг, а для Hf-CDTA – 194 и 387 мг Hf/кг. Каждую дозу вводили шести мышам, критерием токсичности служила общая выживаемость животных. Все павшие мыши были подвергнуты патологоанатомическому исследованию. Полулетальную дозу (LD_{50}) определяли с помощью пробит-анализа в статистической среде R.

Компьютерная томография. Методом КТ была проведена прижизненная лучевая визуализация мышей (самок) линии C57Bl/6 с аденокарциномой молочной железы Ca755, трансплантированной подкожно на правую лапу. Компьютерная томография выполнена с помощью томографа IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer Inc., США). Во время сканирования животные находились в состоянии наркоза, вызванном воздушной смесью 2% изофлурана. КТ выполняли до введения соединений гафния (нативные сканы), через 1 мин после инъекции и далее через различные промежутки времени в течение 1 ч после инъекции. Исследовали два пути введения соединений гафния: внутривенный (100 мкл) и интратуморальный (50 мкл). В качестве препарата сравнения использовали раствор официального рентгеноконтрастного средства йопромид («Ультравист», Bayer, Германия) с концентрацией йода $[I] = 185 \text{ мг/мл}$, раствор вводили мышам внутривенно в объеме 150 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полулетальная доза (LD_{50}) для Hf-CDTA по результатам пробит-анализа составила $408 \pm 64 \text{ мг Hf/кг}$.

Для Hf-NTA наблюдалась 100% летальность животных при введении комплекса в дозах от 120 мг Hf/кг и выше. По результатам аутопсии были выявлены острая печеночная и почечная недостаточности, следствием чего являлись коронарная недостаточность и угнетение центральной нервной системы.

Поскольку средняя масса лабораторной мыши в эксперименте составляла 20 г, доза 120 мг Hf/кг соответствовала 2.4 мг для одной мыши. Такое количество гафния недостаточно для контрастного усиления при КТ, а также недостаточно для успешного применения комплекса в качестве ДПА при ФЭТ, поэтому исследование острой токсичности комплекса Hf-NTA было остановлено на данном этапе. Доза LD_{50} была оценена как составляющая менее 120 мг Hf/кг, но точное значение LD_{50} не было определено в эксперименте. Исследование биораспределения Hf-NTA методом КТ также не проводилось вследствие высокой токсичности комплекса, не позволяющей ввести лабораторным животным достаточное количество контрастного агента.

Для комплекса Hf-CDTA было проведено исследование контрастирующей способности и исследование биораспределения в организме лабораторных животных методом КТ. После внутривенной инъекции Hf-CDTA не было получено контрастного усиления внутренних органов, включая сердце и печень. Контрастное усиление экспериментальной опухоли также не наблюдалось. Однако органы мочевыделительной системы умеренно контрастировались: через 1 мин после инъекции лоханки почек содержали небольшое количество контрастного вещества. Постепенно, в течение времени наблюдения (1 ч), рентгеноплотность содержимого почечных лоханок увеличивалась. Кроме того, через 40 мин также умеренно контрастировалась паренхима почек (рис. 5).

В мочевом пузыре контрастное вещество определялось уже через 1 мин после инъекции, его количество также постепенно увеличивалось со временем (рис. 6).

Для сравнения контрастирующей способности была проведена КТ мышей с официальным йодсодержащим рентгеноконтрастным средством йопромид. После введения йопромидом сердце и печень мышей умеренно контрастировались, причем наибольших значений рентгеноплотность достигала сразу после введения (1 мин), а затем постепенно снижалась и возвращалась к нативному уровню к 37 мин. Почки зна-

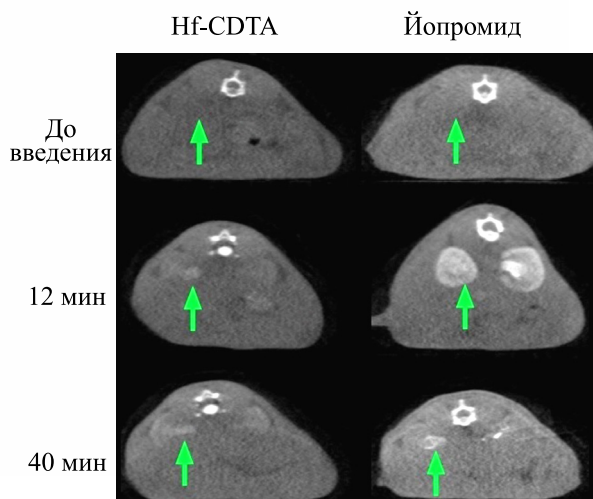


Рис. 5. Аксиальные КТ-срезы на уровне почек мыши до и после внутривенного введения Hf-CDTA и йопромид. Стрелкой указана лоханка левой почки.

чительно контрастировались сразу после инъекции, но через 23 мин рентгеноплотность почек резко снижалась (рис. 5). Мочевой пузырь также содержал контрастное вещество уже через 1 мин после инъекции (рис. 6). Экспериментальная опухоль после введения йопромид контрастное вещество не накапливала.

Полученные данные однозначно подтверждают экскрецию Hf-CDTA с мочой. Однако, по сравнению с йопромидом, экскреция Hf-CDTA замедлена. Рис. 7 и 8 отображают среднюю рентгеноплотность паренхимы и лоханок почек после внутривенного введения Hf-CDTA и йопромид,

приведенную ко введенной дозе контрастного агента. Hf-CDTA демонстрирует лучшую контрастирующую способность, в расчете на одинаковую введенную дозу. Однако исследованное вещество Hf-CDTA менее эффективно в качестве контрастного средства для КТ вследствие относительно высокой токсичности и низкой растворимости, что не позволяет ввести животным достаточное количество контрастного агента, сравнимое с йопромидом.

Контрастное усиление экспериментальной подкожной опухоли Ca755 не отмечалось после введения Hf-CDTA и йопромид. Вероятно, это

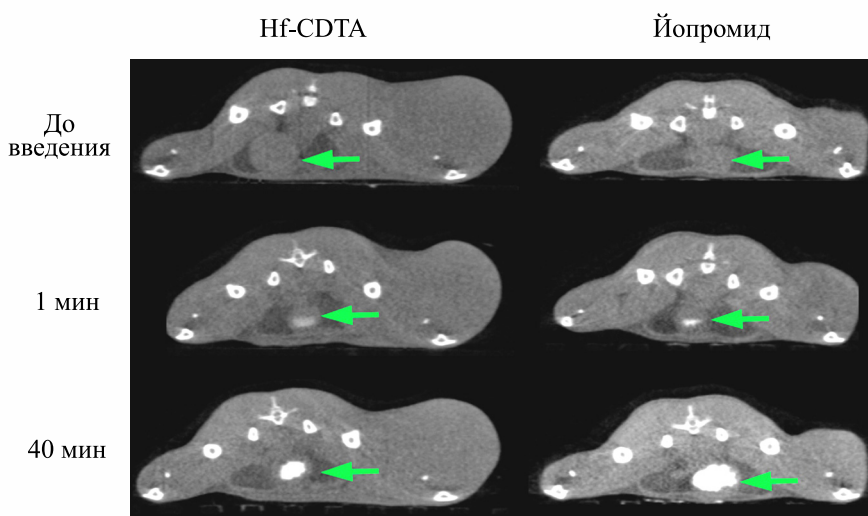


Рис. 6. Аксиальные КТ-срезы на уровне мочевого пузыря мыши до и после внутривенного введения Hf-CDTA и йопромид. Стрелка указывает на мочевой пузырь.

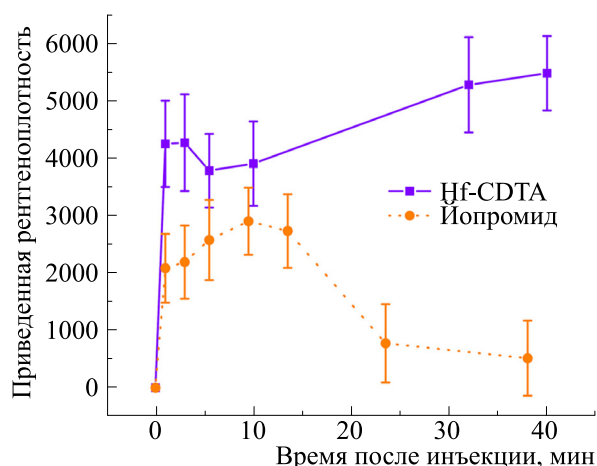


Рис. 7. Приведенная ко введенной дозе рентгеноплотность паренхимы почек в зависимости от времени после внутривенной инъекции Hf-CDTA (сплошная линия) и йопромидов (пунктирная линия).

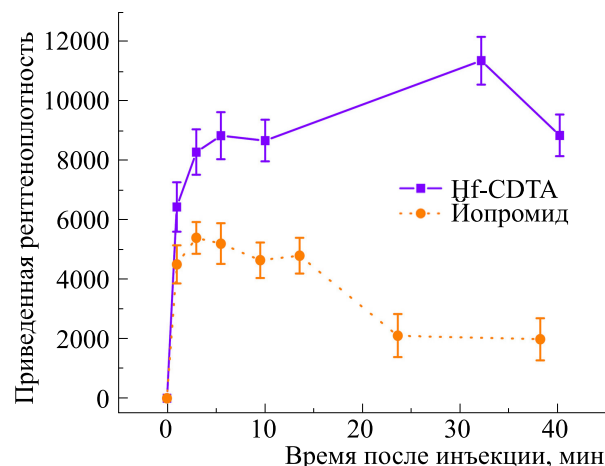


Рис. 8. Приведенная к введенной дозе рентгеноплотность содержимого почечных лоханок в зависимости от времени после внутривенной инъекции Hf-CDTA (сплошная линия) и йопромидов (пунктирная линия).

связано с малым объемом циркулирующей крови у мелких лабораторных животных, вследствие чего контрастное вещество слишком быстро выводится почками и не успевает накопиться в опухоли. Однако способность подкожной Са755 к накоплению контрастных средств была доказана ранее магнитно-резонансной томографией, имеющей большую чувствительность [14].

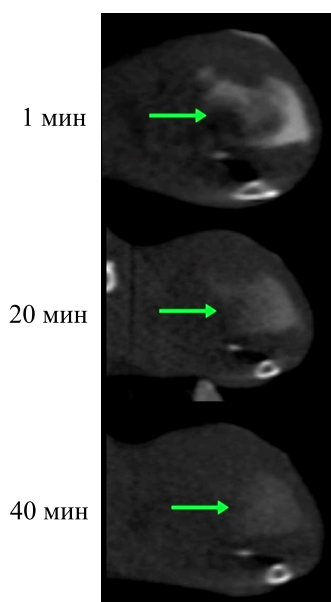


Рис. 9. Аксиальные КТ-срезы подкожной экспериментальной опухоли Са755 в различные временные точки после интратуморальной инъекции Hf-CDTA. Стрелки маркируют область в опухоли, содержащую контрастное вещество.

Для успешной ФЗТ необходимо удержание ДПА в объеме опухоли в течение времени терапевтического облучения, поэтому на следующем этапе была выполнена КТ мышей после интратуморальной инъекции Hf-CDTA (рис. 9). Через 1 мин после интратуморальной инъекции контрастное вещество было неомогенно распределено по объему опухоли в виде гиперденсных включений. Затем наблюдалось постепенное вымывание контрастного вещества: рентгеноплотность гиперденсных включений снижалась, контуры становились нечеткими. Однако небольшое количество контрастного вещества сохранялось в опухоли в течение всего времени наблюдения (1 ч).

Органы мочевыделительной системы контрастировались медленнее, чем после внутривенного введения. Через 5 мин после интратуморальной инъекции контрастное вещество определялось в почечных лоханках, а через 22 мин — в мочевом пузыре. Паренхима почек не контрастировалась, т.к. количество введенного контрастного вещества было меньше, чем при внутривенном введении. Контрастного усиления других внутренних органов и экспериментальной опухоли также не наблюдалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были синтезированы и исследованы два комплекса гафния — Hf-NTA и Hf-CDTA. Комплекс Hf-NTA продемонстрировал хорошую водорастворимость и стабильность как в физиологическом растворе, так и в 5%-м растворе глюкозы. Водный раствор Hf-NTA с концентрацией 80 мг Hf/мл был получен без каких-

либо технических сложностей. Однако острая токсичность данного комплекса слишком высока для радиобиологических исследований *in vivo*. Даже доза 120 мг Hf/кг была расценена как летальная (LD_{100}). Таким образом, Hf-NTA невозможно ввести в живой организм в достаточном количестве для КТ-визуализации или терапевтического применения в ФЗТ.

Комплекс Hf-CDTA показал лишь удовлетворительную растворимость в воде. Максимальная достигнутая концентрация составила 30 мг Hf/мл в физиологическом растворе и 44 мг Hf/мл в 5%-м растворе глюкозы. Однако комплекс обладает благоприятными токсикологическими свойствами: полулетальная доза (LD_{50}) составила 408 ± 64 мг Hf/кг, а максимальная переносимая доза — 185 ± 3 мг Hf/кг. Для КТ мышам внутривенно вводили Hf-CDTA в дозе 4 мг — это количество гафния соответствует нижнему пределу чувствительности КТ-сканера [15]. После внутривенного введения 100 мкл раствора Hf-CDTA ($[Hf] = 44$ мг/мл) на КТ-изображениях наблюдалось контрастное усиление почек и содержимого мочевого пузыря, что доказывает почечный путь экскреции комплекса и подтверждает его перспективность в качестве основы для разработки рентгеноконтрастных средств. Однако исследованный раствор Hf-CDTA имеет относительно высокую токсичность и низкое содержание контрастного агента по сравнению с официальными рентгеноконтрастными препаратами. Соединение Hf-CDTA нуждается в дальнейшей оптимизации и может являться платформой для разработки других лекарственных форм, таких как липосомы, клатраты и др. Содержание гафния в Hf-CDTA достаточно для успешного применения в ФЗТ [16]. Концентрация гафния (44 мг/мл) сравнима с концентрацией в препарате NBTXR3 (53.3 мг/мл), который проходит клинические испытания в качестве ДПА для лучевой терапии саркомы мягких тканей и рака головы и шеи [17, 18]. Пространственно-временные характеристики распределения и удержания Hf-CDTA в подкожной экспериментальной опухоли, оцененные методом КТ после интратуморального введения, также соответствуют условиям успешного проведения ФЗТ [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были синтезированы и исследованы два комплекса гафния — Hf-NTA и Hf-CDTA. Hf-NTA продемонстрировал высокую токсичность и был признан непригодным для использования в радиобиологических исследованиях. Hf-CDTA обладал умеренной токсичностью, но относительно низким содержанием гафния. КТ-исследование показало принципиаль-

ную возможность использования Hf-CDTA в качестве основы для рентгеноконтрастных средств, однако фармакологические свойства Hf-CDTA проигрывают современным йодсодержащим рентгеноконтрастным средствам. При интратуморальном введении препарата его распределение и удержание в опухоли соответствуют требованиям для ФЗТ злокачественных новообразований, что делает его перспективным для дальнейших исследований в области экспериментальной онкологии и лучевой терапии. Кроме того, комплекс Hf-CDTA может служить основой для разработки других лекарственных форм, таких как липосомы или клатраты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-13-00459).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные исследования проводились в соответствии с правовыми и этическими нормами работы с лабораторными животными и были одобрены локальным комитетом по этике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kulakov V. N., Lipengol'ts A. A., Grigor'eva E. Y., and Shimanovskii N. L. Pharmaceuticals for binary radiotherapy and their use for treatment of malignancies. *Pharm. Chem. J.*, **50** (6), 388–393 (2016). DOI: 10.1007/s11094-016-1457-3
2. Kulakov V. N., Lipengol'ts A. A., and Shimanovskii N. L., Pharmaceuticals for binary radiotherapy. *Russ. J. Gen. Chem.*, **83**, 2559–2564 (2013). DOI: 10.1134/S1070363213120542
3. Sheino I. N., Izhevskij P. V., Lipengolts A. A., Kulakov V. N., Wagner A. A., Sukhikh E. S., and Varlachev V. F. Development of binary technologies of radiotherapy of malignant neoplasms: condition and problems. *Bull. Siber. Med.*, **16** (3), 192–209 (2017). DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-192-209
4. Липенгольц А. А., Арнопольская А. М., Шейно И. Н. и Кулаков В. Н. Экспериментальное подтверждение противоопухолевой эффективности нейтронзахватной терапии с гадолинием. *Онкологический журн.*, **3** (2), 63–70 (2020). DOI: 10.37174/2587-7593-2020-3-2-63-70
5. Rose J. H., Norman A., Ingram M., Aoki C., Solberg T., and Mesa A. First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **45**

- (5), 1127–1132 (1999). DOI: 10.1016/S0360-3016(99)00347-8
6. Adam J.-F., Vautrin M., Obeid L., Tessier A., Prezado Y., Renier M., Nemoz Ch., Brochard Th., Bravin A., Bas J., Elleaume H., Berkvens P., Balosso J., and Estève F. Contrast-enhanced Synchrotron Stereotactic Radiotherapy Clinical Trials from a Medical Physicist Point of View. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **90**, S16–S17 (2014). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.05.103.
7. Lux F., Tran V. L., Thomas E., Dufort S., Rossetti F., Martini M., Truillet C., Doussineau T., Bort G., Denat F., Boschetti F., Angelovski G., Detappe A., Crémillieux Y., Mignet N., Doan B. T., Larrat B., Meriaux S., Barbier E., Roux S., Fries P., Müller A., Abadjian M. C., Anderson C., Canet-Soulas E., Bouziotis P., Barberi-Heyob M., Frochot C., Verry C., Balosso J., Evans M., Sidi-Boumedine J., Janier M., Butterworth K., McMahon S., Prise K., Aloy M. T., Ardail D., Rodriguez-Lafrasse C., Porcel E., Lacombe S., Berbeco R., Allouch A., Perfettini J. L., Chargari C., Deutsch E., Le Duc G., and Tillement O. AGuIX® from bench to bedside-Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *Br. J. Radiol.*, **92** (1093), 20180365 (2019). DOI: 10.1259/bjr.20180365
8. Hainfeld J. F., Ridwan S. M., Stanishevskiy Y., Panchal R., Slatkin D. N., and Smilowitz H. M. Iodine nanoparticles enhance radiotherapy of intracerebral human glioma in mice and increase efficacy of chemotherapy. *Sci. Rep.*, **9**, 4505 (2019).
9. Hainfeld J. F., Smilowitz H. M., O'Connor M. J., Dilmanian F. A., and Slatkin D. N. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine (Lond.)*, **8** (10), 1601–1609 (2013). DOI: 10.2217/nnm.12.165
10. Norman A., Ingram M., Skillen R. G., Freshwater D. B., Iwamoto K. S., and Solberg T. X-ray phototherapy for canine brain masses. *Radiat. Oncol. Investig.*, **5** (1), 8–14 (1997). DOI: 10.1002/(SICI)1520-6823(1997)5:1<8::AID-ROI2>3.0.CO;2-1
11. *X-Ray Mass Attenuation Coefficients: NIST Standard Reference Database 126*. URL: <https://www.nist.gov/pml/x-ray-mass-attenuation-coefficients> (Дата обращения 17.07.2023).
12. Bonvalot S., Rutkowski P. L., Thariat J., Carrère S., Ducassou A., Sunyach M. P., Agoston P., Hong A., Mervoyer A., Rastrelli M., Moreno V., Li R. K., Tiangco B., Herraez A. C., Gronchi A., Mangel L., Sy-Ortin T., Hohenberger P., de Baère T., Le Cesne A., Helfre S., Saada-Bouziid E., Borkowska A., Anghel R., Co A., Gebhart M., Kantor G., Montero A., Loong H. H., Vergés R., Lapeire L., Demas S., Kacso G., Austen L., Moureau-Zabotto L., Servois V., Wardelmann E., Terrier P., Lazar A. J., Bovée J. V. M. G., Le Péchoux C., and Papai Z. NBTXR3, a first-in-class radioenhancer hafnium oxide nanoparticle, plus radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with locally advanced soft-tissue sarcoma (Act.In.Sarc): a multicentre, phase 2-3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* **20** (8), 1148–1159 (2019). DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30326-2
13. Shulyak A. T., Bortnikov E. O., Kubasov A. S., Selivanov N. A., Lipengolts A. A., Zhdanov A. P., Bykov A. Y., Zhizhin K. Y., and Kuznetsov N. T. Synthesis of Hafnium(IV) Polyaminoacetates. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **26** (12), Art. 3725 (2021). DOI: 10.3390/molecules26123725
14. Lipengolts A. A., Cherepanov A. A., Kulakov V. N., Grigorieva E. Y., Sheino I. N., and Klimanov V. A. Antitumor efficacy of extracellular complexes with gadolinium in Binary Radiotherapy. *Appl. Radiat. Isot.*, **106**, 233–236 (2015). DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.07.051
15. Lipengolts A. A., Budaeva J. A., Blaickner M., Cherepanov A. A., Menkov M. A., Kulakov V. N., and Grigorieva, E. Iodine quantification with computed tomography for the purpose of dose assessment in contrast enhanced radiotherapy. *Bull. Russ. State Med. Univ.*, (6), 16–19 (2016). DOI: 10.24075/brsmu.2016-06-03
16. Lipengol'ts A. A., Cherepanov A. A., Kulakov V. N., Grigor'eva E. Y., Merkulova I. B., and Sheino I. N. Comparison of the antitumor efficacy of bismuth and gadolinium as dose-enhancing agents in formulations for photon capture therapy. *Pharm. Chem.*, **51**, 783–786 (2017). DOI: 10.1007/s11094-017-1693-1
17. Hoffmann C., Calugaru V., Borcoman E., Moreno V., Calvo E., Liem X., Salas S., Doger B., Jouffroy Th., Mirabel X., Rodriguez J., Chilles A., Bernois K., Dimitriu M., Fakhry N., and Wong Hee Kam S. Phase I dose-escalation study of NBTXR3 activated by intensity-modulated radiation therapy in elderly patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity or oropharynx. *Eur. J. Cancer*, **146**, 135–144 (2021). DOI: 10.1016/j.ejca.2021.01.007
18. Bonvalot S., Rutkowski P. L., Thariat J., Carrère S., Ducassou A., Sunyach M. P., Agoston P., Hong A. M., Mervoyer A., Rastrelli M., Moreno V., Li R. K., Tiangco B. J., Herraez A. C., Gronchi A., Sy-Ortin T., Hohenberger P., de Baère T., Cesne A. L., Helfre S., Saada-Bouziid E., Anghel R. M., Kantor G., Montero A., Loong H. H., Vergés R., Kacso G., Austen L., Servois V. F., Wardelmann E., Dimitriu M., Said P., Lazar A. J., Bovée J. V. M. G., Péchoux C. L., and Papai Z. Final Safety and Health-Related Quality of Life Results of the Phase 2/3 Act.In.Sarc Study With Preoperative NBTXR3 Plus Radiation Therapy Versus Radiation Therapy in Locally Advanced Soft-Tissue Sarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **114** (3), 422–432 (2022). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2022.07.001
19. Lipengolts A. A., Vorobyeva E. S., Cherepanov A. A., Abakumov M. A., Abakumova T. O., Smirnova A. V., Finogenova Yu. A., Grigorieva E. Yu., Sheino I. N., and Kulakov V. N. *Bull. Russ. State Med. Univ.*, **5**, 60–64 (2018). DOI: 10.24075/brsmu.2018.062

Hafnium Complexes as Dose Enhancement Agents for Photon Capture Therapy and as Contrast Agents for Radiotherapy

A.A. Lipengolts*, **, ***, V.A. Skribitsky*, **, Yu.A. Finogenova*, ****, A.T. Shulyak***, M.A. Abakumov*****, A.Yu. Bykov***, E.Yu. Grigorieva*, A.V. Smirnova*, *****, K.E. Shpakova*, **, and K.Yu. Zhizhin***, *****

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoye Shosse 24, Moscow, 115478 Russia

**National Research Nuclear University (Moscow Engineering Physics Institute), Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409 Russia

***N.S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 31, Moscow, 119991 Russia

****Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

*****MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia

*****N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

*****Moscow Clinical Research Center named after A. S. Loginov, Moscow Healthcare Department, Shosse Entuziastov 86, Moscow, 111123 Russia

Hafnium is a promising element as contrast agent for diagnostic and therapeutic radiology. Currently there is no suitable hafnium drugs with renal excretion, which can be used in radiology. In this work two new hafnium complexes with nitrilotriacetic acid (Hf-NTA) and 1,2-diaminocyclohexanetetraacetic acid (Hf-CDTA) were synthesized and studied for acute toxicity and biodistribution. Inorganic chemistry methods were used for Hf-NTA and Hf-CDTA synthesis. Acute toxicity was studied in female mice C57Bl/6. Biodistribution and contrast properties studies of Hf-CDTA were made *in vivo* with micro-CT. Mice with transplanted subcutaneous mammary adenocarcinoma Ca755 were used for the study. Median lethal dose (LD_{50}) of Hf-CDTA was assessed as 408 ± 64 mg Hf/kg and of Hf-NTA less than 120 mg Hf/kg. CT imaging of mice intravenously injected with Hf-CDTA confirmed its renal excretion and contrast capability. CT imaging of tumor region with single intratumoral administration of Hf-CDTA showed promising hafnium concentration and retention in tumor for use in contrast enhanced radiotherapy. Hf-CDTA showed acceptable toxicity and biodistribution in mice with subcutaneous tumors for biomedical application in radiology and radiotherapy. For diagnostic clinical application Hf-CDTA formulation must be improved to increase water solubility and decrease toxicity. Hf-NTA appeared to be unacceptably toxic for radiological application.

Keywords: hafnium, complexes, toxicity, LD_{50} , imaging, computed tomography, contrast agent, photon capture therapy

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНДУКЦИИ И РОСТА ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ТОНКИМ СКАНИРУЮЩИМ ПУЧКОМ ПРОТОНОВ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА *EX VIVO* И *IN VIVO*

© 2024 г. О.М. Розанова*, #, Е.Н. Смирнова*, Т.А. Белякова**, ##, Н.С. Стрельникова**, А.В. Смирнов**

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московская область, 142290, Россия

#E-mail: rozanova.iteb@gmail.com

**Филиал «Физико-технический центр» Физического института им. П.Н. Лебедева РАН, ул. Мира, 1Н, Протвино, Московская область, 142281, Россия

##E-mail: belyakovata@lebedev.ru

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.

После доработки 19.12.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2024 г.

Исследованы закономерности индукции и роста опухолей у мышей при однократном облучении пучком протонов в дозах 30, 60 и 80 Гр клеток асцитной карциномы Эрлиха в условиях *ex vivo* и *in vivo*. Показано, что частота индукции опухолей после облучения протонами клеток асцитной карциномы Эрлиха в дозе 30 Гр при облучении *ex vivo* была ниже, чем после облучения *in vivo*, а при дозах 60 Гр и 80 Гр число опухолей было одинаковым. Временные закономерности возникновения опухолей при облучении клеток асцитной карциномы Эрлиха *ex vivo* значительно отличались от таковых при облучении опухоли *in vivo*: период времени, в течение которого регистрировалось появление новых опухолей, в группах *ex vivo* был одинаковым для всех исследованных доз, а при облучении опухолей *in vivo* этот интервал зависел от величины дозы. Скорость роста опухолей после облучения клеток *ex vivo* и *in vivo* не зависела от дозы, условий облучения и времени их возникновения, но была значительно ниже, чем в контрольных необлученных группах. Полученные результаты представляют интерес для понимания механизмов реализации потенциально летальных повреждений опухолевых клеток, роли микроокружения опухоли в индукции рецидивов и способов их преодоления с использованием потенциала протонной терапии, а также для разработки биомедицинских моделей для поиска оптимальных мишеней для адронной терапии рака.

Ключевые слова: протоны, асцитная карцинома Эрлиха, *ex vivo*, *in vivo*, мыши, рост опухоли.

DOI: 10.31857/S0006302924010172, EDN: QURKGC

В последнее десятилетие во всем мире интенсивно развиваются центры лучевой терапии, оснащенные установками для протонной терапии опухолей. Протонная терапия особенно подходит в тех случаях, когда альтернативные методы лечения не обеспечивают адекватного эффекта, а традиционная лучевая терапия представляет высокий риск для пациента. Более 250 тыс. пациентов получили протонную терапию, которая с успехом применяется для лечения как наиболее распространенных, так и редких видов рака. Применение протонной терапии оказалось особенно эффективным при терапии опухолей головного мозга, головы и шеи, а также в педиатрии [1, 2]. В

нашей стране в последние годы начали работать несколько радиологических центров, в которых используются отечественные и зарубежные установки для протонной терапии. В протонной терапии используется основное физическое преимущество ускоренных высокоэнергетических частиц, а именно специфическое распределение поглощенной дозы: относительно низкая энергия частиц на входе в биологическую ткань и наличие пика Брэгга, при котором происходит максимальное энерговыделение в конце пробега частицы на заранее заданной глубине, непосредственно в опухоли, а затем резкое падение энергии до нуля, что позволяет не повреждать окружающие здоровые ткани [3]. В медицинских центрах при протонной терапии опухолей применяют два основных способа формирования дозовых полей

Сокращения: АКЭ – формы асцитной карциномы Эрлиха, ОСК – опухолевые стволовые клетки.

для равномерного облучения всего объема мишени: пассивное рассеяние пучка и сканирование тонким (карандашным) пучком. При сканировании пучок протонов движется точно по объему мишени, заполняя весь облучаемый объем пиком Брэгга с одновременной модуляцией его интенсивности в процессе движения. Этот метод по сравнению с пассивным рассеянием обеспечивает лучшую трехмерную конформацию дозы, что снижает дозовые нагрузки на окружающие здоровые ткани и не требует подготовки специальных компенсаторов и коллиматоров для конкретного пациента, что сокращает сроки и стоимость лечения [4].

В клиниках при конвенциональной лучевой терапии используется фракционированное облучение в дозе 1.5–2.0 Гр при суммарной очаговой дозе 40–80 Гр. При этом противоопухолевая эффективность оценивается для пациентов по кратко- и долгосрочным критериям (подавление роста первичной опухоли, кожные лучевые реакции, частота рецидивирования, продолжительность жизни, острые и хронические токсические эффекты). Несмотря на совершенствование методов лучевой терапии у значительной части пациентов наблюдаются рецидивы, вторичные опухоли или формирование резистентности к терапии [5], в связи с чем использование протонной терапии открывает новые возможности для исследования причин рецидивирования и их предотвращения. Многими специалистами, в том числе и нами, высказывается мнение, что наиболее перспективным направлением, в котором возможно максимально использовать преимущества сканирующего пучка протонов в лучевой терапии является разработка и применение схем гипofракционирования или даже применения однодвукратного высокодозового фракционного облучения. За последние 10 лет было проведено несколько клинических исследований по гипofракционированной протонной терапии, в которых наиболее распространенными областями лечения были простата, легкие и печень [6]. В работе [7] 200 пациентов с раком предстательной железы на ранней стадии были облучены тонким сканирующим пучком протонов пятью фракциями с суммарной очаговой дозой 36,25 Гр, среднее время наблюдения составило 36 месяцев. Рецидивы наблюдались только у 4% пациентов и не было выявлено токсичности 3-й степени и выше (по шкале токсичности Национального института рака CTCAE ver. 4.0). В другой работе [8] было показано, что при проведении умеренного гипofракционированного облучения опухолей у пациентов с раком предстательной железы сокращение числа фракций протонной терапии с 36–40 до 20–28 при одинаковой суммарной очаговой дозе не вызывало рецидивирования в зоне облучения в течение 6 месяцев и токсических реакций 3-й и 4-й степеней. Более высокие показатели

выживаемости пациентов по сравнению с конвенциональной лучевой терапией наблюдались и через несколько лет после протонной терапии с использованием гипofракционирования. В работе [9] после облучения пациентов с раком печени протонами в дозе 7 Гр за фракцию трехлетняя выживаемость без прогрессирования опухоли составила 95.2% на фоне отсутствия острой токсичности, а общая выживаемость — 86.4%. При исследовании гипofракционированного облучения в дозе 6 Гр за фракцию у пациентов с немелкоклеточным раком легкого общая выживаемость через 5 лет составила 50% и только у 9% наблюдалась поздняя токсичность 3-й степени [10].

В связи с этим для дальнейшей отработки схем гипofракционированного облучения опухолей многими исследователями отмечается необходимость поиска и разработки биомедицинских моделей, приближенных к условиям *in vivo*, которые бы максимально учитывали такие специфические особенности взаимодействия высокоэнергетических заряженных частиц с живой материей, как возможность эскалации дозы и мощности в точно локализованном объеме и низкую зависимость от содержания кислорода в тканях. Кроме того, в последние годы накопились новые данные о причинах и механизмах индукции опухолей, влияния микроокружения, иммунного ответа на разных стадиях терапии опухоли [11], которые открывают возможности для поиска принципиально других мишеней для улучшения терапии. Если традиционно в лучевой терапии приоритетом являлись повреждение ДНК и гибель опухолевых клеток, то сейчас обсуждается существенная роль микроокружения опухоли, иммунный опухолевый ответ, участие гипоксических областей опухоли и эффекта свидетеля в гибели опухолевых и нормальных клеток, поддерживающих структуру опухоли, что не только определяет противоопухолевую эффективность лечения, но и более успешно решает проблемы первичной радиорезистентности и рецидивирования. Ранее нами на модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей была показана возможность олиго- и гипofракционированного облучения опухолей протонами в дозах 30, 40, 60, 80 Гр, которые не только полностью подавляли рост первичной опухоли, но и снижали частоту рецидивирования этой опухоли, увеличивая среднюю и максимальную продолжительности жизни [12].

Большинство видов рака возникают и прогрессируют в результате трансформации и клональной экспансии опухолевых стволовых клетки (ОСК). ОСК представляют собой класс плюрипотентных клеток, которые присутствуют в большинстве типов рака человека, включая рак груди, головы и шеи, печени и крови. На опухолевых моделях было показано, что ОСК участвуют в развитии, инвазии и метастазировании, обладая при этом способностью к устойчивому самооб-

новлению. ОСК, в отличие от опухолевых и неопухолевых клеток, входящих в структуру опухоли, также проявляют повышенную устойчивость к химио- и радиотерапии за счет специфических поверхностных маркеров, профилей генной экспрессии, интенсивного удаления лекарственных препаратов и механизмов репарации [13]. Радиорезистентность ОСК рассматривается в качестве одной из причин рецидивирования онкологических заболеваний после радиотерапии. ОСК отличаются экстремальной устойчивостью к апоптозу, поэтому даже после высокодозной лучевой или цитотоксической терапии в этих клетках стимулируется репарация повреждений ДНК и способность к делению [14]. Показано, что гибель опухолевых клеток растет с увеличением дозы рентгеновского излучения в диапазоне 2–10 Гр, тогда как для ОСК происходит стимулирование деления с увеличением дозы, что приводит к развитию индуцированной радиорезистентности опухоли [15]. Закономерности и механизмы воздействия протонов на эту популяцию клеток *in vitro* изучены недостаточно, а данные часто противоречивы. В работе [16] обнаружена более высокая чувствительность ОСК немелкоклеточного рака легкого к облучению протонами по сравнению с фотонами. В другой работе не было обнаружено существенных изменений относительного количества ОСК при облучении двух клеточных линий рака молочной железы пучками нейтронов, протонов или их сочетанном действии в суммарной равноэффективной дозе 4.0 Гр [17].

Данных о радиобиологических характеристиках ОСК, полученных при действии фотонов или ускоренных частиц на опухоли в условиях *in vivo*, практически нет. Это связано со сложностью идентификации и локализации ОСК в структуре солидных опухолей. Экспериментальные результаты о действии протонов на ОСК в составе опухолей свидетельствуют о специфическом действии протонов по сравнению с фотонами [18]. Накопление таких данных ограничивается небольшим количеством источников протонов в мире, поскольку большинство ускорителей находится на территории медицинских центров, что не позволяет проводить систематические радиобиологические эксперименты.

Предполагая, что основной причиной рецидивирования опухолей является сохранение ОСК, крайне интересно было сравнить закономерности индукции опухолей у мышей после облучения *ex vivo* асцитных клеток карциномы Эрлиха и в составе солидной опухоли в дозах, равных или выше суммарной очаговой дозы при традиционной лучевой терапии, в короткие и отдаленные сроки после облучения.

Целью данной работы являлось изучение закономерностей индукции и роста опухолей у мышей при однократном облучении пучком прото-

нов в высоких дозах клеток карциномы Эрлиха *ex vivo* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах мышей колонии SHK (массой 31–35 г), полученных из питомника животных «Столбовая» НЦ ФМБА РФ (Столбовая, Московская обл.), которых содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Московская обл.) [19]. В качестве модели опухоли была выбрана солидная форма АКЭ [20]. Линия опухолевых клеток получена в ФГБУН «РНЦ им. Н.Н. Блохина» (Москва, Россия). Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путем серийной внутрибрюшинной инокуляции с интервалом 7–9 суток. У животных в асцитических условиях извлекали асцитную жидкость и трижды промывали фосфатно-солевым буфером с помощью центрифугирования при 500 об/мин в течение 5 мин. Затем с помощью красителя трипанового синего в камере Горяева оценивали жизнеспособность клеток АКЭ, которая составляла не менее 98%.

Для облучения *ex vivo* суспензию клеток АКЭ в концентрации $20 \cdot 10^6$ клеток/мл помещали в микропробирки типа «эппендорф» объемом 1.5 мл и облучали при комнатной температуре протонами в дозах 30, 60 и 80 Гр. В тот же день мышам внутримышечно вводили облученные клетки АКЭ в количестве $2 \cdot 10^6$ клеток в объеме 0.1 мл в бедро левой лапы. Мышам контрольной группы инокулировали такое же количество необлученных клеток АКЭ, суспензия которых подвергалась имитации условий облучения. Для облучения *in vivo* солидной АКЭ мышам внутримышечно вводили $2 \cdot 10^6$ клеток в бедро левой задней лапы. Облучение протонами в дозах 30, 60 и 80 Гр проводили на пятые сутки после инокуляции АКЭ при пальпации опухолевого узла у каждого животного. Для иммобилизации мышей на время облучения внутрибрюшинно вводили анестезирующую смесь золетила (0.7 мг/кг) и ксилазина (3.4 мг/кг). Контрольная группа включала необлученных мышей с опухолями, подвергавшихся транспортировке к источнику излучения, анестезии и имитации условий облучения. Для каждой серии экспериментов было проведено не менее двух повторов. Всего использовали 130 мышей, по 10 мышей в каждой группе.

Источником протонного излучения служил синхротрон в ЦКП «Прометеус» ФТЦ ФИАН (Протвино, Московская обл.). При облучении *ex vivo* микропробирку с суспензией клеток АКЭ помещали в водный фантом, проводили конусную лучевую томографию для определения облучаемого объема и в специально разработанной трехмерной планирующей системе составляли

Таблица 1. Количество мышей с опухолями после облучения протонами АКЭ *in vivo* и *ex vivo* в течение месяца

Доза	Количество мышей с опухолями, %									
	7-е сутки		14-е сутки		21-е сутки		28-е сутки		35-е сутки	
	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>
0 Гр	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30 Гр	0	0	0	20	15	40	50	70	60	100
60 Гр	0	0	0	0	5	20	20	20	25	30
80 Гр	0	0	0	0	5	0	25	0	25	10

план облучения. Объем мишени ($V = 30.2 \pm \pm 0.1 \text{ см}^3$) был выбран в форме параллелепипеда с захватом окружающего пространства для гарантированного равномерного облучения всей суспензии клеток. Облучение планировали с одного направления методом сканирования по всему объему. Суспензию клеток в микропробирке облучали в модифицированном пике Брэгга с энергией протонов на выходе с ускорителя 84–101 МэВ. При облучении *in vivo* мышь фиксировали пластиковыми зажимами на платформе из полипропилена таким образом, чтобы облучаемая конечность была максимально удалена от тела, затем платформу наклонно погружали в водный фантом и получали томограмму опухоли. При составлении плана облучения использовали фактический объем опухоли, который в этом эксперименте равнялся $0.45 \pm 0.05 \text{ см}^3$. Данный объем был выбран на основе наших предыдущих работ [21, 22], где была показана более высокая противоопухолевая эффективность и значительное увеличение средней продолжительности жизни мышей при облучении фактического объема опухоли по сравнению с облучением большего, так называемого планируемого объема. Верификацию положения каждой мыши при облучении проводили с помощью лазерной системы позиционирования и съемки проекций с совмещением текущего положения мишени с исходным с точностью 1 мм. Облучение заданного объема проводили с двух полей тонким пучком протонов, энергия протонов на выходе с направления 0° оставляла 98–104 МэВ, с направления 180° – 96–100 МэВ, сигма пучка на входе в водный фантом составляла 2.8–3.6 мм. Облучение проходило в импульсном режиме с длительностью импульса 200 мс и цикличностью 1 импульс в 2 с. Равномерность дозы и размер поля контролировали с помощью радиометрической пленки ЕВТЗ, а поглощенную дозу – электрометром PTW Unidos webline с ионизационной камерой (PTW PinPoint 3D-Chamber 31022, PTW Freiburg GmbH, Германия). На уровне 95% изодозы однородность дозы составляла не менее 97%. Точность определения дозы в зоне облучения – 3%.

После облучения ежедневно наблюдали за частотой индукции солидных опухолей, динамикой и скоростью их роста. Дважды в неделю с помощью штангенциркуля у каждой мыши измеряли три ортогональных диаметра опухоли. Величину опухоли (в см^3) рассчитывали по формуле [23]: $\text{объем опухоли} = \pi/6 \cdot d_1 \cdot d_2 \cdot d_3$, где d_1 – d_3 – три ортогональных диаметра. Опухоль считали появившейся при достижении объема 0.40 см^3 . Скорость роста опухоли рассчитывали по двум параметрам – среднему относительному объему и среднему времени пятикратного увеличения, которое рассчитывалось как среднее количество дней от начала роста до увеличения объема в пять раз.

Статистическую оценку различий между группами, имеющими нормальное распределение, проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента; в остальных случаях использовался непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни. Для сравнения результатов эксперимента, где показатели выражались в долях, достоверность различий оценивали по критерию углового преобразования Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У 100% мышей контрольных групп при инокуляции необлученных клеток индуцировались солидные опухоли, объем которых достигал на 5-е сутки $\sim 0.4 \text{ см}^3$. Через 35 суток они достигали стандартного для этой модели опухолевого роста объема $\sim 8 \text{ см}^3$. В табл. 1 представлены результаты по регистрации частоты индукции опухолей у мышей после инокуляции облученных асцитных клеток и облучения солидных опухолей АКЭ в течение месяца. В группах мышей, которым были инокулированы облученные *ex vivo* клетки, появление опухолей наблюдали через 21 сутки после облучения, задержка начала роста не зависела от дозы облучения. В группе мышей, у которых опухоли локально облучали *in vivo* в дозе 30 Гр, первые опухоли пальпировались на 14-е сутки, при облучении 60 Гр – на 21-е сутки, а при дозе 80 Гр – на 35-е сутки. К концу первого месяца

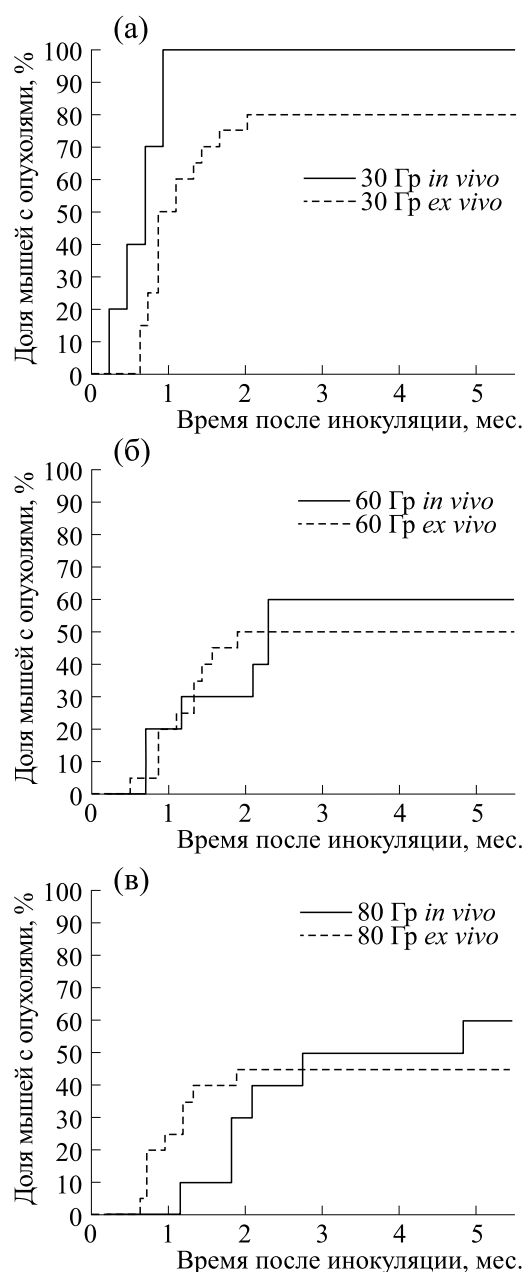


Рис. 1. Динамика индукции опухолей у мышей после облучения клеток АКЭ *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозах 30 Гр (а), 60 Гр (б) и 80 Гр (в).

при облучении асцитных клеток в дозе 30 Гр *ex vivo* опухоли были у 60% мышей, а после облучения солидных опухолей в дозе 30 Гр *in vivo* — у 100%. При облучении в дозе 60 Гр опухолевых клеток *in vivo* и *ex vivo* различий в частоте индукции опухолей не наблюдали, а при дозе 80 Гр *ex vivo* опухоли были у 25% мышей, в отличие от условий *in vivo*, где опухоли пальпировались у 10%. При облучении клеток *ex vivo* латентный период появления первых опухолей в течение первого месяца не зависел от дозы и составил 21 сут-

ки, в отличие от облучения *in vivo*, где данный показатель зависел от дозы.

Таким образом, были обнаружены значительные различия в закономерностях индукции АКЭ после облучения в разных условиях как по частоте индукции опухолей в течение месяца, так и длительности латентного периода. Выявленные различия в динамике индукции опухолей демонстрируют влияние на радиочувствительность опухолевых клеток условий облучения. Более длительный интервал, необходимый для индукции рецидивов после облучения солидной АКЭ *in vivo* у мышей, по сравнению с динамикой возникновения АКЭ после введения облученных при тех же дозах асцитных клеток *ex vivo* можно объяснить тем, что облученные клетки имплантировались здоровым животным, а при облучении солидной АКЭ мыши уже являлись опухоленосителями и подвергались локальному облучению высокими дозами протонов, что индуцировало специфический воспалительный и иммунный ответ. Можно предположить, что при облучении высокими дозами суспензии клеток *ex vivo* и последующем «культивировании» в условиях *in vivo* происходят гибель большинства опухолевых клеток, отбор, выживание и стимулирование деления единичных клеток, что в конечном итоге приводит к рецидиву в отличие от последствий облучения солидной опухоли *in vivo*, состоящей из опухолевых и нормальных клеток, где наблюдались классические закономерности увеличения гибели клеток от дозы. Появление опухолей после инокуляции облученных асцитных клеток *ex vivo* в дозах, равных летальным или выше доз, определенных по критериям выживаемости опухолевых клеток или их колониеобразующей способности, служит еще одним аргументом о критической роли ОСК в рецидивировании опухолей после лучевой терапии и их высокой радиорезистентности [24]. В связи с этим мы поддерживаем мнение некоторых исследователей, что эффективность действия новых методов радиотерапии необходимо оценивать по их действию на ОСК [25]. Показано, что абсолютное количество ОСК увеличивается после однократного облучения рентгеновскими лучами в дозах 1–10 Гр в культурах опухолевых клеток. Если гибель опухолевых клеток растет с увеличением дозы облучения, то для ОСК происходит стимулирование деления, что приводит к развитию индуцированной радиорезистентности опухоли [26].

Далее следили за появлением опухолей на протяжении шести месяцев после облучения. На рис. 1 показана динамика появления опухолей у мышей после облучения клеток АКЭ *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозах 30–80 Гр.

Через шесть месяцев после облучения асцитных клеток в дозе 30 Гр опухоли индуцировались у 80% мышей, а после облучения солидных опухолей — у 100%. После облучения в дозе 60 Гр опу-

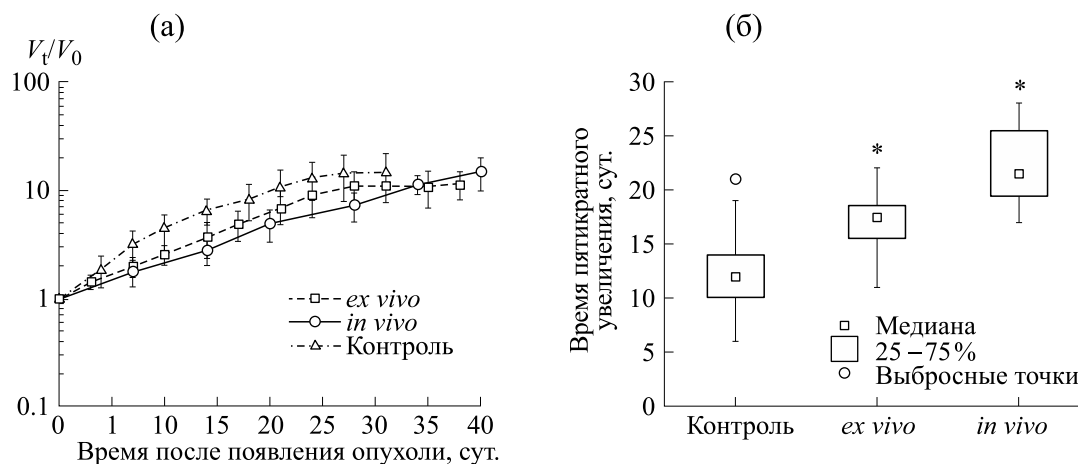


Рис. 2. Скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 30 Гр: (а) — средние относительные объемы опухоли в зависимости от дней после появления опухоли; (б) — количество дней, необходимое для увеличения объема опухоли в пять раз по сравнению с первым измеренным объемом ($>0.40 \text{ см}^3$). Объемы нормализованы к первому измеренному объему ($>0.40 \text{ см}^3$). Статистическая значимость оценивалась с помощью U-критерия Манна–Уитни, * — различие достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.01$).

холевых клеток *ex vivo* и *in vivo* к этому моменту наблюдения частота опухолей была 50 и 60% соответственно, а при дозе 80 Гр *ex vivo* опухоли были у 45% животных и у 60% после облучения *in vivo*. Было показано, что при облучении клеток АКЭ *ex vivo* во всех группах опухоли появляются независимо от дозы в период от 21 до 61 суток после облучения. При облучении опухолей *in vivo* период возобновления роста зависел от величины дозы: при 30 Гр он составлял 14–35 суток, у 60 Гр — от 21–69 суток, а у 80 Гр — от 35 до 146 суток. Таким образом, при наблюдении за динамикой индукции опухолей в течение шести месяцев после облучения были найдены критические интервалы, в течение которых возникают или возобновляют рост опухоли: для условий *ex vivo* максимальный латентный период составил два месяца, а для *in vivo* — пять месяцев, что свидетельствует о влиянии условий облучения и микроокружения опухолей на возобновление роста опухоли. Полученные результаты еще раз демонстрируют высокий туморогенный потенциал и радиорезистентность ОСК АКЭ, поскольку наблюдалась индукция опухолей у здоровых мышей после облучения опухолевых клеток в сублетальных и летальных дозах.

В нашем исследовании после введения мышам суспензии *ex vivo* облученных асцитных клеток последующие процессы, влияющие на судьбу разных клеток, происходили в условиях организма со всеми факторами гибели опухолевых клеток, индуцированных воспалительных реакций организма, гипоксических условий в области роста опухоли, что является, на наш взгляд, полезной экспериментальной моделью для исследования условий микроокружения, влияющих на

индукцию и рост опухоли у животных. В исследованиях *in vitro* при определении радиочувствительности десятков линий опухолевых клеток показано, что многие виды раков являются радиорезистентными, что требует значительного повышения суммарной дозы лучевой терапии [13]. Модель солидной формы АКЭ на мышах, используемая в нашей работе, относится к агрессивному быстрорастущему типу опухоли, со 100% гибелью животных с появившимися опухолями в течение 35–40 суток. Поскольку мы использовали однократные дозы, равные или значительно выше сублетальных и летальных для опухолевых клеток, то выявленные закономерности свидетельствуют, что даже они недостаточны для полного отсутствия рецидивов, что требует дальнейшего поиска усиления действия протонов, возможно, с использованием ингибирования конкретных сигнальных и регуляторных каскадов.

У всех мышей с опухолями, индуцированными за все время наблюдения, измеряли скорость роста опухолей. У мышей контрольных групп *ex vivo* и *in vivo* скорость роста опухолей была одинаковой, что позволило нам суммировать эти данные. На рис. 2 представлена скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 30 Гр. Было обнаружено, что скорость роста опухолей после облучения в дозе 30 Гр в обеих группах не отличалась и была значительно ниже, чем в контрольной. Среднее время пятикратного увеличения объема опухоли в группах при облучении клеток *ex vivo* (18.0 ± 4.4 сут.) достоверно не отличалось от *in vivo* (22.0 ± 4.1 сут.) в отличие от контрольной группы (12.0 ± 2.2 сут.).

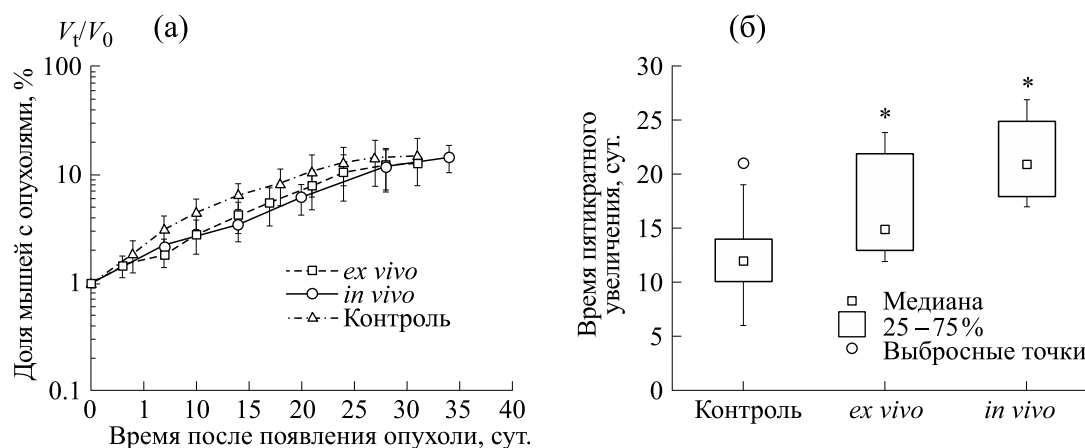


Рис. 3. Скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 60 Гр: (а) — средние относительные объемы опухоли в зависимости от дней после появления опухоли; (б) — количество дней, необходимое для увеличения объема опухоли в пять раз по сравнению с первым измеренным объемом. Объемы нормализованы к первому измеренному объему ($>0.40 \text{ см}^3$). Статистическая значимость оценивалась с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, * — различие достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.01$).

По результатам, представленным на рис. 3, видно, что скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* в дозе 60 Гр не отличалась, но опухоли росли гораздо медленнее, чем в контрольной группе. Среднее время пятикратного увеличения объема опухоли в группах при облучении *ex vivo* составило — 17.0 ± 4.3 сут., *in vivo* — 21.0 ± 2.6 сут., а в контроле — 12.0 ± 2.2 сут.

На рис. 4 представлена скорость роста опухолей у мышей после облучения клеток АКЭ *ex vivo* и *in vivo* в дозе 80 Гр. После появления опухолево-

го узла в месте инокуляции скорость роста опухоли в обеих группах достоверно отличалась от контрольной, при этом опухоли, облученные *in vivo*, росли медленнее, чем облученные *ex vivo*. Среднее время пятикратного увеличения объема опухоли в группах при облучении *ex vivo* составило 17.0 ± 2.2 сут., а *in vivo* — 22.0 ± 2.0 сут., т.е. только при самой высокой использованной дозе нам удалось наблюдать влияние условий облучения на скорость роста опухоли по этому показателю.

Таким образом, были обнаружены значительные различия как в частоте индукции опухолей в

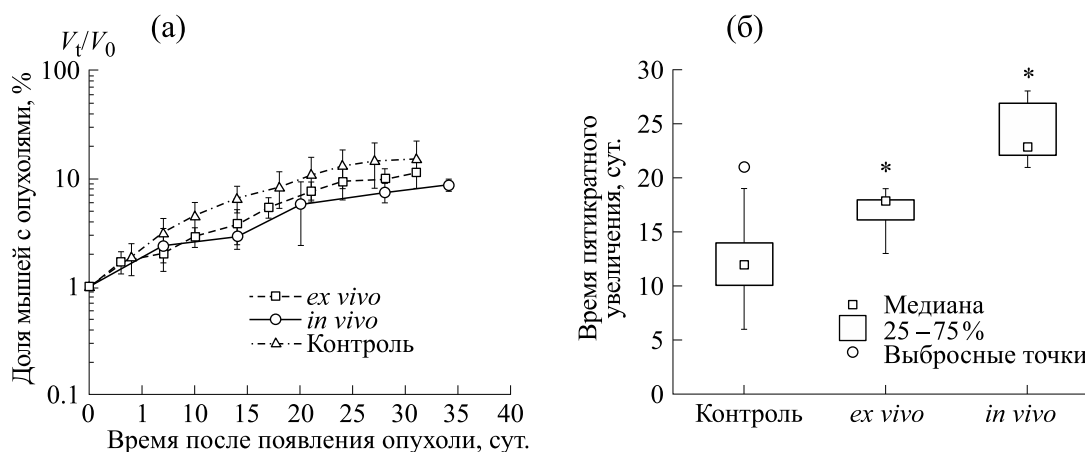


Рис. 4. Скорость роста опухолей у мышей после облучения опухолевых клеток *ex vivo* и *in vivo* протонами в дозе 80 Гр: (а) — средние относительные объемы опухоли в зависимости от дней после появления опухоли; (б) — количество дней, необходимое для увеличения объема опухоли в пять раз по сравнению с первым измеренным объемом. Объемы нормализованы к первому измеренному объему ($>0.40 \text{ см}^3$). Статистическая значимость оценивалась с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, * — различие достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.01$).

течение месяца, так и длительности латентного периода после облучения клеток *ex vivo* и *in vivo*. Более длительный интервал был необходим для индукции рецидивов после облучения солидной АКЭ *in vivo* у мышей по сравнению с динамикой возникновения АКЭ после трансплантации асцитных клеток, облученных *ex vivo* при тех же дозах. Скорость роста опухолей АКЭ после облучения клеток *ex vivo* и *in vivo* не зависела ни от дозы, ни от условий облучения, но значительно отличалась от контроля во всех группах ($p \leq 0.01$). Следует отметить, что во всех облученных группах скорость роста опухолей также не зависела от времени начала роста, т.е. не имело значения, появилась опухоль в течение первого месяца после инокуляции или через 6 месяцев. Можно предположить, что даже после облучения протопами асцитных клеток в дозах, сравнимых с общей очаговой дозой при радиотерапии (40–60 Гр), остается достаточное количество клеток и факторов, инициирующих рецидивы. Это может служить еще одним доказательством, что для развития опухоли достаточно нескольких клеток [27]. Мы предполагаем, что поскольку регистрируемые в нашей работе показатели опухолевого роста являются интегральным результатом гибели, задержки деления разных по радиочувствительности клеток опухоли, стимулирования дифференцировки и пролиферации ОСК в условиях влияния микроокружения опухоли и иммунитета организма, то предложенная экспериментальная модель может послужить полезным инструментом для решения проблем радиорезистентности и рецидивирования опухолей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность руководителю Центра коллективного пользования комплекса протонной терапии А.Е. Шемякову за помощь в проведении облучения в ЦКП «Прометеус» и дозиметрическое сопровождение экспериментов, а также чл.-корр. РАН В.Е. Балакину за инициирование данного исследования и обсуждение полученных результатов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01025-23-01 при частичном финансировании из средств договора НИР № 28/22 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводили в соответствии с национальными и международными руководящими принципами медицинской этики, изложенными в этических принципах медицинских исследований с участием человека Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинская декларация, 2013). Протокол эксперимента (№ 36 от 15.03.2022) был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике, все процедуры проводились в соответствии с законами и правилами, касающимися испытаний на животных и гуманного обращения с ними.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blanchard P., Gunn G. B., Lin A., Foote R. L., Lee N. Y., and Frank S. J., Proton therapy for head and neck cancers. *Semin. Radiat. Oncol.*, **28** (1), 53–63 (2018).
2. Baliga S., Gandola L., Timmermann B., Gail H., Padovani L., Janssens G. O., and Yock T. I. Brain tumors: Medulloblastoma, ATRT, ependymoma. *Pediatric Blood & Cancer*, **68** (S2) (2020). DOI: 10.1002/pbc.28395
3. Tommasino F. and Durante M. Proton radiobiology. *Cancers* (Basel), **7**, 353–381 (2015).
4. Bortfeld T., Paganetti H., and Kooy H. M. Proton Beam Radiotherapy – The State of the Art. *Med. Phys.*, **32** (6), 2048–2049 (2005).
5. Warren J., Noone A., Stevens J., Wu X.-Ch., Hsieh M.-Ch., Mumphy B. J., Schmidt R., Coyle L., Shields R., and Mariotto A. B. The Utility of Pathology Reports to Identify Persons With Cancer Recurrence. *Med. Care* **60** (1), 44–49 (2022). DOI: 10.1097/MLR.0000000000001669
6. Santos A., Penfold S., Gorayski P., and Le H. The Role of Hypofractionation in Proton Therapy. *Cancers* (Basel) **14** (9), (2022). DOI: 10.3390/cancers14092271
7. Kubes J., Vondracek V., Andrlik M., Navrátil M., Sláviková S., Vítek P., Rosina J., Abrahámová J., Prausová J., Grebenyuk A., and Dědečková K. Extreme hypofractionated proton radiotherapy for prostate cancer using pencil beam scanning: Dosimetry, acute toxicity and preliminary results. *J. Med. Imaging Radiat. Oncol.* **63**, 829–835 (2019). DOI: 10.1111/1754-9485.12947
8. Гриценко С. Е., Удалов Ю. Д. и Киселев В. А. Оптимизация метода протонной лучевой терапии у больных раком предстательной железы, получающих лечение в ФГБУ ФНКЦРИО ФМБА России. В сб. матер. VI Всероссийского научно-образовательного конгресса «Онкорadiология, лучевая диагностика и терапия» (М., 2023), сс. 25–26.
9. Kim T. H., Park J.-W., Kim B. H., Oh E. S., Youn S. H., Moon S. H., Kim S. S., Woo S. M., Koh Y.-H., Lee W. J., and Kim D. Y., Phase II Study of Hypofractionated Proton Beam Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* **10**, 542 (2020). DOI: 10.3389/fonc.2020.00542

10. Kharod S. M., Nichols R. Ch., Henderson R. H., Morris Ch. G., Pham D. C., Seeram V. K., Jones L. M., Antonio-Miranda M., Huh S., Li Z., and Hoppe B. S. Image-guided hypofractionated double-scattering proton therapy in the management of centrally-located early-stage non-small cell lung cancer. *Acta Oncol.* **59** (10), 1164–1170 (2020). DOI: 10.1080/0284186X.2020.1759821
11. Di Maggio F. M., Minafra L., Forte G. I., Cammarata F. P., Lio D., Messa C., Gilardi M. C., and Bravatà V. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *J. Inflamm.* (Lond.), **12**, 14 (2015). DOI: 10.1186/s12950-015-0058-3
12. Балакин В. Е., Белякова Т. А., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Шемяков А. Е. и Стрельникова Н. С. Использование модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей для исследования ранних и отдаленных последствий гипофракционированного протонного облучения. *Биомедицина*, **17** (3Е), 127–132 (2021). DOI: 10.33647/2713-0428-17-3Е-127-132
13. Olivares-Urbano M., Grinan-Lison C., Marchal J., and Núñez M I. CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells.* **9** (7), 1651 (2020). DOI: 10.3390/cells9071651
14. Skvortsov S., Debbage P., Lukas P., and Skvortsova I. Crosstalk between DNA repair and cancer stem cell (CSC) associated intracellular pathways. *Semin. Cancer Biol.*, **31**, 36–42 (2015).
15. Матчук О. Н., Замулаева И. А., Селиванова Е. И., Мкртчян Л. С., и Крикунова Л. И. Радиорезистентность опухолевых стволовых клеток — одна из ключевых проблем радиационной онкологии. *Исследования и практика в медицине*, **6** (1), 189 (2019).
16. Zhang X., Lin S. H., Fang B., Gillin M., Mohan R., and Chang J. Y. Therapy-resistant cancer stem cells have differing sensitivity to photon versus proton beam radiation. *J. Thorac Oncol.*, **8** (12), 1484–1491 (2013).
17. Matchuk O. N., Yakimova A. O., Saburov V. O., Koryakin S. N., Ivanov S. A., and Zamuлаeva I. A. Effects of Combined Action of Neutron and Proton Radiation on the Pool of Breast Cancer Stem Cells and Expression of Stemness Genes In Vitro. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **173** (6), 749–753 (2022).
18. Dini V., Belli M., and Tabocchini M. A. Targeting cancer stem cells: protons versus photons. *Br. J. Radiol.*, **93** (1107), 20190225 (2020). DOI: 10.1259/bjr.20190225
19. Smith J. A., van den Broek F. A., Martorell J. C., Hackbarth H., Ruksenas O., and Zeller W. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of a FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Lab. Anim.*, **41** (2), 143–160 (2007). DOI: 10.1258/002367707780378212
20. Mishra S., Tamta A. K., Sarikhani M., Desingu P. A., Kizkekra Sh. M., Pandit A. Sh., Kumar Sh., Khan D., Raghavan S. C., and Sundaresan N. R. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. *Sci. Rep.*, **8** (1), 5599 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-23669-9
21. Балакин В. Е., Шемяков А. Е., Заичкина С. И., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Романченко С. П., Сорокина С. С., Стрельникова Н. С. Гипофракционированное облучение солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей тонким сканирующим пучком протонов. *Биофизика*, **61** (4), 808–812 (2016).
22. Балакин В. Е., Шемяков А. Е., Заичкина С. И., Розанова О. М., Смирнова Е. Н., Романченко С. П., Сорокина С. С., Стрельникова Н. С. Отдаленные лучевые последствия после гипофракционированного облучения протонами солидной карциномы Эрлиха у мышей. *Биофизика*, **62** (1), 161–167 (2017).
23. Sorensen B., Horsman M., Alsner J., Overgaard J., Durante M., Scholz M., Friedrich Th., and Bassler N. Relative biological effectiveness of carbon ions for tumor control, acute skin damage and late radiation-induced fibrosis in a mouse model. *Acta Oncologica*, **54** (9), 1623–1630 (2015). DOI: 10.3109/0284186X.2015.1069890
24. Yang L., Shi P., Zhao G., Xu J., Peng W., Zhang J., Zhang G., Wang X., Dong Zh., Chen F., Cui H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **5** (1), 8 (2020). DOI: 10.1038/s41392-020-0110-5
25. Замулаева И. А. Радиорезистентность популяции опухолевых стволовых клеток: механизмы, способы преодоления и клиническое значение. В сб. матер. Междунар. конф. «Актуальные проблемы радиационной биологии. К 60-летию создания Научного совета РАН по радиобиологии» (Дубна, 2022), сс. 35–38.
26. Замулаева И. А., Матчук О. Н., Селиванова Е. И., Андреев В. Г., Липунов Н. М., Макаренко С. А., Жаворонков Л. П., Саенко А. С. Увеличение количества опухолевых стволовых клеток под воздействием редкоионизирующего излучения. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **54** (3), 256–264 (2014). DOI: 10.7868/S0869803114030187
27. Quintana E., Shackleton M., Sabel M. S., Fullen D. R., Johnson T. M., and Morrison S. J. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, **456** (7222), 593–598 (2008).

Regularities of Induction and Growth of Tumors in Mice upon Irradiation of Ehrlich Carcinoma Cells *ex vivo* and *in vivo* with a Pencil Scanning Beam of Protons

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

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

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

The patterns of tumor induction and growth in mice were studied under single irradiation with a proton beam at doses of 30, 60, and 80 Gy of Ehrlich carcinoma cells under *ex vivo* and *in vivo* conditions. It was shown that the frequency of tumor induction after proton irradiation of Ehrlich carcinoma cells *ex vivo* at a dose of 30 Gy was lower than after irradiation *in vivo*, and at doses of 60 Gy and 80 Gy, the number of tumors was the same. The temporal patterns of tumor occurrence during irradiation of Ehrlich carcinoma cells *ex vivo* differed significantly from *in vivo* irradiation: the period of time when the appearance of new tumors was recorded in the *ex vivo* groups was the same for all doses, and during *in vivo* irradiation it had a dose dependence. The growth rate of Ehrlich carcinoma tumors after cell irradiation *ex vivo* and *in vivo* did not depend on the dose, the method of irradiation, or the time of their occurrence, but was significantly lower than in the control group. The results obtained are of interest for understanding the mechanisms of manifestation of potentially lethal damage to tumor cells, the role of the tumor microenvironment in the induction of relapses and ways to overcome them using the potential of proton therapy, as well as for the development of biomedical models to search for optimal targets for hadron cancer therapy.

Keywords: protons, Ehrlich ascites carcinoma, ex vivo, in vivo, mice, tumor growth

ФЛУКТУАЦИОННЫЙ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ФУРЬЕ-СПЕКТРОМЕТР И ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА ХАРАКТЕРИСТИК ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ

© 2024 г. А.В. Ковалев*,[#], Ю.И. Гринштейн**, А.Н. Мальцева**,
О.В. Крюкова*, В.Г. Суховольский*

*Красноярский научный центр СО РАН, ул. Академгородок, 50, Красноярск, 660036, Россия

[#]E-mail: sunhi.prime@gmail.com

**Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого,
ул. Партизана Железняка, 1, Красноярск, 660022 Россия

Поступила в редакцию 17.01.2024 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 26.01.2024 г.

Рассмотрен метод оценки состояния форменных элементов по диэлектрическим характеристикам суспензии крови. Предложена конструкция флуктуационного диэлектрического Фурье-спектрометра, с помощью которого возможно оценить распределение форменных элементов крови по состоянию мембран. В качестве иллюстрации работы описаны эксперименты по оценке функционального состояния пациентов с ишемической болезнью сердца и эксперимента по влиянию асцитной карциномы Эрлиха на лабораторных мышей. Показано, что, используя предлагаемый спектрометр, можно получить экспрессные оценки изменения характеристик крови при заболеваниях и выявить динамику патологических процессов у животных после заражения.

Ключевые слова: кровь, форменные элементы, состояние, диэлектрические характеристики, флуктуации, измерения, устройство.

DOI: 10.31857/S0006302924010185, EDN: QUJCMQ

Кровь является одной из важнейших тканей организма. Характеристики крови, в частности соотношение численностей различных форменных элементов, являются одними из наиболее значимых диагностических показателей, и обычно анализ состояния пациента начинается с анализа числа клеток форменных элементов в образце крови. Однако, кроме плотности популяций важнейших форменных элементов красной и белой крови, важно оценить морфофункциональное состояние клеточных мембран. Для решения задачи оценки состояния суспензий клеток крови предложено большое число морфологических и биохимических подходов [1–3]. Однако предлагаемые методы либо недостаточно надежны, либо не позволяют осуществлять экспресс-диагностику морфофункционального состояния мембран клеток крови.

Значительное число работ посвящено использованию методов оценки состояния биологических объектов по диэлектрическим характери-

стикам биологических тканей [4–11]. Для описания диэлектрических свойств рассмотрим эквивалентную электрическую схему ткани (рис. 1).

На схеме на рис. 1 видно, что при прохождении электрического тока часть тока течет через

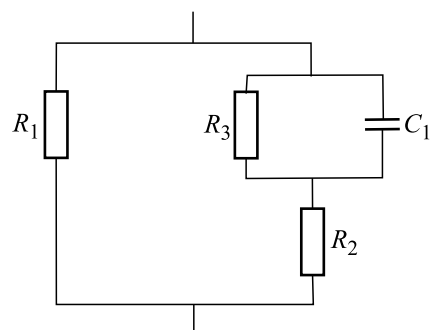


Рис. 1. Эквивалентная электрическая схема суспензии клеток; R_1 — сопротивление раствора, в котором находятся клетки; R_2 — сопротивление цитоплазмы клеток; R_3 — сопротивление мембран клеток; C_1 — емкость мембран клеток.

Сокращения: ФДФС — флуктуационный диэлектрический Фурье-спектрометр, ИБС — ишемическая болезнь сердца.

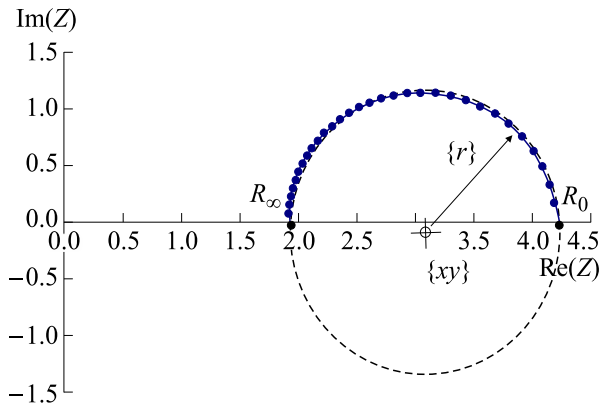


Рис. 2. Импеданс-годограф неоднородной по диэлектрическим характеристикам суспензии клеток (диаграмма Коул–Коула).

раствор, в который погружены клетки. Его можно представлять в виде некоторого сопротивления R_1 (или проводимости $G_1 = 1/R_1$). Часть тока течет через мембраны клеток с сопротивлением R_3 (или проводимостью $G_3 = 1/R_3$) и емкостью C_0 , а далее через цитоплазму, имеющую сопротивление R_2 (или проводимость $G_2 = 1/R_2$).

По эквивалентной схеме можно из микроскопических электрических показателей рассчитать измеряемые в эксперименте величины проводимости G и емкости C суспензии клеток:

$$G(\omega) = G_1 + \frac{G_2(G_3G_2 + G_3^2 + \omega^2C_0^2)}{(G_2 + G_3)^2 + \omega^2C_0^2}, \quad (1)$$

$$C(\omega) = \frac{C_0G_2^2}{(G_2 + G_3)^2 + \omega^2C_0^2}. \quad (2)$$

Полный импеданс суспензии запишем в следующем виде:

$$Z = \frac{1}{A} = \frac{1}{G(\omega) + i\omega C(\omega)}. \quad (3)$$

Зависимость электрических характеристик от частоты пропускаемого электрического тока характеризуется импеданс-годографами, представляющими собой кривые, характеризующие связь величин омической и емкостной проводимости на различных частотах [12–14]. Возможно построение импеданс-годографов в плоскости полной проводимости $\{G, G''\}$, где $G'' = \omega C$, и в диэлектрической плоскости $\{C, C''\}$, где $C'' = (G - G_0)/\omega$. Точки пересечения импеданс-годографов с осями G и C дают в этом случае искомые характеристики C_0 и G_∞ .

Для однородного по электрическим характеристикам вещества кривая импеданс-годографа представляет собой полуокружность (диаграмму

Дебая), построенную в плоскости вещественной $\text{Re}(\omega)$ и мнимой $\text{Im}(\omega)$ компонент импеданса (рис. 2).

Для диаграммы Дебая импеданс-годограф можно описать, используя величины радиуса окружности r и координат центра окружности (x_0, y_0) . Если мембраны клеток в суспензии различны по электрическим свойствам, то импеданс-годограф по-прежнему будет полуокружностью, однако центр его будет находиться ниже оси абсцисс (диаграмма Коул–Коула [15, 16]).

Как видно по выражениям (1)–(3), диэлектрические свойства биологических суспензий зависят от частоты пропускаемого через них электрического тока и описываются кривыми дисперсии импеданса $Z(\omega)$ или адмиттанса $A(\omega)$. Однако в многочисленных работах, посвященных изучению изменений диэлектрических характеристик суспензий клеток после разного рода воздействий, измерялась лишь действительная составляющая импеданса суспензий на одной-двух частотах. При подобных методах измерений невозможно получить сколь-нибудь значительную информацию о диэлектрических свойствах тканей и сопоставлять экспериментальные данные с теоретическими представлениями.

В связи с этим рассмотрена методика измерений диэлектрических характеристик биологических объектов в широком частотном диапазоне и оценена возможность использования этих показателей для оценки состояния клеток крови.

Для быстрого измерения диэлектрических свойств биологического материала в широком диапазоне частот и автоматической обработки полученных данных был предложен метод Фурье-спектроскопии [17–19]. При использовании этого метода на измеряемый объект подается достаточно «богатый» сигнал воздействия, например сигнал, состоящий из большого числа синусоид, и регистрируется функция отклика объекта $A(t)$ в плоскости «амплитуда отклика – время». Если изучаемая система линейная и в ней выполняется закон Ома, т.е. импеданс системы не зависит от величины прикладываемого к системе напряжения, то суммарный отклик на воздействие будет равен сумме откликов на каждое из синусоидальных колебаний определенной частоты. Далее, проводя Фурье-преобразование функции $A(t)$, можно получить спектральную функцию $A(\omega)$.

В качестве подходящего сигнала, возбуждающего систему, использовали импульсную функцию $X(t)$:

$$X(t) = \begin{cases} H, & 0 \leq t \leq T \\ 0, & t > T \end{cases}. \quad (4)$$

Спектр единичного импульса прямоугольной формы дается следующим выражением:

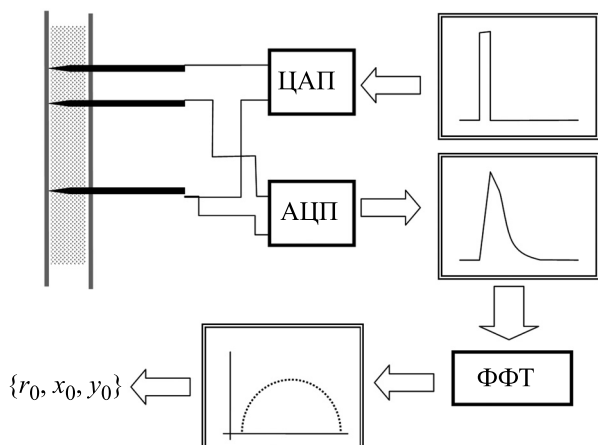


Рис. 3. Блок-схема оригинального автоматизированного диэлектрического Фурье-спектрометра для массовых экспрессных измерений диэлектрических свойств: 1) ЦАП (цифро-аналоговый преобразователь — генератор узкого прямоугольного импульса), 2) АЦП (аналого-цифровой преобразователь), 3) исследуемый образец, 4) регистрация ответного сигнала, 5) Фурье-преобразование полученного сигнала, 6) построение импеданс-годографа, 7) расчет и сохранение параметров импеданс-годографа.

$$X(\nu) = HT \frac{\sin 2\pi T\nu}{2\pi T\nu}, \quad (5)$$

где T — длительность импульса, H — его амплитуда.

Из выражения (5) следует, что воздействие на систему прямоугольного импульса длительностью T равносильно одновременному воздействию синусоидальных колебаний с частотами от 0 до ∞ . Хотя теоретически спектр (5) не ограничен, можно ввести некоторую граничную частоту существенной части спектра, в которой сосредоточена большая часть энергии импульса. Если исходить из условия сосредоточения в этой полосе 90% энергии импульса, граничная частота составит 0.73 от частоты первого нуля спектра:

$$\nu_m = 0,73 \frac{2\pi}{T}. \quad (6)$$

При длительности импульса $T = 10^{-5}$ с граничная частота $\nu_m = 459$ кГц.

Использование методов Фурье-спектроскопии дает, во-первых, значительный выигрыш во времени, требуемом для измерения, так как фактически одновременно производятся измерения на всех частотах, во-вторых, позволяет добиться полной автоматизации измерений, так как значения функции отклика системы $A(t)$ могут вводиться непосредственно в компьютер, где будет производиться Фурье-преобразование и вычисление параметров импеданс-годографа.

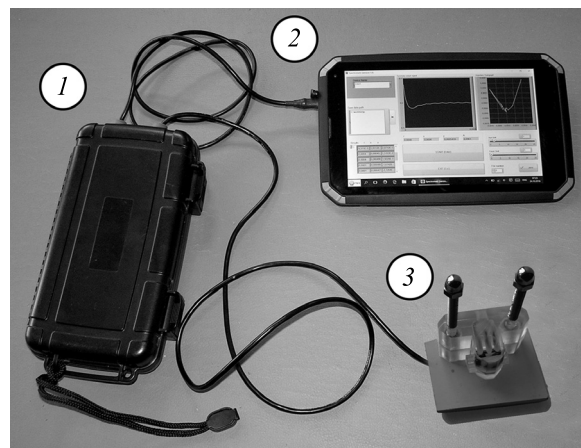


Рис. 4. Общий вид диэлектрического спектрометра для измерения, обработки и хранения данных, визуализации результатов: 1 — плата АЦП-ЦПУ, 2 — компьютер, 3 — кювета для измерений.

В целом схема измерения описана в работе [20] и представлена на рис. 3.

Конструктивно прибор состоит из трех блоков, соединенных сигнальными проводами: а) компьютера с программой проведения измерений, б) платы ввода-вывода, в) измерительной кюветы (рис. 4).

Компоненты соединяются посредством проводов, соединение платы ввода-вывода — измерительная кювета — неразборное соединение плата — компьютер имеет разъем microUSB.

Аналогово-цифровые преобразования производятся с помощью подключенной к компьютеру платы спектрометра. Непосредственно на измеряемый объект электрические импульсы подаются с помощью измерительной кюветы.

В качестве управляющего компьютера может использоваться большинство моделей, оборудованных microUSB-портом и работающих под управлением ОС Windows. Питание устройства производится от компьютера через USB-разъем. При питании компьютера от аккумуляторов непрерывная работа прибора обеспечивается не менее 6 ч.

При точечных измерениях с помощью Фурье-спектрометра обычно используют образец крови объемом 1 мл [21]. При этом результаты измерений характеризуют средние значения диэлектрических характеристик клеток в суспензии крови. Однако ясно, что существует разброс значений диэлектрических характеристик форменных элементов, и состояние крови будет зависеть не только от средних значений, но и вида функции плотности распределения форменных элементов по их состоянию. В связи с этим было желательно оценить не только средние значения диэлектри-

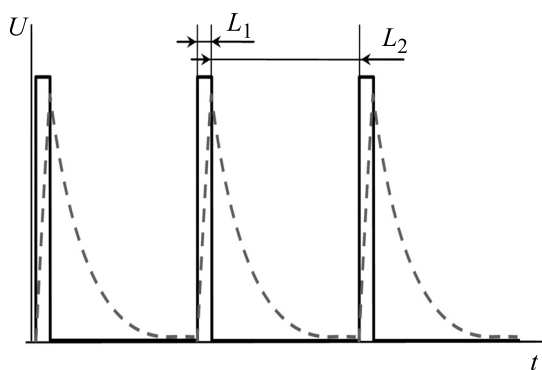


Рис. 5. Схема воздействия электрического поля U на объект и изменения уровня поляризации объекта (L_1 — продолжительность импульса тока, L_2 — продолжительность отклика системы на поляризацию).

ческих характеристик суспензии форменных элементов крови, но и функцию распределения этих показателей. В предельном случае задачу можно решить, измеряя диэлектрические характеристики отдельных клеток крови. Однако такая задача достаточно сложна технически и требует значительно времени для измерений. В качестве альтернативы нами предложено оценить флуктуации диэлектрических характеристик небольших объемов форменных элементов крови.

Флуктуационный диэлектрический Фурье-спектрометр (ФДФС) отличается от описанного выше устройства объемом измеренных образцов и программой измерений.

Используя ФДФС, проводят последовательные измерения малых объемов крови (до 0.002 мл) одного пациента. Предполагается, что вариации состава образца зависят от величины $\sqrt{V}$, где V — объем образца. Различия в диэлектрических характеристиках крови малого объема будут тем больше, чем меньше объем образца и чем шире функция плотности распределения форменных элементов по диэлектрическим характеристикам.

Однако следует иметь в виду, что, наряду с колебаниями измеренных значений диэлектрических свойств образца, вследствие флуктуации состава крови могут проявляться колебания диэлектрических характеристик, связанные с аппаратным шумом измерений, и эти два типа колебаний необходимо разделить. В связи с этим процедура измерений с помощью ФДФС выглядит следующим образом:

— в микрокювету набирается образец крови, и производится цикл измерений диэлектрических характеристик. Отдельное измерение включает в себя подачу на образец прямоугольного импульса напряжения длительностью 1/250 000 с и последующее в течение 200/250 000 с измерений функции

поляризации. Через 201/250 000 с сигнал затухает, и система возвращается к равновесию с нулевым значением вектора поляризации (рис. 5);

— процедура измерений повторяется 10 000 раз, т.е. процедура измерений длится 20 100/250 000 с, или менее 10 с.

При проведении этой процедуры на результаты измерения будут оказывать влияние аппаратные шумы. Для их выделения будет проводиться процедура усреднения по ансамблю из 10 000 измерений, оцениваться отклонения значений диэлектрических измерений каждого из 10 000 измерений от среднего и вычисляться функция плотности распределения шумовых значений.

На следующем этапе измерения с помощью манипулятора рабочая часть кюветы заполняется новым образцом крови, и повторяются измерения этапов 1 и 2.

Для полученных значений диэлектрических характеристик и их шумов на всех этапах оцениваются средние значения диэлектрических характеристик по всем образцам и функции плотности распределения диэлектрических характеристик.

Измерения и расчеты с помощью ФДФС производятся в течение примерно одной минуты и позволяют получить функцию плотности распределения этих характеристик у пациента.

В отличие от предыдущей модели диэлектрического спектрометра, для измерений с помощью которого было достаточно кюветы с измеряемым образцом крови, платы АЦП—ЦАП и компьютера с программным обеспечением, для ФДФС потребовалось разработать систему принудительного движения образца крови через измерительную кювету. К данной системе предъявлялись следующие требования:

— малая скорость движения жидкости. В нашем случае рабочий объем не превышает 50–70 мкл. Таким образом, скорость потока должна быть не более 300 мкл в минуту;

— относительная непрерывность движения. Это исключило из использования большинство систем перфузионной терапии. В данных системах осуществляется автоматический ввод лекарственных препаратов с заданной скоростью и объемом. Однако дискретизация по тактам времени обычно составляет не менее 1 с. В связи с этим для подачи крови была разработана система на основе перистальтического насоса с пропускной способностью 10 мл/мин. Для понижения скорости течения была собрана гидравлическая понижающая система на основе двух поршневых шприцев с объемами 30 и 1 мл. Таким образом, минимальная скорость течения потока в рабочей зоне составляет 100 мкл в час. Минимальное время дискретизации работы насоса около 0.01 с, что обеспечивает необходимую плавность подачи жидкости. В целом система подачи представляет

собой настольную лабораторную установку с габаритами $20 \times 20 \times 10$ см.

Измерительной кюветой, единственным объектом, постоянно контактирующим с образцами крови, является короткая (5 см) силиконовая трубка с внутренним диаметром 1 мм. Три контактные иглы проходят обжим силиконовыми стенками, не допуская утечек образца крови. Используемая трубка является расходным материалом, что обеспечивает санитарную безопасность проведения измерений.

Для расчетов используется оригинальное программное обеспечение, разработанное на базе программного комплекса LabView. В отличие от предыдущих вариантов программы диэлектрической спектроскопии, в данной версии реализован 10-секундный цикл непрерывных измерений с частотой 1000 измерений в секунду с последующей обработкой и сохранением данных.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве примеров использования ФДФС приведем данные измерений объектов — крови лабораторной мыши и крови человека.

В первом эксперименте использовали белых лабораторных мышей-самцов массой 25–27 г, полученных в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск, Россия). Предварительно мышам в брюшную полость вводили суспензию клеток асцитной карциномы Эрлиха в концентрации 3×10^6 клеток/мл [22].

Отбор проб периферической крови проводили из хвостовой вены мышей в динамике роста опухоли на 5-е, 8-е, 10-е, 12-е, 15-е и 17-е сутки. Период забора проб соответствует этапам развития асцитной карциномы Эрлиха в организме животного: 5–8-е сутки — период экспоненциального роста с активной пролиферацией клеток, 10–12-е сутки — стационарная фаза и 15–17-е сутки — терминальная стадия развития заболевания [23].

На каждую дату проводили измерения диэлектрических характеристик крови и определение лейкоцитарной формулы экспериментальных мышей.

Подсчет лейкоцитарных элементов проводили методом световой микроскопии (ок. $10\times$, об. $90\times$) на мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе [24]. В результате взаимодействия с красителем клетки приобретают ярко выраженную специфическую окраску, что позволяет произвести их подсчет и дифференцировку. На мазках подсчитывали не менее 200 клеток, выделяя пять основных видов лейкоцитов (нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, лимфоцитов, моноцитов). Исследование проводили на оборудовании, входящем в состав УНУ «Комплекс оборудования

для управляемого культивирования изолированных органов».

Во втором эксперименте оценивали диэлектрические характеристики крови двух групп, а именно контрольной группы (20 здоровых людей) и группы с патологическими изменениями — 14 пациентов с диагнозом хронической ишемической болезни сердца (ИБС) (в восьми случаях стабильная стенокардия напряжения II–III функционального класса и у восьми человек нарушения ритма по типу фибрилляции предсердий, а у девяти из них отмечались признаки декомпенсации хронической сердечной недостаточности).

Средний возраст пациентов — семь женщин (50%), семь мужчин (50%) — составил 70.6 года. Четыре пациента (28.6%) имели в анамнезе перенесенный инфаркт миокарда, два пациента (18.2%) — острое нарушение мозгового кровообращения. Среди пациентов, госпитализированных по причине декомпенсации хронической сердечной недостаточности (64.3% — девять человек), двусторонний гидроторакс отмечался в 66.67% случаев (шесть человек), в сочетании с асцитом — 22.23% (два человека), при этом отеки стоп и голеней были выявлены в 77.78% случаев среди пациентов с декомпенсацией хронической сердечной недостаточности. Средняя сатурация составила 95.1%, среди пациентов с декомпенсацией хронической сердечной недостаточности — 93.67%. Среднее артериальное давление среди всех пациентов — 136.7/80.7 мм рт.ст, средняя частота сердечных сокращений — 95.7 уд./мин, частота дыхательных движений — 21/мин.

ПРОЦЕДУРА ИЗМЕРЕНИЙ

Диэлектрические характеристики импеданс-годографов во всех экспериментах измеряли для последовательности 10000 измерений за 10 с образца крови, движущегося под воздействием микронасоса через измерительную капиллярную кювету. Типичная форма измерений для отдельных пациентов в первом и втором экспериментах приведена на рис. 6.

По мере перемещения микроскопического образца крови через измерительную кювету его диэлектрические характеристики флуктуируют, и можно оценить функцию плотности распределения $f(R_b)$ параметра R_b по 10000 измерениям диэлектрических характеристик и функцию распределения $F(\Delta R_b)$ значений разностей $\Delta R_b = (R_b(i) - R_b(i-1))$, где i — номер измерения. Если значения R_b не меняются в процессе измерений, то все значения $\Delta R_b = 0$. Если отличия смежных значений R_b редки и большая часть измеренных показателей равна некоторому значению $R_b(c)$, то разброс значе-

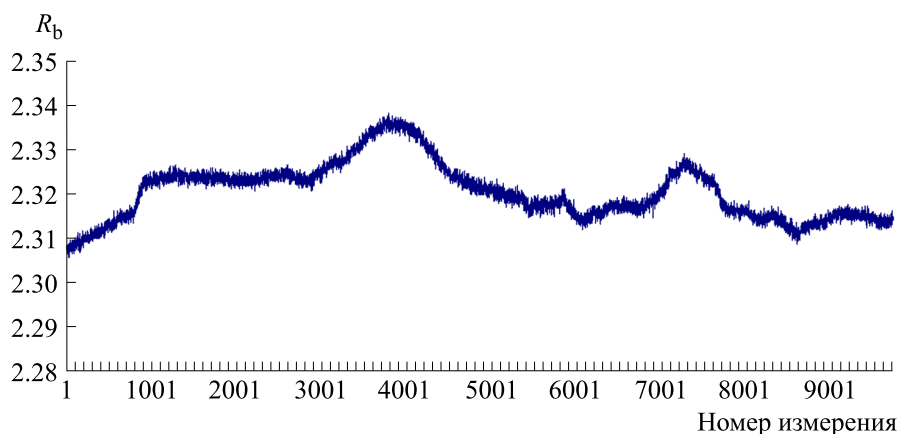


Рис. 6. Порядковый ряд измерений для пациента с ИБС.

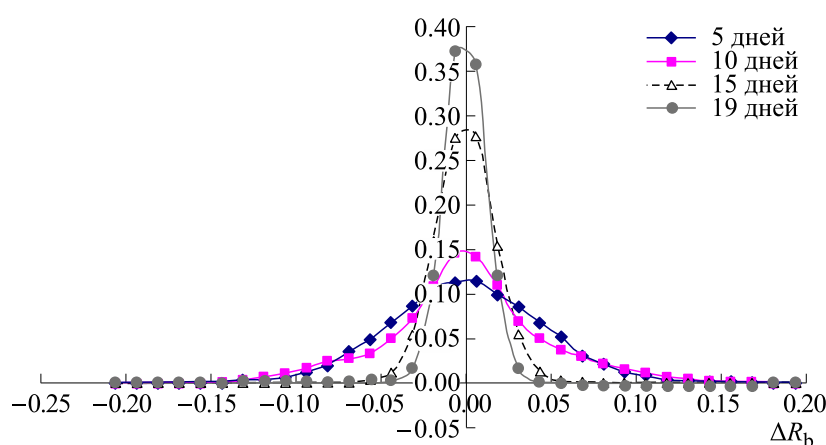


Рис. 7. Функция плотности распределения по диэлектрическому параметру ΔR_b для мышей, зараженных асцитной карциномой Эрлиха. Кривые для разного времени после введения асцитной карциномы Эрлиха.

ний вокруг $R_b(c)$ невелик и значения функции $F(\Delta R_b)$ будут сосредоточены вокруг значения $\Delta R_b = 0$. Если же значения R_b сильно различаются, то функция $F(\Delta R_b)$ будет характеризоваться большим разбросом значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для каждой мыши на различные сутки эксперимента были измерены диэлектрические характеристики и построены функции плотности распределения $F(\Delta R_b)$ по результатам 10000 измерений (рис. 7).

Как видно, по мере роста опухолевых клеток растет эксцесс функции плотности распределения и амплитуда максимума. С чем же связаны изменения функции плотности распределения $F(\Delta R_b)$? В табл. 1 приведены изменения состава форменных элементов крови у мышей в ходе экс-

перимента. Видно, что в ходе эксперимента произошло изменение состава форменных элементов и более 80% клеток в конце эксперимента составляли нейтрофилы. Однородность состава форменных элементов хорошо согласуется с малым значением эксцесса функции плотности распределения $F(\Delta R_b)$.

Аналогичные расчеты функций плотности распределения $f(R_b)$ были выполнены для пациентов с ИБС и здоровых людей из контрольной группы (рис. 8).

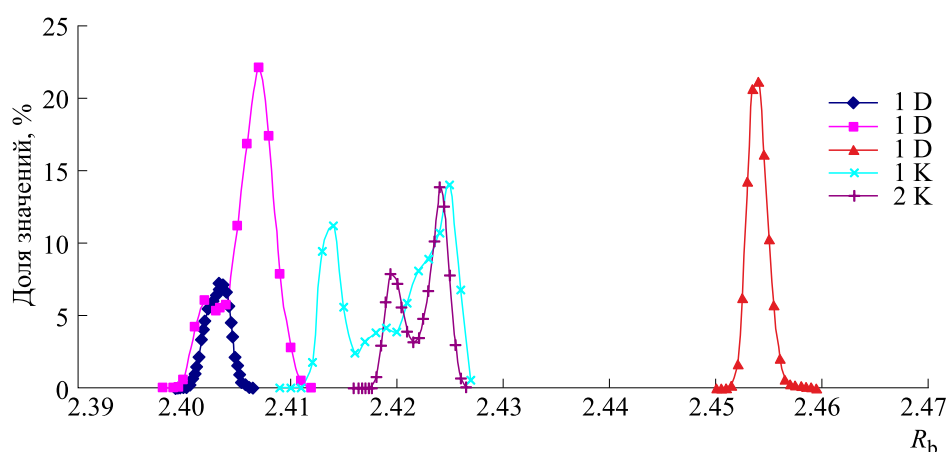
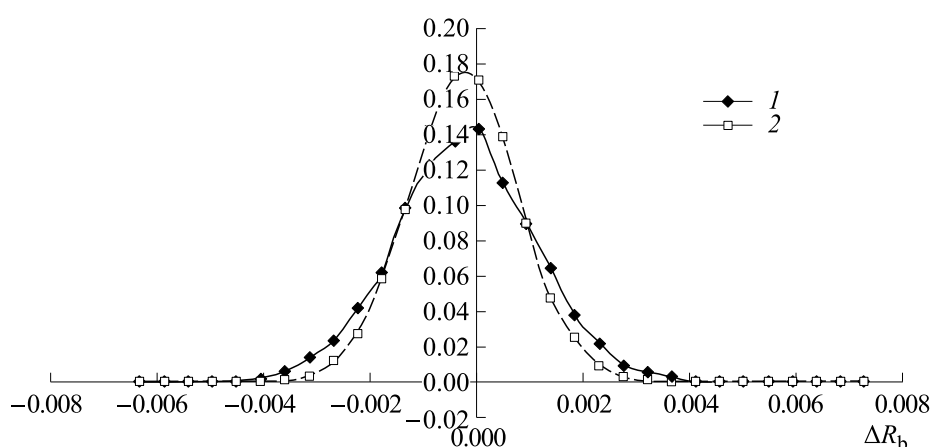
Как видно на рис. 8, у пациентов с ИБС функция плотности распределения унимодальная, а в контрольной группе (здоровые люди) — бимодальная. Однако для пациентов характерен индивидуальный разброс абсолютных значений R_b , что затрудняет сравнение характеристик у больных ИБС и здоровых (контрольная группа). Для нормировки функций распределения можно перейти к функциям $F(\Delta R_b)$ (рис. 9).

Таблица 1. Изменения состава форменных элементов крови у мышей в ходе эксперимента

Время после начала эксперимента, сут.	Состав крови, %				
	Лимфоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Моноциты	Базофилы
5	34.51	54.39	3.19	7.48	0.43
8	32.49	55.88	1.69	9.94	0.00
10	17.89	74.81	0.49	6.81	0.00
12	15.11	80.20	0.11	4.17	0.40
15	13.22	82.14	0.22	3.87	0.55
17	12.81	82.58	0.27	4.34	0.00

Как видно из сравнения функций плотности распределения $F(\Delta R_b)$ на рис. 7 и 9, они будут иметь общий вид для всех изученных объектов. Характеристики функций плотности распределе-

ния $F(\Delta R_b)$ — значения максимума функции и эксцесса (четвертого центрального момента распределения) — для контрольной группы сравнивались с данными для больных ИБС (рис. 10).


Рис. 8. Функции плотности распределения параметра R_b для пациентов с ИБС (пациенты 1D, 2D, 3D) и здоровых людей контрольной группы (1K и 2K).

Рис. 9. Типичные функции плотности распределения значений ΔR_b для здоровых людей (контрольная группа) и больных ИБС: 1 — контроль, 2 — пациенты с ИБС.

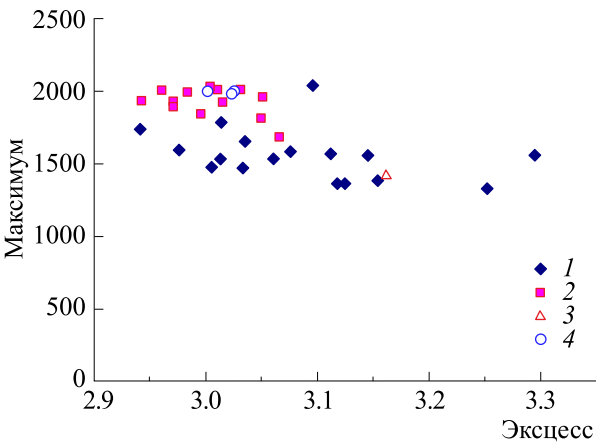


Рис. 10. Различия между контрольной группой и больными ИБС по значениям эксцесса и максимума значения функций плотности распределения: 1 – здоровые люди, 2 – больные ИБС, 3 – ошибка первого рода (пропуск цели), 4 – ошибка второго рода (ложная тревога).

Таблица 2. Классификационная матрица диагностики

	Число точных диагнозов, %	Здоровые	Больные	Ошибки
Здоровые	85.00	17	3	0.150
Больные	92.86	1	13	0.071

Качество диагностики по показателям флуктуационного диэлектрического спектрометра отражено в табл. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрен метод оценки диэлектрических характеристик суспензии крови, позволяющий экспрессно оценить разброс характеристик разных форменных элементов. Предложенный метод позволяет проводить экспресс-диагностику морфофункционального состояния мембран форменных элементов крови у животных и человека. В ходе развития патологических процессов в организме функция плотности распределения диэлектрических показателей трансформируется из поли- в унимодальную форму, что можно рассматривать как показатель состояния крови.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных и рекомендациями локального биоэтического комитета. Процедуры, выполненные в работе с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсин-

ской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисов Ю. А., Левыкина Е. Н., Миндукшев И. В. и Суглобова Е. Д. Модификация метода эритрограмм у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, посредством аппаратного исполнения лазерного малоуглового светорассеяния. *Клинич. лабор. диагностика*, № 4, 22–40 (2014).
2. Deryugina A. V., Ivashchenko M. N., Ignatyev P. S., Belov A. A., and Petrov V. A. Diagnostics possibilities of erythrocytes analysis by the method of laser interference microscopy. *Klin. Lab. Diagn.*, **66** (1), 22–25, (2021). DOI: 10.18821/0869-2084-2021-66-1-22-25
3. Vlasova I. I., Mikhalechik E. V., Gusev A. A., Balabuschewich N. G., Gusev S. A., and Kazarinov K. D. Extremely high-frequency electromagnetic radiation enhances neutrophil response to particulate agonists *Bioelectromagnetics*, **39** (2), 144–155 (2018). DOI: 10.1002/bem.22103
4. Beving H., Eriksson L. E. G., Davey C. L., and Kell D. B. Dielectric properties of human blood and erythrocytes at radio frequencies (0.2–10 MHz); dependence on cell volume fraction and medium composition. *Eur. Biophys. J.*, **57**, 207–215 (1994).
5. Chelidze T. Dielectric spectroscopy of blood. *J. Non-Cryst. Solids*, **305**, 285–294 (2002).

6. Hayashi Y., Katsumoto Y., Omori S., Yasuda A., Asami K., Kaibara M., and Uchimura I. Dielectric Coagulometry: A New Approach To Estimate Venous Thrombosis Risk. *Anal. Chem.*, **82** (23), 9769–9774 (2010). DOI: 10.1021/ac101927n
7. Hayashi Y., Katsumoto Y., Oshige I., Omori S., Yasuda A., and Asami K. Dielectric Inspection of Erythrocytes. *J. Non-Cryst. Solids*, **356**, 757–762 (2010).
8. Jaspard F., Nadi M., Rouane A. Dielectric properties of blood: an investigation of haematocrit dependence. *Physiol. Meas.*, **24** (1), 137–147 (2003). DOI: 10.1088/0967-3334/24/1/310
9. Pribush A., Meiselman H. J., Meyerstein D., and Meyerstein N. Dielectric approach to the investigation of erythrocyte aggregation: I. Experimental basis of the method. *Biorheology*, **36** (5–6), 411–423 (1999).
10. Schwan H. P. Electrical properties of blood and its constituents: alternating current spectroscopy. *Blut*, **46** (4), 185–197 (1983).
11. Sudsiri J., Wachner D., and Gimsa J. On the temperature dependence of the dielectric membrane properties of human red blood cells. *Bioelectrochemistry*, **70** (1), 134–140 (2007). DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.010
12. Gabriel S., Lau R. W., and Gabriel C. The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. *Phys Med Biol.*, **41**, 2251–2269 (1996). DOI: 10.1088/0031-9155/41/11/002
13. Schanne O., Ruiz P., and Ceretti E., *Impedance measurements in biological cells* (John Wiley & Sons, N.Y., 1978).
14. Schwan H. P. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv. Biol. Med. Phys.*, **5**, 147–209 (1957). DOI: 10.1016/b978-1-4832-3111-2.50008-0
15. Cole K. S. and Cole R. H. Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics. *J. Chem. Phys.*, **9**, 341–351 (1941). DOI: 10.1063/1.1750906
16. Cole K. S. Electric impedance of suspensions of spheres. *J. Gen. Physiol.*, **12** (1), 29–36 (1928). DOI: 10.1085/jgp.12.1.29
17. Lisin R., Ginzburg B. Z., Schlesinger M., and Feldman Y. Time domain dielectric spectroscopy study of human cells. I. Erythrocytes and ghosts. *Biochim. Biophys. Acta*, **1280** (1), 34–40 (1996).
18. Суховольский В. Г., Прозоров С. П. и Русских А. В. Диэлектрическая импульсная Фурье-спектроскопия биологических тканей. В кн. *Тезисы докладов II Съезда биофизиков России* (М., 1999), т. II, сс. 624–625.
19. Feldman Y., Ermolina I., and Hayashi Y. Time Domain Dielectric Spectroscopy Study of Biological Systems. *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, **10** (5), 728–753 (2003). DOI: 10.1109/TDEI.2003.1237324
20. Суховольский В. Г., Ковалев А. В., Гринштейн Ю. И., Андина Л. А. и Косинова А. А. В кн. *Матер. V Троицкой конф-ии «Медицинская физика и инновации в медицине»* (Троицк, 2012), т. 2, сс. 362–363.
21. Гринштейн Ю. И., Косинова А. А., Гринштейн И. Ю., Суховольский В. Г., и Ковалев А. В. Способ экспресс-диагностики резистентности и чувствительности к ацетилсалициловой кислоте. Патент РФ № 2578428 от 25.02.2016.
22. *Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха: методическая разработка* Сост. Е. В. Инжеваткин (КрасГУ, Красноярск, 2004).
23. Ozaslan M., Karagoz I. D., Kilic I. H., and Guldur M. E. Ehrlich ascites carcinoma. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**, 2375–2378 (2011).
24. *Клиническая физиология: методические рекомендации*. Сост. А. В. Рыбаков (Костромская ГСХА, Караваево, 2021).

Fluctuation Dielectric Fourier Spectrometer and Rapid Evaluation of Blood Cell Characteristics

A.V. Kovalev*, Yu.I. Grinstein**, A.N. Maltseva**, O.V. Krukova*, and V.G. Soukhovolsky*

*Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Akademgorodok 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

**Professor V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
ul. Partizana Jeleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

A method for determining a state of formed elements from dielectric properties is considered. A design of a fluctuation dielectric Fourier spectrometer is presented which offers the possibility of estimating the distribution of blood cells according to the state of membranes. To demonstrate this method, experiments on the assessment of the functional state of patients with coronary heart disease and experiments on the effect of Ehrlich ascites carcinoma in laboratory mice are described. It has been shown that using the proposed spectrometer, it is possible to obtain rapid assessments of changes in blood characteristics in diseases and to reveal dynamics of pathological processes in animals after infection.

Keywords: blood, formed elements, state, dielectric characteristics, fluctuations, measurements, device

ВЛИЯНИЕ ПУЛЬСИРУЮЩЕГО ХАРАКТЕРА ДВИЖЕНИЯ ЛИКВОРА НА ПАТОЛОГИИ ПОЗВОНОЧНИКА

© 2024 г. А.Г. Зверев*, Ю.Н. Токарев*,#

*Институт проблем безопасного развития атомной энергетики РАН,
Большая Тульская ул., 52, Москва, 115191, Россия

#E-mail: ytokarev@ya.ru

Поступила в редакцию 19.01.2023 г.

После доработки 19.01.2023 г.

Принята к публикации 01.02.2023 г.

*«До тех пор, пока МОЗГ не будет в достаточном количестве
поставлять ликвор, организм будет больным».*

Э.Т. Стилл

На основе динамического параметра расхода спинномозговой жидкости приводится оригинальная формула оценки патологии позвоночно-двигательных сегментов позвоночника. Приведены графики, которые наглядно показывают изменение патологии от глубины травматизации. Полученные данные будут полезны специалистам по компьютерной и магнитно-резонансной томографии, в настоящее время упрощенно описывающим саму патологию.

Ключевые слова: позвоночно-двигательный сегмент, расход, глубина травматизации.

DOI: 10.31857/S0006302924010194, EDN: QUNVAX

Патологии (дисфункции) позвоночника в классическом понимании делятся на сколиозы и различные виды деформаций, главные из которых костные дефекты, протрузии, грыжи. Также существуют редкие неврологические расстройства: мильформация Киари, серингомеолия и т.п., которые в работе и рассматриваются. Эти патологии сопровождаются изменениями анатомического положения позвонка или группы позвонков, которые определяются как дисфункции позвоночно-двигательных сегментов и делятся на физиологические и нефизиологические (травматические). Наличие самой патологии влияет либо на ограничение движения, либо на возникновение болей. Более сложные случаи являются либо дисфункцией Вебстера, грубой травмой, родовой травмой, либо вытекают из вышеприведенного. На основании того же понимания и по снимкам компьютерной и магнитно-резонансной томографии ставится диагноз дорзопатия (остеохондроз) или его вариант с дополнительным описанием протрузий, сколиозов, грыж и т.п. При большей квалификации невролога (вертебролога) диагноз может быть связан с патологией отдельного органа. Эта статистическая информация не

объясняет, почему снижается работоспособность, слабеют мышцы и внутренние органы, происходит потеря гибкости. Наша работа показывает, что эти изменения происходят в первую очередь из-за изменения динамических параметров: давления и расхода спинномозговой жидкости (СМЖ) в зоне дисфункции спинальной полости и, как следствие, в микроспинальной полости спинномозгового нерва. Они влияют на снижение проводимости и общей работоспособности спинномозговых нервов, которых питает СМЖ и выводит из них отработанные продукты жизнедеятельности [1–3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При неправильном трехмерном анатомическом положении позвонка (диагностируемая дисфункция) происходит вдавливание позвоночного кольца в твердую мозговую оболочку спинного мозга. При этом на наружном радиусе спинальной полости будет образовываться рубец (локальное сжатие), который располагается микровыступом внутри полости. Здесь дисфункция аппроксимируется микровыступом, размеры которого необходимо взять из снимков компью-

Сокращения: СМЖ – спинномозговая жидкость.

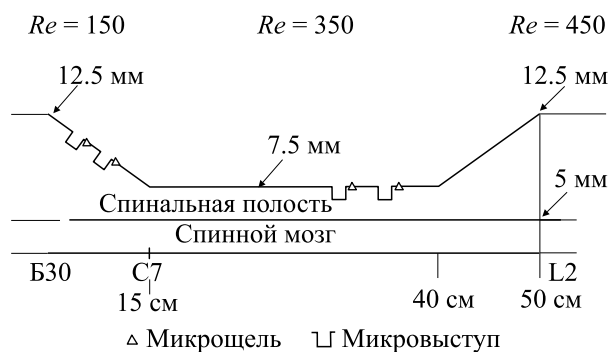


Рис. 1. Схема спинной полости с вариантами дисфункции, в зону микрошели выходит соответствующий спинно-мозговой нерв.

терной и магнитно-резонансной томографии (рис. 1).

Ниже этого дефекта в твердой мозговой оболочке спинного мозга расположены микрошели, куда выходят спинномозговые нервы (рис. 2).

По конструкции спинномозговой нерв является аналогом кольцевой трубы (микроспинальной полостью) между твердой мозговой и наружной (эпиневрием) оболочками нерва. Внутри микроспинальной полости нерва также пульсирует СМЖ [7], поскольку спинальная и микроспинальная полости едины. В зоне дисфункции происходит двухсторонний синхронный процесс. С одной стороны, из-за механического ограничения движения сегментарно в локальном объеме нарушаются тонусно-силовые характеристики [4]. Это приводит к снижению потребности соответствующего спинномозгового нерва в необходимом количестве СМЖ. С другой стороны, дис-

функция локально приводит к скручиванию твердой мозговой оболочки (локальному стенозу) по сечению. Это приведет к уменьшению площади сечения микроспинальной полости на переходе спинальная полость/микроспинальная полость, что вызовет увеличение необходимой силы, т.е. внутричерепное давление для прокачивания объема СМЖ без патологии, вдоль нерва для ее всасывания в оболочку нерва. В итоге дисфункция уменьшает суммарный объем спинальной и микроспинальной полостей, т.е. общий объем спинномозговой жидкости в них [1, 11], тем самым уменьшая общий расход. Кроме этого, за дисфункцией возникают зоны пониженного давления [6], что также приводит к снижению всасывания СМЖ паутинными грануляциями [12, 13] в оболочки спинномозгового нерва. Таким образом, через периневральные щели СМЖ будет меньше всасываться в нерв, что со временем приведет к его деградации. Эта гидродинамика СМЖ

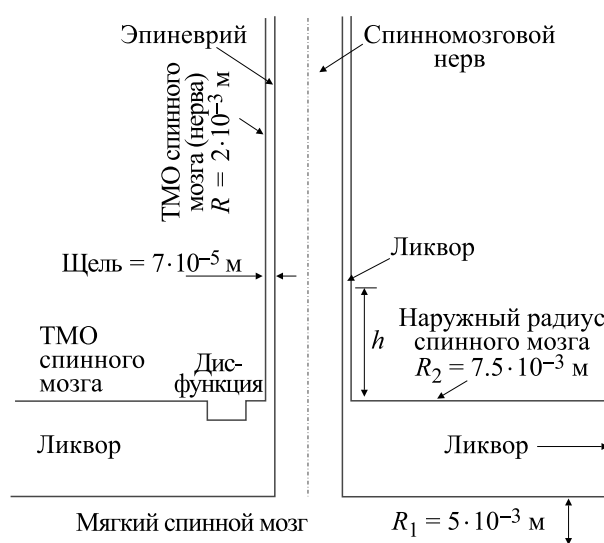


Рис. 2. Схема микроспинальной полости с вариантом дисфункции. ТМО — твердая мозговая оболочка.

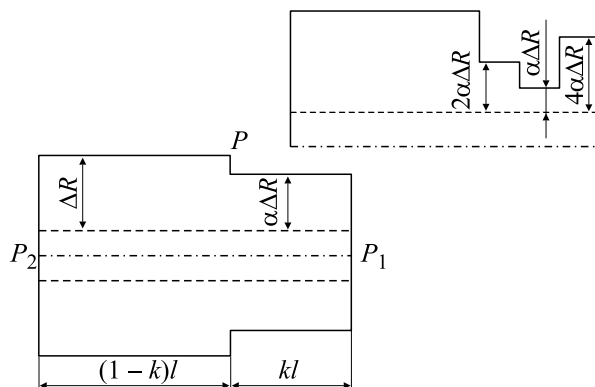


Рис. 3. Суммирование одинаковых дисфункций на правой стороне схемы спинальной полости.

будет снижать потребность нерва в ней, ослабляя силу центральной нервной системы, тонус мускулатуры и работоспособность внутренних органов.

В работе [7] была получена удобная приближенная формула расчета расхода Q нестационарного течения СМЖ внутри спинальной полости:

$$Q_{\max} = \frac{3}{4} \pi \frac{R_2^2 \cdot R_2^2 \cdot \Delta P \cdot \left(1 - \frac{R_1}{R_2}\right)^3}{\rho \cdot v \cdot \sqrt{9 + 4\pi^2 \cdot \alpha^4}}.$$

С учетом замен

$$\rho \cdot A = \Delta P, U_p^2 = A \cdot R_2, U_v = \frac{v}{R_2},$$

$$\tilde{A} = \frac{3}{4} \pi \frac{1}{\rho \cdot v \cdot \sqrt{9 + 4\pi^2 \cdot \alpha^4}}$$

имеем

$$Q = \tilde{A} \cdot R \cdot \Delta R^3 \cdot \frac{\Delta P}{l}.$$

для участка длиной l .

Используя закон Ома для гидродинамической проводимости и условия непрерывности [1], приведем схему сдвига всех патологий на правую сторону и ее варианта с разной глубиной травматизации (рис. 3), где $0 \leq k, \alpha \leq 1, \alpha = \tilde{\alpha}, k$ — общая длина патологии спинальной полости, $\tilde{\alpha} \times \Delta R$ — доля глубины травматизации за счет дисфункции позвонков.

Тогда

$$Q_1 = \tilde{A} \cdot R \cdot \Delta R^3 \cdot \frac{P_2 - P}{(1-k)l},$$

$$Q_2 = \tilde{A} \cdot R \cdot \Delta R^3 \cdot \tilde{\alpha}^3 \frac{P - P_1}{kl}.$$

В силу непрерывности потока

$$Q_1 = Q_2$$

и на границе перепада радиуса зазора за счет дисфункции

$$\begin{aligned} \tilde{A} \cdot R \cdot \Delta R^3 \cdot \frac{P_2 - P}{(1-k)l} &= \tilde{A} \cdot R \cdot \Delta R^3 \cdot \tilde{\alpha}^3 \frac{P - P_1}{kl} \rightarrow (P_2 - P)k = (P - P_1)\tilde{\alpha}^3(1-k) \rightarrow \\ &\rightarrow P = \frac{P_2 k + \tilde{\alpha}^3(1-k)P_1}{k + \tilde{\alpha}^3(1-k)}. \end{aligned}$$

Тогда соотношение норма Q_1 /патологии Q будет равно

$$\frac{Q_1}{Q} = \frac{P_2 - P}{(1-k)l} \frac{\tilde{A} \cdot R \cdot \Delta R^3}{\tilde{A} \cdot R \cdot \Delta R^3} \frac{l}{P_2 - P_1} = \frac{P_2 - \frac{kP_2 + \tilde{\alpha}^3(1-k)P_1}{k + \tilde{\alpha}^3(1-k)}}{(1-k)(P_2 - P_1)} = \frac{kP_2 + \tilde{\alpha}^3(1-k)(P_2 - P_1) - kP_2}{(1-k)(k + \tilde{\alpha}^3(1-k))(P_2 - P_1)} = \frac{\tilde{\alpha}^3}{k + \tilde{\alpha}^3(1-k)}.$$

Эта формула показывает потери ликвора (СМЖ), что позволяет легко понять сложную

гидродинамику процесса. В результате преобразований, перепада давления и сжатия пери-

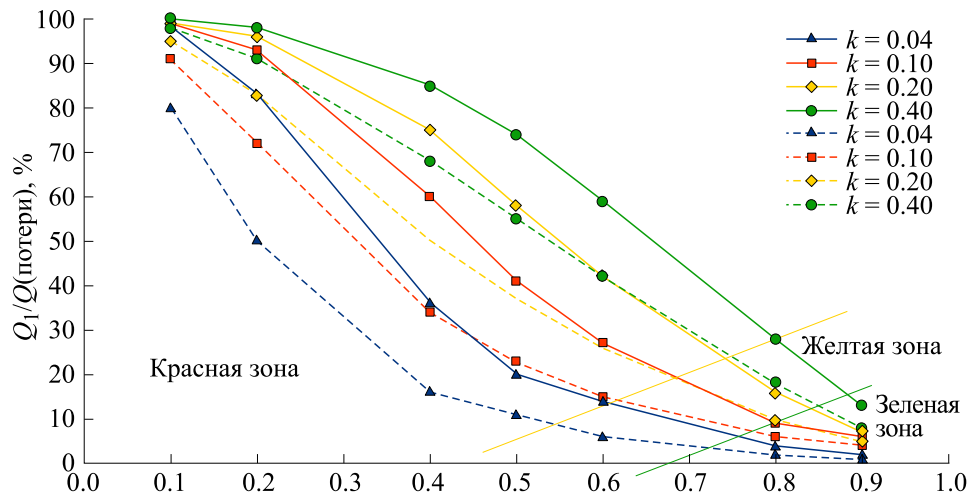


Рис. 4. Потери ликвора от глубины травматизации (в %).

невралных шелей за счет дисфункции потери СМЖ приведут к медленной деградации спинномозгового нерва, а не за счет его псевдоущемления дисфункцией [8]. Для разных дисфункций коэффициент k необходимо пересчитывать (рис. 3, справа), для него k меняем на $k' = (73/192)k$, исходя из сопротивления участка длины l , равного

$$\left(\frac{kl}{\tilde{A} \cdot R \cdot \Delta R^3 \tilde{\alpha}^3} \right).$$

Пусть для дисфункции двух позвонков $k = 0.04$ (4%), для пяти позвонков $k = 0.10$ (10%), для десяти позвонков $k = 0.20$ (20%), для двадцати позвонков $k = 0.40$ (40%).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Смещение крутизны графиков в сторону меньшей глубины травматизации для нестационарного течения по отношению к стационарному течению показывает резкое снижение возможностей, при которых еще вероятна физиологическая дисфункция. По форме графиков можно предположить, что потери до 15% организм еще может компенсировать. Эти потери происходят за счет как физиологической, так и нефизиологической дисфункции f , т.е. зеленая и желтая зоны. Но с увеличением угла наклона потери начинают резко возрастать для всех видов поражений от $k = 0.04$ – 0.40 . На рис. 4 дисфункции пяти позвонков стационарного течения уже соответствуют дисфункциям двух позвонков нестационарного течения.

При нестационарном течении дисфункции пяти позвонков соответствуют дисфункциям десяти позвонков стационарного течения и т.д. вплоть до дисфункций десяти позвонков, соответствующих дисфункциям двадцати позвонков с

резким возрастанием глубины дисфункции по параметру.

Фактически наличие дисфункции двух позвонков соответствующего поражения меняет физиологическую дисфункцию на нефизиологическую, поэтому травматические дисфункции выходят на первый план, что в реальной жизни мы и наблюдаем. Достаточно одной крупной дисфункции, чтобы произошло локальное ограничение движения (наклонов и поворотов), без учета постепенного снижения общей работоспособности, меньшей выработки СМЖ мозгом, снижения функций внутренних органов, потери максимальной силы в стандартных тестах. Позвоночник человека теряет общую гибкость, а вместе с ней и силу в виде снижения собственного объема движений, человек скован, испытывает небольшие хронические боли, приводящие к асимметрии тела (анатомически), которые не дают полноценно жить и работать. Полученные результаты сделаны с определенной долей точности, с ориентиром на изменение крутизны графиков и глубины дисфункции, которые с увеличением патологии локально будут уменьшать амплитуду движения. Возможно, что потери расхода СМЖ более 25% с глубиной поражения более 50% анатомически могут быть предельны, а далее идет разрушение позвонка или разрыв его связок. Тем не менее модель показывает, что при любом наборе дисфункций все графики попадают в красную зону, где травматизация будет ощущаться острой болью, глубоким спазмом, отсутствием подвижности вообще и ступором биомеханики тела. Кроме этого, хорошо видно влияние глубины поражений на потери ликвора. Такие графики могут показывать триединство мира:

Таблица 1. Результаты зависимости потери ликвора от глубины травматизации для нестационарного течения, с учетом приближенной формулы [7], где $\frac{Q_1}{Q} = \frac{\tilde{\alpha}^3}{k + \tilde{\alpha}^3(1-k)}$

Процентное отношение глубины травматизации $\tilde{\alpha}$, отн. ед.	Дисфункция двух позвонков		Дисфункция пяти позвонков		Дисфункция десяти позвонков		Дисфункция двадцати позвонков	
	Отношение нормы к патологии, отн. ед.	Потери ликвора Q_1/Q , %	Отношение нормы к патологии, отн. ед.	Потери ликвора Q_1/Q , %	Отношение нормы к патологии, отн. ед.	Потери ликвора Q_1/Q , %	Отношение нормы к патологии, отн. ед.	Потери ликвора Q_1/Q , %
0.9 (10%)	0.98	2	0.94	6	0.93	7	0.87	13
0.8 (20%)	0.96	4	0.91	9	0.84	16	0.72	28
0.6 (40%)	0.86	14	0.73	27	0.58	42	0.41	59
0.5 (50%)	0.80	20	0.59	41	0.42	58	0.26	74
0.4 (60%)	0.64	36	0.40	60	0.25	75	0.15	85
0.2 (80%)	0.17	83	0.07	93	0.04	96	0.02	98
0.1 (90%)	0.02	98	0.01	99	0.01	99	0.002	~100

земля — начало зеленой зоны, где происходит зарождение жизни (энергия + жидкость), затем зеленая, желтая и начало красной зоны соответствуют человеку, а далее небо — красная зона, где ликвор начинает стремиться к нулю — смерть (—энергия и жидкость). Каждый график является линией судьбы отдельного человека с патологией от единиц до десятков дисфункций. Таким образом, нефизиологические (травматические) дисфункции являются главными повреждениями позвоночника. К ним относятся травмы внутриутробного развития, родовые, травмы в течение жизни и глубокие психоэмоциональные. Резкое снижение потребности в полном объеме ликвора в спинальной полости ведет к уменьшению его производства в головном мозгу. Это влечет спад общей работоспособности, так как ликвор не в полной мере выполняет дренажную функцию, т.е. отвод продуктов жизнедеятельности из головного мозга и позвоночника. Это приведет к замедлению движений, запускающих старение тела, которое в первую очередь связано с нарушением биомеханики черепа, позвоночника и крестца, т.е. структур управления производства ликвора, кровотоком, а не возрастным старением. Такая механика управляется изменением динамических параметров: функциональной связью скорости, давления и расхода, артериальной, венозной крови и СМЖ [9, 10]. Кроме этого, начальное снижение когнитивных способностей в интервале 40—50 лет также связано с меньшей вы-

работкой ликвора в целом [9], хотя после 50 лет и происходит их восстановление, но за счет уменьшения мозга. Тем не менее те, кто в этот период не практиковал активную умственную деятельность, будут испытывать трудности в ее стабилизации. Общая схема варианта старения выглядит так: наличие дисфункции в позвоночнике → снижение производства ликвора → уменьшение двигательной активности → уменьшение крови, поступающей в головной мозг, или усиление кровотока для улучшения питания головного мозга с возможным увеличением внутричерепного давления → снижение когнитивных способностей → старение. Понятно, что могут быть и два других варианта: нарушение биомеханики черепа и крестца и хронически запущенные патологии головного мозга и тела в виде классических заболеваний. Эти варианты в работе не рассматриваются, так как расчеты сделаны для широко распространенных патологий позвоночника (дисфункции позвоночно-двигательных сегментов) без сочетанных хронических заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Двигательные патологии позвоночника резко нарушают интегральную биомеханику человека. Они изменяют общие стандарты движения человека как в любой профессии, так и в спорте. Даже наличие нескольких дисфункций резко меняет биомеханику позвоночника в виде ограничения в

привычных движениях, необходимых для полноценной жизни. Это особенно важно в пожилом возрасте, когда неустраненные дисфункции приводят к хроническим обострениям, сокращая продуктивную жизнь человека. Важно выявить эти патологии на ранних стадиях, используя техники остеопатии, компьютерной и магнитно-резонансной томографии и другую высокотехнологичную аппаратуру, чтобы эффективно их лечить, восстанавливая сложную биомеханику тела. Объяснение этих патологий на основе гидродинамических параметров и биомеханики тела будет способствовать более правильной постановке диагноза. Кроме этого, приведенные расчеты расширяют понимание патологии позвоночника, объясняя снижение двигательных параметров тела (сила, гибкость, работоспособность).

В современном мире в связи с быстрым развитием IT-технологий и искусственного интеллекта создаются электромеханические протезы, позволяющие также восстанавливать утраченные движения. Параллельно с использованием 3D-принтера продвигаются технологии ремонта любого органа (ткани) биомеханики тела. Это было смоделировано в американском фильме «Суррогаты» 2009 года, когда люди, потеряв физические кондиции, только живут в квартирах, а их искусственные тела (роботы) создают иллюзию благополучия, работая вместо них в городе. Этот путь развития тоже допустим, так как позволяет инвалидам улучшить качество жизни, но он более затратен. В конце концов, как всегда, процедура состязания здорового человека и человека с частично искусственной биомеханикой выявит победителя. При одинаковых затратах здоровый человек без искусственной биомеханики побеждает, таким образом тема работы имеет приоритет. Правда, стоит отметить, что разработанные электромеханические манипуляторы для рук и ног (экзоскелеты) позволяют иметь преимущества перед обычным человеком, но для ограниченного объема движений. Тем не менее они пока не могут создать конкуренцию обычной технике от ручных инструментов до подъемных кранов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем искреннее признание преподавателям РВШОМ по остеопатии и сотрудникам ИБРАЭ РАН д-ру физ.-мат. наук В.М. Головизнину и канд. физ.-мат. наук В.Г. Кондакову.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зверев А. Г. *Роль ликвородинамики в физиологии человека* (дипломная работа) (Русская высшая школа остеопатической медицины, М., 2015).
2. Решетиллов В. И. Отток ликвора из подболочного пространства. *Вопр. нейрохирургии*, № 6, 44–46 (1982).
3. Bert R. J., Settippalle N., Tiwana E., Muddasani D., Nath R., Wellman B., Mihlon F., Negahdar M., Amini A., and Boakye M. The relationships among spinal CSF flows, spinal cord geometry, and vascular correlations: evidence of intrathecal sources and sinks. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **317** (3), R470–R484 (2019). DOI: 10.1152/ajpregu.00101.2018
4. Васильева Л. Ф. *Мануальная диагностика и терапия* (Фолиант, СПб., 2001).
5. Солодков А. С. и Сологуб Е. Б. *Физиология спортивной деятельности* (СПб., 1999).
6. Armaly B. F., Durst F., Pereira J. C. F., and Schöning B. Experimental and theoretical investigation of backward-facing step flow. *J. Fluid Mechanics*, **127**, 473–496 (1983). DOI: 10.1017/S00222112083002839
7. Зверев А. Г. и Токарев Ю. Н. Неинвазивный подход в гидродинамике СМЖ в спинальной полости. *Биофизика*, **67** (1), 150–159 (2022).
8. Жарков П. Л., Жарков А. П. и Бубновский С. М. «Поясничные» боли. *Диагностика, причины, лечение* (М., 2001).
9. Москаленко Ю. Е., Вайнштейн Г. Б., Рябчикова Н. А., Хальворсон П., Кравченко Т. И. и Варди Т. Функциональное единство систем внутричерепной гемолитородинамики, биомеханических свойств черепа и когнитивной деятельности мозга. *Региональное кровообращение и микроциркуляция*, **9** (3), 43–46 (2010).
10. Alperin N., Mazda M., Lichtor T., and Lee H. S. From Cerebrospinal Fluid Pulsation to Noninvasive Intracranial Compliance and Pressure Measured by MRI Flow Studies. *Curr. Med. Imaging*, **2** (1) (2006). DOI: 10.2174/157340506775541622
11. Bechter K. and Schmitz B. Cerebrospinal fluid outflow along lumbar nerves and possible relevance for pain research: case report and review. *Croat. Med. J.*, **55** (4), 399–404 (2014). DOI: 10.3325/cmj.2014.55.399
12. Chen L., Elias G., Yostos M. P., Stimec B., Fasel J., and Murphy K. Pathways of cerebrospinal fluid outflow: a deeper understanding of resorption. *Neuroradiology*, **57** (2), 139–147 (2015). DOI: 10.1007/s00234-014-1461-9
13. Wright B. L., Lai J. T., and Sinclair A. J. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. *J. Neurol.*, **259** (8), 1530–1545 (2012). DOI: 10.1007/s00415-012-6413-x

Effects of the Pulsating Flow of Cerebrospinal Fluid on Spinal Pathologies**A.G. Zverev* and Yu.N. Tokarev***

**Institute for Problems of Safe Development of Nuclear Energy, Russian Academy of Sciences,
Bolshaya Tuskaya ul. 52, Moscow, 115191 Russia*

Based on cerebrospinal fluid flow dynamic parameters, an original formula for assessing pathology of the spinal motion segments of the vertebra is given. In this paper, graphs are used to clearly show changes in pathology depending on the depth of trauma. The data collected can be useful for computed tomography and magnetic resonance imaging technicians, who still describe pathology in a simple way.

Keywords: spinal motion segment, flow rate, depth of trauma