

СОДЕРЖАНИЕ

Том 69, номер 5, 2024

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

- Численное моделирование диффузии электроактивной молекулы в биоподобных гидрогелевых средах
И.А. Черенков, М.Д. Кривилев, М.М. Игнатьева, А.Ю. Емельянова, В.Г. Сергеев 939
- Адсорбция белков на нитроцеллюлозные мембраны из потока раствора – теория и эксперимент
К.А. Прусаков, С.В. Замалутдинова, А.Е. Сидорова, Д.В. Багров 949
- Сравнительная оценка силовых характеристик взаимодействия липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* с антителами методами оптической ловушки и атомно-силовой микроскопии
А.А. Бывалов, В.С. Белозёров, И.В. Коньшев, Б.А. Ананченко 959
- Исследование методом разностной ИК-Фурье-спектроскопии вторичной структуры мембранного белка бактериородопсина при облучении микроволнами 8–18 ГГц
Е.Л. Терпугов, О.В. Дегтярева, Е.Е. Фесенко 968
- Оценка аффинности связывания в комплексах ACE2–RBD S-белка коронавируса с использованием сверточных нейронных сетей
Е.А. Богданова, А.В. Чернухин, К.В. Шайтан, В.Н. Новоселецкий 979
-

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

- Пермеабилзация мембран клеток *Pseudomonas aeruginosa* под воздействием ударных волн
С.Н. Летута, А.Т. Ишемгулов, О.К. Давыдова, А.Н. Никиян, М.Е. Григорьев 990
- Эффекты салициловой и ацетилсалициловой кислот в митохондриальных и эритроцитарных мембранах
Т.В. Ильич, А.И. Савко, Т.А. Коваленя, Е.А. Лапина, И.Б. Заводник 997
- Наличие белков септинов в зоне нервно-мышечных синапсов соматической мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris*
Л.Ф. Нуруллин, Е.М. Волков 1011
- Исследование цитотоксичности наночастиц селена, синтезированных с использованием искусственного металлсвязывающего опухолеспецифичного белка W8-3C
Н.В. Позднякова, Ю.К. Бирюкова, З.А. Соколова, М.А. Барышникова, Е.С. Щербакова, М.С. Смирнова, А.Б. Шевелев 1018
-

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

- Параметризация модели времени цветения образцов дикого нута с переносом знаний от нескольких источников
З.А. Саранин, М.Г. Самсонова, К.Н. Козлов 1029

Модели генных сетей цветения и возможности их адаптации для анализа механизмов яровизации у бобовых

В.В. Гурский, М.А. Дук, М.П. Банкин, М.Г. Самсонова, С.Ю. Суркова 1037

Типовой патологический процесс при глутаматной нейротоксичности: роль активных форм азота и кислорода

В.П. Реутов, Н.В. Пасикова, Е.Г. Сорокина 1044

Механизмы образования и функционирования в живых организмах динитрозильных комплексов железа как «рабочей формы» оксида азота

А.Ф. Ванин 1078

Поведение популяции простейших микроорганизмов под действием электромагнитного излучения сотовых телефонов

Л.А. Морозова, С.В. Савельев 1097

Исследование особенностей формирования поведенческих навыков у крыс в трехлучевом лабиринте

С.П. Драган, Д.Б. Комаров, И.А. Веселовский, А.В. Богомолов 1104

Влияние полисахарида из *Helianthus tuberosus* L. на антипролиферативную активность производного N-гликозида индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1269

*М.П. Киселева, И.С. Голубева, В.П. Дерягина, А.В. Ланцова,
Л.В. Эктова, Е.А. Корнюшенков, Л.М. Борисова, Е.А. Генералов* 1109

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Свойства резорбируемых кондуитов на основе нановолокон из поли(L-лактида) и волокон из хитозана для регенерации периферических нервов

*Н.А. Тагандурдыева, М.А. Трубе, И.О. Шемякин, Д.Н. Соломицкий,
Г.В. Медведев, Е.М. Ивановна, И.П. Добровольская, В.Е. Юдин* 1118

ДИСКУССИИ

Просвещение и коммерция

Г.Р. Иваницкий 1130

ХРОНИКА

Памяти ученого-биофизика, педагога, организатора науки, профессора Э.К. Рууге

В.П. Реутов 1140

Contents

Vol. 69, No. 5, 2024

Molecular Biophysics

- Numerical Simulation of the Diffusion of Electroactive Molecule in Biosimilar Hydrogel Media
I.A. Cherenkov, M.D. Krivilev, M.M. Ignat'eva, A. Yu. Emel'yanova, and V.G. Sergeev 939
- Adsorption of Proteins onto Nitrocellulose Membranes from a Flowing Solution – Theory and Experiment
K.A. Prusakov, S.V. Zamalutdinova, A.E. Sidorova, and D.V. Bagrov 949
- Comparative Evaluation of Interaction Force Characteristics for the Lipopolysaccharide of *Yersinia pseudotuberculosis* and Antibodies by Optical Trapping and Atomic Force Microscopy
A.A. Byvalov, V.S. Belozherov, I.V. Konyshchev, and B.A. Ananchenko 959
- FT-IR Difference Spectroscopy for Studying the Secondary Structure of the Membrane Protein Bacteriorhodopsin When Submitted to Microwave Radiation at 8–18 GHz
E.L. Terpugov, O.V. Degtyareva, and E.E. Fesenko 968
- Assessment of Binding Affinity in the Complexes of CoV-S-Protein's RBD and the ACE2 Using Convolutional Neural Networks
E.A. Bogdanova, A.V. Chernukhin, K.V. Shaitan, and V.N. Novoseletsky 979
-

Cell Biophysics

- Shock Wave-induced Cell Membrane Permeabilization of *Pseudomonas aeruginosa*
S.N. Letuta, A.T. Ishemgulov, O.K. Davydova, A.N. Nikiyan, and M.E. Grigoriev 990
- Effects of Salicylic and Acetylsalicylic Acids in Mitochondrial and Erythrocyte Membranes
T.V. Ilyich, A.I. Savko, T.A. Kovalenya, E.A. Lapshina, and I.B. Zavodnik 997
- The Presence of Septin Proteins in the Neuromuscular Junction of Somatic Muscle in the Earthworm *Lumbricus terrestris*
L.F. Nurullin and E.M. Volkov 1011
- Study of Cytotoxicity of Selenium Nanoparticles Synthesized Using Artificial Metal-Binding Tumor-Specific Protein W8-3C
N.V. Pozdnyakova, Yu.K. Biryukova, Z.A. Sokolova, M.A. Baryshnikova, E.S. Shcherbakova, M.S. Smirnova, and A.B. Shevelev 1018
-

Complex Systems Biophysics

- Parameterization of a Model for Wild Chickpea Flowering Time by Transferring the Knowledge Learned from Multiple Sources
Z.A. Saranin, M.G. Samsonova, and K.N. Kozlov 1029
- Models of Flowering Gene Networks and Their Adaptation for the Analysis of Vernalization Mechanisms in Legumes
V.V. Gursky, M.A. Duk, M.P. Bankin, M.G. Samsonova, and S. Yu. Surkova 1037

Typical Pathological Process in Glutamate Neurotoxicity: the Role of Reactive Nitrogen and Oxygen Species <i>V.P. Reutov, N.V. Pasikova, and E.G. Sorokina</i>	1044
Mechanisms of the Formation and Function of Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms <i>A.F. Vanin</i>	1078
Influence of Mobile Phone Electromagnetic Radiation Exposure on Behavior of Protozoan Population <i>L.A. Morozova and S.V. Savel’ev</i>	1097
Study of Peculiarities of the Formation of Behavioral Skills in Rats in the Three-Arm Maze <i>S.P. Dragan, D.B. Komarov, I.A. Veselovsky, and A.V. Bogomolov</i>	1104
Influence of Polysaccharide from <i>Helianthus tuberosus</i> L. on Antiproliferative Activity of N-Glycoside Indolo[2,3-a]carbazole Derivative LCS-1269 <i>M.P. Kiseleva, I.S. Golubeva, V.P. Deryagina, A.V. Lantsova, L.V. Ektova, E.A. Korniyushenkov, L.M. Borisova, and E.A. Generalov</i>	1109

Medical Biophysics

Properties of Resorbable Conduits Based on Poly(L-Lactide) Nanofibers and Chitosan Fibers for Peripheral Nerve Regeneration <i>N.A. Tagandurdyeva, M.A. Trube, I.O. Shemyakin, D.N. Solomitskiy, G.V. Medvedev, E.M. Ivan’kova, I.P. Dobrovolskaya, and V.Ye. Yudin</i>	1118
--	------

Discussion

Education and Commerce <i>G.R. Ivanitskii</i>	1130
--	------

Chronicle

For Memory Prof. E.K. Ruuge <i>V.P. Reutov</i>	1140
---	------

УДК 577.32+57.083.1

ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ЭЛЕКТРОАКТИВНОЙ МОЛЕКУЛЫ В БИОПОДОБНЫХ ГИДРОГЕЛЕВЫХ СРЕДАХ

© 2024 г. И.А. Черенков*., М.Д. Кривилев*., М.М. Игнатъева*,
А.Ю. Емельянова*, В.Г. Сергеев*

*Удмуртский государственный университет, Университетская ул., 1, Ижевск, 426034, Россия

** Удмуртский федеральный исследовательский центр УрО РАН,
ул. Татьяны Барамзиной, 34, Ижевск, 426067, Россия

E-mail: ivch75@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.12.2023 г.

После доработки 31.01.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

На основе экспериментальных данных циклической вольтамперометрии получены значения коэффициентов диффузии толуидинового синего в гидрогелях альгината, желатина и их комбинаций. С использованием экспериментальных значений коэффициентов в цифровой модели проведены расчеты значений токов восстановления, показавшие соответствие результатам экспериментов. Предложено использование времени выхода силы тока на стационарное значение как показателя диффузионных свойств гидрогелевой среды. Результаты предполагается использовать для разработки методов оценки диффузионных свойств гидрогелевых сред: биочернил и тканеинженерных конструкций.

Ключевые слова: циклическая вольтамперометрия, диффузионные процессы, биосовместимые гидрогели, биочернила, численное моделирование.

DOI: 10.31857/S0006302924050013, EDN: MLQQQN

Биоэлектрохимический анализ является перспективным аналитическим инструментом для неразрушающего контроля биологических тканей и тканеинженерных конструкций различной степени сложности, позволяющим оценить проницаемость межклеточного матрикса или гидрогеля биочернил для электроактивных молекул-зондов. Такой анализ может быть полезен для оценки качества биочернил, гидрогелевых скаффолдов и контроля постпроцессинга при биопечати тканеинженерных конструкций [1–5], а в перспективе – для диагностики и мониторинга процессов воспаления, регенерации, диспластических явлений в соединительной ткани.

Чаще всего в биоэлектрохимических исследованиях оценивают электрохимическое поведение молекул-медиаторов в зависимости от окислительно-восстановительной активности ферментов или клеток, рассматривая биологические компоненты как катализаторы редокс-превращений медиатора, активность которых отражается на электродных процессах [6–8]. Фундаменталь-

ные принципы влияния физико-химических характеристик среды на электродные процессы, в том числе и особенности диффузии электроактивных частиц в вязких средах, рассмотрены в работах В.Г. Левича [9]. Представляет интерес их приложение к биоподобным гидрогелеобразователям различного состава, используемым в трехмерном культивировании, а также являющимися компонентами биочернил для аддитивных биомедицинских технологий.

В случае адаптации биоэлектрохимического анализа к задачам исследования тканевых систем или их инженерных аналогов необходимо принимать во внимание и свойства гидрогелевой среды – ее вязкость, катионно-анионный состав и другие физико-химические свойства, способные оказать влияние на диффузию медиатора к электродной поверхности [9–11].

Представляется возможным определение численных параметров диффузии в гидрогелевой среде, содержащей биополимеры-гелеобразователи или их комбинации, по данным электрохимических измерений. Это позволяет провести расчеты влияния гелевой среды на формирование электрохимического сигнала, определяемого

Сокращения: ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор, ТС – краситель толуидиновый синий, ЦВА – циклическая вольтамперометрия.

диффузией растворимого окислительно-восстановительного медиатора. Такие расчеты могут быть использованы для оптимизации условий биоэлектрохимического анализа, при конструировании диффузионных электрохимических сенсоров и разработке методов неразрушающего контроля гидрогелевых сред.

Целью нашей работы является исследование диффузии электроактивных молекул в биоподобных гидрогелевых средах различного состава и оценка влияния диффузионных ограничений на формирование электрохимического сигнала с помощью компьютерного моделирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Электрохимические измерения. Электрохимические эксперименты проводили с использованием планарных электродных систем, изготовленных методом трафаретной печати (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, Россия) и включающих графитсодержащие рабочий и вспомогательный электроды, а также хлорсеребряный электрод сравнения. Перед измерениями электроды подвергали циклированию в диапазоне потенциалов +1200...–1200 мВ в среде фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) для стабилизации характеристик.

В качестве гелеобразователей использовали желатин (3% масс.) и альгинат натрия (3% масс.) в виде растворов на ФСБ, которые готовили непосредственно перед экспериментом. При использовании раствора альгината исследовали гидрогель альгината кальция, формирование которого происходило непосредственно на рабочем электроде при нанесении 100 мкл 2 М раствора хлорида кальция с последующим удалением избытка раствора. В отдельных сериях экспериментов использовали комбинированные гидрогели – «альгинат натрия–желатин» и «альгинат кальция–желатин» в различных соотношениях.

Роль электрохимического медиатора выполнял фенотиазинный краситель толуидиновый синий (ТС), для которого в специальной серии экспериментов определяли основные электрохимические характеристики.

Электрохимические измерения производили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостате-гальваностате Р-45Х (Electrochemical Instruments, Черноголовка, Россия). Использовали диапазон потенциалов 0...–450 мВ (относительно Ag/AgCl) со скоростью развертки потенциала от 2 до 100 мВ/с в зависимости от задач эксперимента. Измеряемым параметром были значения силы тока на рабочем электроде. Для оценки изменений силы тока в гидрогелевых средах анализировали 10 циклов развертки сразу после внесения раствора ТС, а затем по 4 цикла с

интервалом в 300 с до установления постоянных значений силы тока. Концентрация ТС во всех измерениях была постоянной и составляла 0.1 мМ. Фоновым электролитом служил ФСБ (рН 7.2).

Анализ данных ЦВА проводили с использованием программы ES8 (Electrochemical Instruments, Черноголовка, Россия) и программы eL-Chem Viewer 3.3 [12].

Данные электрохимических экспериментов использовали для расчетов коэффициентов диффузии, применявшихся далее при расчетах в цифровой модели.

Математическая модель. *Содержательная постановка задачи.* Каплю гидрогеля на основе альгината натрия и/или желатина наносят на графитовый электрод. Далее электрод размещают в электрохимической ячейке в буферном растворе, содержащем растворенный краситель (ТС). Необходимо провести компьютерное моделирование диффузии электроактивных молекул ТС в капле гидрогелевой среды и формирования электрохимического отклика (значений силы тока) с учетом следующих варьируемых входных данных:

- геометрических параметров планарного электрода и капли гидрогеля;
- объема гидрогеля, нанесенного на электрод (V);
- концентрации красителя толуидинового синего в буферном растворе ($C_0^{ТС}$);
- коэффициента диффузии (D) красителя, значения которого варьируют для разных гидрогелевых систем.

Поскольку исследуется электрохимический отклик системы, требуется решить задачу диффузии в нестационарной постановке. Выходными данными задачи для последующего анализа являются:

- распределение концентрации ТС в произвольный момент времени внутри капли гидрогеля;
- зависимость концентрации ТС от времени в контрольных точках на поверхности электрода;
- интегральный концентрационный поток на поверхности электрода;
- полный электрический ток, возникающий в электрохимической цепи как функция времени, для сравнения с экспериментальными значениями силы тока, полученными при ЦВА.

Физико-химическая постановка задачи. Планарный электрод имеет круглую поверхность, на которую наносится гидрогель. По периметру рабочей зоны электрода присутствует электроизолирующий бортик, который отделяет рабочую зону электрода от остальной поверхности датчика. Таким образом, электрохимическая реакция

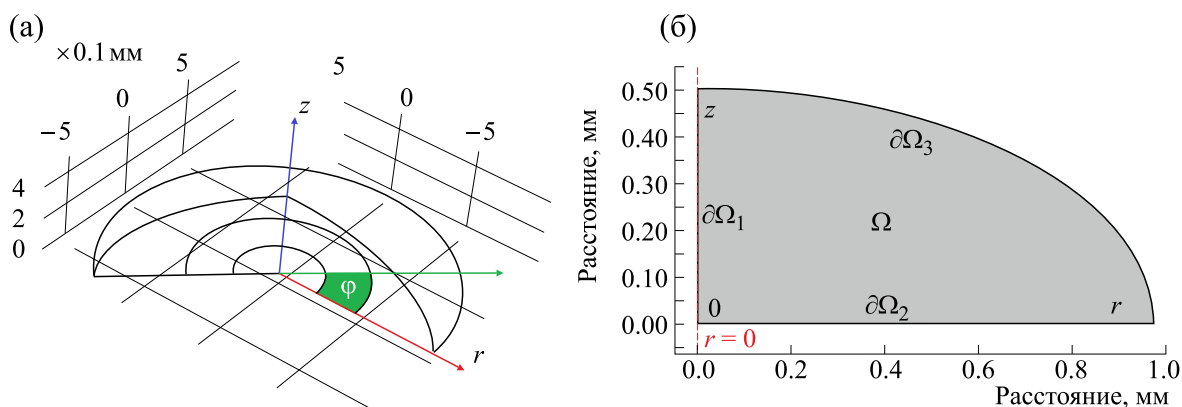


Рис. 1. (а) – Геометрия расчетной области, использованная для моделирования диффузии в капле гидрогеля на электроде; (б) – схема нумерации границ расчетной области.

происходит только на поверхности рабочей зоны. С учетом этого была построена 3D-модель капли гидрогеля, изометрическая проекция которой приведена на рис. 1а. Капля с большой степенью достоверности может быть описана эллипсоидом вращения с высоким коэффициентом сжатия, поэтому при математическом моделировании целесообразно перейти от полной 3D-постановки в цилиндрической системе координат (r, z, φ) к 2D-постановке в системе координат (r, z) с учетом вращательной симметрии объекта. Для нестационарной задачи диффузии, решаемой для капли в форме полуэллипсоида и с учетом вращательной симметрии начальных и граничных условий, решение в плоских сечениях капли, проходящих через ось симметрии, перпендикулярную плоскости электрода, будет совпадать. Причиной такой симметрии является исходная постановка задачи, которая предполагает отсутствие зависимости от угловой координаты φ , определяющей угловое перемещение вокруг оси z (рис. 1а), следовательно, решение также не будет зависеть от этой координаты. В таком случае достаточно найти решение задачи в расчетной области, равной четверти плоского сечения, как показано на рис. 1б.

Размер рабочего электрода определяет радиус наносимой капли, который составляет $R = 0.975$ мм. В модели площадь вычисляется через радиус рабочей области электрода по формуле $S = \pi R^2$. Площадь рабочего электрода $S = 3$ мм². Высота hd капли как полуэллипсоида зависит от объема наносимого гидрогеля V . Высота полуэллипсоида hd определяется как $hd = 1.5V/S$. В результате для гидрогеля объемом 1 мкл высота hd капли приблизительно равна 0.5 мм.

На рис. 1б представлена нумерация границ расчетной области Ω , на которых задаются различные граничные условия, исходя из протекающих на них физико-химических процессов. Граница № 1 соответствует оси симметрии расчет-

ной области, граница № 2 соответствует поверхности электрода, а граница № 3 показывает переход от среды гидрогеля к фоновому электродолу. Исходя из этих данных, далее будут заданы различные типы граничных условий.

Расчет коэффициентов проводился с помощью уравнения Рэндлса–Шевчика, позволяющего по значениям пиковых токов, полученных при ЦВА, рассчитать коэффициент диффузии красителя:

$$I_p = -0.446cA\sqrt{\frac{n^3 F^3 \nu D}{RT}}, \quad (1)$$

где I_p – пиковые значения силы тока (А), c – концентрация ТС (моль/м³), A – площадь рабочего электрода (м²), n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции, F – постоянная Фарадея (Кл/моль), ν – скорость развертки потенциала (В/с), D – коэффициент диффузии (м²/с), R – универсальная газовая постоянная (Дж/моль·К), T – температура (К) [13]. Для расчетов использованы полученные в эксперименте пиковые значения силы тока: 0.92 мкА – буферный раствор без гелеобразователей, 0.55 мкА – гидрогель альгината кальция, 0.58 мкА – гидрогель желатина, 0.73 мкА – гидрогель «альгинат–желатин» без стабилизации ионами кальция, 0.61 мкА – гидрогель «альгинат–желатин», стабилизированный ионами кальция. Температуру принимали равной 295 К. Остальные данные приведены в табл. 1.

Коэффициенты диффузии D заданы в параметрах модели и характеризуют проницаемость гидрогелей разного состава для ТС. В моделировании рассматривали четыре системы, коэффициенты диффузии для которых рассчитывали на основе данных электрохимических экспериментов:

Таблица 1. Входные параметры модели исследуемого процесса

ТВ	Выражение	Значение	Описание
$D_{ТВ}$	$1.52 \cdot 10^{-9} \text{ [м}^2/\text{с]}$	$1.52 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$	Коэффициент диффузии ТС в фоновом электролите
$C_{ТВ}^{\text{bulk}}$	$0.1 \text{ [моль/м}^3\text{]}$	0.1 моль/м^3	Концентрация ТС в фоновом электролите
V	10^{-6} [л]	$1 \cdot 10^{-9} \text{ м}^3$	Объем капли гидрогеля
hd	$V/((2/3) \cdot \pi \cdot Rd^2)$	$5.02 \cdot 10^{-4} \text{ м}$	Высота капли гидрогеля
Rd	0.975 [мм]	$9.75 \cdot 10^{-4} \text{ м}$	Радиус электрода
S	$Rd^2 \cdot \pi$	$2.99 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2$	Площадь поверхности электрода

– гидрогель на основе альгината, стабилизированный ионами кальция ($D = 0.43 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$);

– желатиновый гидрогель ($D = 0.51 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$);

– гидрогель на основе смеси желатина и альгината натрия без сшивки ионами кальция ($D = 0.75 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$);

– гидрогель на основе смеси желатина и альгината, стабилизированный ионами кальция ($D = 0.55 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$).

Для сравнения использовали фосфатно-солевой буферный раствор без гелеобразователя: коэффициент диффузии ($D = 1.52 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$) для водных растворов рассчитан на основе результатов ЦВА. По литературным данным [14] оценочные значения коэффициента диффузии ТС для водных сред, полученные по данным расчетов на основе приближения Стокса–Эйнштейна, дают сопоставимое значение ($D = 1.42 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$).

Математическая постановка задачи. В данной модели гель представлен пассивным, т.е. не учитываются его возможные взаимодействия с ТС – например, адсорбция молекул анионными группами альгината. Рассматривается исключительно диффузионная задача в отсутствие как конвективного переноса, так и движения электроактивной метки в электрическом поле согласно следующим основаниям: во-первых, естественная конвекция подавлена, так как разность плотностей в микрокапле пренебрежимо мала, а вязкость гидрогелей существенно выше вязкости буферного раствора. В таких условиях электролит можно считать неподвижным [9]. Во-вторых, миграция ионов всегда учитывается в общем случае, если фоновый электролит не участвует в переносе заряда. В нашем случае концентрация фонового электролита

($C_{ФСБ} = 0.1 \text{ моль/л}$) значительно превышает концентрацию ТС ($C_{ТС} = 0.0001 \text{ моль/л}$). В таких условиях число переноса для ТС снижается, и при математическом описании электрохимических систем в уравнении массопереноса пренебрегают миграционным слагаемым [13]. В этом случае процесс диффузии описывается уравнением диффузии, где диффузионный поток подчиняется закону Фика:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{J}, \quad (2)$$

$$\mathbf{J} = -D\nabla C, \quad (3)$$

где C – концентрация ТС в гидрогеле, \mathbf{J} – диффузионный поток ТС, D – коэффициент диффузии. В начальный момент времени $t = 0$ гидрогель не содержит краситель, следовательно, справедливо условие

$$C|_{\Omega} (t = 0) = 0. \quad (4)$$

В связи с тем, что объем наносимого раствора электроактивной метки во много раз больше объема геля, на боковой границе полуэллипсоида была задана постоянная концентрация ТС в объеме наносимого раствора, использованная во всех электрохимических экспериментах ($C_{ТС} = 10^{-4} \text{ М}$). Следовательно, на поверхности капли гидрогеля (граница № 3) во время эксперимента соблюдается условие

$$C|_{\partial\Omega_3} (t) = C_0^{\text{ТС}}. \quad (5)$$

На границе № 1 принимается граничное условие 2 рода с нулевым массовым потоком через границу, что соответствует уравнению

$$\mathbf{J} \cdot \mathbf{n}|_{\partial\Omega_1} = 0, \quad (6)$$

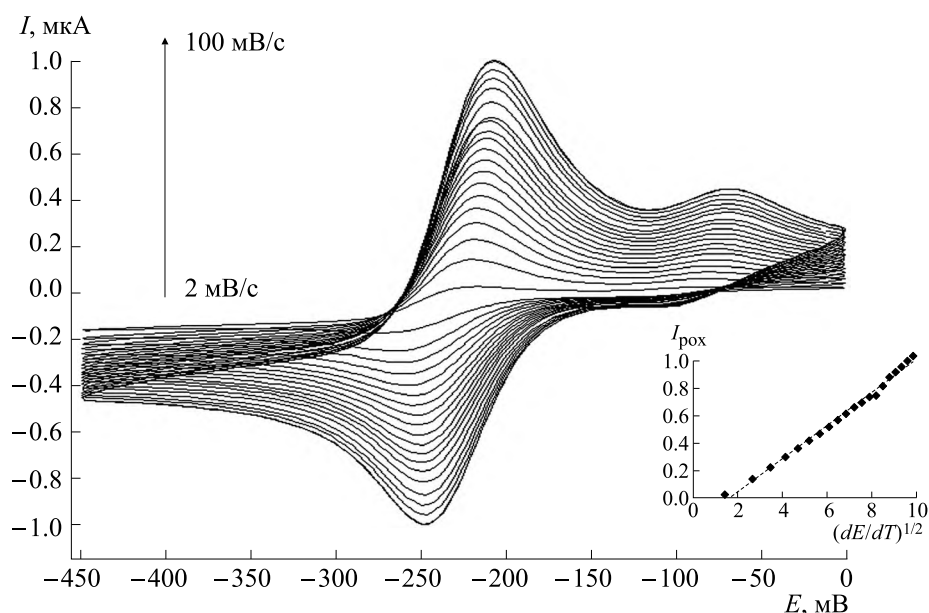


Рис. 2. Циклическая вольтамперометрия толуидинового синего в среде фосфатно-солевого буферного раствора (0.15 М, рН 7.2) при разных скоростях развертки потенциала (2–100 мВ/с). На врезке – зависимость пиковых значений силы тока от квадратного корня скорости развертки потенциалов.

где \mathbf{n} – вектор нормали к центру плоскости электрода. Рабочая поверхность электрода (граница № 2) характеризуется наличием электрохимической реакции, при которой ТС восстанавливается, т.е. концентрация его окисленной формы снижается до нуля. В результате на указанной границе должно быть задано условие для концентрации окисленной формы ТС:

$$C_{\partial\Omega_2}(t) = 0. \tag{7}$$

Алгоритмическая постановка задачи и компьютерная реализация. Варьируемым параметром в нашей модели являлся коэффициент диффузии ТС, который зависел от состава гидрогеля. Вспомогательные параметры модели приведены в табл. 1.

Все этапы моделирования диффузии ТС в гидрогеле осуществляли при помощи программного пакета *COMSOL Multiphysics 5.5* (академическая лицензия № 9602303 *СКЛ*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования электрохимического поведения ТС в среде фосфатно-солевого буферного раствора показали формирование при ЦВА выраженных анодных и катодных пиков, соответствующих восстановлению и окислению ТС на электроде (рис. 2а).

В серии экспериментов была определена зависимость пиковых значений силы тока от квадратного корня скорости развертки потенциала (рис. 2б).

Полученные данные позволяют считать электрохимическое поведение ТС близким к обратимому, а лимитирующей стадией – диффузию молекул ТС к электроду [9, 13].

Для обратимых электрохимических процессов справедливо уравнение Рэндлса–Шевчика, связывающее показатели силы тока с коэффициентом диффузии электроактивной молекулы [13]. Это позволяет оценить диффузионные параметры гидрогелевых сред с помощью ЦВА в эксперименте и получить ориентировочные значения коэффициента диффузии ТС для последующих расчетов в математической модели.

В среде гидрогелей кривые ЦВА, отражающие электрохимические превращения ТС, имеют характерный вид (рис. 3) с нарастанием анодных и катодных токов во времени. При этом положение пиков по оси потенциалов остается практически неизменным.

Расчетные значения коэффициента диффузии, полученные на основании экспериментальных данных, показывают (табл. 2), что все исследованные гидрогелевые среды накладывают диффузионные ограничения на процессы электрохимических превращений ТС. Наибольшее влияние отмечено для гидрогеля альгината кальция, который обеспечивает снижение коэффициента диффузии по сравнению с фоновым электролитом примерно в три раза. При этом коэффициент диффузии в среде желатина с альгинатом без сшивки ионами кальция значительно

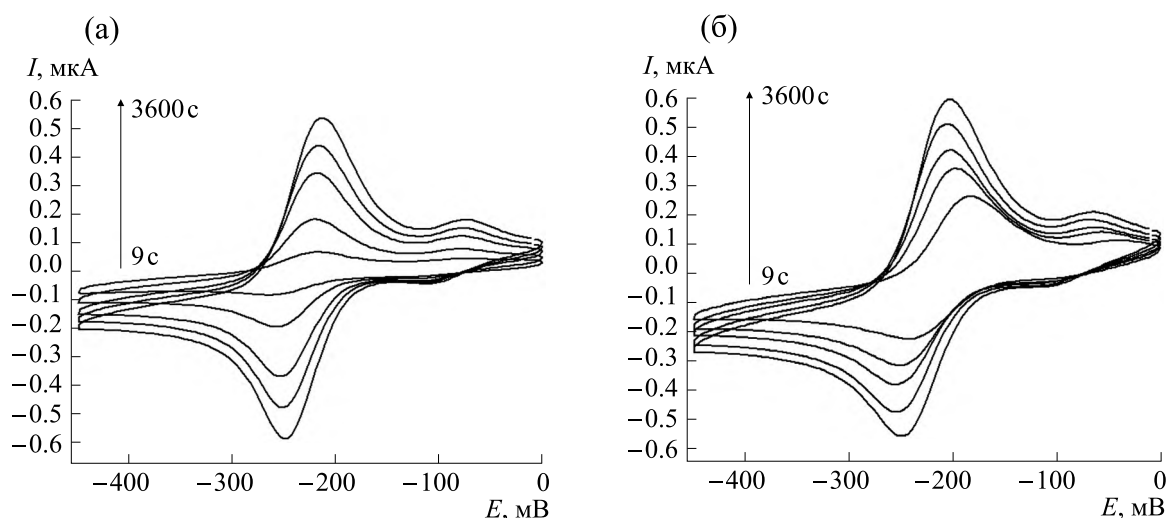


Рис. 3. Типичные зависимости циклической вольтамперометрии толуидинового синего ($C = 1$ мМ) в геле желатина (а) и в геле альгината кальция (б). Фоновый электролит – фосфатно-солевой буферный раствор (0.15 М, рН 7.2). Скорость развертки потенциала 100 мВ/с.

превышает данный показатель для других исследованных гидрогелевых сред.

Экспериментальные исследования на электроде могут выполняться с использованием капли гидрогеля различного объема. С учетом ранее полученных результатов [11, 15] было принято решение проводить дальнейшие измерения с каплями гидрогеля объемом $V = 1.0$ мкл. В этом случае снижается погрешность измерений, повышается воспроизводимость результатов.

С использованием коэффициента диффузии в качестве варьируемого параметра выполнена серия расчетов по установлению стационарного распределения электроактивного вещества вблизи поверхности электрода. Установившееся распределение концентрации ТС в капле гидрогеля и направления диффузионных потоков ТС к поверхности электрода представлены на рис. 4.

Целью расчетов являлось определение значения силы тока, формирующегося в ходе электровосстановления. Это позволило корректно сравнить распределение электроактивного вещества в двух случаях:

- 1) в отсутствие гелеобразователя на электроде;
- 2) при нанесении гидрогеля на рабочий электрод.

Важным вопросом конструирования биоэлектродных систем с участием диффундирующих электроактивных молекул является оценка влияния диффузионных параметров среды на формирование тока в электрохимическом процессе (в нашей модели – электровосстановление ТС). Данный анализ выполнен в следующем разделе.

Таблица 2. Экспериментально полученные значения коэффициентов диффузии, использованные для расчета силы тока

Система	Коэффициент диффузии, $\times 10^{-9}$ м ² /с	Значение по отношению к коэффициенту диффузии без гидрогеля, %
Фосфатно-солевой буферный раствор	1.52	100
Гель желатина с альгинатом натрия в фосфатно-солевом буферном растворе	0.75	49.3
Гель желатина с альгинатом кальция в фосфатно-солевом буферном растворе	0.55	36.2
Гель желатина в фосфатно-солевом буферном растворе	0.51	33.6
Гель альгината кальция в фосфатно-солевом буферном растворе	0.43	28.3

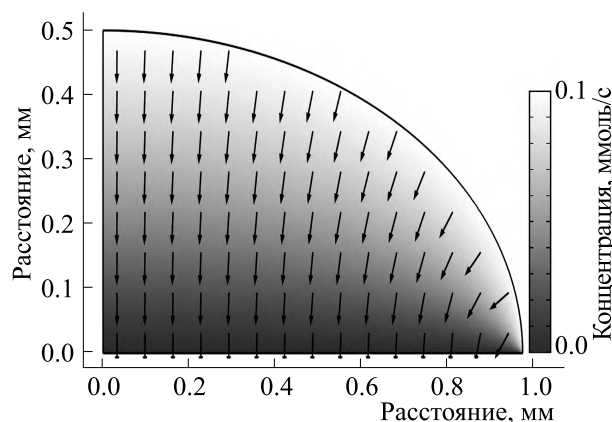


Рис. 4. Поле концентрации толуидинового синего и массовые диффузионные потоки в расчетной области.

Нужно отметить, что для всех изученных систем случай расчета электрохимической реакции для ФСБ является полностью модельным и не соответствующим условиям эксперимента. Действительно, при отсутствии гидрогеля на электроде распределение ТС вблизи его поверхности устанавливается практически мгновенно. В случае нанесения гидрогелевых капель создается барьерный слой, который задерживает выход на стационарное распределение. На рис. 5 показаны графики установления тока для ФСБ.

Анализ тока на электроде в зависимости от диффузионных характеристик среды. Экспериментальные результаты, приведенные в предыдущем разделе, показали, что исследуемая система изменяет характеристики отклика при изменении состава гидрогелевой среды. Теоретическая модель диффузии электроактивного вещества в фосфат-

но-солевом буферном растворе показывает значимое различие во временах установления предельного значения концентрационного градиента на поверхности электрода.

Для связывания экспериментальных данных и результатов математического моделирования требуется провести анализ зависимости тока на электроде от времени и диффузионных свойств среды. Сила тока в данном случае выступает основной регистрируемой характеристикой системы, анализ поведения которой позволит выявить влияние гидрогеля на процесс формирования сигнала. С этой целью в модели рассчитывалась сила тока как функция времени согласно формулам:

$$\nabla C|_z = \frac{\partial C}{\partial z} \approx \frac{\Delta C}{\Delta z}, \quad (8)$$

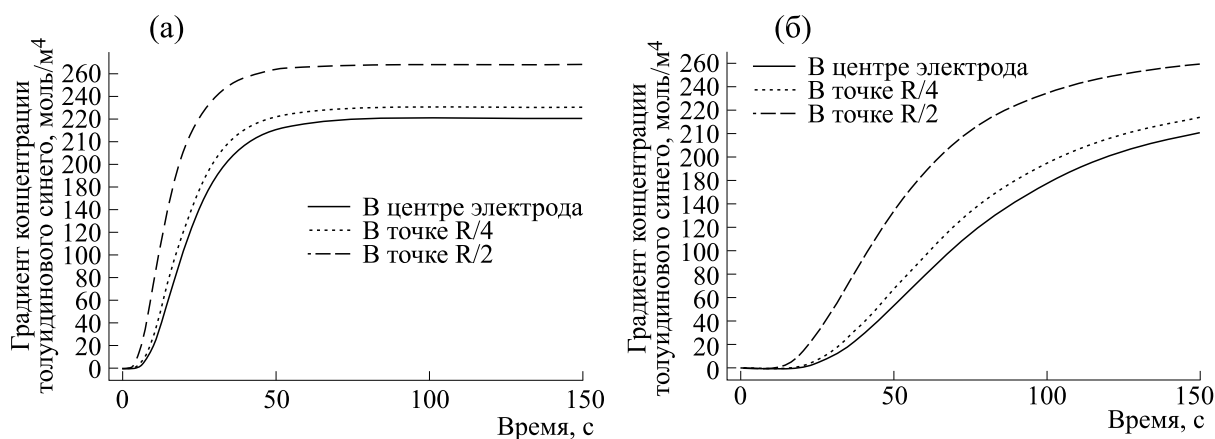


Рис. 5. Изменения градиента концентрации толуидинового синего, определяющего силу тока на электроде, при разных коэффициентах диффузии: (а) – в среде буферного раствора без гелеобразователей ($D = 1.52 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$); (б) – в среде буферного раствора с гидрогелем альгината кальция ($D = 0.43 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$).

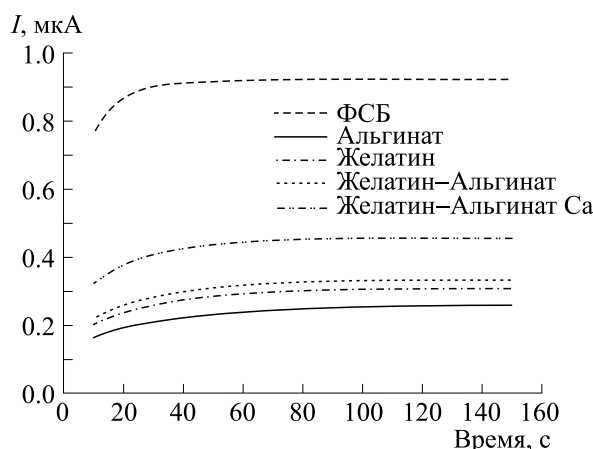


Рис. 6. Изменения показателей силы тока во времени для разных гидрогелевых сред.

$$\mathbf{J} = -D\nabla C, \quad (9)$$

$$\mathbf{j} = neN_A \mathbf{J}, \quad (10)$$

$$I = \int \mathbf{j} \cdot \mathbf{n} dS, \quad (11)$$

где ∇C – градиент концентрации электроактивного вещества, моль/ м^4 ; \mathbf{J} – диффузионный поток молекул, моль/ $(\text{м}^2\text{с})$; \mathbf{j} – плотность тока, $\text{Кл} \times \left(\frac{1}{\text{моль}}\right) \times \left(\frac{\text{моль}}{\text{м}^2\text{с}}\right) = \frac{\text{Кл}}{\text{м}^2\text{с}} = \text{А}/\text{м}^2$; I – сила тока, А.

Результаты сравнительного анализа приведены на рис. 6. Расчеты показывают, что коэффициент диффузии оказывает существенное влияние на два параметра: предельное значение силы тока и характеристическое время выхода электрохимической системы на постоянное значение силы тока (плато на графике $I=f(t)$). В зависимости от диффузионных характеристик среды предельный ток уменьшается со значения 0.92 мкА (фо-

новый электролит без гелеобразователей) до 0.26 мкА (альгинат кальция). Таким образом, гелеобразователь вносит существенный вклад в формирование значений предельного тока. При этом отличие между альгинатом и буферным раствором без гелеобразователя составляет порядка 72%, что легко регистрируется в ходе электрохимического эксперимента и является важным аспектом с точки зрения конструирования электрохимических датчиков для исследования тканей и их инженерных аналогов.

Вторая характеристика – время выхода силы тока на стационарное значение – также оказывается чувствительна к диффузионным свойствам среды. Расчеты прогнозируют увеличение времени выхода с 50 с (фоновый электролит без гелеобразователей) до 117 с (желатин с альгинатом кальция) и далее 150 с (альгинат кальция) (рис. 5, табл. 3). Отличие между данными, полученными в среде альгинатного гидрогеля и буферного раствора без гелеобразователя, составляет около

Таблица 3. Оценка времени выхода показателей силы тока на квазистационарные значения для различных сред

Система	Коэффициент диффузии $\times 10^{-9}$ ($\text{м}^2/\text{с}$)	Время выхода (с) на заданный уровень от предельного тока I_{lim}	
		90% I_{lim}	95% I_{lim}
Фосфатно-солевой буферный раствор	1.52	15	22
Гель желатина с альгинатом в фосфатно-солевом буферном растворе	0.75	31	45
Гель желатина с альгинатом кальция в фосфатно-солевом буферном растворе	0.55	41	60
Гель желатина в фосфатно-солевом буферном растворе	0.51	44	64
Гель альгината кальция в фосфатно-солевом буферном растворе	0.43	51	74

68%. Предварительно установлено, что время выхода является более чувствительным параметром, чем собственно сила тока.

С практической точки зрения целесообразным является определение обеих характеристик системы для изучения диффузионных свойств среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предварительные расчеты позволяют прогнозировать оптимальные параметры электрохимической системы для неразрушающего экспресс-контроля гидрогелевых материалов при использовании электроактивных веществ с известными свойствами, а также при решении обратной задачи – расчета коэффициентов диффузии электроактивных молекул (лекарственных препаратов и биологически активных веществ) в гидрогелевой среде с заданными параметрами. Основные выводы исследования следующие:

– данные электрохимического анализа позволяют сделать заключение о диффузионных свойствах гидрогелевой среды в зависимости от ее состава, показывая почти 4-кратное снижение коэффициента диффузии по отношению к буферному раствору без гелеобразователей;

– наиболее значимыми электрохимическими параметрами, зависящими от коэффициента диффузии электроактивной молекулы в гидрогелевой среде, оказались абсолютные значения силы тока, формирующегося в ходе электровосстановления толуидинового синего, и время выхода силы тока на стационарное значение. Обе характеристики могут использоваться при разработке методик применения электрохимических датчиков для анализа биоподобных гидрогелевых сред и тканевых матриц.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

М.Д. Кривилев выражает благодарность АО ЦНИИмаш за частичную финансовую поддержку в рамках целевых работ «Перитектика».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giuseppe M. D., Law N., Webb B., Macrae A. R., Liew L. J., Sercombe T. B., Dilley R. J., and Doyle B. J. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D-bioprinting. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **79**, 150–157 (2018). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2017.12.018
- Jia J., Richards D. J., Pollard S., Tan Y., Rodriguez J., Visconti R. P., Trusk T. C., Yost M. J., Yao H., Markwald R. R., and Mei Y. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomater.*, **10** (10), 4323–4331 (2014). DOI: 10.1016/j.actbio.2014.06.034
- Sonaye S. Y., Ertugral E. G., Kothapalli C. R., and Sikder P. Extrusion 3D (bio)printing of alginate-gelatin-based composite scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Materials (Basel)*, **15** (22), 7945 (2022). DOI: 10.3390/ma15227945
- Shams E., Barzad M. S., Mohamadnia S., Tavakoli O., and Mehrdadfar A. A review on alginate-based bioinks, combination with other natural biomaterials and characteristics. *J. Biomater. Appl.*, **37** (2), 355–372 (2022). DOI: 10.1177/08853282221085690
- Pahlevanzadeh F., Mokhtari H., Bakhsheshi-Rad H. R., Emadi R., Kharaziha M., Valiani A., Poursamar S. A., Ismail A. F., RamaKrishna S., and Berto F. Recent trends in three-dimensional bioinks based on alginate for biomedical applications. *Materials (Basel)*, **13** (18), 3980 (2020). DOI: 10.3390/ma13183980
- Sales F. C., Iost R. M., Martins M. V., Almeida M. C., and Crespilho F. N. An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes. *Lab. Chip.*, **13** (3), 468–474 (2013). DOI: 10.1039/c2lc41007a
- Schaetzle O., Barrière F., and Baronian K. Bacteria and yeasts as catalysts in microbial fuel cells: electron transfer from micro-organisms to electrodes for green electricity. *Energy Environ. Sci.*, **1** (6), 607–620 (2008). DOI: 10.1039/B810642H
- Katz E., Shipway A. N., and Willner I. Biochemical fuel cells. In *Handbook of fuel cells – fundamentals, technology and applications*. Ed. by W. Vielstich, H. A. Gasteiger, and A. Lamm (John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2003), vol. 1, pp. 355–381.
- Левич В. Г. *Физико-химическая гидродинамика* (Институт компьютерных исследований, М.–Ижевск, 2016).
- Burla F., Sentjabrskaja T., Pletikapic G., van Beugen J., and Koenderink G. H. Particle diffusion in extracellular hydrogels. *Soft Matter*, **16** (5), 1366–1376 (2020). DOI: 10.1039/c9sm01837a
- Черенков И. А., Кривилев М. Д., Игнатьева М. М., Вахрушева Е. В. и Сергеев В. Г. Биоэлектрохимическое моделирование диффузии толуидинового синего

- го в гидрогеле в присутствии пероксидазы и трипси-на. *Биофизика*, **66** (5) 865–870 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050045, EDN: NUKQSU
12. Hrbac J., Halouzka V., Trnkova L., and Vacek J. eL-Chem Viewer: A freeware package for the analysis of electroanalytical data and their post-acquisition processing. *Sensors (Basel)*, **14** (8), 13943–13954 (2014). DOI: 10.3390/s140813943
 13. *Электроаналитические методы*. Под ред. Ф. Шольц (БИНОМ. Лаборатория знаний, М., 2010).
 14. Goudie M. J., Ghuman A. P., Collins S. B., Pidaparti R. M., and Handa H. Investigation of diffusion characteristics through microfluidic channels for passive drug delivery applications. *J. Drug Deliv.*, **2016**, 7913616 (2016). DOI: 10.1155/2016/7913616
 15. Новаковская М. В., Игнатъева М. М., Черенков И. А. Влияние липополисахарида сальмонеллы на диффузию толуидинового синего в альгинатном гидрогеле. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **7** (3), 458–461 (2022). DOI: 10.29039/rusjbrpc.2022.0544, EDN: PTNZPN

Numerical Simulation of the Diffusion of Electroactive Molecule in Biosimilar Hydrogel Media

I.A. Cherenkov*, M.D. Krivilev*, **, M.M. Ignat'eva*, A.Yu. Emel'yanova*, and V.G. Sergeev*

*Udmurt State University, Universitetskaya ul. 1, Izhevsk, 426034 Russia

**Udmurt Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Tatyany Baramzinoj 34, Izhevsk, 426067 Russia

Based on experimental data of cyclic voltammetry, the values of the diffusion coefficients for toluidine blue in alginate hydrogel, gelatine hydrogel and alginate-gelatine hydrogels were obtained. Using the experimental values of the coefficients in a numerical model, the values of the recovery of flows have been calculated showing them consistent with what was the experimental. It is proposed to use the period in time during which the value of the flow force reaches the value of steady state flow force as an indicator of the diffusion properties of the hydrogel medium. The findings of this study can be used for the development of methods for the evaluation of the diffusion properties of hydrogel media: bioinks and tissue-engineered structures.

Keywords: cyclic voltammetry, diffusion processes, biocompatible hydrogels, bioinks, numerical modelling

АДСОРБЦИЯ БЕЛКОВ НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫЕ МЕМБРАНЫ ИЗ ПОТОКА РАСТВОРА – ТЕОРИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТ

© 2024 г. К.А. Прусаков*, С.В. Замалутдинова**, А.Е. Сидорова**, Д.В. Багров**.*

*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, Малая Пироговская ул., 1а, Москва, 119435, Россия

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

*E-mail: bagrov@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024 г.

После доработки 05.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Некоторые лабораторные аналитические процедуры основаны на том, что исследуемую пробу пропускают через пористую полимерную мембрану. При этом аналит связывается с поверхностью мембраны, модифицированной специфическим рецепторным слоем, а затем обнаруживается с помощью оптического или электрохимического сигнала. В работе проведен экспериментальный и теоретический анализ закономерностей связывания аналита с нитроцеллюлозной мембраной. Рассмотрены два случая – специфическое связывание аналита с антителами, иммобилизованными на мембране, а также неспецифическая адсорбция аналита. Показано, что при увеличении объема пробы, прошедшего через мембрану, количество адсорбированного аналита растет, и в общем случае это может использоваться для повышения чувствительности биосенсоров.

Ключевые слова: адсорбция, нитроцеллюлоза, мембрана, антитела.

DOI: 10.31857/S0006302924050029, **EDN:** MLOHZK

Пористые полимерные мембраны являются незаменимым расходным материалом в лабораторных исследованиях. Их используют для различных видов блоттинга, например, вестерн-блоттинга, дот-блоттинга и других, кроме того, они являются компонентами тест-полосок и устройств «бумажной микрофлюидики» [1, 2]. Они могут быть изготовлены из нейлона-6, нитрата или ацетата целлюлозы, поливинилиденфторида или других полимеров.

В процедурах блоттинга растворы наносят на мембраны, а осаждение исследуемых веществ происходит под действием электрического поля или потока жидкости, созданного внешним источником давления. Объемы проб обычно небольшие и составляют порядка ~1–100 мкл. В то же время пористая структура мембраны допускает пропускание через нее сравнительно большого объема растворов. Например, антибактериальные фильтры с диаметром приблизительно 20–25 мм могут быть использованы для обработки

объема порядка ~100 мл и более. В связи с этим возникает вопрос: что будет происходить, если пропускать через мембрану большой объем пробы, содержащий аналит, размер которого значительно меньше размера поры, например, молекулу белка? Для такого аналита ситовой фильтрации не будет, но возможно, удастся собрать его из большого объема пробы – и за счет этого увеличить чувствительность анализа, выполняемого на мембране?

Задачи анализа проб, имеющих относительно большой объем (порядка нескольких миллилитров) и содержащих малое количество аналита, возникают при экологическом мониторинге состава водоемов и сточных вод, контроле качества продуктов питания, а также в некоторых медицинских анализах биологических жидкостей человека. Использование микропористых мембран считается эффективной стратегией в том случае, если анализ основан на образовании молекулярных комплексов на твердой поверхности, так как мембраны обеспечивают большую удельную площадь поверхности сенсорного слоя, чем плоские подложки [3–5].

Для эффективной доставки молекул аналита в толщу мембраны необходимо создать поток

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин, БСА-Су3 – бычий сывороточный альбумин, меченый флуорофором Су3, PBS – фосфатно-солевой буфер, ИФА – иммуноферментный анализ, БКМТ – биотинилированный конъюгат мелатонина.

жидкости с помощью внешнего источника давления. Нами была предложена система, которая позволяет пропускать через мембрану сравнительно большой объем пробы (в данной работе использовали максимум 8 мл, что почти на два порядка больше, чем типичный объем 100 мкл, используемый в иммуно-ферментном анализе), а также контролировать скорость потока жидкости через нее. Ранее с помощью этой проточной системы было показано, что адсорбция аналита на поверхность полимера из потока жидкости происходит более интенсивно, чем при инкубации мембраны в растворе аналита [6].

В анализах, основанных на регистрации сигнала от мембраны, предел детекции (минимальная детектируемая концентрация) зависит от минимального количества аналита, осажденного на мембрану, которое необходимо для возникновения заметного сигнала. Если количество осажденного аналита можно увеличить, то это поможет сделать процедуру анализа более чувствительной, а в некоторых случаях – снизить время анализа [7]. Цель данной работы состояла в том, чтобы определить зависимость количества аналита, осажденного на мембрану, от объема пробы. Это было сделано для двух механизмов адсорбции: неспецифической физической адсорбции и специфической, для исследования которой на мембрану наносили антитела против аналита. В обоих случаях наблюдалось увеличение количества адсорбированного аналита от объема пробы, причем экспериментальные результаты находились в хорошем соответствии с теоретическими оценками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общая схема эксперимента и проточная ячейка для обработки мембран. Для исследования адсорбции аналитов на поверхности мембран при протекании сквозь них растворов была использована оригинальная система зажимов. В них мембрана зафиксирована так, что поток жидкости поступает перпендикулярно ее лицевой стороне. Структура зажима ограничивает область мембраны диаметром 6 мм и имеет специальные поддерживающие элементы, которые не позволяют мембране прогибаться под действием потока жидкости.

Зажим изготовлен из листа поликарбоната толщиной 6 мм с помощью фрезеровки и сверления. Для подключения шлангов с растворами в отверстиях на зажиме с помощью эпоксидного клея закреплены металлические трубки с внешним диаметром 0.8 мм. Поддерживающие элементы и элементы, ограничивающие рабочую область мембраны, изготовлены из листов полиэтилентерефталата толщиной 0.2 мм с помощью лазерной абляции на станке GLS Spirit (GCC, Китай). Эти элементы приклеены к поверхности по-

ликарбоната с помощью листового акрилового адгезива 3М 468MP. «Мертвый» объем такой системы составил приблизительно 100 мкл. На рис. 1а представлена схема зажима, стрелками указано направление потока жидкости. Для фиксации зажима используется внешняя оправка из металлических деталей, скрепляемых винтами. Был изготовлен зажим для одновременной обработки шести мембран (рис. 1б). Для создания потока жидкости через них использовали перистальтический насос BT100M DG-8 (Chongy, Китай) и силиконовые шланги TYGON S3 с внутренним диаметром 0.51 мм.

Перед экспериментами внутренние поверхности зажима и шлангов блокировали путем пропускания 1% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА), затем промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и только после этого мембрану размещали в зажиме. После каждого эксперимента систему промывали 70% этанолом, дистиллированной водой и высушивали потоком воздуха.

Как показано на рис. 1б, информация об адсорбции аналита на мембрану может быть получена путем измерения оптического сигнала от мембраны либо путем измерения концентрации аналита в растворе, прошедшем через мембрану. Во всех экспериментах использовали мембраны из нитроцеллюлозы с эффективным диаметром пор 0.45 мкм (1620115, Bio-rad, США).

Измерение неспецифической адсорбции. Для анализа неспецифической адсорбции использовали бычий сывороточный альбумин, меченный флуорофором Су3 (БСА-Су3) (рис. 2а). Перед сборкой ячейки мембраны из нитроцеллюлозы обработали в тлеющем разряде на приборе Emittech K100X (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) с двух сторон. Обработку проводили при силе тока 30 мА в течение 45 с.

В эксперименте использовали растворы с одинаковой концентраций БСА-Су3 и разными объемами. Концентрация раствора, подаваемого на каждый кусочек мембраны, составляла 500 нг/мл, а объемы были равны 1, 2, 4, 6 и 7 мл. Их пропускали через мембрану однократно, со скоростью 125 мкл/мин.

Флуоресценцию мембран измеряли на планшетном ридере Chameleon (Hidex, Финляндия) с фильтром возбуждения 540/10 нм и фильтром эмиссии 580/10 нм. Для этого мембраны вырезали из них фрагменты с диаметром 6 мм и располагали эти фрагменты в 96-луночном планшете.

С помощью этого же прибора определяли концентрации БСА-Су3 в растворах, которые прошли через мембраны. Для этого использовали калибровочную зависимость интенсивности

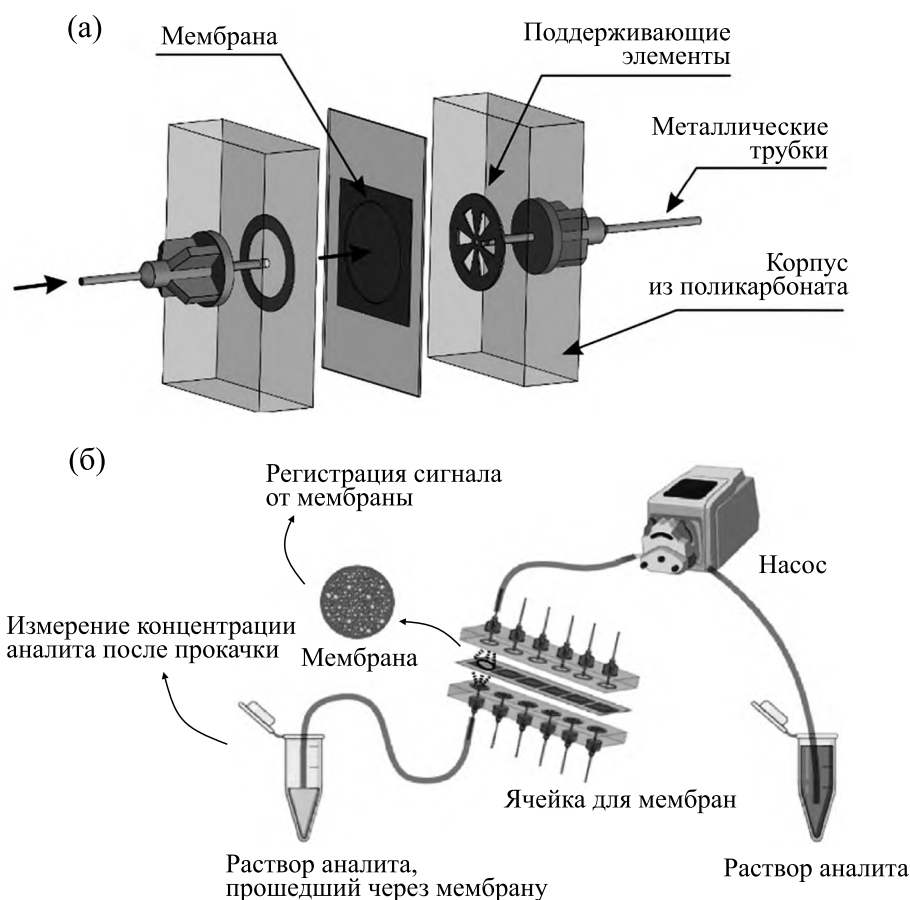


Рис. 1. Схема проточной системы (а) и общая схема эксперимента (б).

флуоресценции от концентрации раствора, использовали точки калибровки 500, 400, 300, 200, 100 и 0 нг/мл.

Измерение специфического связывания и иммуноанализ. В экспериментах по специфическому связыванию анализата с мембраной использовали компоненты набора реагентов KSA908Ge11 для определения мелатонина методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Cloude-Clone Corp., США). В качестве анализата выступал биотинилированный конъюгат мелатонина (БКМТ) с БСА. Для обеспечения аффинного связывания на мембраны наносили улавливающие антитела против мелатонина, это делали путем циклического пропускания раствора с концентрацией 8.3 мкг/мл (разведение стокового раствора 1 : 100) через мембраны в течение 1 ч. После этого мембраны блокировали с помощью реагента, предлагаемого производителем, в течение 1 ч.

Через подготовленные мембраны пропускали растворы БКМТ разного объема и одинаковой концентрации (50 нг/мл) один раз со скоростью 125 мкл/мин. Объемы проб составляли 1, 2, 4, 6 и

8 мл. Для измерения снижения концентрации анализата все пробы собирали на выходе из системы.

Уменьшение концентрации БКМТ в растворах, прошедших сквозь реакционную камеру, оценивали методом ИФА в ячейках 96-луночного планшета (использовали предельно упрощенный вариант ИФА, так как анализ биотинилирован и его сравнительно легко обнаружить). Для калибровки использовали последовательные разведения стокового раствора БКМТ в PBS (pH 7.4) в два раза до минимальной концентрации 0.8 нг/мл.

Анализ проводили по протоколу, предлагаемому производителем, с небольшими изменениями. Улавливающие антитела разводили в проприетарном буфере (pH 9.5) до концентрации 0.83 мкг/мл и наносили по 100 мкл в лунку, инкубировали 1 час (здесь и далее при 37°C и покачивании со скоростью 130 об/мин). Промывали один раз буфером PBS с добавлением 0.075% Tween-20 в течение 1 мин, затем инкубировали с 200 мкл блокирующего буфера в течение часа для

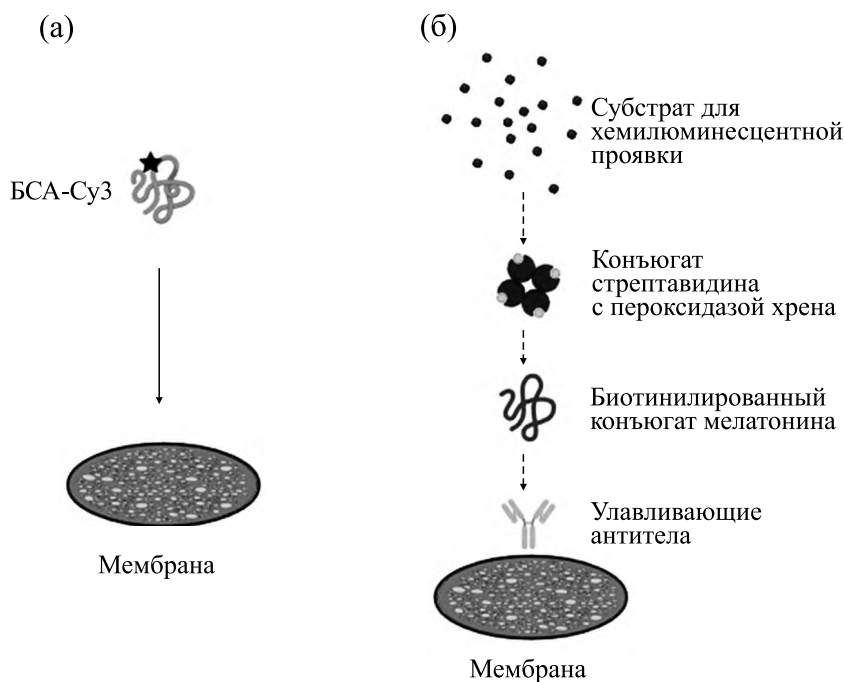


Рис. 2. Схема связывания аналита с подложкой: (а) — неспецифическое связывание, (б) — специфическое связывание.

блокирования неспецифических сайтов связывания и однократно промывали.

Образцы и калибровочные растворы объемом 50 мкл вносили в лунки в двух повторностях, инкубировали 1 ч, после чего трижды отмывали. Затем наносили 100 мкл раствора конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена, инкубировали 30 мин и пять раз промывали. На последнем этапе вносили по 90 мкл тетраметилбензидаина, инкубировали 15 мин и добавляли 50 мкл 0.5 М серной кислоты. Измерение оптической плотности при 450 нм проводили на полуавтоматическом планшетном фотометре STAT FAX 2100 (Awareness Technology Inc., США).

Для измерения сигнала от мембран (рис. 2б) с ними провели аналогичную процедуру. После прокачки растворов аналита мембраны отмывали путем пропускания PBST. Затем с помощью реакционной камеры через каждую мембрану циклически пропускали по 500 мкл раствора конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена в течение 30 минут. Мембраны отмывали путем последовательного пропускания 3 мл PBS с добавлением 0.075% Tween-20 и 3 мл PBS, затем их извлекали из камер, располагали на предметном стекле и добавляли хемилюминесцентный субстрат Affinity ECL (ООО «БелкиАнтитела», РФ). Интенсивность хемилюминесценции измеряли на приборе ChemiDoc (BioRad, США).

Математическая модель адсорбции аналита на мембрану из потока жидкости. Для теоретического описания процессов, происходящих в объеме мембраны, нами ранее была разработана математическая модель на основе системы дифференциальных уравнений диффузии, массопереноса потоком жидкости и кинетики адсорбции [8]. В основе модели лежат два уравнения:

$$\frac{\partial C(z,t)}{\partial t} + \frac{\partial S(z,t)}{\partial t} = D_{\text{eff}} \frac{\partial^2 C(z,t)}{\partial z^2} - U_{\text{flow}} \frac{\partial C(z,t)}{\partial z},$$

$$\frac{\partial S(z,t)}{\partial t} = k_{\text{on}} C(z,t) (\Gamma_v - S(z,t)) - k_{\text{off}} S(z,t),$$

где z — координата по оси, направленной перпендикулярно плоскости мембраны в направлении потока; $C(z,t)$ — концентрация аналита в растворе как функция от координаты и времени; $S(z,t)$ — концентрация аналита, адсорбированного на мембране, как функция от координаты и времени; D_{eff} — эффективный коэффициент диффузии аналита в порах мембраны; U_{flow} — линейная скорость потока жидкости; k_{on} и k_{off} — кинетические константы прямой и обратной реакции комплексообразования на поверхности мембраны; Γ_v — объемная концентрация сайтов связывания на мембране. На практике с помощью перистальтического насоса задается объемная скорость

прокачки. Линейная же скорость потока жидкости сквозь мембрану U_{flow} вычисляется с учетом площади мембраны (в данной работе это круг с диаметром 6 мм).

Данную систему дифференциальных уравнений решали численно и вычисляли пространственное распределение концентрации адсорбированного анализита как функцию от времени. Поскольку объемная скорость прокачки постоянна, зависимость от времени может быть легко преобразована в зависимость от прокаченного объема пробы.

Для сравнения результатов моделирования с экспериментальными данными дополнительно проводили численное интегрирование полученных функций распределения по объему мембраны. Это позволяло рассчитать общее количество анализита, связанного с мембраной. В отличие от пространственного распределения, интегральная величина может быть легко измерена экспериментально по падению концентрации анализита в растворах, протекающих сквозь реакционную камеру.

Кроме общего количества анализита, связанного с мембраной, по пространственным распределениям количества связанного анализита вычисляли его количество на лицевой стороне мембраны при $z = 0$. Это количество связано с оптическими сигналами, зарегистрированными от мембран, — флуоресцентным (в случае физической адсорбции) или хемилюминесцентным (в случае специфического связывания).

В обоих случаях сигналы детектировали с лицевой стороны мембраны, т.е. с той стороны, с которой поступал поток раствора анализита. Эти измерения позволяют оценить количество анализита в тонком приповерхностном слое, из которого может быть собран оптический сигнал. Оцененная таким способом концентрация связанного анализита в приповерхностном слое также была сопоставлена с результатами численного моделирования. Для этого использовали сечения полученных расчетных пространственных распределений концентрации связанного анализита по $z = 0$, т.е. по лицевой поверхности мембраны. Измерения оптических сигналов от мембран не позволяют определить количество адсорбированного анализита без калибровки и могут быть сопоставлены с результатами расчетов только визуально. Тем не менее, эти данные можно рассматривать как дополнительный метод, подтверждающий предложенную концепцию и корректность математической модели.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая схема экспериментов и теоретические предпосылки. Для измерения зависимости коли-

чества связанного с мембраной анализита от объема пробы нами была создана система зажимов, которая позволяет зафиксировать мембрану в потоке раствора (рис. 1). В данной системе для создания потока жидкости использовали перистальтический насос. Он имеет преимущество перед альтернативными способами (шприцевой или вакуумный насос), так как позволяет пропускать через мембрану сравнительно большие объемы растворов (порядка ~ 1 мл), а при необходимости — циклически пропускать через мембрану пробу небольшого объема. Кроме того, имеется возможность менять направление прокачки, а также одновременно обрабатывать несколько мембран с одинаковой скоростью потока жидкости.

Измеряемой величиной во всех экспериментах являлось количество анализита, адсорбированного на мембране, которое вычисляли по снижению концентрации в растворах, прошедших сквозь мембраны. Были рассмотрены два механизма адсорбции анализита на мембрану: неспецифическая физическая адсорбция и специфическое взаимодействие между антигеном и антителом. В первом случае анализитом являлся флуоресцентно меченый БСА. Снижение его концентрации в растворе определяли путем измерения интенсивности флуоресценции растворов и сравнения полученных значений с калибровочной кривой. Во втором случае взаимодействие исследовали на примере антител против мелатонина и БКМТ. Снижение концентрации БКМТ измеряли с помощью ИФА с колориметрической детекцией.

Для теоретического исследования свойств проточной аналитической системы была разработана математическая модель, описывающая процессы диффузии и адсорбции системой дифференциальных уравнений [8]. Данная модель имеет несколько допущений. Во-первых, поскольку латеральные размеры мембраны в эксперименте (диаметр 6 мм) намного превосходят ее толщину (~ 110 – 115 мкм), в математическом моделировании рассматривали одномерную задачу. Модель пренебрегала потоками и диффузией в направлениях, перпендикулярных нормали к внешней поверхности мембраны. Таким образом, модель описывала только процессы, происходящие в центральной области, ограниченной диаметром держателя (6 мм), и игнорировала краевые эффекты вблизи границ. Во-вторых, сложная пространственная структура мембраны и распределение по ней сайтов связывания были заменены на равномерное распределение сайтов связывания с постоянной объемной концентрацией Γ_v . В-третьих, для того чтобы учесть влияние структуры мембраны на диффузию молекул анализита внутри пор, был введен эффективный коэффициент диффузии D_{eff} , который меньше

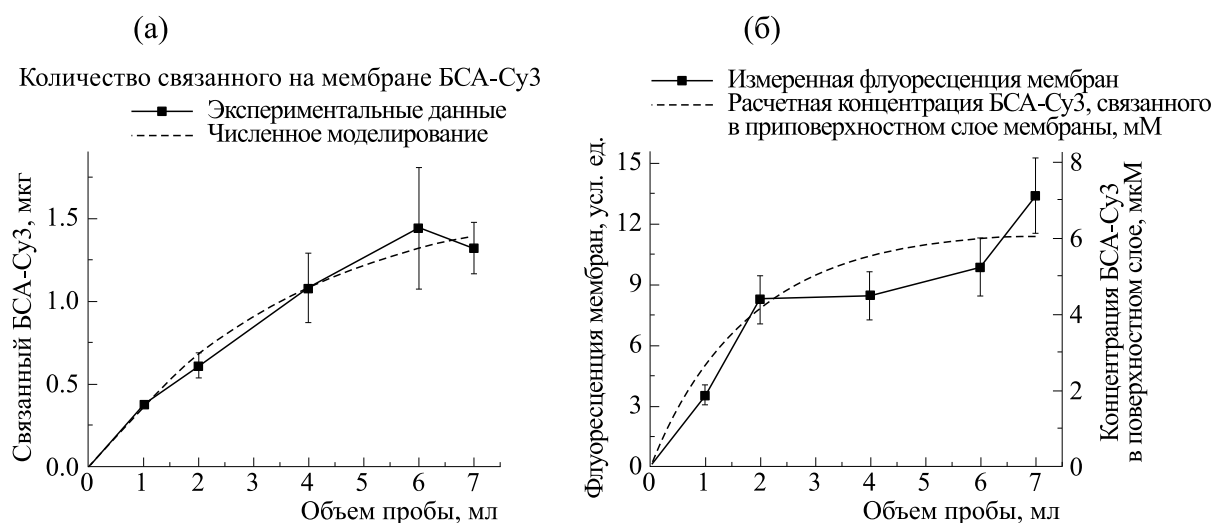


Рис. 3. Результаты измерения неспецифического связывания в зависимости от прокаченного объема пробы: (а) – измеренное количество адсорбированного БСА-Cu3, связанного с мембраной, и результаты расчета; (б) – флуоресцентный сигнал от мембраны и результат расчета концентрации аналита в приповерхностном слое мембраны с лицевой стороны.

коэффициента диффузии молекул аналита в свободном объеме:

$$D_{\text{eff}} = \varepsilon D/2,$$

где ε – величина пористости мембраны, которую в литературе обычно оценивают как 0.4–0.6. Граничные условия для системы дифференциальных уравнений определяли из условий проведения эксперимента. Так, поскольку в мембрану всегда поступает поток раствора с одной и той же концентрацией аналита C_0 , граничное условие на лицевой стороне принимает следующий вид:

$$C(0,t) = C_0.$$

На той поверхности мембраны, из которой вытекает поток раствора, граничное условие отражает требование отсутствия изменения объемной концентрации аналита, так как адсорбция происходит только внутри мембраны:

$$\left. \frac{\partial C(z,t)}{\partial z} \right|_{z=h} = 0,$$

где h – толщина мембраны.

В данном исследовании в экспериментах варьировали только объем пробы, а все остальные параметры (концентрации аналитов, скорость прокачки, тип мембраны) оставались неизменными. Для обоих аналитов (БСА и БКМТ) скорость прокачки была равна 125 мкл/мин. Данные о кинетических константах реакций комплексообразования и концентрации сайтов связывания, требующиеся для проведения численных расчетов, выбирали на основе литературных данных [9–11], а затем варьировали, чтобы расчетные

кривые наиболее точно соответствовали экспериментальным данным.

Измерение неспецифической адсорбции. Как зависит количество аналита, захваченного мембраной, от объема раствора, прошедшего через нее? Результаты эксперимента, выполненного с БСА, представлены на рис. 3. Исходная концентрация раствора составляла 500 нг/мл, а после пропускания через мембрану она снижалась до 100–300 нг/мл в зависимости от прокаченного объема пробы. Объемы растворов составляли 1, 2, 4, 6 и 7 мл, соответственно масса БСА, осажденного на мембрану, лежала в диапазоне 0–1.5 мкг (рис. 3а). Мы считали, что весь БСА, ушедший из раствора, остался именно на мембране, так как все поверхности шлангов и соединений, с которыми контактировал раствор, были заблокированы, и мы пренебрегали адсорбцией БСА на них.

Зависимость массы БСА, адсорбированного на мембране, от прокаченного объема пробы, была использована для выбора констант численного моделирования, а именно кинетических констант k_{on} и k_{off} , а также объемной плотности сайтов связывания Γ_v . Хорошее соответствие между результатами экспериментов и результатами расчетов достигалось при значениях $k_{\text{on}} = 3.75 \cdot 10^3$ (моль \cdot с) $^{-1}$, $k_{\text{off}} = 1.15 \cdot 10^{-3}$ с $^{-1}$, $\Gamma_v = 0.35$ мМ. Соответствующая кривая показана на рис. 3а пунктиром, квадрат коэффициента корреляции Пирсона $R^2 = 0.986$. Таким образом, для неспецифической физической адсорбции конъюгата БСА на обработанную в тлеющем разряде нитроцеллюлозу константу диссоциации можно оценить $K_d = 0.3$ мкМ,

что соответствует литературным данным. Например, по данным ионообменной хроматографии константа диссоциации для адсорбции БСА на поверхность агарозного сорбента составляла 3.6 мкМ [12] или, по другим оценкам, – в диапазоне 0.46–22.3 мкМ [13].

Для дополнительной проверки на рис. 3б приведено сравнение интенсивности флуоресценции мембран с теоретически рассчитанной концентрацией аналита в приповерхностном слое мембраны. Видно, что эти графики разумно совпадают, хотя сравнивать их аналитически сравнительно сложно. Действительно, описанные измерения сигналов от мембран аналогичны тем, которые делают при дот-блоттинге, а он является качественным или полуколичественным, но не количественным методом. В данном случае зависимость интенсивности флуоресценции от количества адсорбированного флуоресцентно меченого белка не откалибрована, и ее сложно измерить, так как неизвестно, с какой именно глубины мембраны собирается оптический сигнал. Кроме того, расчеты показывают, что в нашей системе наблюдается сложное распределение концентрации связанного аналита по глубине мембраны, которое трудно поддается калибровке. Тем не менее, качественное совпадение зависимостей на рис. 3б является дополнительным подтверждением того, что адсорбция возрастает по мере увеличения объема пробы, а также применимости вычислительной модели.

Из полученных зависимостей видно, что математическая модель корректно описывает экспериментальные данные, позволяет прогнозировать количество адсорбированного аналита и динамику поведения системы. Кроме того, можно заметить, что все полученные зависимости выпуклы вверх и стремятся к выходу на плато. Так происходит из-за насыщения сорбционной емкости мембраны и стремления системы к равновесию. Однако на данных скоростях прокачки и объемах пробы равновесие и насыщение не были достигнуты. Разработанная модель позволяет оптимизировать эти параметры без дополнительных экспериментов и адаптировать систему под задачи конкретной аналитической платформы или биосенсора.

Эксперименты, описанные в данном разделе, а также наши более ранние эксперименты с аналогичной проточной системой [6] позволили выявить важную методическую особенность. Пузырьки воздуха, попавшие в систему с потоком растворов, могут закупорить реакционную камеру и исказить результаты анализа. Так происходит вследствие того, что реакционная камера пе-

регорожена гидрофильной микропористой мембраной, которая, будучи смоченной, не пропускает сквозь себя воздух при давлениях, которые может создать перистальтический насос. Наиболее остро эта проблема проявлялась при первом заполнении системы и решалась несколькими сменами направления потока через мембрану, пока все пузырьки воздуха не покидали систему. За счет малого «мертвого» объема системы, израсходованный на эти манипуляции объем раствора практически не влиял на результаты эксперимента.

Измерение специфического связывания. В исследовании специфического комплексообразования на мембране в качестве аналита был использован биотинилированный конъюгат мелатонина, а в качестве молекул рецепторного слоя использовали антитела против мелатонина. БКМТ представляет собой конъюгат трех компонентов – БСА, мелатонина и биотина. Он используется в коммерческом наборе для ИФА на мелатонин, основанном на конкурентном взаимодействии. В данной работе он выполнял роль удобного для обнаружения аналита – за счет биотинилирования, он может быть обнаружен с помощью конъюгатов стрептавидина с пероксидазой хрена и последующего добавления колориметрического или хемилюминесцентного субстрата. В состав набора реагентов для ИФА входит раствор БКМТ с известной концентрацией. В обычном ИФА он является служебным реагентом (конкурентом), а в наших экспериментах – аналитом.

В экспериментах по исследованию специфического связывания на мембрану наносили последовательно разные растворы: улавливающие антитела, блокирующий раствор, аналит, а также необходимый для регистрации сигнала от мембраны проявляющий раствор конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. Все растворы наносили на мембрану с помощью проточной аналитической системы.

После пропускания раствора БКМТ через мембраны было измерено снижение его концентрации и вычислено количество БКМТ, связанного с мембраной. Как и в эксперименте по измерению неспецифического связывания, мы предполагали, что уменьшение концентрации обусловлено адсорбцией аналита на мембрану, а не на шланги или их соединения с камерой. На рис. 4а представлен график зависимости количества связанного БКМТ от использованного объема аналита, он представляет собой возрастающую кривую. С помощью моделирования были выбраны следующие значения констант: $k_{\text{он}} = 2.75 \cdot 10^3 \text{ (моль} \cdot \text{с)}^{-1}$, $k_{\text{офф}} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ с}^{-1}$, $\Gamma_v = 0.24 \text{ мМ}$.

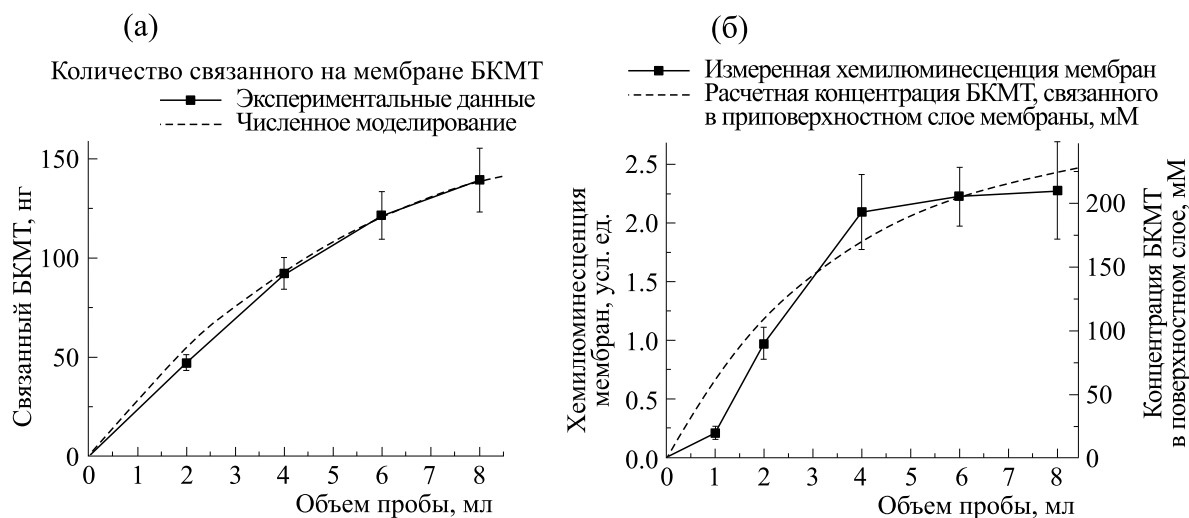


Рис. 4. Результаты измерения специфического связывания в зависимости от прокаченного объема: (а) — количество БКМТ, связанного с мембраной, вычисленное по убыви концентрации БКМТ в растворе; (б) — хемилюминесцентный сигнал от мембран и результат расчета концентрации БКМТ в приповерхностном слое мембраны с лицевой стороны.

Квадрат коэффициента корреляции Пирсона составил $R^2 = 0.997$. Соотношение скоростей прямой и обратной реакции позволяет вычислить константу диссоциации: $K_d = 0.18$ нМ — это хорошо соответствует характерным значениям константы диссоциации для взаимодействия между антигеном и антителом [14–16]. Количество сайтов связывания Γ_v оказалось меньше, чем в случае неспецифической адсорбции, так как специфическое связывание анализита возможно только на тех участках поверхности полимера, на которых адсорбированы антитела, причем их антиген-связывающий участок экспонирован в раствор.

При выбранных константах была вычислена концентрация БКМТ в приповерхностном слое мембраны, она показана пунктирной линией на рис. 4б. Она хорошо соответствует измеренным хемилюминесцентным сигналам. Расхождения могут быть связаны с тем, что находящиеся в зажиме мембраны деформируются и после извлечения оказываются не совсем плоскими. Это приводит к неоднородному растеканию хемилюминесцентного субстрата и, как следствие, влияет на регистрируемую интенсивность хемилюминесценции. При исследовании неспецифической адсорбции такой проблемы не возникало, потому что флуоресцирующий реагент (конъюгат БСА с Су3) был нанесен в проточной системе, а хемилюминесцентный субстрат наносили после извлечения мембран из нее.

Ранее нами было теоретически показано, что пропускание большого объема пробы через мембрану позволяет сконцентрировать на ней

аналит — вплоть до насыщения всех доступных сайтов связывания [8]. Это может быть полезно для снижения предела детекции аналитических методов, которые основаны на регистрации сигнала от мембраны, таких как дот-блоттинг. В данной работе это теоретическое предсказание было подтверждено экспериментально.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение чувствительности лабораторных анализов является сложной инженерно-технической задачей. Для анализов, в которых предусмотрена адсорбция анализита из подвижной фазы на неподвижный твердый носитель, чувствительность может быть улучшена за счет большого объема пробы. В данной работе это было продемонстрировано для двух систем, в которых происходила адсорбция молекул белка на поверхность пористой мембраны.

Эксперименты были выполнены с помощью проточной системы, которая позволяет пропускать исследуемые растворы через мембрану с заданной скоростью. Были рассмотрены два случая: неспецифическая адсорбция и специфическая, для исследования которой на мембраны наносили антитела против анализита и затем блокировали свободные сайты связывания. В обоих случаях количество анализита, осажденного на мембрану из потока, возрастало по мере увеличения объема пробы. Это было подтверждено как измерениями снижения концентрации анализита в пробе, так и оптическими сигналами от анализита, осажденного на мембрану.

Экспериментальные результаты были использованы для моделирования процесса адсорбции с использованием теоретической модели, предложенной ранее [8]. Были получены константы диссоциации, равные 0.3 мкМ и 0.18 нМ для неспецифической адсорбции и специфического связывания соответственно.

В дальнейшем представляет интерес проведение аналогичных измерений в более широком диапазоне концентраций аналита и для разных скоростей подачи аналита на мембрану. Такие работы помогут развитию мембранных аналитических систем и биосенсоров.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-74-10042.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sule R., Rivera G., and Gomes A. V. Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. *BioTechniques*, **75** (3), 99–114 (2023). DOI: 10.2144/btn-2022-0034
- Chen X. and Shen J. Review of membranes in microfluidics. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **92** (2), 271–282 (2017). DOI: 10.1002/jctb.5105
- Ishikawa E. Factors limiting the sensitivity of noncompetitive heterogeneous solid phase enzyme immunoassays. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. by P. C. van der Vliet and S. Pillai (Elsevier, 1999), V. 27, pp. 7–16. DOI: 10.1016/S0075-7535(08)70563-1
- Mansfield M. A. Nitrocellulose membranes for lateral flow immunoassays: a technical treatise. In *Lateral Flow Immunoassay*. Ed. by R. Wong and H. Tse (Humana Press, 2009), pp. 1–19. DOI: 10.1007/978-1-59745-240-3_6
- Pavlova E., Maslakova A., Prusakov K., and Bagrov D. Optical sensors based on electrospun membranes – principles, applications, and prospects for chemistry and biology. *New J. Chem.*, **46** (18), 8356–8380 (2022). DOI: 10.1039/D2NJ01821G
- Maslakova A., Prusakov K., Sidorova A., Pavlova E., Ramonova A., and Bagrov D. Pressure-driven sample flow through an electrospun membrane increases the analyte adsorption. *Micro*, **3** (2), 566–577 (2023). DOI: 10.3390/micro3020038
- Hosseini S., Azari P., Aeinehvand M. M., Rothan H. A., Djordjevic I., Martinez-Chapa S. O., and Madou M. J. Intransient ELISA: A novel approach to fabrication of electrospun fiber mat-assisted biosensor platforms and their integration within standard analytical well plates. *Appl. Sci.*, **6** (11), 336 (2016). DOI: 10.3390/app6110336
- Prusakov K. A. and Bagrov D. V. Convection-diffusion-adsorption model for the description of the analyte-binding reactions on a membrane. *Anal. Lett.*, 1–17 (2024). DOI: 10.1080/00032719.2023.2301503
- Frutiger A., Tanno A., Hwu S., Tiefenauer R. F., Vörös J., and Nakatsuka N. Nonspecific binding - fundamental concepts and consequences for biosensing applications. *Chem. Rev.*, **121** (13), 8095–8160 (2021). DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00044
- Squires T. M., Messinger R. J., and Manalis S. R. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nature Biotechnol.*, **26** (4), 417–426 (2008). DOI: 10.1038/nbt1388
- Stenberg M. and Nygren H. Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces. *J. Immunol. Methods*, **113** (1), 3–15 (1988). DOI: 10.1016/0022-1759(88)90376-6
- Yamamoto S. and Sano Y. Short-cut method for predicting the productivity of affinity chromatography. *J. Chromatography A*, **597** (1–2), 173–179 (1992). DOI: 10.1016/0021-9673(92)80107-6
- Patel B. C. and Luo R. G. Protein adsorption dissociation constants in various types of biochromatography. *Studies in Surface Science and Catalysis*, **120 A**, 829–845 (1999). DOI: 10.1016/S0167-2991(99)80573-4
- Landry J. P. P., Ke Y., Yu G.-L. L., and Zhu X. D. D. Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform. *J. Immunol. Methods*, **417**, 86–96 (2015). DOI: 10.1016/j.jim.2014.12.011
- Pellequer J. L. L. and Van Regenmortel M. H. V. H. V. Measurement of kinetic binding constants of viral antibodies using a new biosensor technology. *J. Immunol. Methods*, **166** (1), 133–143 (1993). DOI: 10.1016/0022-1759(93)90337-7
- Cho H. K., Seo S. M., Cho I. H., Paek S. H., Kim D. H., and Paek S. H. Minimum-step immuno-analysis based on continuous recycling of the capture antibody. *Analyt.*, **136** (7), 1374–1379 (2011). DOI: 10.1039/c0an00811g

Adsorption of Proteins onto Nitrocellulose Membranes from a Flowing Solution – Theory and Experiment

K.A. Prusakov*, **S.V. Zamalutdinova****, **A.E. Sidorova****, and **D.V. Bagrov****

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

***Department of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

Some analytical laboratory procedures involve passing the sample through a porous polymer membrane. In this process, the analyte binds to the surface of the membrane modified with a specific receptor layer and is then detected using optical or electrochemical signals. This paper presents an experimental and theoretical analysis of the binding patterns of the analyte to nitrocellulose membranes. Two cases are considered: specific binding of the analyte to antibodies immobilized on the membrane and non-specific adsorption of the analyte. It is shown that increasing the volume of the sample passed through the membrane leads to an increase in the amount of adsorbed analyte, and this can generally be used to improve the sensitivity of biosensors.

Keywords: adsorption, nitrocellulose, membrane, antibodies

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СИЛОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Yersinia pseudotuberculosis* С АНТИТЕЛАМИ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2024 г. А.А. Бывалов*, **, #, В.С. Белозёров*, **, И.В. Коньшев*, **, Б.А. Ананченко*

**Вятский государственный университет, Московская ул., 36, Киров, 610000, Россия*

***Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН,
Первомайская ул., 50, Сыктывкар, Республика Коми, 167982, Россия*

#*E-mail: byvalov@nextmail.ru*

Поступила в редакцию 07.10.2023 г.

После доработки 30.11.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2024 г.

С помощью оптического пинцета и атомно-силовой микроскопии проведена сравнительная оценка силы связи липополисахарида из культуры *Yersinia pseudotuberculosis* с моноклональными антителами. Обсуждаются особенности двух методов, определяющие существенные различия в значениях измеряемой силы разрыва связи между сенсibilизированным липополисахаридом зондом (полистирольной микросферой в случае оптического пинцета и иглой кантилевера из нитрида кремния в случае атомно-силовой микроскопии) и субстратом (стекло и слюда соответственно), покрытым моноклональными антителами. В случае атомно-силовой микроскопии игла кантилевера до момента останковки пьезостолика скользит по поверхности субстрата, вызывая изменение пространственной структуры сенситинов и, как следствие, перераспределение множественной связи между агломератом липополисахарида и антителами. При использовании метода оптического пинцета существенного смещения микросферы по поверхности субстрата не происходит и, в отличие от атомно-силовой микроскопии, разрыв сложной связи между липополисахаридом и комплементарными антителами регистрируется в виде единственного и кратковременного (1–2 мс) скачка сигнала фотодетектора. Фиксируемые значения силы разрыва связи, измеряемой обоими методами, относительноны и варьируют в зависимости от выбранных условий проведения экспериментов. Показано, что неспецифическая составляющая силы разрыва связи, измеряемой методом атомно-силовой микроскопии, существенно выше по сравнению с таковой, определяемой методом оптического пинцета.

Ключевые слова: оптический пинцет, атомно-силовая микроскопия, липополисахарид, моноклональные антитела, сила связи.

DOI: 10.31857/S0006302924050031, EDN: MKTSLT

Применение различных методов для оценки характеристик одного и того же объекта исследования и сравнение полученных экспериментальных данных является, как правило, необходимым подходом для получения объективных результатов. В области нанобиологии известно много примеров не только количественного, но и качественного несоответствия данных, полученных при использовании даже достаточно близких друг другу и признаваемых вполне корректными мето-

дов. Для выявления причин таких расхождений, далеко не всегда очевидных и объяснимых, требуются специальные исследования.

В предшествующих работах методами оптического пинцета (ОП) [1] и атомно-силовой микроскопии (АСМ) [2] мы определили силовые характеристики взаимодействия в системе «антиген – антитело» на примере липополисахарида (ЛПС) из культуры *Yersinia pseudotuberculosis* и моноклональных антител (МКАт). Эти два метода наряду с другими биофизическими методами широко используются в биологических исследованиях. С их помощью на молекулярном и клеточном уровнях изучаются биомеханические процессы, механизмы взаимодействий объектов биотической

Сокращения: ОП – оптический пинцет, АСМ – атомно-силовая микроскопия, ЛПС – липополисахарид, МКАт – моноклональные антитела, NHS-PEG27-acetal – N-гидроксисукцинимид-полиэтиленгликоль27-ацеталь, NHS – N-гидроксисукцинимид.

Таблица 1. Условия экспериментов по определению силовых характеристик взаимодействия исследуемых объектов методами ОП и АСМ

Метод	Способ, скорость подведения пьезостолика	Расстояние, пройденное пьезостоликом при подведении от контакта до остановки, нм	Время контакта, с	Способ, скорость отведения пьезостолика, нм/с	Расстояние, пройденное пьезостоликом при отведении, мкм	Скорость нагружения, нН/с	Диаметр (материал) зонда	Способ сенсibilизации зонда ЛПС	Способ сенсibilизации подложки МКАт
ОП	Ступенчато, шаг 50 нм	100–150	1	Непрерывно, 140	4	0.039	1000 нм (полистирольная микросфера)	Физическая адсорбция	Хемосорбция на стекле [7]
АСМ	Непрерывно, 500 нм/с	100–150	1	Непрерывно, 500	1	37	~20 нм (игла кантилевера из нитрида кремния)	Хемосорбция через NHS-полиэтиленгликоль27-ацеталь [8]	Хемосорбция на слюде [7]

и абиотической природы и др. При характеристике отличительных особенностей двух методов, рассматриваемых в многочисленных публикациях, в том числе обзорного характера [3, 4], авторы определяют их достоинства, ограничения и различия в сферах применения. Вместе с тем, экспериментальных данных о применении этих методов для измерения сил взаимодействия в модельных системах с идентичными парами лиганд – рецептор, антиген – антитело и др. практически нет. Цель настоящей работы состояла в выявлении особенностей двух методов, определяющих существенные различия в значениях измеряемой силы разрыва связи между ЛПС, иммобилизованным на полистирольных микросферах (ОП) и на зонде кантилевера из нитрида кремния (АСМ), и моноклональными антителами, адсорбированными на стекле и слюде соответственно. Подобные исследования расширяют и углубляют знания о природе подобных взаимодействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиген (липополисахарид). Во всех проведенных экспериментах был использован препарат ЛПС одной и той же серии, выделенный из культуры *Y. pseudotuberculosis 1b*, выращенной при температуре 10°C, способствующей продукции О-боковых цепей [5].

Антитела. В работе использовали моноклональные антитела к О-боковым цепям ЛПС *Y. pseudotuberculosis 1b* (МКАт2) [6]. В качестве от-

рицательного контроля использовали моноклональные антитела к белковому эпитопу наружной мембраны, не взаимодействующие с ЛПС (МКАт7) [6].

Иммобилизация антител. Моноклональные антитела наносили на аминированные (3-аминопропил)триэтоксисиланом подложки (стекло для ОП и слюда для АСМ) одним и тем же способом хемосорбции с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и N-гидроксисукцинимидом (NHS) [7].

Сенсibilизация микросфер и кантилевера. Сенсibilизацию полистирольных микросфер диаметром 1 мкм препаратом ЛПС проводили методом физической адсорбции, сенсibilизацию кантилевера – методом хемосорбции с использованием NHS-полиэтиленгликоль27-ацетала [8].

Условия проведения экспериментов. Измерение сил оцениваемой связи осуществляли на установке NanoTracker™ (JPK Instruments AG, Германия) и атомно-силовом микроскопе Ntegra Prima (NT-MDT, Зеленоград, Россия) с применением измерительного вкладыша AU-028 для проведения эксперимента в жидкости при использовании зондов серии PNP-DB (NanoWorld, Швейцария), имеющих радиус закругления иглы ~10 нм и жесткость консоли ~0.06 нН/нм. Детали условий проведения экспериментов методами ОП и АСМ описаны в работах [1, 2], а также в табл. 1.

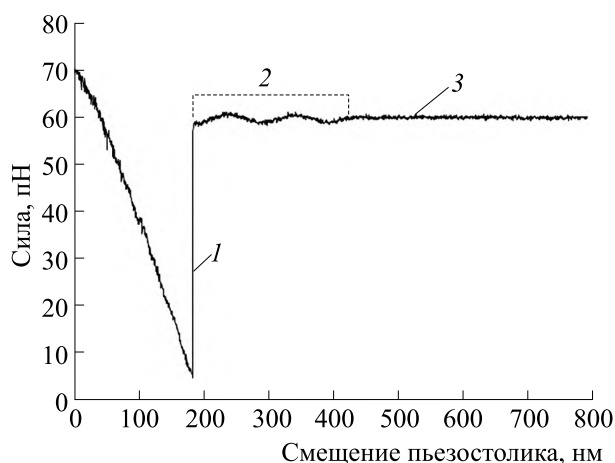


Рис. 1. Типичная силовая кривая отведения, описывающая взаимодействие ЛПС и МКАт2 методом оптического пинцета: 1 – отрыв, 2 – область проявления «тени», 3 – базисная линия.

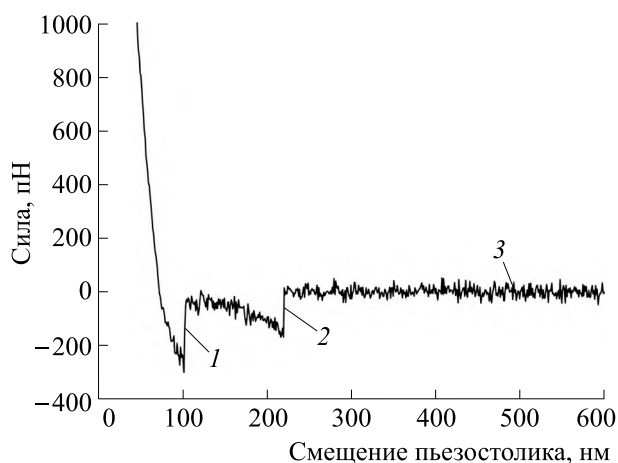


Рис. 2. Типичная силовая кривая отведения, описывающая взаимодействие ЛПС и МКАт2 методом АСМ: 1 – первый отрыв, 2 – последний отрыв, 3 – базисная линия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для адекватного сравнения силы отрыва, определяемой двумя вышеназванными методами, применяли идентичные объекты исследования – антиген и антитела. Был использован препарат ЛПС одной и той же серии, выделенный из культуры *Y. pseudotuberculosis 1b*, которую выращивали при пониженной температуре (10°C), способствующей продукции О-боковых цепей [5]. Второй компонент исследуемой пары – моноклональные антитела к О-боковым цепям ЛПС *Y. pseudotuberculosis 1b* (МКАт2) – также был одинаков для обоих методов. В качестве отрицательного контроля использовали моноклональные антитела к белковому эпитопу наружной мембраны, не взаимодействующие с ЛПС (МКАт7) [6].

В результате проведенного ранее определения силовых характеристик взаимодействия препарата ЛПС *Y. pseudotuberculosis* с комплементарными и гетерологичными моноклональными антителами методами ОП [1] и АСМ [2] было сделано однозначное заключение о наличии специфической составляющей в сложной многокомпонентной связи. Очевидным было также участие в изучаемом обоими методами взаимодействии неспецифических сил, отличных от взаимодействия «антиген – специфическое антитело».

Как видно из табл. 1, основными различиями между сравниваемыми вариантами проведения измерений методами ОП и АСМ являются скорость нагружения (loading rate), материал и диаметр зондов, способ сенсibilизации зондов препаратом ЛПС. Очевидно, этими причинами объясняется получение результатов, отличающихся качественными и количественными характеристиками. Так, резко различается форма регистри-

руемых хронограмм сигнала фотодетекторов двух приборов. Типичные силовые кривые сигнала, полученные методами ОП и АСМ, представлены на рис. 1 и 2 соответственно.

В случае применения метода ОП отрыв микросферы от стеклянной подложки в подавляющем большинстве случаев фиксируется в виде единственного и практически одномоментного (продолжительностью не более 3 мс, как правило – 1–2 мс) скачка сигнала с выходом на базисную линию. Для системы «ЛПС-10 – МКАт2» время с момента пересечения базисной линии силовой кривой отведения (начала нагружения связи) до разрыва связи составляло в среднем 900 мс, за которые пьезостоллик опускался на 120–150 нм.

При оценке методом АСМ силы связи в системе «ЛПС-10 – МКАт2» от начала нагружения связи до выхода силовой кривой на базисную линию при указанных выше условиях измерений проходит, в среднем, 200–300 мс. Регистрируемый сигнал имеет сложную форму и включает, как правило, более одного отрыва, программно выявляемого как однонаправленный относительно резкий подъем хронограммы сигнала до ближайшего изменения направления силовой кривой на противоположное. Длительность такого единичного отрыва составляла обычно 5–8 мс. Среднее число отрывов при выбранных нами условиях оценки шума было равным ~2.0.

Одним из возможных подходов к оценке обоими методами силы специфического взаимодействия «ЛПС – МКАт2» является определение силы разрыва связи, последней для АСМ и единственной, в подавляющем большинстве случаев, для ОП. Однако, как видно из данных табл. 2, абсолютные значения этого показателя не отражают действительную силу оцениваемого

Таблица 2. Сила связи ЛПС *Y. pseudotuberculosis* 1b с моноклональными антителами, измеренная методами ОП и АСМ

Сенситив стекла (ОП), слюды (АСМ)	Измеренная сила разрыва последней связи ($X_{\text{mean}} \pm 99\%CI$, нН)	
	ОП*	АСМ
МКАт2 (комплементарные ЛПС)	0.057 ± 0.012	0.240 ± 0.017
МКАт7 (гетерологичные)	0.035 ± 0.008	0.222 ± 0.017

Примечание. 95%CI – доверительный интервал для $p = 0.95$; * – Для большей наглядности сопоставления данных значения средней силы разрыва связи представлены с доверительным интервалом, а не стандартным отклонением, как в оригинальной работе [1].

специфического взаимодействия. Об этом свидетельствуют результаты определения двумя методами силы связи в системах «ЛПС – МКАт7», в которых нет специфического связывания.

По-видимому, относительно приемлемое представление о силе специфического взаимодействия могут дать значения разницы в силе разрываемой связи между системами на основе МКАт2 и МКАт7. Так, эти значения, полученные с помощью методов ОП и АСМ, оказались достаточно близкими и составили соответственно 22 и 18 нН (табл. 2). Однако едва ли и эти числа отражают реальную силу взаимодействия субъединицы ЛПС и молекулы МКАт2 хотя бы потому, что антитела [9] и тем более ЛПС [2, 10] могут присутствовать на поверхности сенсibiliзируемых субстратов в виде крупномолекулярных агрегатов. Регистрируемая сила указанной связи, измеренная для каждого из двух методов, может быть и выше и ниже приведенных в табл. 2 значений. Величина ее зависит от условий проведения эксперимента: особенностей свойств сенситинов, субстратов, методов функционализации, физико-химических характеристик среды, алгоритма измерений и обработки полученных результатов [11–13]. Вышеперечисленное определяет не только результирующую силу регистрируемых взаимодействий, но и взаимовлияние специфической и неспецифической составляющих сигнала хронограммы.

Совокупность представленных результатов позволяет предположить, что в модели оцениваемого двумя методами взаимодействия между комплементарными антителами и ЛПС на поверхности микросферы или иглы кантилевера формируются сложные множественные связи специфического и неспецифического характера. А наличие на хронограмме единичного скачка сигнала или малое количество регистрируемых отрывов может определяться тем, что разрыв первой связи вызывает перераспределение силы между оставшимися связями с резким повыше-

нием приложенной нагрузки и соответствующим сокращением длительности связей. Это приводит к быстрому разрыву оставшихся связей после разрыва первой, что объясняет регистрацию разрыва множественных связей как одно событие. Такое толкование экспериментальных данных предложено авторами работы [14] применительно к изучению методом АСМ взаимодействия частиц одного из риновирусов человека, иммобилизованных на игле кантилевера, с липопротеиновыми рецепторами плазматической мембраны на поверхности слюды. Несмотря на существенные различия между упомянутой модельной системой и использованной в настоящей работе, такое объяснение, по-видимому, применимо и для полученных нами данных, учитывая склонность ЛПС к агрегации и связанное с этим формирование множественных связей. Вполне вероятно, в большей мере это относится к результатам, полученным методом ОП, поскольку в данных экспериментах при каждом отведении мы регистрировали лишь один разрыв связи, длящийся 1–2 мс. При измерениях методом АСМ, как правило, фиксировали более одного разрыва связей, и каждый из них характеризовался большей длительностью по сравнению с методом ОП.

Следует отметить, что парциальный вклад неспецифических взаимодействий в суммарную картину сигнала хронограммы, в среднем, существенно превышает вклад специфических взаимодействий. Это наблюдение справедливо при оценке силы связи между ЛПС и МКАт2 как методом ОП [1], так и, в большей мере, методом АСМ [15]. По-видимому, регистрация собственно специфического отрыва этими методами практически невозможна, во всяком случае, для антигенов, склонных к агрегации. Тем не менее, минимизировать вклад неспецифической компоненты в оцениваемое взаимодействие можно, выбирая оптимальные для каждого конкретного эксперимента условия. Следует отметить, что при подведении «чистого» или сенсibiliзированного каким-либо антигеном зонда к поверхности

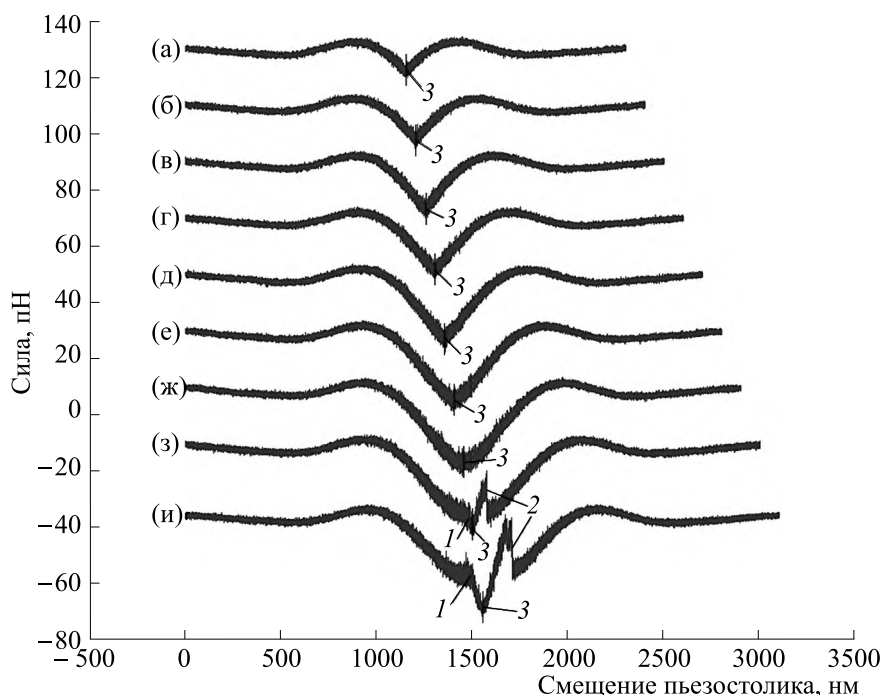


Рис. 3. Демонстрация эффекта «тени» на силовых кривых, полученных с использованием метода оптической ловушки: 1 – момент контакта двух несенсибилизированных полистирольных микросфер, 2 – разрыв связи, 3 – начало отведения. Объяснения в тексте.

субстрата неспецифический сигнал если и регистрируется методом АСМ до момента касания, то его выраженность минимальна [15]. Напротив, при использовании метода ОП подведение микросферы к исследуемому объекту достаточно большого размера вплоть до их соприкосновения сопровождается выраженным изменением сигнала фотодетектора. После разрыва связи, регистрируемого при отведении в виде скачка сигнала, визуализируется изменение сигнала в виде зеркального, симметричного относительно точки контакта микросферы и субстрата, отображения сигнала подведения-отведения. На рис. 1 эта зона сигнала отведения, зона эффекта «тени», помечена цифрой 2.

Более ярко и наглядно упомянутый выше эффект «тени» проявляется при приближении лазерной ловушки к объекту в горизонтальной плоскости. На рис. 3 приведены хронограммы сигнала подведения и отведения закрепленной на дне чашки микросферы диаметром 3 мкм к захваченной в ловушку микросфере диаметром 1 мкм с постоянной скоростью 100 нм/с. После каждого цикла подведения-отведения расстояние, пройденное пьезостолликом, увеличивали на 50 нм до контакта между микросферами (хронограммы (а)–(ж)) и после их взаимодействия в результате контакта (хронограммы (з), (и)). Как видно из данных рис. 3, выраженность феномена «тени»

растет при уменьшении расстояния между микросферами. Указанный эффект «тени» выявлен и теоретически обоснован в работе [16] при изучении методом ОП силы взаимодействия липополисахарида иерсиний с эукариотическими клетками. Степень его проявления зависит от размеров и показателя преломления взаимодействующих объектов; при их увеличении эффект «тени» усиливается. Однако, вклад этого неспецифического компонента в силу разрываемой связи, оцениваемую по амплитуде скачка сигнала, относительно невысок вследствие чрезвычайно низкой, фактически одномоментной длительности этого события. Помимо феномена «тени» основная неспецифическая составляющая взаимодействия, регистрируемого методом ОП, определяется, как и в методе АСМ, физико-химическими характеристиками сенситивов и материалов зонда (микросферы) и подложки, а также иными условиями проведения экспериментов.

Учитывая относительно невысокую по сравнению с ОП чувствительность АСМ, способной регистрировать силы разрываемой связи, как правило, превышающие 20 пН [17], область применения этих двух методов силовой спектроскопии может не совпадать. Они считаются взаимодополняемыми [18]. Вместе с тем оба метода применялись для оценки силы связывания в системах «антиген – антитело», причем сила такого

взаимодействия, оцениваемая методом АСМ, колеблется в пределах 50–900 пН, и разрыв такой связи происходит на расстоянии 25–300 нм, в том числе и за счет «растяжения» взаимодействующих молекул [19]. Сила разрываемой связи между микрообъектами, определяемая методом ОП, как правило, находится в пределах 0.1–100 пН [20]. Примеров сравнительной экспериментальной оценки двумя методами силы одного и того же межмолекулярного взаимодействия в литературе встречается мало. Так, приблизительно одинаковая (34–35 пН) сила связи между молекулами муцина Tn-PSM, проявляющего способность к агрегации, самосборке (self-associating mucin), достигалась при использовании различных значений скорости нагружения (loading rate) – 350 пН/с для ОП [21] и 640 пН/с для АСМ [22].

Оценивая силу связи в сравниваемых модельных системах – «сенсibilизированная ЛПС микросфера – МКАт на стекле» в случае ОП и «сенсibilизированный ЛПС кантилевер – МКАт на слюде» в случае АСМ, следует учитывать еще и другие особенности этих систем. Одна из них состоит в том, что площадь соприкосновения обоих сенситинов на твердых субстратах существенно различается. Так, даже если толщину слоя МКАт на поверхности того и другого субстрата принять равной ~5 нм [23] (по другим данным – 14.5 нм [24]), то площадь контакта «чистых», несенсibilизированных иглы кантилевера (радиус закругления ~10 нм) и микросферы (диаметр 1 мкм) с покрытыми МКАт субстратами по расчетам составляет 314 и 15700 нм² соответственно, если подведение столика завершилось соприкосновением минеральных поверхностей носителей сенситинов (слюды или стекла) с зондом (иглой кантилевера или микросферой). Вполне вероятно, что используемой мощности оптического пинцета недостаточно для преодоления слоя антител и непосредственного касания микросферы с минеральной подложкой. Однако площадь контакта иглы кантилевера со слоем антител на субстрате и при этом допущении должна быть явно меньше по сравнению с площадью контакта сенсibilизированной микросферы со слоем антител. В случае сенсibilизации зонда и микросфер препаратом ЛПС площадь соприкосновения функционализированных поверхностей в обоих случаях должна существенно увеличиться, о чем косвенно можно судить, например, по увеличению амплитуды и работы сил адгезии при атомно-силовом исследовании [15]. Несмотря на значительно большую площадь контакта между целевыми молекулами при измерениях методом ОП, регистрируемые методом АСМ значения си-

лы связи оказались существенно выше по сравнению с таковыми для ОП (табл. 2). Очевидно, основная причина такого расхождения состоит в различном удельном вкладе в оцениваемое взаимодействие, главным образом, неспецифической составляющей. Это считается одной из проблем практического применения АСМ в подобных исследованиях [3]. Вполне вероятно, указанное несовпадение результатов измерений объясняется использованием различной скорости нагружения связей, значимость которой в формировании интегрального сигнала фотодетектора выше по сравнению с влиянием площади контакта сенситинов и, по-видимому, другими факторами, определяющими отличительные особенности двух методов.

Существенное различие сравниваемых методов состоит также в способе механического контакта микросферы и иглы кантилевера с субстратами. В первом случае при подъеме пьезостолика и соответствующем выходе микросферы из фокуса лазерного луча после первичного соприкосновения не происходит ее смещения относительно поверхности функционализированного стекла. Напротив, вслед за первичным касанием функционализированной слюды иглой кантилевера последующее движение пьезостолика приводит к взаимному смещению/трению двух объектов. Так, согласно расчетам, при использованных нами условиях проведения измерений методом АСМ (тип кантилевера и угол его наклона, пройденное пьезостоликом расстояние от момента соприкосновения зонда с жестким субстратом до остановки) зонд «скользит» (скребет) по поверхности слюды, «проходя» около 24–36 нм. Едва ли это приводит к разрыву ковалентной связи «ЛПС – зонд» и «МКАт – слюда», поскольку полученные результаты свидетельствуют о наличии специфической связи между МКАт2 и ЛПС, определяемой методом АСМ (табл. 2). Однако пространственная структура молекул МКАт и особенно ЛПС, в большей мере склонного к агрегации, по названной причине может трансформироваться, приводя к изменению механизма и силы как специфического, так и неспецифического взаимодействия, которое можно было бы зарегистрировать в отсутствие «скольжения» зонда.

Значительное отличие сравниваемых вариантов анализа состоит в использовании нами в этих экспериментах физической, пассивной адгезии ЛПС на полистироловой микросфере для ОП и химической, ковалентной сшивки ЛПС с зондом из нитрида кремния для АСМ. Главным образом, именно такие методы иммобилизации целевых

биообъектов используются в аналогичных работах для двух сравниваемых методов. Целесообразность ковалентного связывания целевого антигена с материалом зонда кантилевера определяется в том числе и вышеуказанным «скреблением» зонда поверхности слюды после их соприкосновения, что при физической адсорбции сенситина может привести к разрыву его связи с материалом зонда и кардинальному изменению его свойств, приводящему, соответственно, к получению некорректных результатов. Ковалентное прикрепление обеспечивает надежную связь между биомолекулами и зондом, сила которой многократно превышает силу оцениваемой связи. Примером может служить исследование взаимодействия между химически связанным с зондом фибриногеном и стеклянной подложкой [25]. При измерении подобных взаимодействий методом ОП скорость нагружения, как правило, на 1–3 порядка ниже по сравнению с таковой в исследованиях методом АСМ. Наряду с другими факторами это делает необязательным ковалентное связывание антигена с поверхностью микросферы, так как для разрыва связи «антиген – антитело» требуются силы, как правило, не превышающие нескольких десятков пН и существенно меньшие по сравнению с силой связи сенситина с подложкой. Кроме того, физическая адсорбция, в отличие от химического связывания, не приводит к значительным изменениям нативной структуры сенситина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы ОП и АСМ, используемые для силовой спектроскопии взаимодействий микрообъектов, объединяет, в первую очередь, применение лазерного луча, который используется для передачи на фотодетектор местоположения зонда, а применительно к ОП и для захвата и манипулирования микрообъектом. Вместе с тем, рассмотренные выше особенности методов ОП и АСМ обуславливают получение существенно различающихся значений измеряемой силы связывания, в нашем случае – липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* с комплементарными моноклональными антителами. В отличие от метода АСМ, разрыв сложной связи между ЛПС и комплементарными антителами при использовании метода ОП регистрируется в виде единственного и кратковременного скачка сигнала фотодетектора. В случае АСМ в процессе подведения к кантилеверу пьезостоллика от момента касания до момента его остановки игла кантилевера скользит («скрежет») по поверхности субстрата, вызывая перераспре-

деление множественной связи между агломератом ЛПС и антителами; при использовании метода ОП существенного смещения микросферы по поверхности субстрата не происходит. Показано, что регистрируемые обоими методами силы связи являются величинами относительными и могут варьировать в широком диапазоне значений, в том числе в зависимости от условий и алгоритма осуществления экспериментов. При сравнении результатов, полученных двумя методами на выбранной модели, следует учитывать, что силы взаимодействия между компонентами системы включают специфическую и неспецифическую составляющие, соотношение которых для методов ОП и АСМ может быть различным. Тем не менее, при правильной оценке достоинств и ограничений, свойственных каждому из двух сравниваемых методов, они, безусловно, являются эффективными взаимодополняющими подходами и с успехом применяются для силовой спектроскопии взаимодействий нанообъектов биотической и абиотической природы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Konyshov I., Byvalov A., Ananchenko B., Fakhrullin R., Danilushkina A., and Dudina L. Force interactions between *Yersinia* lipopolysaccharides and monoclonal antibodies: An optical tweezers study. *J. Biomech.*, **99**, 109504 (2020). DOI: 10.1016/j.jbiomech.2019.109504
2. Ananchenko B., Belozherov V., Byvalov A., Konyshov I., Korzhavina A., and Dudina L. Evaluation of intermolecular forces between lipopolysaccharides and monoclonal antibodies using atomic force microscopy. *Int. J. Biol. Macromol.*, **156**, 841–850 (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.055
3. Neuman K. C. and Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat. Methods*, **5** (6), 491–505 (2008). DOI: 10.1038/nmeth.1218
4. Zhang Q., Li S., Yang Y., Shan Y., and Wang H. Studying structure and functions of cell membranes by single molecule biophysical techniques. *Biophys. Rep.*, **7** (5), 384–398 (2021). DOI: 10.52601/bpr.2021.210018

5. Skurnik M. Molecular genetics, biochemistry and biological role of *Yersinia* lipopolysaccharide. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **529**, 187–197 (2003).
6. Бывалов А. А., Кононенко В. Л. и Конышев И. В. Влияние О-боковых цепей липополисахарида на адгезивность *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774, установленное методом оптической ловушки. *Прикл. биохимия и микробиология*, **53** (2), 234–243 (2017).
7. Vashist S. K., Lam E., Hrapovic S., Male K. B., and Luong J. H. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chem. Rev.*, **114** (21), 11083–11130 (2014). DOI: 10.1021/cr5000943
8. Ebner A., Wildling L., and Gruber H. J. Functionalization of AFM tips and supports for molecular recognition force spectroscopy and recognition imaging. *Methods Mol. Biol.*, **1886**, 117–151 (2019). DOI: 10.1007/978-1-4939-8894-5_7
9. Gleńska-Olender J., Sęk S., Dworecki K., and Kaca W. A total internal reflection ellipsometry and atomic force microscopy study of interactions between *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides and antibodies. *Eur. Biophys J.*, **44** (5), 301–307 (2015). DOI: 10.1007/s00249-015-1022-0
10. Rodríguez C. and Hardy E. Lipopolysaccharide aggregates in native agarose gels detected by reversible negative staining with imidazole and zinc salts. *Anal. Biochem.*, **485**, 72–80 (2015). DOI: 10.1016/j.ab.2015.06.020
11. Zhou Z. L., Tang B., Ngan A. H., Dong Z. N., and Wu Y. S. Hepatitis B surface antigen-antibody interactions studied by optical tweezers. *IET Nanobiotechnol.*, **6** (1), 9–15 (2012). DOI: 10.1049/iet-nbt.2010.0023
12. Witt H. and Janshoff A. Using force spectroscopy to probe coiled-coil assembly and membrane fusion. *Methods Mol. Biol.*, **1860**, 145–159 (2019). DOI: 10.1007/978-1-4939-8760-3_8
13. Dorobantu L. S. and Gray M. R. Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning*, **32** (2), 74–96 (2010). DOI: 10.1002/sca.20177
14. Rankl C., Kienberger F., Wildling L., Wruss J., Gruber H. J., Blaas D., and Hinterdorfer P. Multiple receptors involved in human rhinovirus attachment to live cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105** (46), 17778–17783 (2008). DOI: 10.1073/pnas.0806451105
15. Бывалов А. А., Белозёров В. С., Ананченко Б. А. и Конышев И. В. Специфические и неспецифические взаимодействия липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* с моноклональными антителами, охарактеризованные методом атомно-силовой микроскопии. *Биофизика*, **67** (6), 1056–1067 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050023
16. Бывалов А. А., Кононенко В. Л. и Конышев И. В. Исследование взаимодействия липополисахаридов *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* с мембраной макрофага J774 методом силовой спектроскопии с использованием оптического пинцета. *Биол. мембраны*, **35** (2), 115–130 (2018). DOI: 10.7868/S0233475518020032
17. Formosa-Dague C., Castelain M., Martin-Yken H., Dunker K., Dague E., and Sletmoen M. The role of glycans in bacterial adhesion to mucosal surfaces: how can single-molecule techniques advance our understanding? *Microorganisms*, **6** (2), 39 (2018). DOI: 10.3390/microorganisms6020039
18. Elmahdy M. M., Drechsler A., Gutsche C., Synytska A., Uhlmann P., Kremer F., and Stamm M. Forces between blank surfaces as measured by the colloidal probe technique and by optical tweezers—a comparison. *Langmuir*, **25** (22), 12894–12898 (2009). DOI: 10.1021/la901804a
19. Arnal L., Longo G., Stupar P., Castez M. F., Cattelan N., Salvarezza R. C., Yantorno O. M., Kasas S., and Vela M. E. Localization of adhesins on the surface of a pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy. *Nanoscale*, **7** (41), 17563–17572 (2015). DOI: 10.1039/c5nr04644k
20. Zhang H. and Liu K. K. Optical tweezers for single cells. *J. R. Soc. Interface*, **5** (24), 671–690 (2008). DOI: 10.1098/rsif.2008.0052
21. Haugstad K. E., Hadjalirezai S., Stokke B. T., Brewer C. F., Gerken T. A., Burchell J., Picco G., and Sletmoen M. Interactions of mucins with the Tn or sialyl Tn cancer antigens including MUC1 are due to GalNAc-GalNAc interactions. *Glycobiology*, **26** (12), 1338–1350 (2016). DOI: 10.1093/glycob/cww065
22. Haugstad K. E., Gerken T. A., Stokke B. T., Dam T. K., Brewer C. F., and Sletmoen M. Enhanced self-association of mucins possessing the T and Tn carbohydrate cancer antigens at the single-molecule level. *Biomacromolecules*, **13** (5), 1400–1409 (2012). DOI: 10.1021/bm300135h
23. Chaves R. C., Teulon J. M., Odorico M., Parot P., Chen S. W., and Pellequer J. L. Conformational dynamics of individual antibodies using computational docking and AFM. *J. Mol. Recognit.*, **26** (11), 596–604 (2013). DOI: 10.1002/jmr.2310
24. Zhang Z., Orski S., Woys A. M., Yuan G., Zarraga I. E., Wagner N. J., and Liu Y. Adsorption of polysorbate 20 and proteins on hydrophobic polystyrene surfaces studied by neutron reflectometry. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **168**, 94–102 (2018). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.04.036
25. Tsapikouni T. S. and Missirlis Y. F. Measuring the force of single protein molecule detachment from surfaces with AFM. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **75** (1), 252–259 (2010). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.08.041

Comparative Evaluation of Interaction Force Characteristics for the Lipopolysaccharide of *Yersinia pseudotuberculosis* and Antibodies by Optical Trapping and Atomic Force Microscopy

A.A. Byvalov*, **, V.S. BelozeroV*, **, I.V. Konyshchev*, **, and B.A. Ananchenko*

*Vyatka State University, Moskovskaya ul. 36, Kirov, 610000 Russia

**Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomaiskaya ul. 50, Syktyvkar, Komi Republic, 167982 Russia

Optical tweezers and atomic force microscopy were used for comparative evaluation of the interaction force between the lipopolysaccharide of *Yersinia pseudotuberculosis* and monoclonal antibodies. This paper discusses the peculiarities of two methods which allow determining significant differences in the values of the measured force required to rupture the interaction of probe sensitized by lipopolysaccharide (polystyrene microsphere for optical tweezers and silicon nitride cantilever for atomic force microscopy) with substrate (glass and mica, respectively) covered with monoclonal antibodies. In atomic force microscopy, the cantilever slides along the substrate for some time after the piezo stage is brought to a stop, causing changes in the spatial structure of sensitins and, therefore, redistribution of multiple bonds between the lipopolysaccharide agglomerate and antibodies. No significant displacement of the microsphere along the substrate occurs when an optical tweezers setup is used, and, unlike atomic force microscopy, the breaking of a complex bond between lipopolysaccharide and complementary antibodies is recorded in the form of a single and short-term (1–2 ms) leap of the photodetector signal employing optical tweezers. The recorded values of the force required to rupture the interaction measured by both methods are relative and vary depending on the chosen experimental conditions. It is shown that the non-specific component of the force needed to break the interaction measured by atomic force microscopy is significantly higher than that determined with optical tweezers.

Keywords: optical tweezers, atomic force microscopy, lipopolysaccharide, monoclonal antibodies, interaction force

УДК 577.32; 577.342

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ РАЗНОСТНОЙ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ МЕМБРАННОГО БЕЛКА БАКТЕРИОРОДОПСИНА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ МИКРОВОЛНАМИ 8–18 ГГц

© 2024 г. Е.Л. Терпугов*,*, О.В. Дегтярева*, Е.Е. Фесенко*

*Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение ФИЦ
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: EL_Terpugov@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.07.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принята к публикации 04.09.2023 г.

Инфракрасная разностная спектроскопия с преобразованием Фурье была использована для изучения влияния миллиметрового электромагнитного излучения на структуру бактериородопсина в условиях освещения. Детальный анализ ИК-Фурье-спектров выявил выраженные структурные изменения в области амид I, амид II и перестройки сети водородных связей. Хорошо разрешенные пики амидных полос позволяют распознать два разных компонента (α -I и α -II) α -спиральной конформации опсина. Обнаруженные с помощью разностной ИК-Фурье-спектроскопии необратимые конформационные изменения бактериородопсина в пурпурных мембранах позволяют предположить, что микроволны индуцируют структурные перестройки белков, не связанные с температурой.

Ключевые слова: бактериородопсин, темновая/световая адаптация, оптическая спектроскопия, дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия, электромагнитные волны сверхвысокой частоты, биологический эффект.

DOI: 10.31857/S0006302924050048, EDN: MKPXBP

Бактериородопсин (БР) — мембранный белок, который был обнаружен в пурпурных мембранах бактерий *Halobacterium salinarum*, функционирует как активированная светом протонная помпа, эффективно переносящая протоны через мембрану и создающая электрохимический градиент протонов [1, 2]. БР имеет белковую часть в виде одной полипептидной цепи с 248 аминокислотными остатками и ретинальный хромофор, соединенный с белком через ϵ -аминогруппу Lys₂₁₆ через протонированное шиффово основание. Пространственная организация этого белка хорошо охарактеризована [3, 4]. Структура БР определена как преимущественно α -спиральная [5]. Трансмембранная часть БР сложена в семь антипараллельных регулярных α -спиралей, идущих от одного до другого края мембраны и образующих слегка наклоненный к ее плоскости пучок, а одинокая β -шпилька и все нерегулярные участки цепи, соединяющие спирали петли, выходят из пурпурных мембран. Вклад α -спиральных участков в

общей структуре составляет 52%, тогда как β -спиральная структура белка составляет 26%. В пурпурных мембранах БР сгруппирован по 3 молекулы, триады, которые имеют четкую гексагональную решетку. БР в мембране составляет по массе порядка 75%, а остальные 25% приходятся на липиды.

Биологическая функция БР основана на структурных изменениях белка, запускаемых поглощением света ретинальным хромофором [6, 7]. В темноте бактериородопсин содержит практически равновесную смесь продуктов БР₅₇₀ и БР₅₅₀ соответственно с *полностью-транс*- и *13-цис*-конфигурацией ретиналя, тогда как в светоадаптированном состоянии БР₅₇₀ содержит ретиналь исключительно с *полностью-транс*-геометрией. Относительно различий в конформации апобелка между двумя этими формами известно, что определенные изменения, вовлеченные во вторичную или третичную структуру апобелка, высоко локализованы в месте взаимодействия апобелка с ретиналем и искажение конформации

Сокращения: БР — бактериородопсин, ИК — инфракрасный, СВЧ — сверхвысококачественный.

в результате изомеризации не распространяется на весь апобелок.

Под действием света происходит изомеризация ретиналя, т.е. осуществляется переход из *13-цис-* в *полностью-транс-*состояние ретиналя, что инициирует цикл событий, которые приводят к переносу протона через плазматическую мембрану. Возникающий электрохимический градиент используется клеткой для синтеза АТФ, необходимого для поддержания жизнедеятельности галобактерий в условиях пониженного содержания кислорода. Фотохимия БР интенсивно изучалась в последние годы различными методами [8, 9]. Недавно было показано, что бактериородопсин обладает большой активностью не только в оптическом, но и в микроволновом диапазоне от 3 до 40 ГГц. В водной среде оба состояния БР (свето- и темноадаптированное) имеют максимум поглощения на частоте возле 8 и 25 ГГц [10]. Адсорбционные свойства БР в области микроволн представляют не только фундаментальный интерес, но также важны с точки зрения их практического применения.

В предыдущей работе мы исследовали влияние микроволнового излучения на структуру БР с использованием пленок пурпурных мембран в темноадаптированном состоянии (БР^T) [11]. Использование темноадаптированных пленочных образцов позволяло исключить влияние света и водной среды на конечный результат. В настоящей работе мы продолжили эти исследования на светоадаптированных образцах (БР^C) с использованием дифференциальной инфракрасной (ИК) Фурье-спектроскопии, одним из важных преимуществ которой перед статичной, или ИК-спектроскопией с временным разрешением, является ее способность получать информацию о молекулярных изменениях боковых аминокислотных групп (особенно карбоксильных групп и ароматических аминокислот), кофакторов (например, хромофоров и субстратов) и изменениях амидных мод в ходе белковых реакций или вызванных внешними воздействиями структурными и функциональными нарушениями. Измерения на пленочных образцах бактериородопсина в условиях световой адаптации должны обеспечить биологически более реалистичную картину взаимодействия микроволн с белком путем отслеживания изменений в хромофорном ретинале и белковых компонентах в амидной I и II и других областях спектра, важных для оценки изменений во вторичной структуре. Взаимодействие белка с внешним электрическим полем может изменить его структуру и динамическое поведение, что потенциально может повлиять на биологическую функцию белка и вызвать неопределенные последствия для здоровья. Это может иметь решающее значение для изучения возможностей потен-

циальных применений эффектов, индуцированных электромагнитным излучением, в белковой инженерии и медицине [12, 13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образца. Пурпурные мембраны были выделены из бактерий *Halobacterium salinarum* ET-1001 стандартно, как описано ранее [14]. Осадок пурпурных мембран после отмывки ресуспендировали в дистиллированной воде без добавления буфера (pH 6.6) до концентрации 10 мг/мл. Далее аликвоту 5 мкл суспензии пурпурных мембран высаживали на CaF₂-пластину, которую использовали в качестве подложки. Образец медленно высушивали на воздухе при комнатной температуре. Измерения проводили на образцах с $OD_{568} = \sim 0.6-0.9$ и относительной влажностью $\sim 30\%$ согласно работе [15].

Сверхвысокочастотная аппаратура. Сверхвысокочастотный (СВЧ) генератор модели Г4-195 (Россия), который использовался в настоящем исследовании, имел возможность регулирования частоты в пределах 8–18 ГГц в режиме медленной или быстрой перестройки частоты. Генератор Г4-195 – это автоматически управляемый резонатор с регулируемой частотой, обеспечивающий однородность распределения энергии в многомодовом микроволновом резонаторе. Принципиальная схема настройки СВЧ-генератора детально описана ранее в работе [11]. В качестве средства вывода СВЧ-излучения с генератора использовали коаксиальный кабель с антенной, которая была установлена на расстоянии 5 см от образца в кюветном отделении спектрометра. Излучение было направлено на образец под углом 15 градусов к нормали плоскости образца. Выходная мощность на излучателе составляла 10 мВт/см², что соответствовало рекомендуемому нормативному пределу общего воздействия на человека. Время экспозиции составляло 40 мин.

Учитывая, что БР обладает микроволновой активностью в диапазоне от 3 до 40 ГГц [9], мы использовали весь диапазон устройства 8–18 ГГц в режиме быстрой перестройки частоты, при которой смена частоты происходила за период 1 с.

Спектральные измерения ИК-Фурье-техникой и в УФ-видимой области. Дифференциальные ИК-Фурье-спектры поглощения записывали на двухлучевом двухканальном ИК-Фурье-спектрометре ФС-02 с использованием охлаждаемых жидким азотом низкотемпературных МСТ-приемников, германиевым окошком на криостате. Детально прибор описан ранее в работе [16]. Каждый спектр записывали с накоплением 400 сканов и разрешением 4 см⁻¹. Дифференциальные изменения получали посредством вычитания из спектра, записанного при включенном генераторе,

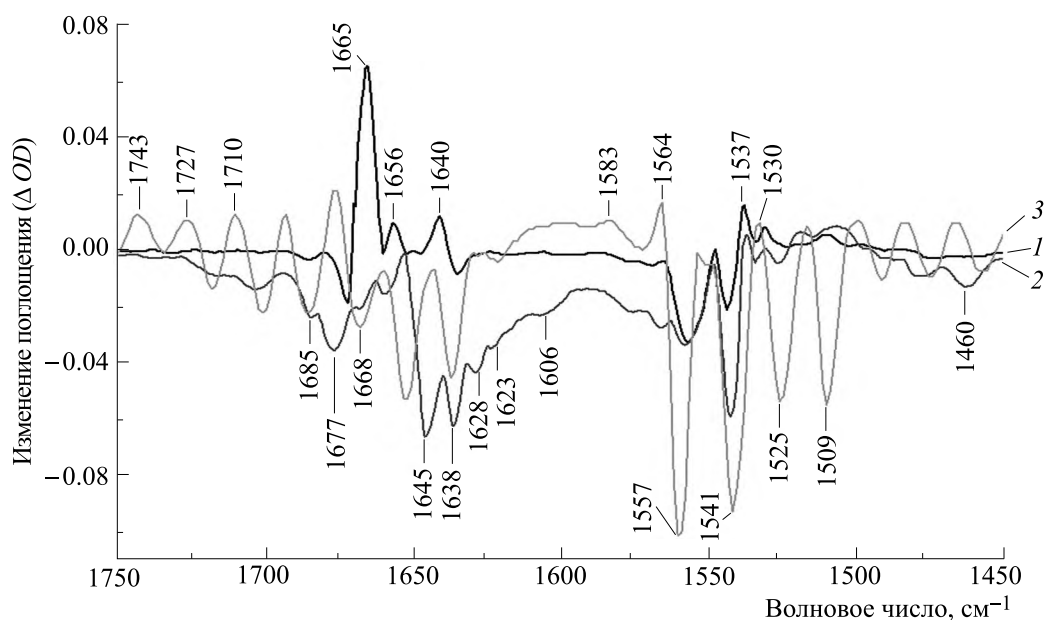


Рис. 1. Разностный (облученный микроволнами минус необлученный) ИК-Фурье-спектр БР^С в области 1750–1450 см⁻¹. Облучение проводили электромагнитной радиацией миллиметрового диапазона (8–18 ГГц, 10 мВт/см²) в режиме быстрой перестройки частоты: кривая 1 – однократное облучение, кривая 2 – двукратное облучение, кривая 3 – трехкратное облучение. Запись спектра проводили при непрерывном облучении одновременно микроволнами и видимым светом ($\lambda > 500$ нм, 160 мВт).

спектра, записанного при выключенном генераторе. В обоих случаях в течение записи спектра образец БР освещался непрерывным светом ($\lambda > 500$ нм, 160 мВт). Для каждой записи использовали свежий образец. Первоначально записывали спектр светоадаптированного образца, затем запись спектра проводили одновременно освещая образец светом и микроволнами 8–18 ГГц. После записи спектров облученные образцы БР помещали в темноту и выдерживали в течение 24 ч при комнатной температуре.

Спектрофотометрические измерения в УФ-видимой области были выполнены на спектрофотометре Spеcord UV/VIS M-40 (Германия) на облученных образцах БР после длительного (в течение нескольких месяцев) хранения их в темноте при комнатной температуре и атмосферном давлении. В этом случае для приготовления пленок из пурпурных мембран в качестве подложки использовали кварцевые стекла. Измерения проводили на темно- и светоадаптированных пленках БР ($OD \sim 0.6$).

Все измерения проводили при комнатной температуре и атмосферном давлении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлен дифференциальный ИК-Фурье-спектр между облученным и необлученным светоадаптированным образцом БР (БР^С) в спектральной области 1750–1450 см⁻¹,

который демонстрирует наличие ряда полос, разбросанных по всей амидной области 1700–1500 см⁻¹. Эти амидные полосы разностного спектра обусловлены белковым остовом, претерпевшим изменения в течение облучения. Как видно, спектр содержит относительно небольшой набор полос, локализованных в диапазонах между 1700 и 1650 см⁻¹ и от 1640 до 1500 см⁻¹, где наиболее сильные полосы выявлены на частотах 1665 и 1557 см⁻¹, являющихся типичными для полос поглощения амид I и II соответственно. Эти полосы характеризуют α -спиральную конформацию апобелка. Полоса амид I обусловлена в основном валентными С=О- и С–N-колебаниями, а основной вклад в интенсивность и частоту полосы амида II вносят валентные С–N-колебания в сочетании с плоскостными деформационными N–H-колебаниями пептидных групп [17]. Как хорошо известно, эти две главные белковые полосы проявляют чувствительность к отдельным элементам вторичной белковой структуры, характеру водородных связей, спираль-спиральным взаимодействиям и геометрической ориентации в α -спиралях БР [18]. Специфическая форма и положение амидных полос коррелируют со специфической вторичной структурой. В нативном белке БР α -спиральная конформация апобелка характеризуется присутствием в спектре ИК-поглощения основной полосы амид I около 1665 см⁻¹ с плечами около 1680 и 1642 см⁻¹ и

дополнительными полосами субкомпонентов, которые выявляются методами с высоким спектральным разрешением. Смещение главной белковой полосы на $10\text{--}12\text{ см}^{-1}$ в высокочастотную область по сравнению с полосой нормальной α -спирали объясняется тем, что α -спираль в тримере БР имеет α_{II} -, а не α_I -конформацию. В качестве одной из возможных причин конформационного различия между α_{II} - и α_I -формами полагают наличие разницы в двугранных углах. Согласно теоретическим расчетам, приведенным в работе [5], α_{II} -спиральная структура имеет двугранные углы (ϕ и ψ), отличные от углов α_I -спиральной конформации, за счет чего в α_{II} -спиральной структуре длина Н-связи ($\text{C}=\text{O}\dots\text{H}-\text{N}-\text{H}$) немного больше, чем в α_I -структуре, что приводит к увеличению константы связи и, соответственно, к увеличению частоты валентных колебаний в α_{II} -форме. Другой возможной причиной может быть характер спираль-спиральных взаимодействий [18]. Однако точная причина существующих различий до сих пор неизвестна.

Детальный анализ спектра показал, что в области между 1700 и 1600 см^{-1} присутствуют две разные по интенсивности положительные полосы при 1665 и 1656 см^{-1} , которые по своему положению позволяют распознать две различные компоненты ($\alpha\text{-I}$ и $\alpha\text{-II}$) α -спиральной конформации апобелка соответственно. Появление слабой полосы при 1656 см^{-1} может происходить от того, что исходная α -спиральная конформация апобелка БР уже включает в себя обе эти формы [19]. С другой стороны, появление α_I -формы могло быть результатом воздействия СВЧ-поля и производимого им теплового эффекта, который мог термически дестабилизировать белок, вызвав небольшие изменения двугранного угла или изменения водородных связей пептидных групп, что обусловило частично конформационный переход от $\alpha\text{-II}$ - к $\alpha\text{-I}$ -форме. Ранее подобное явление наблюдалось в БР при внешнем воздействии высокой температурой (с помощью общего нагрева, высокого давления или импульсного лазерного возбуждения) [20–23]. Одновременно с этим в светоадаптированном образце БР наблюдали присутствие формы с *13-цис*-конформацией ретиналя, что авторы интерпретировали исходя из известных представлений о том, что нагрев способствует увеличению скорости темновой адаптации и увеличению равновесной концентрации *13-цис*-изомера за счет *полностью-транс*-изомера ретиналя. При высоком давлении каталитический эффект авторы также связывали с возникновением некоего промежуточного и/или протонированного состояния группы, близкой к ретиналю, что конформационно могло дестаби-

лизировать опсин и оказать влияние на стабилизацию заряда вблизи шиффога основания, а также на геометрию связей в хромофорном ретинале [22].

В данном случае при микроволновом облучении в спектре светоадаптированного БР (рис. 1, спектр 1) наблюдали дуплет моды $\text{C}=\text{C}$ при 1536 и 1529 см^{-1} , обусловленный $\text{C}=\text{C}$ -валентными колебаниями хромофорного ретиналя *полностью-транс*- и *13-цис*-конформации ретиналя соответственно. В области локализации амида I помимо главной полосы выявлены другие полосы, например, довольно слабая полоса при $1686(-)\text{ см}^{-1}$ и средней интенсивности полоса при $1672(-)\text{ см}^{-1}$, а также пара полос $1634(-)/1640(+)\text{ см}^{-1}$, которые отнесены к субкомпонентам белковой структуры (к элементам с неупорядоченной и *бета*-структурой) [24, 25]. Примечательно, что последние две полосы могли быть изменены за счет вклада валентных $\text{C}=\text{N}$ -колебаний протонированного/депротонированного шиффога основания соответственно. В области амид II ($1600\text{--}1500\text{ см}^{-1}$) спектр демонстрирует присутствие двух интенсивных отрицательных полос при 1557 и 1541 см^{-1} , вклад в который могут вносить как валентные $\text{N}-\text{H}$ -колебания белка (амид II) с α_I - и α_{II} -спиральной структурой соответственно, так и $\text{C}=\text{C}$ -валентные колебания полиеновой цепи хромофорного ретиналя.

Таким образом, очевидно, что в индуцированный СВЧ-полем эффект вовлечены как ретиналь, так и опсин. В данной работе подобные изменения в БР наблюдали в случае использования режима быстрой (в течение 1 с), но не медленной (более 1 с) перестройки частоты (данные не приведены). Учитывая, что БР характеризуется высокой термоустойчивостью, разумно было предположить, что наблюдаемая реакция, производимая действием СВЧ, обратима и в отсутствие внешних стимулов в результате терморелаксации белок может вернуться в исходное состояние БР с восстановленной структурой. Для того, чтобы в этом убедиться, мы повторили эксперимент с тем же самым образцом, предварительно поместив его на 24 ч в темноту. Против ожидания, образец не вернулся к своей первоначальной форме. Это могло быть результатом сильно замедленной термальной релаксации измененной структуры либо результатом структурной трансформации с появлением неправильной квазистабильной структуры БР.

Детальное сравнение разностных спектров исходного БР^C и после повторного облучения, представленных на рис. 1 (спектры 1 и 2), показало расхождения между ними по числу и положению выявляемых пиков, форме, относительной

полуширине и амплитуде спектральных полос. Примечательно отметить появление в высокочастотной области в спектре повторно облучаемого БР^С (рис. 1, спектр 2) широкой полосы выше 1710 см^{-1} , где локализованы колебания СООН-групп боковых аминокислотных остатков, скрытых во внутреннем пространстве белка [26, 27]. Со стороны основных полос амида I наблюдали сложные спектральные изменения, включающие перераспределение интенсивности, изменение формы и небольшие ($\sim 2\text{--}3\text{ см}^{-1}$) сдвиги их максимумов в высокочастотную область. При этом отмечено изменение (возрастание) интенсивности полос при $1685(-)$ и $1677(-)\text{ см}^{-1}$, а также полосы при $1638(-)\text{ см}^{-1}$ и полос в области между 1650 и 1600 см^{-1} , где вместо практически гладкой полосы появилась положительная широкая полоса со множеством пиков при $1628(+)$, $1623(+)$ и $1606(+)\text{ см}^{-1}$, представляющих в основном валентные С=О-колебания в пептидных группах субкомпонентов белка [24, 28]. В области амида II также отмечено возрастание сигнала на частотах 1575 , 1561 и 1541 см^{-1} .

Таким образом, повторное воздействие СВЧ-полем изменило паттерн первоначально наблюдаемых спектральных изменений, что указывает на более сложную конформационную динамику с участием как основной цепи, так и различных субкомпонентов белка, таких элементов, как β -сшивки и нерегулярные части белковой структуры, как результат масштабной перегруппировки водородных связей внутри белка. Чтобы наблюдать за развитием конформационной динамики, мы повторили эксперимент по предыдущей схеме. В результате было установлено, что дополнительное воздействие СВЧ-полем не вызвало денатурации белка и диссоциации ретиналя (пурпурный цвет мембран не изменился). В то же время разностный спектр, записанный в этом случае (рис. 1, спектр 3) продемонстрировал дополнительные, еще более сложные изменения. В частности, в высокочастотной области выше 1700 см^{-1} появились новые пики при $1743(+)\text{ см}^{-1}$ и $1727(+)/1718(-)\text{ см}^{-1}$, которые отнесены к колебаниям СООН-групп боковых аминокислотных остатков, находящихся в непосредственной близости к ретиналю [29]. В области амида I у полосы α_1 -амид I при 1657 см^{-1} произошел сдвиг в низкочастотную область в сторону 1652 см^{-1} . В области между 1650 и 1560 см^{-1} изменились форма полос и знак их амплитуды. Со стороны полос амида II наблюдали резкое увеличение интенсивности при 1557 и 1541 см^{-1} , тогда как частота их колебаний не изменилась, что совсем не удивительно, поскольку хорошо известно, что частота колеба-

ний амида II в α -спиралях, которые представляют собой комбинацию валентных С–N- и деформационных N–H-колебаний в плоскости, проявляет особую чувствительность к состоянию протонирования пептидной единицы, а не вторичной структуры [30]. В то же время водородная связь и внутрицепочечная конфигурация пептидных групп могут существенно влиять на интенсивность колебательной моды амида II в пептидных цепях, что показано в теоретическом исследовании [31]. Таким образом, наблюдаемые в этом случае спектральные изменения подтвердили эффект влияния микроволн на вторичную структуру БР^С в плазматических мембранах и необратимый характер происходящих изменений, что коррелирует с данными других авторов, свидетельствующих о влиянии микроволнового излучения как на конформацию отдельных глобулярных белков [32, 33], так и сложных систем, включая клеточные мембраны (см., например, работу [34]). Поскольку в облученных образцах БР наблюдалась большая структурная неоднородность белка опсина, интересно было попытаться спектрально оценить влияние СВЧ-поля на движение альфа-спиралей и динамику конформационных изменений. Для сравнения мы использовали величину интенсивности полос, принадлежащих α_1 -спиральной структуре α_1 - и α_{II} -форм из разложенных спектров, как это показано на рис. 2.

На рис. 2 представлено разложение сложного профиля амидных полос на гауссовы компоненты. Мы оценили конформационную динамику по соотношению интенсивностей полос амида I α_1 - и α_{II} -форм в разностных спектрах.

На рис. 3 показана гистограмма изменения величины соотношения высот амплитуд полос с α -I- и α -II-спиральной структурой при увеличении длительности микроволнового облучения путем повторения записи с перерывом на хранение в темноте в течение суток. Численные значения соотношения интенсивностей двух спектральных компонент (I_{1668}/I_{1656}) получены на основе разложения сложного профиля полос амида I на спектральные компоненты 1668 и 1656 см^{-1} при одно-, двух- и трехкратном облучении. Как видно, по мере увеличения длительности воздействия соотношение интенсивностей полос при 1668 и 1656 см^{-1} менялось соответственно от 1.690 ± 0.175 и 1.280 ± 0.276 до значения 0.4900 ± 0.0954 , что четко свидетельствует о структурных перестройках внутри белкового остова, сопровождающихся, в том числе, изменением альфа-спиральной конфигурации регулярных α -спиралей внутри мембраны и переходом от α -II- к α -I-типу. Очевидно, что трансформация вторичной структуры в присутствии СВЧ, и светового поля включает более глобальные

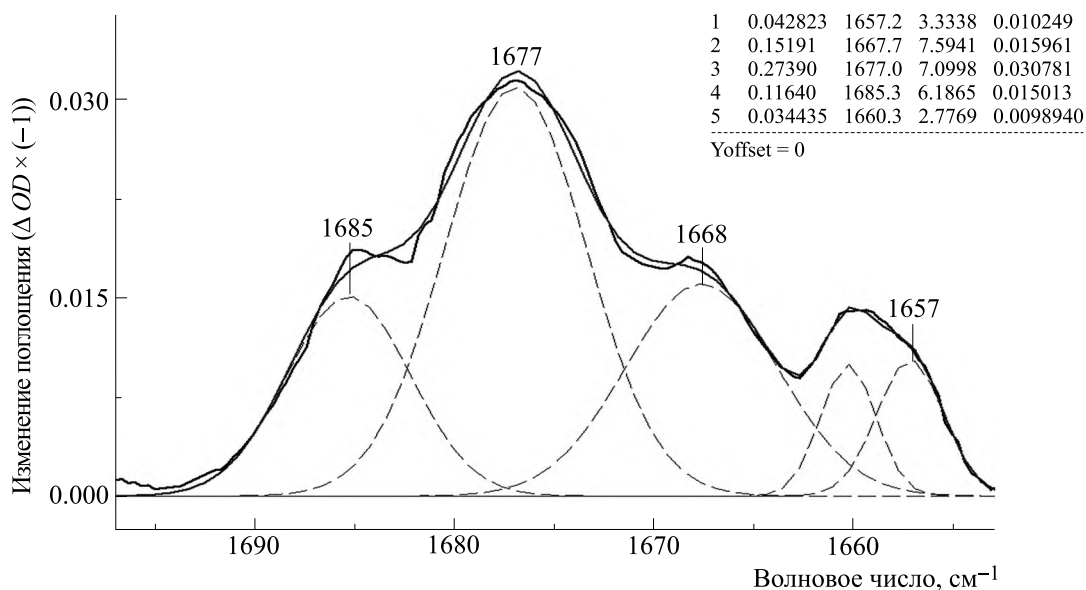


Рис. 2. Разложение разностного спектра БР из рис. 1 в области 1670–1650 cm^{-1} . Спектр оптимально аппроксимирован гауссовыми полосами индивидуальных компонентов амида I. По оси ординат – амплитуда изменения поглощения ΔD (умножено на -1).

структурные изменения по сравнению с теми, что наблюдаются в ходе световой и тепловой реакции нативного белка в пурпурных мембранах. Обнаруженные в данном эксперименте изменения на уровне конформации белка имели необратимый характер. Примечательно отметить, что БР с образовавшейся, вероятно, неправильной квазиустойчивой структурой в отсутствие каких-либо внешних стимулов мог пребывать в таком состоянии неопределенно долго. В этом мы смогли убе-

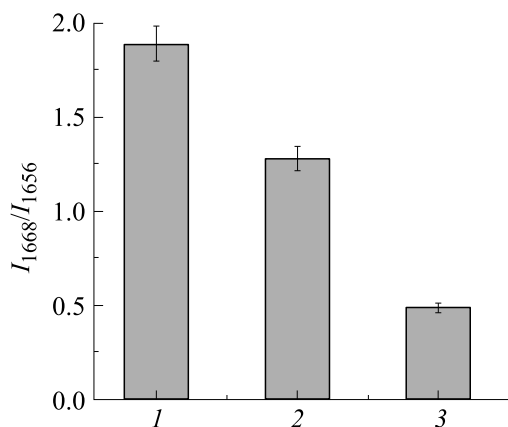


Рис. 3. Гистограмма динамики конформационного перехода от конформера II к конформеру I альфа-спиральной цепи БР по изменению соотношения амплитуды (I_{1668}/I_{1656}) полос амида I по деконволюционным разностным спектрам ИК-поглощения из рис. 1. Точки данных представляют собой средние значения как минимум двух выборок $\pm SE$.

даться, записав спектры поглощения образца БР спустя несколько месяцев после облучения.

На рис. 4 представлены спектры поглощения темноадаптированного (спектр 1) и светоадаптированного (спектр 2) образца БР спустя несколько месяцев после облучения. Спектры, представленные на рис. 4, полностью очищены от рэлеевского рассеяния. Спектры поглощения облученного темно- и светоадаптированного БР демонстрируют максимумы возле 560 и 566 нм соответственно, которые по положению не совпадают с теми, что наблюдали в спектрах поглощения нативного БР ($\lambda_{\text{max}}^{\text{БР}^T} = 550$ нм и $\lambda_{\text{max}}^{\text{БР}^C} = 570$ нм). Кроме того, было отмечено обратимое увеличение в темноте поглощения облученного образца и наличие неизвестных продуктов.

Данные спектры поглощения темно- и светоадаптированного образцов могли быть удовлетворительно аппроксимированы гауссовыми кривыми. Первоначально спектр БР^T включал только две гауссовы компоненты с положением максимума возле 537.00 ± 1.86 нм и 581.0 ± 0.8 нм. Спектр БР^C (рис. 4, спектр 2) включал минимальный состав, состоящий из трех компонент – основных гауссовых компонент с максимумами при 537.0 ± 1.5 нм и 581.84 ± 1.30 нм и третьей, самой слабой гауссовой компоненты, которая имела максимум при 417.0 ± 2.3 нм. По своему положению компонента с максимумом при 417.0 ± 2.3 нм более всего соответствовал высокому уровню возбуждения ретинального хромофора (β -полоса) и/или дополнительному, близкому к M_{412}

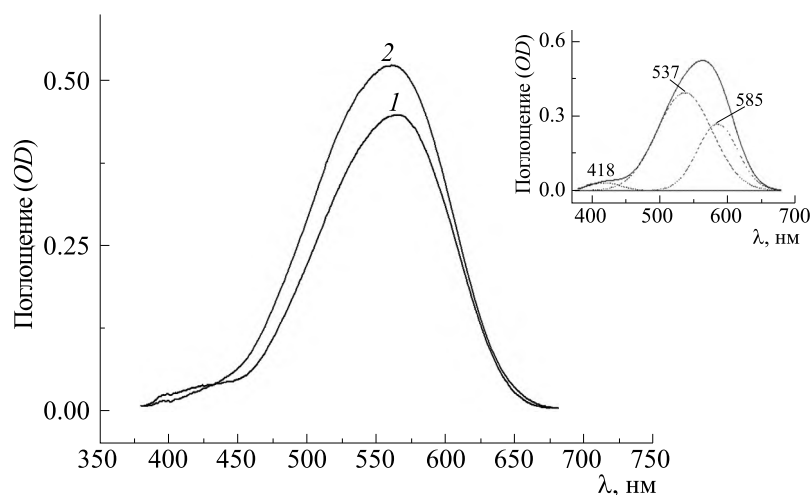


Рис. 4. Спектры оптического поглощения облученного БР в условиях темновой и световой адаптации: 1 – спектр темноадаптированного БР, записан после длительного (в течение нескольких месяцев) хранения после облучения микроволнами (8–18 ГГц, 10 мВт/см²); 2 – спектр светоадаптированного образца записан сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин). Спектры полностью очищены от рэлеевского рассеяния. На врезке: разложение спектра 2 оптимально подходящими гауссовыми полосами отдельных компонентов.

фотопродукту. Спектральная компонента с максимумом поглощения возле 537 нм могла быть близка к L_{537} -форме [35], однако спектральная компонента с максимумом поглощения 581 нм не соответствовала ни одному из пяти идентифицированных в фотоцикле продуктов, представляющих собой спектрально-различные виды (К, L, M, N и О) [6].

Освещение пленок пурпурных мембран привело не только к смещению главного максимума от 566 к 560 нм, но и к смещению равновесия в сторону увеличения поглощения возле 581 нм. В темноадаптированном состоянии облученного БР содержание продукта BR_{537} в равновесной смеси превышало более, чем в 2 раза содержание продукта BR_{581} ($I_{537}/I_{581} = 2.14 \pm 0.09$). Освещение облученного БР непрерывным светом в течение 15 мин приводило к изменению равновесия в сторону увеличения поглощения BR_{581} ($I_{537}/I_{581} = 1.65 \pm 0.14$) и появлению нового продукта – BR_{417} . Изменение в соотношении компонент и компонентном составе фотопродуктов в облученном БР демонстрирует наличие фотореакции.

Разностный спектр облученного микроволнами БР между свето- и темноадаптированным образцами демонстрировал глубокий отрицательный минимум при $\lambda = 532$ нм и слабый положительный максимум при 410 ± 2 нм (рис. 5, спектр 1), тогда как в разностном спектре нативного БР основной положительный максимум между свето- и темноадаптированным образцом находится возле 590 нм (см., например, работу [36]).

Кроме того, нами было замечено, что увеличение длительности фотовозбуждения путем чередования световой и темновой адаптации не оказывало практически никакого влияния на соотношение компонент I_{537}/I_{581} в составе BR^T и BR^C . В то же время дополнительное освещение приводило к сдвигу максимума (на ~ 2 нм) в синюю область в спектрах поглощения BR^T и BR^C и появлению дополнительной структуры в разностном спектре в области 580–650 (рис. 5, спектры 3 и 4), что указывает на возможное существование фотореакций, связанных с относительно небольшими изменениями оптической плотности. Рис. 5 наглядно иллюстрирует динамику фотореакции БР при увеличении длительности фотовозбуждения. При повторном действии световой подсветки в разностном спектре облученного БР каждый раз отмечали сокращение глубины и полуширины основного минимума, его сдвиг в сторону более коротких волн от 532 к 509 нм, а также появление положительного максимума около 600 нм в спектрах (рис. 5, спектры 3 и 4), что отражает локальные изменения в окружении ретинального хромофора, диэлектрической константе, кинетических характеристиках измененного белка, фотопродуктах и их составе. Также это наблюдение показывает, что сформировавшаяся в результате облучения неправильная структура неустойчива в присутствии внешнего светового поля, которое способно повлиять на фотореакцию белка.

Описанные выше результаты, получены на пленках пурпурных мембран с ограниченным содержанием воды. В этих условиях белок БР, не будучи экспонирован в водной среде, не испытывает с ее стороны нагрева посредством термического

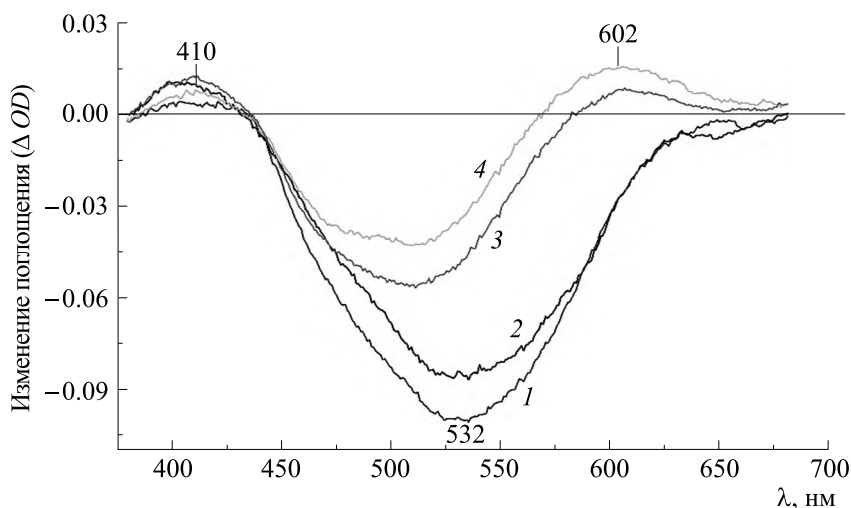


Рис. 5. Фотоиндуцированные изменения оптического поглощения бактериородопсина после длительного хранения после облучения микроволнами (8–18 ГГц, 10 мВт/см²). Разностный спектр (свет минус темнота): 1 — спектр записан сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин); 2 — образец выдержан в течение ночи в темноте после записи спектра 1 и спектр записан сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин); 3 — образец выдержан в течение ночи в темноте после записи спектра 2, запись спектра произведена сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин); 4 — образец выдержан в течение ночи в темноте после записи спектра 3 и спектр записан сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин).

обмена с раствором, который сильно поглощает микроволновое излучение. Показано, что облучение пленок пурпурных мембран электромагнитным излучением сверхвысокой частоты в режиме быстрой перестройки частоты малой мощности вызывает структурные перестройки как внутри хромофорного центра, так и в самом белковом остове за счет разворачивания спиралей и перехода α_{II} - к α_I -форме α -спиральной структуры и появления некоего вида β -структур. Это привело нас к заключению о том, что возможный нагрев образца под воздействием микроволн производит эффект на вторичную структуру БР, который не является тем же самым, что при общем прогреве образца или нагреве, вызванном лазерным излучением или высоким давлением. Структурная трансформация, индуцированная действием СВЧ-поля, приводит к образованию неправильной конфигурации спиралей, вследствие чего затруднена температурная и структурная релаксация апобелка. В настоящее время у нас нет четкого понимания, почему при некотором сходстве действие микроволнового облучения на БР отличается от действия тепла, вызванного общим нагревом.

Между тем, в литературе появляется все больше свидетельств, что микроволновое излучение может влиять на конформацию белков [32, 38–40] за счет проявления не теплового, а атермического действия микроволн, механизм которого менее всего изучен и не имеет однозначного объяснения [32, 37–39]. Механизмы, участвующие в предполагаемых нетепловых эффектах, непосредственно не связаны с изменением тепла, а

скорее связывают с различными типами структурных преобразований. Недавно в работе [41] заявлено о специфическом микроволновом эффекте, выявленном на зеленом флуоресцентном белке, который авторы связывают с атермическим эффектом, обусловленным поглощением микроволн молекулами связанной воды, присутствующими в структуре белка, как внутри (ряд молекул воды тянется от хромофора к глобуле), так и на поверхности (слой связанной воды присоединен к поверхности белковой глобулы). Как хорошо известно, поглощение связанной воды лежит в диапазоне 1–15 ГГц [42], в который также попадают частоты 8–18 ГГц, используемые в нашем исследовании. Мы полагаем, что и в нашем случае не последнюю роль могло также сыграть взаимодействие микроволн с молекулами связанной воды, которые содержатся внутри протон-переносящего канала в БР [43] и на поверхности белка опсина. Электрическое поле посредством взаимодействия с различными заряженными, полярными и поляризуемыми группами, включая молекулы связанной воды, способно повлиять на распределение заряда в структуре БР и/или прочность водородных связей в сети, соединяющей молекулы воды с белковой глобулой внутри протон-переносящего канала. Как результат, происходит трансформация основной цепи, перераспределение водородных связей и образование неправильной структуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия пленочных образцов БР в пурпурных мембранах, облучаемых микроволнами 8–18 ГГц продемонстрировала в режиме реального времени чувствительность его вторичной структуры как со стороны C=O- и N–H-мод пептидных групп, так и молекулярных групп в окружении ретиналя. Показано, что индуцированные воздействием микроволн структурные перестройки как внутри хромофорного центра, так и в самом белковом остове были необратимыми в рассматриваемом периоде. Это подтверждается тем, что в результате облучения в белке произошли частичная трансформация конфигурации основной цепи от II к I типу, изменение структуры водородных связей с перераспределением заряда в окружении ретиналя. Облученный белок с неправильной структурой демонстрировал наличие равновесной смеси продуктов, их фотоактивность, динамическую реакцию на фотовозбуждение, однако пока не известно, был ли БР способен качать протоны и вернуться в состояние с нативной структурой. Во всяком случае, этот загадочный результат требует своего дальнейшего изучения.

Мы также полагаем, что способность микроволн изменять структуру сети водородных связей может стать многообещающим инструментом для дальнейших фундаментальных исследований и будущих приложений в биотехнологии и медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (<http://www.ckp-rf.ru/ckp/670266/>). Авторы выражают свою благодарность за помощь в работе сотрудникам ЦКП Н.К. Призовой и Л. М. Хайбулаевой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lozier R. H., Bogomolni R. A., and Stoerkenius W. Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*. *Biophys J.*, **15** (9), 955–962 (1975). DOI: 10.1016/S0006-3495(75)85875-9
- Ernst O. P., Lodowski D. T., Elstner M., Hegemann P., Brown L. S., and Kandori H. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem. Rev.*, **114** (1), 126–163 (2014). DOI: 10.1021/cr4003769
- Fahmy K. and Sakmar T. P., Interdisciplinary biophysical studies of membrane proteins bacteriorhodopsin and rhodopsin. *Biophys. Rev.*, **15**, 111 (2023). DOI: 10.1007/s12551-022-01003-y
- Henderson R., Baldwin J. M., Ceska T. A., Zemlin F., Beckmann E., and Downing K. H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.*, **213** (14), 899–929 (1990). DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80271-2
- Krimm S. and Dwivedi A. M. Infrared spectrum of the purple membrane: clue to a proton conduction mechanism? *Science*, **216** (4544), 407–408 (1982). DOI: 10.1126/science.6280277
- Mathies R. A., Lin S. W., Ames J. B., and Pollard W. T. From femtoseconds to biology: mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **20**, 491–518 (1991). DOI: 10.1146/annurev.bb.20.060191.002423
- Birge R. R. Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1016** (3), 293–327 (1990). DOI: 10.1016/0005-2728(90)90163-x
- Balashov S. P. Photoreactions of the photointermediates of bacteriorhodopsin. *Isr. J. Chem.*, **35** (3–4), 415 (1995).
- Lanyi J. K. Mechanism of ion transport across membranes. Bacteriorhodopsin as a prototype for proton pumps. *J. Biol. Chem.*, **272** (50), 31209–31212 (1997). DOI: 10.1074/jbc.272.50.31209
- Birge R. R., Govender D. S. K., Izgi K. C., and Tan E. H. L. Role of calcium in the proton pump of bacteriorhodopsin. microwave evidence for a cation-gated mechanism. *J. Phys. Chem. B.*, **100** (23), 9990–10004 (1996). DOI: 10.1021/jp953669e
- Terpugov E. L., Degtyareva O. V., and Fesenko E. E. Microwave-induced structural changes in bacteriorhodopsin: studies using optical and Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biophysics*, **63** (5), 705–711 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918050226
- Kandori H. Biophysics of rhodopsins and optogenetics. *Biophys. Rev.*, **12** (2), 355–361 (2020). DOI: 10.1007/s12551-020-00645-0
- Saeedi P., Moosaabadi J. M., Sebtahmadi S. S., Meh-rabadi J. F., Behmanesh M., and Mekhilef S. Potential applications of bacteriorhodopsin mutants. *Bioengineered*, **3**, 326–328 (2012). DOI: 10.4161/bioe.21445
- Oesterhelt D. and Stoerkenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol.*, **31**, 667–678 (1974).

15. O'Brien F. E. M. The control of humidity by saturated salt solutions, *J. Sci. Instr.*, **25** (3), 73–76 (1948). DOI: 10.1088/0950-7671/25/3/30
16. Terpugov E. L., and Degtyareva O. V. FTIR emission spectra of bacteriorhodopsin in a vibrational excited-state. *Biochemistry (Moscow)*, **66** (11), 1315–1322 (2001). DOI: 10.1023/A:1013195605416
17. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1767** (9), 1073–1101 (2007). DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004
18. Karjalainen E.-L. and Barth A. Vibrational coupling between helices influences the amide I infrared absorption of proteins. Application to bacteriorhodopsin and rhodopsin. *J. Phys. Chem. B.*, **116** (15), 4448–56 (2012). DOI: 10.1021/jp300329k
19. Rothschild K. J. and Clark N. A. Anomalous amide I infrared absorption of purple membrane. *Science*, **204** (4390), 311–312 (1979). DOI: 10.1126/science.432645
20. Taneva S. G., Caaveiro J. M. M., Muga A., and Coñi F. M. A pathway for the thermal destabilization of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, **367** (3), 297–300 (1995). DOI: 10.1016/0014-5793(95)00570-Y
21. Torres J., Sepulcre F., and Padrós E., Conformational Changes in Bacteriorhodopsin Associated with Protein-Protein Interactions: a functional alpha I-alpha II helix switch? *Biochemistry*, **34** (50), 16320–16326 (1995). DOI: 10.1021/bi00050a012
22. Barnett S. M., Edwards C. M., Butler I. S., and Levin I. W. Pressure-induced transmembrane (II)- to (I)-helical conversion in bacteriorhodopsin: an infrared spectroscopic study. *J. Phys. Chem. B.*, **101** (46), 9421–9424 (1997). DOI: 10.1021/jp972086x
23. Wang J. and El-Sayed M. A. Temperature jump-induced secondary structural change of the membrane protein bacteriorhodopsin in the premelting temperature region: a nanosecond time-resolved Fourier transform infrared study. *Biophys. J.*, **76** (5), 2777–2783 (1999). DOI: 10.1016/s0006-3495(99)77431-x
24. Byler D. M. and Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, **25** (3), 469–487 (1986). DOI: 10.1002/bip.360250307
25. Surewicz W. K. and Mantsch H. H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, **952** (2), 115–130 (1988). DOI: 10.1016/0167-4838(88)90107-0
26. Maeda A., Sasaki J., Shichida Y., and Yoshizawa T. Water structure changes in bacteriorhodopsin photocycle: Analysis by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **31** (2), 462–467 (1992). DOI: 10.1021/bi00117a023
27. Fischer W. B., Sonar S, Marti T., Khorana H. G., and Rothschild K. J. Detection of a water molecule in the active-site of bacteriorhodopsin: hydrogen bonding changes during the primary photoreaction. *Biochemistry*, **33** (43), 12757–12762 (1994). DOI: 10.1021/bi00209a005
28. Jackson M. and Mantsch H. H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, **30** (2), 95–120 (1995). DOI: 10.3109/10409239509085140
29. Braiman M. S., Mogi T., Marti T., Stern L. J., Khorana H. G., and Rothschild K. J. Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96, and 212. *Biochemistry*, **27** (23), 8516–8520 (1988). DOI: 10.1021/bi00423a002
30. Krimm S. and Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.*, **38**, 181–364 (1986). DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60528-8
31. Torii H. and Kawanaka M. Secondary structure dependence and hydration effect of the infrared intensity of the amide ii mode of peptide chains. *J. Phys. Chem. B.*, **120** (8), 1624–1634 (2016). DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b08258
32. Porcelli M., Cacciapuoti G., Fusco S., Massa R., d'Ambrosio G., Bertoldo C., De Rosa M., and Zappia V. Non-thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. *FEBS Lett.*, **402** (2–3), 102–106 (1997). DOI: 10.1016/s0014-5793(96)01505-0
33. Bohr H. and Bohr J. Microwave-enhanced folding and denaturation of globular proteins. *Phys. Rev. E*, **61** (4), 4310–4314 (2000). DOI: 10.1103/PhysRevE.61.4310
34. Fesenko E. E., Geletyuk V.I., Kazachenko V. N., and Chemeris N. K. Preliminary microwave irradiation of water solutions changes their channel-modifying activity. *FEBS Lett.*, **366** (1), 49–52 (1995). DOI: 10.1016/0014-5793(95)98629-w
35. Klink B. U., Winter R., Engelhard M., and Chizhov I. Pressure dependence of the photocycle kinetics of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, **83** (6), 3490–3498 (2002). DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75348-4
36. Kouyama T., Bogomolni R. A., and Stoerkenius W. Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, **48** (2), 201 (1985). DOI: 10.1016/S0006-3495(85)83773-5
37. Zhao X. and Wang C., The non-thermal biological effects and mechanisms of microwave exposure. *Inter. J. Rad. Res.*, **19** (3), 483–494 (2021). DOI: 10.29252/ijrr.19.2.483
38. Adair R. K. Biophysical limits on athermal effects of RF and microwave radiation *Bioelectromagnetics*, **24** (1), 39–48 (2002). DOI: 10.1002/bem.10061
39. de Pomerai D. I., Smith B., Dawe A., North K., Smith T., Archer D. B., Duce I. R., Jones D., and Candido P. M. Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *FEBS Lett.*, **543** (1–3), 93–97 (2003). DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00413-7
40. Calabrò E. and Magazù S. The α -helix alignment of proteins in water solution toward a high-frequency

- electromagnetic field: A FTIR spectroscopy study. *Electromagn. Biol. Med.*, **36** (3), 279–288 (2017). DOI: 10.1080/15368378.2017.1328691
41. Coptly A. B., Neve-Oz Y., Barak I., Golosovsky M., and Davidov D. Evidence for a specific microwave radiation effect on the green fluorescent protein. *Biophys. J.*, **91** (4), 1413–1423 (2006). DOI: 10.1529/biophysj.106.084111
42. Dawkins A. W. J., Nightingale N. R. V., South G. P., Sheppard R. J., and Grant E. H. The role of water in microwave absorption by biological material with particular reference to microwave hazards. *Phys. Med. Biol.*, **24** (6), 1168 (1979). DOI: 10.1088/0031-9155/24/6/007
43. Deng H., Huang L., Callender R., and Ebrey T. Evidence for a bound water molecule next to the retinal Schiff base in bacteriorhodopsin and rhodopsin: a resonance Raman study of the Schiff base hydrogen/deuterium exchange. *Biophys. J.*, **66** (4), 1129–1136 (1994). DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80893-8

FT-IR Difference Spectroscopy for Studying the Secondary Structure of the Membrane Protein Bacteriorhodopsin When Submitted to Microwave Radiation at 8–18 GHz

E.L. Terpugov*, O.V. Degtyareva*, and E.E. Fesenko*

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

Fourier transform infrared (FTIR) difference spectroscopy was used to study the effects of microwaves radiation on the structure of bacteriorhodopsin under light condition. The detailed FTIR spectral analysis revealed the pronounced structural changes in amide I and amide II regions as well as the rearrangements of the hydrogen-bonding network. Well-resolved peaks of amide bands allow accurate determination of two different components (α -I and α -II) of an α -helical conformation of opsin. Irreversible conformational changes of bacteriorhodopsin in purple membranes, detected by FTIR difference spectroscopy, suggest that regardless of temperature, microwaves induce protein structural rearrangements.

Keywords: bacteriorhodopsin, dark/light adaptation, optical spectroscopy, Fourier transform infrared difference spectroscopy, microwaves, biological effect

ОЦЕНКА АФФИННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ В КОМПЛЕКСАХ ACE2–RBD S-БЕЛКА КОРОНАВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕРТОЧНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

© 2024 г. Е.А. Богданова*, А.В. Чернухин**, К.В. Шайтан*, В.Н. Новоселецкий***, #

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

**Факультет цифровых технологий и химического инжиниринга Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева, Миусская площадь, 9, Москва, 125047, Россия

***Биологический факультет Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэнь, Гоцзидасюэюань, 1, Даюньсиньчэн, район Лунган, Шэньчжэнь, 518172, Китайская Народная Республика

#E-mail: novoseletsky@smbu.edu.cn

Поступила в редакцию 14.05.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 22.05.2024 г.

Проведена оценка экспериментально полученных структур 48 комплексов рецептора ACE2 с RBD S-белка коронавируса SARS-CoV и SARS-CoV-2 (включая мутантные формы последнего), для которых рассчитана константа диссоциации. Для предсказания аффинности связывания использован разработанный авторами ранее нейросетевой алгоритм ProBAN, а также ряд других алгоритмов оценки свободной энергии Гиббса: Prodigy, FoldX, DFIRE и RosettaDock. Сопоставление результатов оценки показывает, что ProBAN демонстрирует лучшее качество предсказания (корреляция Пирсона – 0.56, средняя абсолютная ошибка – 0.7 ккал/моль). Полученные результаты позволяют предположить лучшее качество предсказания аффинности и для других белок-белковых комплексов. Информация об исследуемых комплексах и результаты предсказания доступны в репозитории по ссылке: https://github.com/EABogdanova/ProBAN_RBD-ACE2.

Ключевые слова: белок-белковые взаимодействия, интерфейс взаимодействия, аффинность связывания, коронавирус, RBD–ACE2, биоинформатика.

DOI: 10.31857/S0006302924050053, EDN: MKJZVI

Проникновение вируса SARS-CoV-2 в организм человека начинается со взаимодействия RBD-домена его S-белка с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2, англ. angiotensin converting enzyme 2), выполняющим роль мембранного рецептора. Широкое распространение SARS-CoV-2 по сравнению с его предшественниками было связано с более высокой аффинностью связывания S-белка с ACE2 [1, 2]. В процессе накопления мутаций в S-белке, в RBD-домене, в частности, происходило возникновение новых вариантов, таких как Alpha, Beta, Omicron и др., которые характеризуются более быстрым распространением и эффективным проникновением в клетки человека. Осознание данной закономерности повлекло за собой большое количество исследований интерфейса связывания RBD–ACE2,

а также аминокислотных замен, влияющих на аффинность связывания между данными молекулами [3–5].

Физическое взаимодействие между молекулами белков имеет давнюю историю изучения многочисленными экспериментальными и вычислительными методами [6, 7], включая методы биоинформатики [8]. Одной из главных характеристик взаимодействия является константа диссоциации комплексов «белок–белок» (K_d), которая может быть выражена через энергию связывания $\Delta G = RT \ln K_d$. Создание алгоритмов аккуратной оценки этой энергии позволило бы более эффективно проводить направленный мутагенез взаимодействующих белков [9], что имеет существенное значение для создания медицинских препаратов белковой природы, включая антитела [10].

Сокращения: ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2, MAE – средняя абсолютная ошибка.

В настоящее время в банке данных белковых структур PDB содержится более сотни структур комплексов ACE2 человека (hACE2) и RBD SARS-CoV-2, причем как нативного ACE2 и исходной формы RBD, так и их многочисленных мутантных форм, а также комплексов hACE2–RBD и SARS-CoV. Столь обширные структурные данные позволяют провести анализ молекулярных взаимодействий между RBD и hACE2 и выявить типичные и уникальные контакты между остатками [11–14]. Кроме того, этот уникальный набор высококонсервативных структур комплексов позволяет тестировать различные методы оценки белок-белковых взаимодействий.

В данной работе мы провели тестирование ряда ранее предложенных алгоритмов оценки энергии взаимодействия в комплексах «белок–белок» (Prodigy [15], FoldX [16], DFIRE [17], RosettaDock [18]), а также разработанного нами алгоритма ProBAN [19, 20]. Сопоставление обобщающих характеристик этих алгоритмов показывает значительно большую точность алгоритма ProBAN (коэффициент корреляции Пирсона равен 0.56, средняя абсолютная ошибка (англ. MAE – mean absolute error) равна 0.68 ккал/моль), что делает его перспективным инструментом для оценки аффинности связывания в белок-белковых комплексах.

МЕТОДЫ

Для анализа аффинности связывания были отобраны комплексы RBD–ACE2 с известными пространственными структурами и значениями константы диссоциации. Итоговый набор данных содержит 48 комплексов ACE2 и RBD вирусов SARS-CoV (3 структуры) и SARS-CoV-2 (45 структур), включая исходный вариант, а также различные штаммы и инженерные варианты.

Предсказание аффинности связывания осуществлялось алгоритмом ProBAN [20], основанным на сверточной нейронной сети. Кратко, основные шаги алгоритма следующие:

Шаг 1. Методом логистической регрессии определяется оптимальная разделяющая плоскость (рис. 1а) между взаимодействующими молекулами белков. Для лучшего разделения атомов двух молекул в процессе обучения алгоритма для координат подбираются коэффициенты (для моделей машинного обучения эти параметры называются весами) и добавляется общее смещение. Из полученных параметров можно составить уравнение разделяющей плоскости следующего вида:

$$D = W_1x + W_2y + W_3z + \beta,$$

где W_1, W_2, W_3 – коэффициенты, β – смещение.

Далее производится расчет центров масс по обе стороны в области на расстоянии 10 Å от разделяю-

щей плоскости. Точка пересечения вектора, объединяющего центры масс, и разделяющей плоскости определяет центр будущей решетки. Высота решетки задается нормалью к плоскости с ограничением ± 20 Å от центра решетки. Длина решетки определяется по направлению наибольшего разброса атомов в области, ограниченной высотой. Ограничение по длине (± 40 Å от центра) подбиралось эмпирически из соображения, что для большей части комплексов, используемых для обучения модели, данной длины ограничительной ячейки будет достаточно для локализации всего интерфейса связывания. Ширина определяется по вектору, ортогональному двум уже заданным с границей, идентичной длине (± 40 Å от центра). На основе полученных векторов строится итоговая решетка размером $81 \times 81 \times 41$ с шагом 1 Å.

Шаг 2. Для дальнейшего рассмотрения происходит отбор таких атомов, которые удалены не более чем на 10 Å от ближайшего атома взаимодействующей цепи, и располагаются в пределах решетки (рис. 1б).

Шаг 3. Для каждой ячейки размером $1 \times 1 \times 1$ Å, определяются атомы, лежащие внутри нее, и свойства атомов становятся свойствами ячейки. Набор и число свойств ячейки (каналы в терминах машинного обучения) подбирались на основе их влияния на продуктивность и качество обучения нейронной сети. Всего было использовано 10 различных свойств (гидрофобность, заряд, полярность, способность образовывать водородные связи и др.), которые вносят наибольший вклад в предсказание константы диссоциации.

Шаг 4. Полученный массив размера $10 \times 81 \times 81 \times 41$ подается на вход сверточной нейронной сети (рис. 1в), на выходе которой генерируется значение pK_d ($pK_d = -\log(K_d)$).

Для последующего сравнения с другими алгоритмами осуществляется расчет энергии Гиббса по следующей формуле:

$$\Delta G = RT \ln(K_d),$$

где T – температура (300 К), R – универсальная газовая постоянная (1.99 кал/(моль·К)), K_d – константа диссоциации (М).

Данная модель была обучена и протестирована на наборе белок-белковых комплексов с известными значениями константы диссоциации в базе данных PDBBind v.2020 [21]. Исследуемые комплексы RBD–ACE2 не содержатся в данной версии базы данных, что позволяет проводить предсказание на обученной модели без возможности «утечки» данных из обучающей выборки.

Для сравнительной оценки алгоритма ProBAN нами было отобрано несколько широко используемых и доступных методов предсказания ΔG связывания белок-белковых комплексов на основе пространственной структуры: Prodigy (пред-

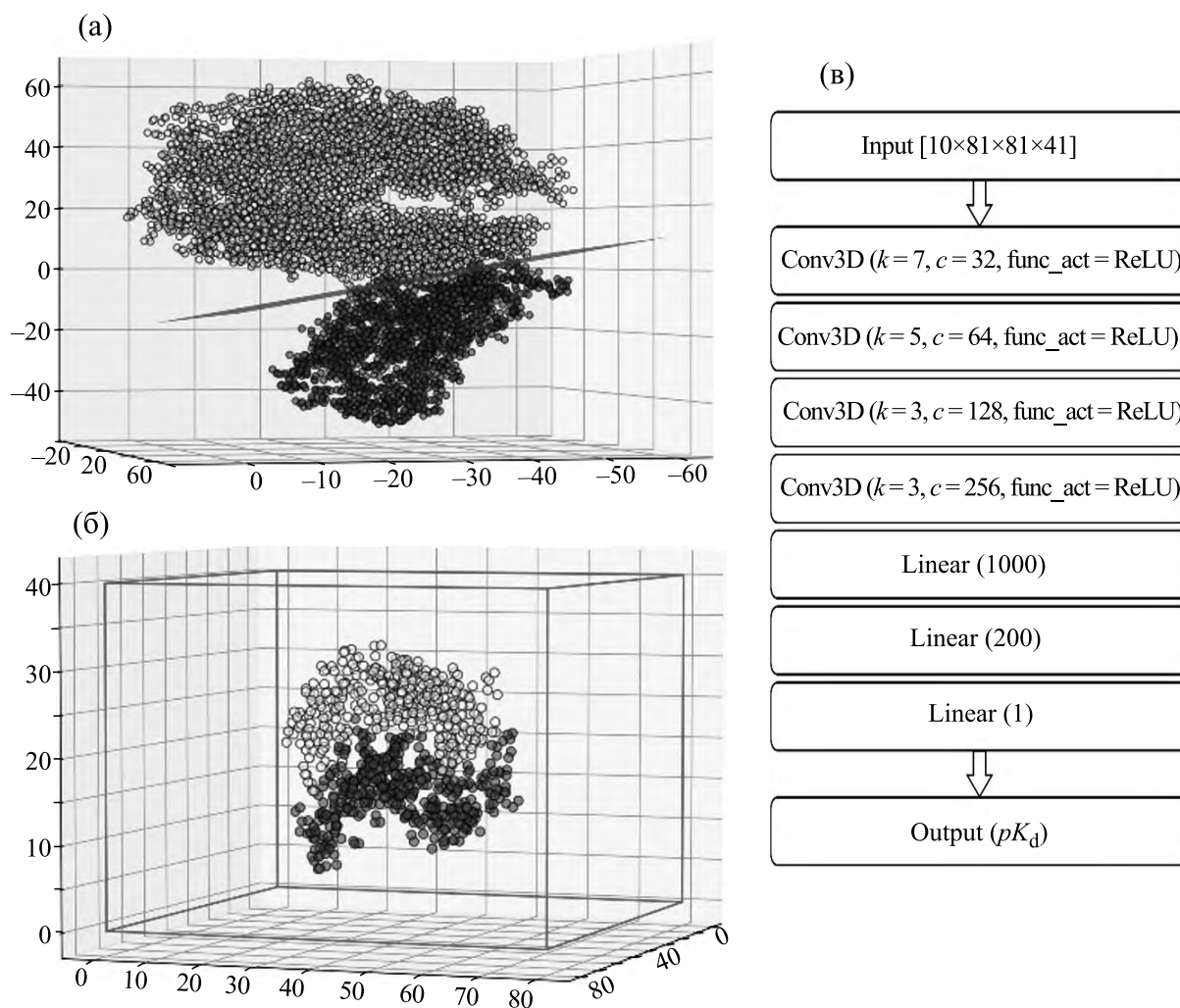


Рис. 1. Основные этапы в работе алгоритма ProBAN: (а) – точечная диаграмма атомов комплекса ACE2-RBD (6lzc) с рассчитанной разделяющей плоскостью; (б) – точечная диаграмма атомов, отобранных для дальнейшего анализа, в ограничивающей ячейке; (в) – архитектура нейронной сети ProBAN. На вход подается четырехмерный массив, включающий в себя информацию о белок-белковом комплексе. Данные проходят последовательно через 4 сверточных слоя (Conv3D) с уменьшением размера ядра свертки (k), увеличением количества каналов (c) и функцией активации (func_act) ReLU, затем проходят через 3 полносвязных слоя (Linear) с уменьшением количества каналов, формируя в итоге значение pK_d .

сказывает также K_d) [15], FoldX [16], DFIRE [17] и RosettaDock [18]. Предсказание с использованием Prodigy осуществляли на специальном онлайн-сервисе [22], для FoldX использовали одноименную программу FoldX Suite 4.0. Расчет с использованием остальных методов осуществляли на онлайн-сервисе CCharPPI [23, 24]. В качестве метрик качества использовали корреляцию Пирсона и среднюю абсолютную ошибку (англ. MAE).

Анализ полученных результатов, а также предсказание алгоритмом ProBAN осуществлялось с использованием Python дистрибутива Anaconda.

Анализ межмолекулярных взаимодействий в комплексах белок-белок был выполнен с помощью программы PLATINUM [25]. Визуализация

комплексов и оптимизация сети водородных связей выполнена с помощью программ Maestro (Schrödinger, LLC) и VMD [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ интерфейсов. Рассматриваемые в настоящей работе комплексы RBD–ACE2 образованы рецептор-связывающим доменом (receptor binding domain, RBD) S-белка коронавируса SARS-CoV и SARS-CoV-2 и молекулой ангиотензин-превращающего фермента 2 (рис. 2а). В непосредственном контакте RBD–ACE2 принимают участие 26 остатков со стороны RBD (позиции 403, 417, 439, 446, 449, 453, 455, 456, 458, 475–477, 484–487, 489, 490, 493, 496, 498, 500–503, 505 согласно последовательности UniProt P0DTC2) и

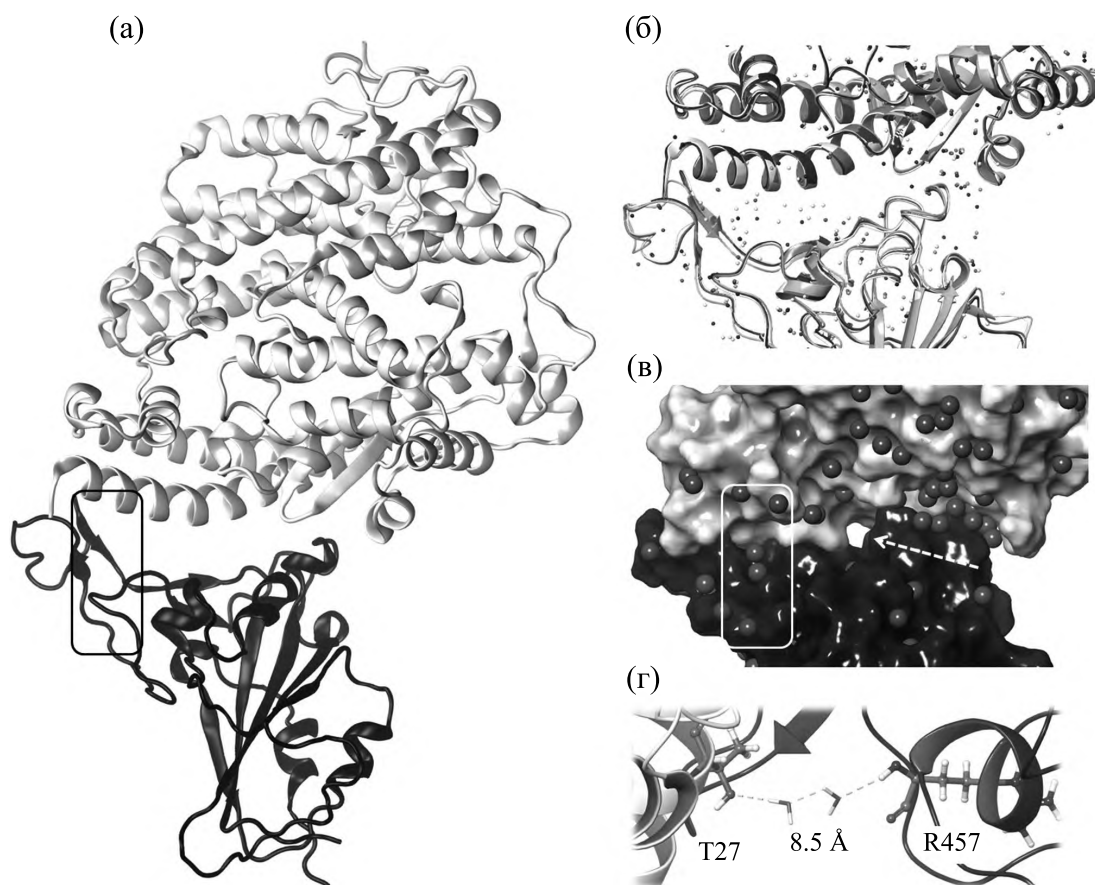


Рис. 2. (а) – Общий вид комплекса ACE2 (показан светлым) и RBD (показан темным) (PDB-код 6lzg) в ленточном представлении. Рамка соответствует области расположения остатков T27 (ACE2) и R457 (RBD). (б) – Совмещение интерфейсов взаимодействия ряда структур комплекса ACE2–RBD: 6lzg (показана самым темным), 7ekh (показана темным), 7lo4 (показана светлым) и 8df5 (показана самым светлым). Молекулы кристаллизационной воды показаны шариками соответствующих цветов (масштаб не соблюден). (в) – Интерфейс взаимодействия ACE2–RBD (PDB-код 6lzg). Молекулярные поверхности субъединиц, соответствующих ACE2 и RBD, показаны светлым и темным, соответственно. Атомы кислорода, соответствующие молекулам воды, показаны промежуточным серым. Рамка соответствует области расположения остатков T27 (ACE2) и R457 (RBD). Стрелка указывает на полость. (г) – Две молекулы воды и цепочка водородных связей, обеспечивающие взаимодействие остатка T27 ACE2 (слева) и остатка R457 RBD (справа). Расстояние между соответствующими атомами белка 8.5 Å.

22 остатка со стороны ACE2 (позиции 19, 24, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 37, 38, 41, 42, 79, 82, 83, 329, 330, 352–355, 357 согласно последовательности UniProt Q9BYF1). Взаимная ориентация взаимодействующих белков и конформация интерфейса весьма консервативны (рис. 2б): совмещение структур комплексов по Ca-атомам указанных 48 остатков дает среднеквадратичное отклонение $<1 \text{ \AA}$ для всех рассмотренных нами структур. Поверхность непосредственного контакта имеет сложную форму, но может быть заключена в параллелепипед с размерами $45 \times 15 \times 15 \text{ \AA}$. Анализ межмолекулярных взаимодействий показывает, что основными из них являются гидрофобные контакты и водородные связи (данные не приведены).

В первом приближении интерфейс взаимодействия RBD–ACE2 состоит из двух макрообластей

плотного примыкания молекул и полости между ними (рис. 2в). Будем для определенности называть эти макрообласти большой (рис. 2в, слева) и малой (рис. 2в, справа), поскольку число вовлеченных в их образование аминокислотных остатков со стороны RBD составляет 15 и 11, а со стороны ACE2 – 11 и 11 соответственно.

Межмолекулярные взаимодействия в комплексах RBD–ACE2 подробно освещаются практически в каждой работе, посвященной той или иной расшифрованной структуре [27–30]. Считается, что наиболее значимыми для связывания являются три области (hot spot), первая из которых соответствует малой макрообласти, а две другие – большой макрообласти. Итак, первая область локализована вокруг остатка Lys353 ACE2 и характеризуется взаимодействиями, образованными остатками Lys353, Asp38, Tyr41,

Gln42, Leu45 и Asn330 со стороны ACE2 и остатками Thr500, Asn501, Gln498 и Tyr505 со стороны RBD. Мутации в указанных позициях значимо влияют на аффинность связывания. Так, например, выявлено, что замена аспарагина на тирозин в 501 позиции RBD у альфа штамма SARS-CoV-2 значительно увеличивает аффинность [11, 12].

Вторая область ассоциирована с остатком Lys31 ACE2 и характеризуется контактами, образованными остатками Leu455, Glu484, Lys417 со стороны RBD и Asp30 и Lys31 со стороны ACE2 [29]. Также в мутантах дикого штамма выявлен остаток Gln493, который усиливает взаимодействие в данной области.

Третья область также расположена вблизи N-конца ACE2, с которым взаимодействует короткая подвижная петля RBD (рис. 2а, слева). Эта петля охватывает спираль ACE2 (остатки 21–52) с почти противоположной стороны от основного интерфейса, что обеспечивает более обширную область взаимодействий [31] и стабильное относительное расположение RBD и ACE2. Критически важными для взаимодействия в этой области являются следующие остатки RBD: Ala475, Gly476 и Phe486, первые два взаимодействуют с Ser19, а третий – с Met82 и Leu79 [32]. При этом ранее было показано, что мутации в позиции Gly476, а также Ala475 негативно сказываются на аффинности связывания [13].

Обращает на себя внимание полость, расположенная между макрообластями (рис. 2в). В естественных условиях она, очевидно, заполнена молекулами воды и ионами, однако в известных кристаллографических структурах молекулы кристаллизационной воды в этой полости отсутствуют. Мы полагаем, что ключевой причиной этого является высокая подвижность молекул воды в этой области, вызванная несоответствием гидрофобных свойств поверхностей молекул ACE2 и RBD в этой области пространства. Рассмотрение свойств поверхностей показывает, что поверхность ACE2 между остатками Lys353 и Lys31 обладает гидрофильными свойствами, в то время как соответствующая ей поверхность RBD между пятен контактов этих остатков обладает гидрофобными свойствами (результаты не приведены). Это наблюдение хорошо соотносится с ранее опубликованными результатами анализа структур комплексов «белок–белок», полученных с высоким разрешением, который выявил более стабильное состояние молекул кристаллизационной воды вблизи полярных незаряженных остатков белка по сравнению с заряженными или неполярными остатками [33].

Несмотря на влияние молекул воды и ионов, расположенных на интерфейсе взаимодействия или в его окрестности, на организацию белок-белковых комплексов [34], при описании экспе-

риментальных структур комплексов RBD–ACE2 этим молекулам практически не уделяется внимание. Между тем структуры, полученные методом рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением (как правило, 2.5 Å или лучше), содержат большое число молекул кристаллизационной воды. Так, в структурах 6lzg, 7ekh, 7lo4 и 8df5 в непосредственной близости от ACE2 или RBD содержится 322, 250, 132 и 163 молекулы воды соответственно, а структура 8df5 содержит еще и один ион хлора. Большая часть этих молекул расположена в карманах на поверхности белка hACE2, однако заметное число находится и в окрестности интерфейса взаимодействия этого белка с RBD (рис. 2в). Интересно отметить, что множества молекул воды, находящиеся в этих структурах, пересекаются не полностью, что, с одной стороны, позволяет выявить наиболее консервативные сайты связывания воды, а с другой стороны, гипотетически, позволяет создать молекулярную модель интерфейса, содержащую в себе все возможные молекулы воды, включая подвижные молекулы воды, расположенные в вышеупомянутой полости. Однако создание такой модели лежит за рамками данной работы.

Для выявления молекул кристаллизационной воды, которые могут опосредовать белок-белковое взаимодействие, нами было выполнено добавление атомов водорода и оптимизация сети водородных связей для рассматриваемых структур высокого разрешения (6lzg, 7ekh, 7lo4 и 8df5) в программе Maestro (Schrodinger LLC, США), причем положение тяжелых атомов не подвергалось изменению. Собственно выявление молекул воды выполняли визуально. Итоговая информация представлена в табл. 1. Видно, что для рассмотренных структур высокого разрешения характерно наличие как минимум нескольких цепочек водородных связей. Рассмотрение таких цепочек показывает, что во взаимодействии белков в комплексе играют роль не только остатки, непосредственно образующие нековалентные взаимодействия, но и остатки, образующие такие взаимодействия посредством молекул воды. Это предположение находит подтверждение и в литературе [35]. В частности, показано, что поверхность взаимодействующих белков, примыкающих к интерфейсу их взаимодействия, но не вовлеченная в него непосредственно, обогащена полярными атомами (т.е. атомами N и O). Очевидно, полярные атомы, расположенные недостаточно близко для образования непосредственной водородной связи, могут сделать это, образовав связи посредством молекул воды (рис. 2г).

Однако прямой учет подобных связей в белок-белковых комплексах по ряду причин является затруднительным. Прежде всего, для такого учета необходимо наличие молекул воды в явном виде и в достаточном количестве, что далеко не всегда

Таблица 1. Наблюдаемые в структурах высокого разрешения цепочки водородных связей с участием молекул воды (остаток ACE2 – молекулы воды – остаток RBD)

Код структуры, (разрешение, Å)	Непрямое взаимодействие посредством молекул воды		
	одной	двух	трех
6lzg (2.5)	K31-w-E484 (4.2) A386-w-Y505 (5.4)	T27-w-w-R457 (8.5) Q325-w-w-P499 (8.3) G354-w-w-V503 (5.4) G354-w-w-G504 (6.9)	G354-w-w-w-D405 (9.0)
7ekh (2.4)	T27-w-A475 (5.9) Y83-w-N487 (4.4)	T324-w-w-T500 (7.4) G354-w-w-G504 (6.9)	–
7lo4 (2.5)	–	G354-w-w-V503 (5.1) G326-w-w-V503 (7.0) Q325-w-w-V503 (7.3)	–
8df5 (2.7)	T27-w-A475 (5.6) D30-w-N417 (5.6) H34-w-N417 (4.2)	E35-w-w-F490 (7.6) G354-w-w-G504 (6.8)	E35-w-w-w-G485 (10.5)

Примечание. В скобках дано расстояние (в Å) между соответствующими атомами указанных остатков.

наблюдается даже для структур высокого разрешения. Это делает необходимым обращение к методам молекулярного моделирования для создания и оптимизации водного окружения интерфейса. Эти же методы должны быть использованы и для учета тепловых колебаний молекул как белков, так и воды. Далее, даже будучи выявленной, такая цепочка водородных связей сложна в интерпретации с точки зрения собственной энергии и вклада в энергию взаимодействия белков. Наконец, зачастую ставится задача быстрой оценки энергии взаимодействия в комплексе (например, в задачах белок-белкового докинга), что вообще не позволяет рассматривать молекулы воды в явном виде.

Для обхода этих затруднений и одновременно учета не прямых (опосредованных молекулами воды или как-то иначе) взаимодействий мы разработали алгоритм, использующий сверточную нейронную сеть.

Нейросетевая модель оценки связывания. Рассмотрение комплексов RBD–ACE2 с известными пространственной структурой и значением K_d выявило 48 комплексов. Большая часть этих комплексов имеют значение pK_d от 7 до 9 (рис. 3), в то время как низкая аффинность связывания ($pK_d < 7$) характерна для 5 комплексов, два из которых образованы RBD вируса SARS-CoV (3sci, 6cs2), а три оставшихся содержат RBD SARS-CoV-2 с мутациями F486L (7eke (ACE2 человека), 7wa1 (ACE2 норки)) или Y453F (7w8s (ACE2 норки)). Комплексы с самой высокой аффинностью связывания содержат hACE2 и RBD SARS-CoV-2 с мутациями D614G, N501Y, E484K, K417N (7sy4, 7sy8) или RBD SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75

(8asy), BQ.1.1 (8if2) и рекомбинантный вариант ХВВ.1 (8iov).

Для анализа предсказания характеристик связывания в белок-белковых комплексах алгоритмом ProBAN было проведено его сравнение с предсказаниями, полученными веб-сервисом Prodigy. Данный метод осуществляет оценку аффинности связывания функцией, основанной на межмолекулярных контактах и признаках непосредственно на интерфейсе и полученных из анализа поверхности, не относящейся к интерфейсу взаимодействия. Метрики, полученные в результате оценки данного алгоритма, находятся в табл. 2. Хорошо видно, что ProBAN показывает более высокое качество предсказания по сравнению с Prodigy. Мы полагаем, что причиной этого

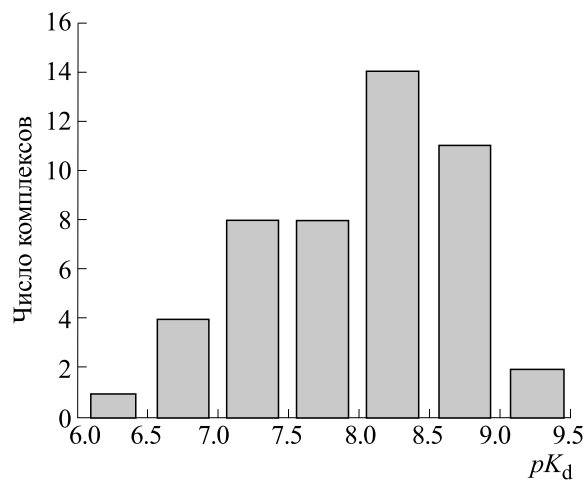


Рис. 3. Распределение комплексов RBD–ACE2 из исследуемого набора по значениям pK_d .

Таблица 2. Метрики качества предсказания аффинности связывания для комплексов ACE2–RBD для отобранных алгоритмов

Алгоритм	Коэффициент корр. Пирсона для ΔG	p -value*	MAE для ΔG (ккал/моль)	MAE для pK_d
ProBAN	0.56	3.3e-05	0.7	0.5
Prodigy	−0.38	7.2e-03	1.2	0.9
FoldX	0.41	4e-03	8.1	—
DFIRE (все комплексы)	−0.04	0.74	12.3	—
DFIRE (без 7u0n)	0.14	0.36	9.5	—
RosettaDock	−0.11	0.46	5	—

Примечание. * – Расчет p -value осуществлялся с использованием Z-преобразования Фишера.

является использование как более полной информации о взаимодействиях между атомами, так и большего порогового значения расстояния между атомами (10 Å), которое классифицирует пары атомов на взаимодействующие и нет. Используемое в Prodigy аналогичное пороговое значение расстояния между атомами (5.5 Å), по-видимому, отсеивает часть важных атомов, вносящих вклад в связывание.

Большое число алгоритмов, используемых для оценки аффинности связывания в белок-белковых комплексах, предсказывают не значение константы диссоциации, а свободную энергию Гиббса связывания. Для оценки работы данных алгоритмов (FoldX, DFIRE, RosettaDock) на исследуемом наборе данных из полученных нами значений K_d мы рассчитали ΔG и сравнили с ΔG полученной с использованием данных алгоритмов (рис. 4). Рассчитанные значения метрик качества для разных алгоритмов представлены в табл. 2, причем значения p -value, близкие к нулю, говорят о высокой достоверности рассчитанных коэффициентов корреляции. Видно, что ProBAN оказывается наиболее эффективным среди всех проанализированных алгоритмов. На втором месте по размеру средней ошибки находится Prodigy, однако корреляция принимает отрицательное значение, что свидетельствует о неспособности алгоритма оценивать влияние мутаций на направление изменения аффинности связывания в изучаемом наборе данных. Таким образом, учитывая рассчитанное значение MAE, используемая в Prodigy оценочная функция, может использоваться для оценки ΔG с погрешностью в 1.2 ккал/моль. В свою очередь, для определения вклада мутаций в аффинность относительно нативной структуры RBD–ACE2 более успешно может быть использован FoldX, который по значе-

нию корреляции (0.41) на исследуемом наборе данных находится на втором месте после ProBAN. Данный вывод согласуется с более ранними исследованиями по предсказанию аффинности связывания в комплексах RBD–ACE2 [36]. Остальные алгоритмы (DFIRE, RosettaDock) оказались менее успешными в предсказании свободной энергии Гиббса для изучаемых белок-белковых комплексов. Также стоит заметить, что для одного из комплексов (7u0n) DFIRE предсказал значение $\Delta G = 137.6$ ккал/моль, что явно является выбросом и свидетельствует о возможной нестабильности алгоритма. Для более объективной оценки работы данного метода метрики качества были пересчитаны для набора из 47 комплексов без 7u0n, что позволило их улучшить, но статистически значимой корреляции также не удалось достичь (табл. 2), как и для RosettaDock.

В результате предсказания константы диссоциации моделью ProBAN удалось получить значение корреляции Пирсона между экспериментальными и рассчитанными значениями pK_d , равное 0.56, и MAE = 0.5 (рис. 5). Также отдельно для каждого комплекса рассчитывалась абсолютная ошибка (англ. AE – Average Error) по формуле:

$$AE = |\text{True_pKd} - \text{Pred_pKd}|,$$

где True_pKd – значение pK_d , рассчитанное из экспериментально полученной K_d для комплекса, Pred_pKd – значение pK_d , предсказанное алгоритмом.

Среди с комплексов с наибольшей абсолютной ошибкой (больше 1) подавляющая часть имела разрешение хуже 3 Å (6cs2, 7wk6, 7tex) и один имел разрешение 2.85 Å (8asy). Наблюдаемая закономерность свидетельствует о негативном вкладе нечетко разрешенного положения атомов в качество предсказания аффинности связыва-

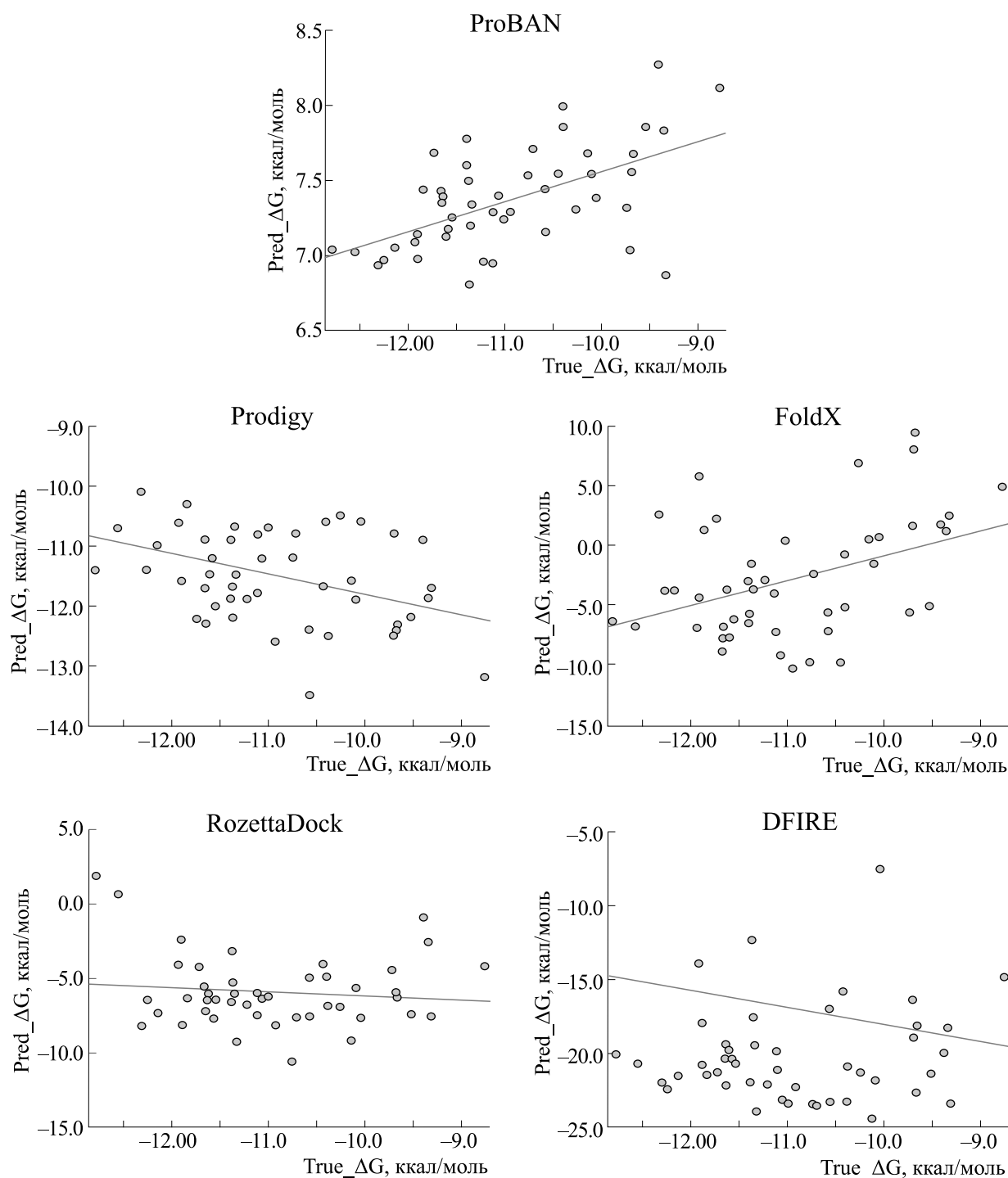


Рис. 4. Результаты предсказаний ΔG для комплексов RBD-ACE2 моделей: ProBAN, Prodigy, FoldX, DFIRE (было исключено предсказание для комплекса 7u0n) и RosettaDock.

ния, так как искажается информация об меж-атомных расстояниях, играющих ключевую роль во взаимодействии между белковыми молекулами. Так, совмещение структуры комплексов bcs2 и 3sci по Ca-атомам остатков, образующих интерфейс RBD-ACE2, показывает, что, несмотря на

незначительное отклонение в положении основной цепи (среднеквадратичное отклонение равно 0.8 \AA), наблюдаются значительные отличия в ориентации боковых цепей многих соседних остатков. В частности, рассмотрение пары остатков R395(RBD)-R559(ACE2) дает расстояние между

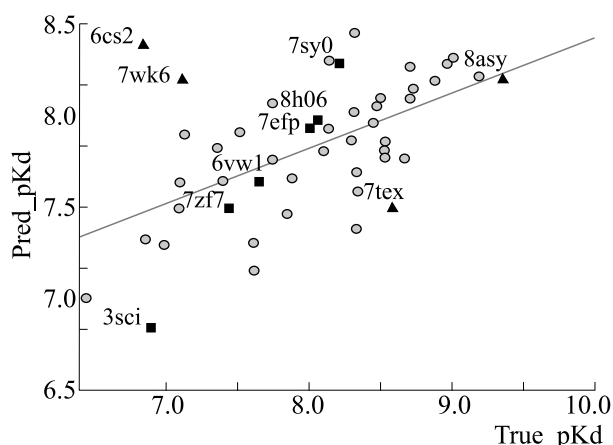


Рис. 5. Результаты предсказаний pK_d для комплексов RBD–ACE2 алгоритмом ProBAN. Треугольниками отмечены комплексы с абсолютной ошибкой больше 1, квадратами – с ошибкой меньше 0.1; добавлены PDB-коды в качестве ярлыков. Серыми кружками отмечены комплексы с абсолютной ошибкой меньше 1, но больше 0.1).

атомами CZ равно 8.9 и 14.3 Å соответственно. Таким образом, согласно нашему представлению, эти остатки аргинина вносят вклад в связывание при рассмотрении структуры 6cs2 и не вносят его при рассмотрении структуры 3sci. Различное положение боковых цепей других остатков интерфейса или соседних с ними так же имеет большое значение, однако подробное рассмотрение подобных различий лежит за рамками данной работы. При этом стоит отметить, что, не считая комплексы 6cs2, 7wk6, для которых структуры получены с низким разрешением (4.4 и 3.7 Å соответственно), наилучшие предсказания характерны для комплексов с более низкой аффинностью связывания ($pK_d < 8$), что ранее было замечено в работе, посвященной оценке других алгоритмов [36]. Данная закономерность может быть связана с тем, что мутации, дестабилизирующие интерфейс связывания, приводят к более крупным конформационным перестройкам, которые более эффективно могут учитываться предсказательными алгоритмами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Собран набор данных, содержащий структуры комплексов ACE2–RBD с известными константами связывания, который может использоваться для изучения факторов, влияющих на связывание между RBD и ACE2, а также для обучения и тестирования алгоритмов, осуществляющих предсказание аффинности связывания. Использование нейросетевых методов, в частности, ProBAN, для оценки константы диссоциации и свободной энергии Гиббса возможно не только между нативными RBD и ACE2, но и между другими

мутантными формами. Полученные метрики качества свидетельствуют о недостаточной стабильности предсказаний для комплексов с высокой аффинностью связывания, что указывает на необходимость улучшения предикторов при увеличении набора доступных данных для анализа. Собранный набор данных, а также результаты предсказания выложены в онлайн-репозитории, доступном по ссылке: https://github.com/EABogdanova/ProBAN_RBD-ACE2.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-74-30003.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Choudhary S., Sreenivasulu K., Mitra P., Misra S., and Sharma P. Role of genetic variants and gene expression in the susceptibility and severity of COVID-19. *Ann. Lab. Med.*, **41** (2), 129–138 (2021). DOI: 10.3343/alm.2021.41.2.129
- Ali A. and Vijayan R. Dynamics of the ACE2-SARS-CoV-2/SARS-CoV spike protein interface reveal unique mechanisms. *Sci. Rep.*, **10** (1), 14214 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-71188-3
- Vogel M., Augusto G., Chang X., Liu X., Speiser D., Mohsen M. O., and Bachmann M. F. Molecular definition of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 receptor-binding domain mutations: Receptor affinity versus neutralization of receptor interaction. *Allergy*, **77** (1), 143–149 (2022). DOI: 10.1111/all.15002
- Bozdaganyan M. E., Shaitan K. V., Kirpichnikov M. P., Sokolova O. S., and Orekhov P. S. Computational analysis of mutations in the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike and their effects on antibody binding. *Viruses*, **14** (2), 295 (2022). DOI: 10.3390/v14020295
- Lan J., He X., and Ren Y. Structural insights into the SARS-CoV-2 Omicron RBD-ACE2 interaction. *Cell Res.*, **32**, 593–595 (2022). DOI: 10.1038/s41422-022-00644-8

6. Chothia C. and Janin J. Principles of protein–protein recognition. *Nature*, **256**, 705–708 (1975). DOI: 10.1038/256705a0
7. Archakov A. I., Govorun V. M., Dubanov A. V., Ivanov Y. D., Veselovsky A. V., Lewi P., and Janssen P. Protein–protein interactions as a target for drugs in proteomics. *Proteomics*, **3** (4), 380–391 (2003). DOI: 10.1002/pmic.200390053
8. Shi T. L., Li Y. X., Cai Y. D., and Chou K. C. Computational Methods for protein–protein interaction and their application. *Curr. Prot. Peptide Sci.*, **6**, 443–449 (2005). DOI: 10.2174/138920305774329313
9. Vangone A. and Bonvin A. M. Contacts-based prediction of binding affinity in protein–protein complexes. *eLife*, **4**, e07454 (2015). DOI: 10.7554/eLife.07454
10. Purisima E. O., Corbeil C. R., Gaudreault F., Wei W., Deprez C., and Sulea T. Solvated interaction energy: from small-molecule to antibody drug design. *Front. Mol. Biosci.*, **7** (10), 1210576 (2023). DOI: 10.3389/fmolb.2023.1210576
11. Jawad B., Adhikari P., Podgornik R., and Ching W. Y. Key interacting residues between RBD of SARS-CoV-2 and ACE2 receptor: combination of molecular dynamics simulation and density functional calculation. *J. Chem. Inf. Model.*, **61** (9), 4425–4441 (2021). DOI: 10.1021/acs.jcim.1c00560
12. Salleh M. Z., Derrick J. P., and Deris Z. Z. Structural evaluation of the spike glycoprotein variants on SARS-CoV-2 transmission and immune evasion. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (14), 7425 (2021). DOI: 10.3390/ijms22147425
13. Yang Y., Zhang Y., Qu Y., Zhang C., Liu X. W., Zhao M., Mu Y., and Li W. Key residues of the receptor binding domain in the spike protein of SARS-CoV-2 mediating the interactions with ACE2: a molecular dynamics study. *Nanoscale*, **13** (20), 9364–9370 (2021). DOI: 10.1039/d1nr01672e
14. Zhang Z. B., Xia Y. L., Shen J. X., Du W. W., Fu Y. X., and Liu S. Q. Mechanistic origin of different binding affinities of SARS-CoV and SARS-CoV-2 spike RBDs to human ACE2. *Cells*, **11** (8), 1274 (2022). DOI: 10.3390/cells11081274
15. Xue L. C., Rodrigues J. P., Kastiris P. L., Bonvin A. M., and Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics*, **32** (23), 3676–3678 (2016). DOI: 10.1093/bioinformatics/btw514
16. Schymkowitz J., Borg J., Stricher F., Nys R., Rousseau F., and Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucl. Acids Res.*, **33**, W382–W388 (2005). DOI: 10.1093/nar/gki387
17. Zhang C., Liu S., and Zhou Y. Accurate and efficient loop selections by the DFIRE-based all-atom statistical potential. *Prot. Sci.*, **13** (2), 391–399 (2004). DOI: 10.1110/ps.03411904
18. Lyskov S., and Gray J. J. The RosettaDock server for local protein–protein docking. *Nucl. Acids Res.*, **36**, W233–W238 (2008). DOI: 10.1093/nar/gkn216
19. Bogdanova E. A., Novoseletsky V. N., and Shaitan K. V. Binding affinity prediction in protein–protein complexes using convolutional neural network. In *Advances in Neural Computation, Machine Learning, and Cognitive Research VII (NEUROINFORMATICS 2023)*. Ed. by B. Kryzhanovsky, V. Dunin-Barkowski, et al. (Springer, Cham., 2023), pp. 389–397. DOI: 10.1007/978-3-031-44865-2_42
20. Bogdanova E. A. and Novoseletsky V. N. ProBAN: neural network algorithm for predicting binding affinity in protein–protein complexes. *Proteins*, **92** (9), 1127–1136 (2024). DOI: 10.1002/prot.26700
21. Wang R., Fang X., Lu Y., Yang C. Y., and Wang, S. The PDBbind database: methodologies and updates. *J. Med. Chem.*, **48** (12), 4111–4119 (2005). DOI: 10.1021/jm048957q
22. Moal I. H., Jiménez-García B., and Fernández-Recio J. CCharPPI web server: computational characterization of protein–protein interactions from structure. *Bioinformatics*, **31**(1), 123–125 (2015). DOI: 10.1093/bioinformatics/btu594
23. Pyrkov T. V., Chugunov A. O., Krylov N. A., Nolde D. E., and Efremov R. G. PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes. *Bioinformatics*, **25** (9), 1201–1202 (2009). DOI: 10.1093/bioinformatics/btp111
24. Humphrey W., Dalke A., and Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics*, **14** (1), 33–28 (1996). DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
25. Su C., He J., Han P., Bai B., Li D., Cao J., Tian M., Hu Y., Zheng A., Niu S., Chen Q., Rong X., Zhang Y., Li W., Qi J., Zhao X., Yang M., Wang Q., and Gao G. F. Molecular basis of mink ACE2 binding to SARS-CoV-2 and its mink-derived variants. *J. Virology*, **96** (17), e0081422 (2022). DOI: 10.1128/jvi.00814-22
26. Han P., Su C., Zhang Y., Bai C., Zheng A., Qiao C., Wang Q., Niu S., Chen Q., Zhang Y., Li W., Liao H., Li J., Zhang Z., Cho H., Yang M., Rong X., Hu Y., Huang N., Yan J., Wang Q., Zhao X., Gao G. F., and Qi J. Molecular insights into receptor binding of recent emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Commun.*, **12** (1), 6103 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-26401-w
27. Wang Q., Zhang Y., Wu L., Niu S., Song C., Zhang Z., Lu G., Qiao C., Hu Y., Yuen K. Y., Wang Q., Zhou H., Yan J., and Qi J. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, **181** (4), 894–904 (2020). DOI: 10.1016/j.cell.2020.03.045
28. Starr T. N., Greaney A. J., Hannon W. W., Loes A. N., Hauser K., et al. Shifting mutational constraints in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain during viral evolution. *Science (New York)*, **377** (6604), 420–424 (2022). DOI: 10.1126/science.abo7896

29. Geng Q., Shi K., Ye G., Zhang W., Aihara H., and Li F. Structural basis for human receptor recognition by SARS-CoV-2 Omicron variant BA.1. *J. Virology*, **96** (8), e0024922 (2022). DOI: 10.1128/jvi.00249-22
30. Nelson-Sathi S., Umasankar P. K., Sreekumar E., Nair R. R., Joseph I., Nori S. R. C., Philip J. S., Prasad R., Navyasree K. V., Ramesh S., Pillai H., Ghosh S., Santosh Kumar T. R., and Pillai M. R. Mutational landscape and *in silico* structure models of SARS-CoV-2 spike receptor binding domain reveal key molecular determinants for virus-host interaction. *BMC Mol. Cell Biol.*, **23** (1), 2 (2022). DOI: 10.1186/s12860-021-00403-4
31. Kastriitis P. L., Rodrigues J. P., Folkers G. E., Boelens R., and Bonvin, A. M. Proteins feel more than they see: Fine-tuning of binding affinity by properties of the non-interacting surface. *J. Mol. Biol.*, **426** (14), 2632–2652 (2014). DOI: 10.1016/j.jmb.2014.04.017
32. Reichmann D., Phillip Y., Carmi A., and Schreiber G. On the contribution of water-mediated interactions to protein-complex stability. *Biochemistry*, **47** (3), 1051–1060 (2008). DOI: 10.1021/bi7019639
33. Schweke H., Mucchielli M. H., Sacquin-Mora S., Bei W., and Lopes A. Protein interaction energy landscapes are shaped by functional and also non-functional partners. *J. Mol. Biol.*, **432** (4), 1183–1198 (2020). DOI: 10.1016/j.jmb.2019.12.047
34. Ozden B., Şamiloğlu E., Özsan A., Erguven M., Yükrük C., Koşaca M., Oktayoğlu M., Menteş M., Arslan N., Karakulah G., Barlas A. B., Savaş B., and Karaca E. Benchmarking the accuracy of structure-based binding affinity predictors on Spike-ACE2 deep mutational interaction set. *Proteins*, **92** (4), 529–539 (2024). DOI: 10.1002/prot.26645

Assessment of Binding Affinity in the Complexes of CoV-S-Protein's RBD and the ACE2 Using Convolutional Neural Networks

E.A. Bogdanova*, A.V. Chernukhin**, K.V. Shaitan*, and V.N. Novoseletsky***

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

**Faculty of Digital Technologies, and Chemical Engineering, D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

***Faculty of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, International University Park Road, 1, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen, Guangdong Province, 518172, People's Republic of China

The experimentally obtained structures of 48 complexes of the ACE2 receptor with the S protein's RBD of the coronaviruses SARS-CoV and SARS-CoV-2 (including mutant forms of the latter) were assessed and the dissociation constant was calculated for them. Prediction of binding affinity was carried out using ProBAN, a neural network algorithm, previously developed by the authors, and a number of other algorithms for estimating the Gibbs free energy such as Prodigy, FoldX, DFIRE and RosettaDock. A comparison of the evaluation results shows that ProBAN has the best prediction quality (Pearson correlation – 0.56, MAE – 0.7 kcal/mol) of all the analyzed algorithms. The results obtained suggest better quality of affinity prediction for other protein-protein complexes. Information about the complexes under study and prediction results are available in the repository at the link: https://github.com/EABogdanova/ProBAN_RBD-ACE2.

Keywords: protein-protein interactions, interaction interface, binding affinity, coronavirus, RBD-ACE2, bioinformatics

УДК 577.345, 57.043

ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАН КЛЕТОК *Pseudomonas aeruginosa* ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УДАРНЫХ ВОЛН

© 2024 г. С.Н. Летуга*, А.Т. Ишемгулов*.,# , О.К. Давыдова*, А.Н. Никиян*, М.Е. Григорьев*

*Оренбургский государственный университет, просп. Победы, 13, Оренбург, 460018, Россия

#E-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.10.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Исследовано влияние ударных акустических волн на проницаемость мембран грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* для анионного фотосенсибилизатора эритрозина. Ударные волны генерировались путем быстрого локального нагрева среды, возникающего в ходе безызлучательной релаксации высоких электронно-возбужденных состояний молекул фотосенсибилизатора, заселяемых лазерным импульсом высокой плотности мощности. Показано, что под воздействием ударных волн увеличивается проницаемость мембран бактерий, эритрозин проникает внутрь клеток, что сопровождается повышением эффективности фотодинамического действия на микроорганизмы.

Ключевые слова: ударные волны, пермеабиллизация мембран клеток, антимикробная фотодинамическая терапия.

DOI: 10.31857/S0006302924050068, EDN: MKIRZT

Антимикробная фотодинамическая терапия (аФДТ), не допускающая микробной резистентности, — важная составляющая современной стратегии борьбы с патогенными микроорганизмами. Фотодинамический эффект основан на высокой цитотоксичности активных форм кислорода, генерируемых фотосенсибилизаторами (ФС) после облучения светом, длина волны которого совпадает со спектром поглощения. В качестве ФС используют химически стабильные соединения, нетоксичные в темновых реакциях, но эффективно генерирующие активные формы кислорода при активации светом. Наиболее известные активные формы кислорода — синглетный кислород и анион-радикалы — действуют на грамположительные и грамотрицательные бактерии, некоторые виды грибов и вирусов, а также разрушают или предотвращают образование микробных биопленок [1–5]. Эффективность аФДТ зависит от характера взаимодействия ФС с клетками-мишенями и их способности проникать внутрь бактерий. В ряде работ показано [6–8], что проникновение ФС в клетки многократно повышает результативность аФДТ и, фактически, является обязательным условием фотодинамического действия.

Сокращения: аФДТ — антимикробная фотодинамическая терапия, ФС — фотосенсибилизатор, КОЕ — колониеобразующие единицы.

Плазматические мембраны состоят из липидных бислоев, которые практически непроницаемы для заряженных молекул ФС. Для лучшего проникновения ФС в бактериальные клетки используют различные приемы, в том числе временную пермеабиллизацию клеток [9], что в совокупности с последующей фотодинамической обработкой резко повышает эффективность фотодеструкции микробных образований. Добавим к сказанному, что увеличение проницаемости мембран востребовано не только в аФДТ, но и в генной инженерии и терапии для доставки в клетки плазмид, олигонуклеотидов и других макромолекул. Поэтому поиск методов увеличения проницаемости мембран — весьма актуальная задача.

Известны приемы пермеабиллизации мембран с помощью ультразвука [10, 11], электропорации [12] и др. В работе [13] продемонстрирована возможность временного увеличения проницаемости мембран с помощью ударных волн. Для генерации ударных волн используют различные устройства — ударные трубки, ударно-волновые литотриптеры [14] или короткие лазерные импульсы, включая лазерную абляцию мишеней [15, 16]. Не все из перечисленных методов изменения проницаемости мембран клеток представляют собой совершенные технологии, в равной степени удобные для практического применения даже в условиях *in vitro*. В этой связи каждый из

альтернативных приемов повышения проникновения ФС в клетки заслуживает внимания, что особенно актуально для грамотрицательных бактерий, более устойчивых к фотодинамическому действию [2].

В работе представлены результаты исследования проникновения анионного ФС эритрозина внутрь грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* после воздействия ударных волн, генерируемых путем быстрого локального нагрева среды. Локальный нагрев осуществлялся с помощью коротких (10 нс) импульсов сфокусированного лазерного излучения, возбуждающих молекулы-термосенсибилизаторы, в роли которых выступал тот же эритрозин. Квантовый выход интеркомбинационной конверсии у молекул эритрозина близок к единице, поэтому при концентрации красителя 0.5 мМ уже при плотности мощности P возбуждения 1–2 МВт/см² примерно через 2 нс после начала возбуждения практически все молекулы в растворе переходят в триплетное состояние. Полосы поглощения из основного и триплетного состояний в красителях сильно перекрываются, и оставшаяся часть световой энергии поглощается молекулами в триплетном состоянии с заселением высоких электронно-возбужденных состояний [17–21]. При плотности мощности возбуждения выше 5–7 МВт/см² «включается» канал поглощения из первого возбужденного синглетного состояния с заселением высоких синглетных уровней энергии. Время жизни высоких электронно-возбужденных состояний, как правило, не превышает единиц пикосекунд, а основной канал релаксации – безызлучательная внутренняя конверсия с передачей тепла окружению [22–24]. При мощном импульсном возбуждении молекул эритрозина обеспечивается очень быстрый локальный нагрев среды с генерацией ударных акустических волн. Учитывая, что эритрозин является эффективным генератором активных форм кислорода, пермеабилитацию мембран бактерий с последующим проникновением красителя в клетки оценивали сравнивая выживаемость бактерий в результате фотодинамической обработки до и после воздействия ударных волн.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Материалы. Для исследований использовали суточные культуры клеток *Pseudomonas aeruginosa* (коллекция Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН). Перед облучением бактерии переносились в физиологический раствор (0.9%-й водный раствор NaCl). Плотность полученной суспензии стандартизировали фотометрически с помощью спектрофотометра Immunochem-2100 (HighTechnology Inc., США) на дли-

не волны 600 нм. Для оценки выживаемости бактерий, обработанных видимым светом (532 нм) до и после воздействия ударными волнами, применяли метод подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Количество КОЕ определяли через 24 ч роста на цетримидном агаре при температуре 37°C. Величина КОЕ до воздействия ударных волн, добавления красителя и облучения составляла $(30.0 \pm 5.3) \times 10^6$ /мл.

Возбуждение и регистрация ударных волн. Экспериментальная установка для генерации и регистрации ударных волн в растворах красителей описана в работе [25]. Растворы помещали в прямоугольную кварцевую кювету сечением 5×20 мм² и облучали через ее торцевую стенку. Источником возбуждения служил импульсно-периодический YAG:Nd-лазер (вторая гармоника $\lambda = 532$ нм, длительность импульса 10 нс, Solar LS, Беларусь).

С помощью цилиндрической собирающей линзы лазерный луч фокусировался в перетяжку с апертурой 3.5×0.35 мм². Плотность мощности возбуждения была максимальна в фокусе и регулировалась в пределах 0.1–10 МВт/см². В области фокусировки происходил локальный нагрев и возникали ударные волны. Термосенсибилизатором служил анионный ксантоновый краситель эритрозин, концентрация которого в растворах составляла 0.25–0.50 мМ. Часть света после перетяжки проникала в раствор (рис. 1а). При плотности мощности 10 МВт/см² и концентрации красителя 0.5 мМ возбуждающее излучение проникало вглубь раствора на расстояние менее 10 мм.

Вдоль перетяжки линзы (или параллельно ей на регулируемом расстоянии) пропускали зондирующий луч диаметром 1 мм от невозмущающего маломощного (менее 1 мВт) He–Ne-лазера. Прошедший сквозь кювету луч попадал на входную щель монохроматора МДР-41 (ОКБ «Спектр», Россия). Интенсивность прошедшего луча измеряли с помощью фотоэлектронного умножителя ФЭУ-84.

Эритрозин в невозбужденном состоянии не поглощает свет длины волны 632 нм. После возбуждения раствора излучением YAG:Nd-лазера (532 нм) образуются долгоживущие триплетные состояния молекул красителя, происходит локальный нагрев среды и возникают ударные волны. Измеряя пропускание зондирующего луча на разном расстоянии от перетяжки, можно зарегистрировать наведенное триплет-триплетное поглощение и рефракцию зондирующего луча при его пересечении распространяющейся акустической волной (рис. 1б).

На рис. 1б представлено изменение интенсивности зондирующего луча на расстоянии 5 мм от перетяжки. После окончания возбуждающего

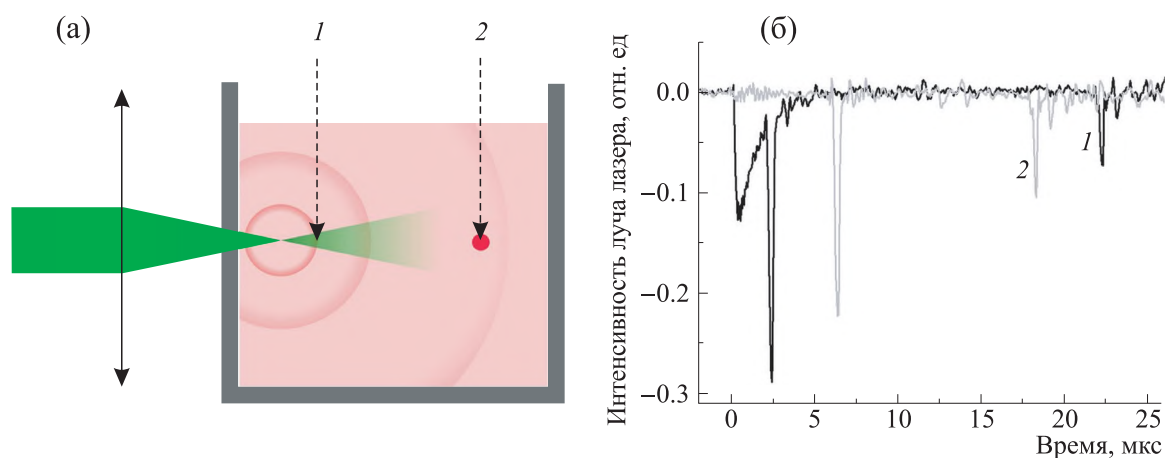


Рис. 1. (а) — Схема облучения образцов в кювете. (б) — Кинетические кривые пропускания зондирующего луча He-Ne-лазера на разных расстояниях от перетяжки возбуждающего пучка: кривая 1 — на расстоянии 5 мм от перетяжки, кривая 2 — на расстоянии 11.4 мм от перетяжки.

импульса интенсивность прошедшего луча уменьшается и затем за время около 5 мкс восстанавливается до первоначального значения. Уменьшение пропускания обусловлено наведенным триплет-триплетным поглощением молекул эритрозина. Время жизни триплетных состояний красителя в физрастворе при нормальных условиях составляет около 3 мкс. Резкий провал в момент времени около 2.5 мкс на фоне кривой наведенного поглощения возникает из-за рефракции зондирующего луча и его смещения от центра входной щели монохроматора в момент пересечения распространяющейся акустической волной. На рис. 1б в области 22.5 мкс виден еще один провал. Это результат рефракции зондирующего луча при его пересечении волной, отраженной от задней стенки кюветы.

На этом же рисунке представлено пропускание зондирующего луча на расстоянии 11.4 мм от перетяжки линзы. На таком расстоянии уже нет наведенного поглощения, поскольку в эту область кюветы не проникает возбуждающий свет и нет молекул в триплетном состоянии, но уверенно регистрируется ударная волна (на шкале времени около 6.5 мкс), возникающая в перетяжке линзы и распространяющаяся в среде. Видны также отраженные волны (в интервале 18–20 мкс) от разных поверхностей кюветы. По известному времени между моментами пересечения зондирующего луча прямой и отраженной волной была определена скорость волны, которая составила 1495 ± 30 м/с, что совпадает со скоростью звука в физиологическом растворе. Таким образом, из-за трехмерной формы кюветы поле давления в пробирке неоднородно, и на бактерии в растворе действуют прямые и отраженные акустические волны.

Для определения угла преломления луча была построена кривая распределения интенсивности излучения по сечению зондирующего пучка с шагом 50 мкм (диаметр пучка 1 мм). По уменьшению интенсивности света из-за преломления луча в момент прохождения ударной волны оценивали расстояние, на которое луч отклонялся от центра входной щели монохроматора. На расстоянии 300 мм от кюветы отклонение луча составляло от 0.22 ± 0.02 мм до 0.31 ± 0.03 мм, что соответствует углам отклонения от $3'$ до $6'$. По известному отклонению луча от начальной траектории определяли изменение показателя преломления света.

Задача об измерении показателя преломления воды при высоких динамических давлениях и связи коэффициента преломления с плотностью жидкости и давлением решена в работе [27]. Используя эмпирическую формулу связи показателя преломления n с плотностью ρ воды ($n = 1.332 + 0.322(\rho - 1)$), оценили изменение плотности среды при прохождении прямых и отраженных волн в 1.017 ± 0.008 и 1.011 ± 0.005 г/см³ соответственно (в отсутствие возмущений плотность раствора составляла 1.005 г/см³), а соответствующие пиковые давления — 26.4 ± 5.3 и 13.1 ± 2.6 МПа. Результаты измерений сильно зависят от колебаний энергии лазерного импульса, генерирующего ударные волны в каждом эксперименте.

Фотодинамическая обработка бактерий. Квантовый выход в триплетное состояние в молекулах эритрозина в воде близок к единице [28] и этот краситель обладает выраженной фотодинамической активностью [29, 30]. При этом аФДТ существенно возрастает, если ФС проникает внутрь клеток [6–8]. Мы использовали это обстоятельство для оценки изменения выживаемости

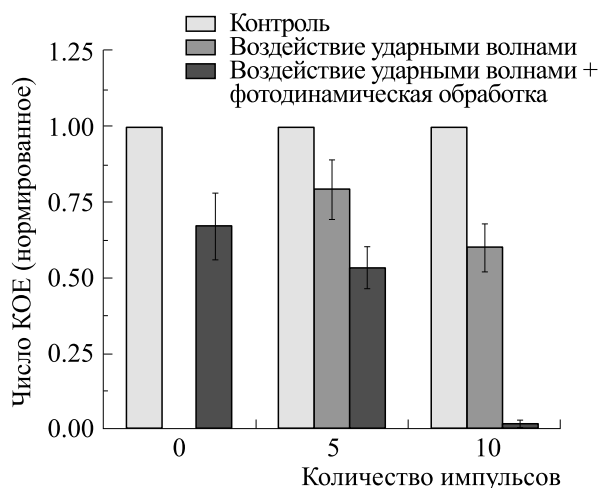


Рис. 2. Изменение числа колониеобразующих единиц *P. aeruginosa* после воздействия на суспензию 0, 5 и 10 сфокусированных импульсов YAG:Nd-лазера и последующего облучения галогенной лампой в течение 5 мин.

бактерий вследствие повышения проницаемости клеточных мембран под воздействием ударных волн. После воздействия на бактерии 5 или 10 ударными волнами на расстоянии 15 мм от перетяжки (на рис. 1 область обозначена кружком) отбирали контрольную пробу. На таком расстоянии от области фокусировки возбуждающего луча исключается термическое и фотодинамическое воздействие на клетки. Затем раствор облучали в течение 5 мин коллимированным пучком света от галогенной лампы через светофильтр СЗС-22 с плотностью мощности около 100 мВт/см^2 в полосе поглощения эритрозина. Сравнивали значения КОЕ бактерий после фотодинамической обработки до и после воздействия на них ударных волн (рис. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 показаны гистограммы величин КОЕ: контрольной суспензии бактерии с красителем, той же суспензии после фотодинамической обработки, после воздействия 5 и 10 ударными волнами и суспензии бактерий с красителем после воздействия 5 и 10 ударными волнами с последующей фотодинамической обработкой в течение 5 мин.

Как видно из гистограмм на рис. 2, после облучения суспензии с бактериями в присутствии эритрозина в течение 5 мин светом в полосе поглощения красителя с плотностью мощности около 100 мВт/см^2 , даже без воздействия на микроорганизмы ударных волн, имеет место фотодинамический эффект. Количество КОЕ уменьшается более чем на 30%, что свидетельствует о

высокой фотодинамической активности эритрозина по отношению к бактериям *P. aeruginosa*.

После воздействия 5 ударных волн КОЕ снижается вследствие деструктивного действия ударных волн на бактерии (рис. 2). Ранее было показано, что ударные волны способны разрушать мембраны клеток [31]. Однако наиболее интересный результат в контексте задачи настоящей работы – повышение эффективности аФДТ после воздействия на клетки ударными волнами. Фотодинамическая обработка растворов после воздействия 5 ударных волн приводит к дополнительному сокращению жизнеспособности микроорганизмов. Еще более выражено данный эффект проявляется после воздействия на клетки 10 ударных волн. Как следует из рис. 2, выживаемость бактерий после аФДТ составляет лишь 2%. В отдельных экспериментах при последовательном воздействии на клетки волна + облучение жизнеспособность утрачивали все микроорганизмы. Объяснить данный экспериментальный факт можно только изменением проницаемости плазматической мембраны под воздействием ударных волн, проникновением эритрозина внутрь клеток и существенным повышением эффективности аФДТ.

Механизм пермеабилзации клеток под воздействием ударных волн пока окончательно неясен. Авторы работы [32] показали, что проницаемость клеточной мембраны зависит от профиля ударной волны. Условием повышения проницаемости мембран названа соизмеримость ширины волны на полувысоте с размерами клеток. Поры образуются на мембране при возникновении резких градиентов давления. Деформация происходит из-за неравномерного распределения

давления и локального разрыва прикреплений мембраны к цитоскелету в областях высокого давления в клетках.

В работе [33] временное увеличение проницаемости клеток обосновано возникновением силы сдвига на плазматической мембране, вызываемой ударной волной. В жидкости *in vitro* клетки движутся в направлении распространения волны, и между клеткой и жидкой фазой возникают напряжения сдвига. Сила, действующая на мембраны, увеличивается пропорционально разности скоростей движения клеток и жидкости. Сделан вывод о том, что доминирующим фактором повышения проницаемости мембран живых клеток является импульс ударной волны (т.е. давление, интегрированное во времени), а не пиковое давление.

Если принять этот механизм за основу, то рост количества пермеабилizованных клеток с увеличением числа ударных волн в наших экспериментах, по-видимому, связан с тем, что клетки имеют разное «исходное» количество мембранных пор, увеличивающихся при возникновении сил сдвига на текучей плазматической мембране при каждом воздействии ударной волны. Анионный краситель эритрозин проникает в клетки только при определённых размерах пор на мембране. При этом следует учитывать, что на бактерии действуют как прямые волны, так и волны, отражённые от разных поверхностей, каждая из которых даёт вклад в увеличение проницаемости мембран.

Анализ литературных данных о временном изменении проницаемости мембран клеток под действием ударных волн, инициированных в жидких средах разными способами, указывает на зависимость процесса от типа клеточной линии. Эффективность пермеабилizации зависит от плотности внутриклеточных органелл, подвижности (текучести) мембран клеток и от стадии клеточного цикла. Мы использовали клетки на стадии экспоненциальной фазы роста. Неизменной остаётся возможность повышения результативности аФДТ за счёт проникновения ФС в бактериальные клетки после их предварительной обработки ударными волнами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предварительная пермеабилizация мембран ударными волнами значительно усиливает фотодинамическое воздействие сенсibilizатора на бактериальные клетки. В зависимости от способа возбуждения сенсibilizатор может служить одновременно и фотодинамическим агентом, и тепловым источником, генерирующим ударные волны. Ударные волны способны уничтожать клетки вне зависимости от глубины проникновения света и кислорода в среду. Повышение эффективно-

сти фотодинамического действия после предварительной пермеабилizации мембран, безусловно, расширит сферу применения аФДТ, что особенно актуально для грамотрицательных бактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (проект № FSGU-2023-0003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamblin M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **33**, 67 (2016). DOI: 10.1016/j.mib.2016.06.008
2. Huang L., Dai T., and Hamblin M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol. Biol.*, **635**, 155–173 (2010). DOI: 10.1007/978-1-60761-697-9_12
3. Svyatchenko V. A., Nikinov S. D., Mayorov A. P., Gelfond M. L., and Loktev V. B. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 *in vitro* using methylene blue and Radachlorin. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **33**, 102112 (2021). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102112
4. Lago A. D. N., Fortes A. B. C., Furtado G. S., Menezes C. F. S., and Goncalves L. M. Association of antimicrobial photodynamic therapy and photobiomodulation for herpes simplex labialis resolution: case series. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **32**, 102070 (2020). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102070
5. Fabio G. B., Martin B. A., Dalmolin L. F., and Lopez R. F. V. Antimicrobial photodynamic therapy and the advances impacted by the association with nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, **80**, 104147 (2023). DOI: 10.1016/j.jddst.2022.104147
6. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B*, **39** (1), 1–18 (1997). DOI: 10.1016/s1011-1344(96)07428-3
7. Кустов А. В., Гарасько Е.В., Белых Д. В., Худяева И. С., Старцева О. М., Макаров В. В., Стрельников А. И. и Березин Д. Б. Фотосенсиби-

- лизаторы хлоринового ряда для антимикробной фотодинамической терапии. *Успехи современного естествознания*, **12** (2), 263 (2016). DOI: 10.17513/use.36297
8. O'Neill J. *Tackling a global health crisis: initial steps. The Review on Antimicrobial Resistance* (Review on antimicrobial resistance, London, 2015). <https://amr-review.org/sites/default/files/Report-52.15.pdf>
 9. Napala I. Breaking the Barrier: Methods for reversible permeabilization of cellular membranes *Crit. Rev. Biotechnol.*, **17**, 105 (1997). DOI: 10.3109/07388559709146609
 10. Liu, J., Lewis T. N., and Prausnitz M. R. Non-invasive assessment and control of ultrasound-mediated membrane permeabilization. *Pharm. Res.*, **15**, 918 (1998). DOI: 10.1023/a:1011984817567
 11. Huber P. E. and Pesterer P. *In vitro* and *in vivo* transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Ther.*, **7**, 1516 (2000). DOI: 10.1038/sj.gt.3301242
 12. Ho S. Y. and Mittal G. S. Electroporation of cell membranes: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **16**, 349 (1996). DOI: 10.3109/07388559609147426
 13. Lauer U., Burgelt E., Squire Z., Messmer K., Hofschneider P. H., Gregor M. and Delius M. Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Ther.*, **4**, 710–715 (1997). DOI: 10.1038/sj.gt.3300462
 14. Gambihler S., Delius M., and Ellwart J. W. Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves. *J. Membr. Biol.*, **141**, 267–275 (1994). DOI: 10.1007/BF00235136
 15. Lee, S. and Doukas A. G. Laser-generated stress waves and their effects on the cell membrane. *J. Sel. Top. Quant.*, **5**, 997–1003 (1999). DOI: 10.1109/2944.796322
 16. Mulholland S. E., Lee S., McAulie D. J., and Doukas A. G. Cell loading with laser-generated stress waves: the role of the stress gradient. *Pharm. Res.*, **16**, 514–518 (1999). DOI: 10.1023/a:1018814911497
 17. Alfimov M. V., Batekha I. G., Sheck Yu. B., and Gerko V. I. Triplet-triplet absorption and energy transfer from high triplet states. *Spectrochimica Acta. Part A: Mol. Spectr.*, **27**, 329–341 (1971). DOI: 10.1016/0584-8539(71)80039-9
 18. Летохов В. С. *Нелинейные селективные фотопроцессы в атомах и молекулах* (Наука, М., 1983).
 19. Nickel B. and Roden G. Stepwise two-photon excitation of tetracene; fluorescence from upper excited singlet states. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **81** (3), 281–285 (1977). DOI: 10.1002/bbpc.19770810308
 20. Tobita S., Kaisu Y., Kobayashi H., and Tanaka I. Study of higher excited singlet states of zinc(II)-tetraphenylporphyrin. *J. Chem. Phys.*, **81** (7), 2962–2969 (1984). DOI: 10.1063/1.448046
 21. Orner G. C., Topp M. R. Biphotonic laser excitation of upper singlet state fluorescence in organic dyes. *Chem. Phys. Lett.*, **36** (5), 295–300 (1975). DOI: 10.1016/0009-2614(75)80240-5
 22. Lin H.-B. and Topp M. R. Low quantum-yield molecular fluorescence. Aromatic hydrocarbons in solution at 300 K. *Chem. Phys. Lett.*, **46** (2), 251–255 (1977). DOI: 10.1016/0009-2614(77)80309-6
 23. Ermolaev V. L. Ultrafast nonradiative transitions between higher excited states in organic molecules *Russ. Chem. Rev.*, **70**, 471–490 (2001). DOI: 10.1070/RC2001v070n06ABEH000657
 24. Nagaoka C., Fujita M., Takemura T., and Baba H. Fluorescence from an upper excited state of o-hydroxybenzaldehyde in the vapor phase. *Chem. Phys. Lett.*, **123** (6), 489–492 (1986). DOI: 10.1016/0009-2614(86)80048-3
 25. Letuta S. N., Pashkevich S. N., Ishemgulov A. T., and Nikiyan A. N. Inactivation of planktonic microorganisms by acoustic shock waves. *Russ. J. Phys. Chem. A*, **95** (4), 848–854 (2021). DOI: 10.1134/S0036024421040142
 26. Letuta S. N., Ishemgulov A. T., Dorofeev D. V., and Tsurko D. E. Kinetics of induced absorption of multi-atomic molecules during two-photon excitation. *Bull. of the Lebedev Physics Institute*, **50**, 54–59 (2023). DOI: 10.3103/S1068335623130055
 27. Yadav H. S., Murty D. S., Verma S. N., Sinha K. H. C., Gupta B. M., and Chand D. Measurement of refractive index of water under high dynamic pressures. *J. Appl. Phys.*, **44**, 2197–2200 (1973). DOI: 10.1063/1.1662536
 28. Rohatgi-Mukherjee K. K. *Fundamentals of photochemistry* (Wiley Eastern Ltd., New Delhi, Bangalore, Bombay, 1978). DOI: 10.1002/bbpc.19790830824
 29. Tokubo L. M., Rosalen P. L., and Cássia J. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagn. Photodynam. Ther.*, **23**, 94–98 (2018). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.05.004
 30. Fracalossi C., Nagata J. Y., Pellosi D. S., Terada R., Hioka N., Baesso M. L., Sato F., Rosale P. L., Caetano W., and Fujimaki M. Singlet oxygen production by combining erythrosine and halogen light for photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans*. *Photodiagn. Photodynam. Ther.*, **15**, 127–132 (2016). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.06.011
 31. Letuta S. N., Ishemgulov A. T., Nikiyan A. N., Razdobreev D. A., Galaktionova L. V., Dorofeev D. V., and Tsurko D. E. Mechanisms of damage in *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* upon pulse photoexcitation of molecular sensitizers. *Biophysics*, **67**, 419–426 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922030137
 32. Ito Y., Veysset D., Kooi S. E., Martynowych D., Nakagawa K., and Nelson K. A. Interferometric and fluorescence analysis of shock wave effects on cell membrane. *Communications Physics*, **3** (2020). DOI: 10.1038/s42005-020-0394-3
 33. Kodama T., Hamblin M. R., and Doukas A. G. Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse. *Biophysical Journal*, **79**, 1821–1832 (2000). DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76432-0

Shock Wave-induced Cell Membrane Permeabilization of *Pseudomonas aeruginosa***S.N. Letuta*, A.T. Ishemgulov*, O.K. Davydova*, A.N. Nikiyan*, and M.E. Grigoriev*****Orenburg State University, prosp. Pobedy 13, Orenburg, 460018 Russia*

Effects of acoustic shock waves on membrane permeability of Gram-negative bacteria *P. aeruginosa* for an anionic photosensitizer, such as erythrosine, were studied. Shock waves were generated by rapid local medium heating due to nonradiative relaxation of high electronically excited states of photosensitizer molecules introduced with a high-power laser pulse. It has been shown that upon exposure to shock waves bacteria display an increase in membrane permeability; erythrosine enters the cells, followed by an increase in the photodynamic efficacy on microorganisms.

Keywords: shock waves, cell membrane permeabilization, antimicrobial photodynamic therapy

ЭФФЕКТЫ САЛИЦИЛОВОЙ И АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТ В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2024 г. Т.В. Ильич*, #, А.И. Савко*, Т.А. Коваленя*, Е.А. Лапшина*, И.Б. Заводник*

*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
бульв. Ленинского Комсомола, 5, Гродно, 230009, Беларусь

#E-mail: ilych_tv@grsu.by

Поступила в редакцию 16.01.2024 г.

После доработки 06.02.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

С целью дальнейшего выяснения механизмов фармакологических эффектов салициловой и ацетилсалициловой кислот изучены взаимодействия этих кислот с митохондриальными и эритроцитарными мембранами и оценена роль ионов кальция/протонов в эффектах салицилатов. Салициловая и, в меньшей степени, ацетилсалициловая кислоты в концентрации 0.5–2.0 мМ эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс, нарушая сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования, индуцировали деполаризацию митохондриальной мембраны и потенцировали Ca^{2+} -стимулируемое формирование митохондриальных пор высокой проницаемости в средах, не содержащих ЭГТА. Циклоспорин А и рутений красный частично ингибировали процесс открытия митохондриальных пор, индуцируемый салициловой и ацетилсалициловой кислотами как в отсутствие, так и в присутствии ионов Ca^{2+} . Салициловая кислота (180–360 мкМ) выражено ускоряла протон-индуцированный лизис (при pH 3.2) эритроцитов человека и вызывала гиперполяризацию мембран эритроцитов (при pH 5.5, но не при pH 7.4), вероятно, в результате переноса протонов в цитоплазму клетки. Таким образом, салициловая и ацетилсалициловая кислоты взаимодействуют с митохондриальными и плазматическими мембранами, выступают эффективными протоно-/ Ca^{2+} -ионофорами, стимулируют митохондриальный кальциевый унипортер.

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота, салициловая кислота, митохондрии печени крыс, эритроциты человека, ионы кальция.

DOI: 10.31857/S0006302924050073, EDN: MKGOYO

Ацетилсалициловая кислота (АСК, аспирин), нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП), представляет собой наиболее известный и наиболее часто назначаемый лекарственный препарат, эффективное жаропонижающее, антитромботическое и обезболивающее средство. Противовоспалительное действие АСК проявляется в первую очередь опосредовано путем ингибирования синтеза простагландинов. Один из основных механизмов действия аспирина связан с прямой модификацией (ацетилированием) остатков аминокислоты серина в молекулах бел-

ков и ферментов [1]. Лечение острых и хронических сердечно-сосудистых заболеваний связано с длительным приемом НПВП, в первую очередь салицилатов. В то же время последние клинические и эпидемиологические исследования демонстрируют новые механизмы действия и новые, в том числе противораковые, эффекты аспирина и других НПВП [2], возможность коррекции нейродегенеративной патологии. Недавно показано, что салсалат (Salsalate), пролекарство, метаболизирующее в организме до салицилата, демонстрирует благоприятные эффекты при диабете 2 типа и неалкогольной жировой болезни печени, уменьшает уровень глюкозы и содержание липидов в печени [3]. Ранее мы показали благоприятные эффекты длительного введения АСК при экспериментальном диабете у крыс, которые, как мы предполагаем, связаны с конкуренцией реакций неферментативного гликозилирования и ацетилирования белков АСК [4].

Сокращения: АСК – ацетилсалициловая кислота, НПВП – нестероидный противовоспалительный препарат, СК – салициловая кислота, VDAC – потенциал-зависимый анионный канал, МРТР – митохондриальная пора высокой проницаемости, ЭГТА – натриевая соль этиленгликольтетрауксусной кислоты, RuR – рутений красный, CsA – циклоспорин А, DiSC3(5) – 3,3'-дипропил-тиадикарбодиазанин иодид, MCU – митохондриальный кальциевый унипортер.

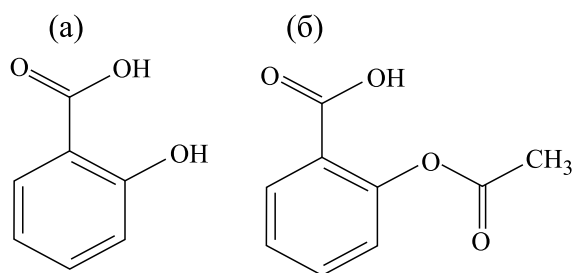


Рис. 1. Структурные формулы салициловой (а) и ацетилсалициловой (б) кислот.

Постоянный интерес к биохимическим эффектам салициловой и ацетилсалициловой кислот (рис. 1) направлен на выяснение тонких регуляторных механизмов и поиск новых фармакологических приложений этих лекарственных средств. Многие фармакологические и токсические эффекты салицилатов объясняют действием на организацию и стабильность биологических мембран. Ранее, используя эритроцитарные и липосомальные мембраны в качестве модельной системы, было показано прямое взаимодействие салициловой кислоты (СК) и ее производных с фосфолипидами и пертурбирующее воздействие на мембраны [5].

Хорошо охарактеризованы регуляторные эффекты салициловой кислоты как фитогормона в растительных клетках: СК в диапазоне 0.01–5 мМ, эффективно накапливаясь в клетках табака (*Nicotiana tabacum*), блокирует поток электронов в митохондриях к пулу убихинонов, ингибирует потребление кислорода в состоянии 3, разобщая митохондриальное дыхание, регулирует экспрессию ряда салицилат-зависимых генов [6]. СК изменяет морфологию и функциональную активность митохондрий в растительных клетках в зависимости от дозы и длительности воздействия, ингибирует процесс окислительного фосфорилирования, является эффективным регулятором митохондриально-опосредованной передачи сигналов защиты и апоптоза. Однако в деталях механизмы действия салицилата в растительной клетке неизвестны [7].

АСК и СК эффективно взаимодействуют с внутриклеточными сигнальными путями, включая митоген- и АМР-активируемые каскады протеинкиназ, рибосомальную S6-киназу, активируют факторы TGF- β и NF- κ B, регулируют рост и гибель клеток [8]. При этом митохондрии рассматриваются в качестве основной внутриклеточной мишени действия АСК и СК. Салицилаты увеличивают АТФ- и иономицин-зависимое поступление ионов Ca^{2+} в митохондрии, индуцируют апоптотическую гибель клеток, модулируя митохондриальный потенциалзависимый анионный канал (VDAC – voltage-dependent anion chan-

nel) [2]. Ростом митохондриальной протонной проводимости и прямым нарушением митохондриального сопряжения в присутствии СК объясняют подавление салицилатами липогенеза *de novo* [3].

Уже в классических работах 1950-х годов были показаны разобщение салицилатами дыхания и окислительного фосфорилирования, деполяризация митохондриальной мембраны, ингибирование АТФазы, набухание митохондрий за счет эффекта СК как переносчика протонов [9, 10]. Известно, что аспирин вызывает апоптоз многих типов клеток, в том числе тромбоцитов, при этом АСК дозозависимо индуцировала диссипацию митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), экспонирование фосфатидилсерина клеточных мембран и активацию каспазы-3 в тромбоцитах [11].

Авторы работы [12] продемонстрировали, что СК ингибирует поглощение и усиливает высвобождение кальция митохондриями, тем самым повышая уровень свободного кальция в цитоплазме. Одновременно СК стимулирует Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий, что приводит к ингибированию транспорта электронов в электрон-транспортной цепи, нарушению сопряжения окисления и фосфорилирования и нарушению синтеза АТФ из АДФ. При этом авторы предполагали, что нарушение гомеостаза ионов Ca^{2+} играет определяющую роль в индуцированной СК митохондриальной дисфункции [12]. В качестве одного из механизмов проапоптотического эффекта АСК было предположено формирование митохондриальной поры высокой проницаемости (MPTP – mitochondrial permeability transition pore) [13].

Митохондрии – динамичные и пластичные клеточные органеллы, биохимически они обеспечивают энергетические потребности клеток, участвуют в разнообразных регуляторных и метаболических процессах в клетке, интегрируют сигнальные каскады, во-многом определяют физиологию и патологию клетки, в том числе процессы апоптоза и некроза [14], выполняют функцию основного сенсора, регулятора и депо ионов кальция, декодера кальциевого сигнала [15]. Ca^{2+} – ключевой внутриклеточный вторичный мессенджер, один из важнейших внутриклеточных сигналов, регулирующих многочисленные физиологические процессы в клетке, ее метаболизм и выживание [16]. Избыточное накопление Ca^{2+} в митохондриях в сочетании с окислительным стрессом, индуцирует апоптотическую гибель клеток, вызывая открытие MPTP, диссипацию митохондриального мембранного потенциала, высвобождение цитохрома С и других проапоптотических факторов [17]. Дисфункция мито-

хондрий, в первую очередь в клетках с высоким потреблением энергии, нарушения энергетики клетки и кальциевого гомеостаза связаны со многими патологическими состояниями, такими как заболевания сердечно-сосудистой системы, нейродегенеративные расстройства, диабет, онкология [18].

Широко известны антиоксидантные свойства СК, которая при взаимодействии с $\cdot\text{OH}$ -радикалами, образует 2,3- и 2,5-дигидроксibenзойные кислоты. В то же время недавно показано, что аспирин и, в меньшей степени, салицилат (≥ 2.5 мМ) вызывали быструю генерацию активных форм кислорода в клетках, что, в свою очередь, приводило к деполяризации плазматической мембраны и активации потенциалзависимых кальциевых каналов, нарушению кальциевого гомеостаза, апоптотической и некротической гибели клеток независимым от каспаз путем [19].

Салицилат (0.3–5 мМ) концентрационно-зависимо индуцировал гибель гепатоцитов, присутствие ионов Ca^{2+} (2.5 мМ) в среде Кребса–Рингера потенцировало токсические эффекты СК [20]. Митохондриальная дисфункция, формирование МРТР, разобщение митохондрий, нарушения митохондриального дыхания и кальциевого гомеостаза, истощение АТФ, окислительный стресс, индуцируемые при окислительном метаболизме АСК в гепатоцитах с участием *cyt P450*, представляют основные факторы повреждения печени салицилатами и играют определяющую роль в патогенезе синдрома Рея (Reye's syndrome). При этом обнаружен синергизм в действии салицилатов и ионов Ca^{2+} [20–22].

Несмотря на многочисленные исследования, механизмы взаимодействия АСК и СК с митохондриальными и клеточными мембранами, во многом определяющие фармакологические и токсические эффекты этих лекарственных средств, эффекты салицилатов на Ca^{2+} -зависимые митохондриальные процессы, требуют дальнейшего выяснения [13]. Цель настоящей работы – сравнительный анализ мембранных эффектов СК и АСК в митохондриях печени и эритроцитах. Мы оценили действие салицилатов на респираторную активность, мембранный потенциал, процесс формирования МРТР в присутствии и в отсутствие ионов Ca^{2+} в изолированных митохондриях печени крыс и воздействие салицилатов на мембранный потенциал, кислотно-устойчивость эритроцитов человека. Полученные нами результаты позволяют предположить, что мишенью действия СК и АСК является липидный бислой митохондриальных и эритроцитарных мембран, где салицилаты выступают в качестве липофильного перенос-

чика ионов кальция/протонов, митохондриальный кальциевый унипортер.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использовали ацетилсалициловую кислоту, салициловую кислоту, динатриевую соль янтарной кислоты (сукцинат), моносодиевую соль глутаминовой кислоты (глутамат), натриевую соль малоновой (яблочной) кислоты, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис-НCl), сахарозу, сафранин О, натриевую соль этиленгликольтетрауксусной кислоты (ЭГТА), валиномицин, карбонилцианид *n*-трифторметоксифенилгидразон, рутений красный (RuR), циклоспорин А (CsA) (Merck KGaA, Германия; Sigma-Aldrich, США); хлорид калия, хлорид натрия, хлорид кальция, соляную кислоту, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, этанол (АО «РЕАХИМ», Россия); флуоресцентный зонд 3,3'-дипропил-тиадикарбоцианин иодид (DiSC3(5) – 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide) (Molecular Probes, США). Все растворы были приготовлены на воде, очищенной в системе Milli-Q Direct (Merck KGaA, Германия).

Эритроциты. Эритроциты человека получали из крови здоровых доноров (Гродненский областной центр трансфузиологии, Гродно, Беларусь), кровь стабилизировали антикоагулянтном цитратом натрия. Эритроциты выделяли центрифугированием при 4°C, 1 000 g, 5 мин (центрифуга Z 32 НК, Hermle Labortechnik GmbH, Германия), тремя циклами ресуспендирования и промывки в 20 объемах изотонического фосфатного буфера (150 мМ NaCl + 1.9 мМ KH_2PO_4 + 8.1 мМ K_2HPO_4 , pH 7.4), тщательно удаляя слой лейкоцитов. Эритроциты использовали непосредственно после выделения.

Мембранный электрический потенциал и кислотный лизис эритроцитов человека. Мембранный потенциал эритроцитов человека определяли, используя потенциал-чувствительный оптический зонд DiSC3(5) [23], как описано нами ранее [24]. Кратко, эритроциты (гематокрит 0.2%) суспендировали в 1 мл изотонического солевого раствора, содержащего 10 мМ Трис-НCl (pH 7.4 или 5.5) и 150 мМ (KCl + NaCl) с изменяющейся концентрацией ионов K^+ в диапазоне от 50 до 140 мМ, и 2 мкМ зонда DiSC3(5). До и после внесения в суспензию АСК и СК после стабилизации интенсивности флуоресценции зонда в пробы вносили специфический K^+ -ионофор валиномицин (1 мкМ) и определяли концентрацию ионов калия во внеклеточной среде $[\text{K}^+]_{\text{out}}$, при которой интенсивность флуоресценции зонда не изменялась после внесения валиномицина. Значение

мембранного потенциала эритроцитов рассчитывали по уравнению Нернста:

$$E_m = RT/F \cdot \ln([K^+]_{out}/[K^+]_{in}),$$

где E_m – мембранный потенциал, R – газовая постоянная, F – константа Фарадея, T – абсолютная температура (295 К). СК, АСК, зонд DiSC3(5) и валиномицин вносили в виде концентрированных этанольных растворов. Внутриэритроцитарную концентрацию ионов калия $[K^+]_{in}$ принимали равной 150 мМ. Концентрация этанола в образцах не превышала 0.4%. Флуоресценцию DiSC3(5) возбуждали при 625 нм и регистрировали при 660 нм (спектрофлуориметр LS-5B, PerkinElmer Inc., Великобритания).

Кинетические кривые кислотного лизиса эритроцитов человека регистрировали спектрофотометрически (спектрофотометр V-650, Jasco, Япония) по изменению оптической плотности суспензии эритроцитов при 700 нм. Эритроциты вносили в 2 мл среды (конечный гематокрит – 0.3%), содержащей 0.05 М цитратно-фосфатный буфер, pH 3.2, 0.14 М NaCl и различные концентрации СК или АСК (исходная концентрация 72 мМ в этаноле) при 22°C. В качестве параметра, характеризующего устойчивость эритроцитов, использовали $t_{1/2}$ – время, соответствующее гемолизу половины клеток.

Митохондрии печени крыс. Митохондрии печени крыс-самцов выделяли в охлажденной среде, содержащей 0.25 М сахарозы, 0.02 М Трис-НСl, pH 7.2, при 4°C, используя метод дифференциального центрифугирования [25] (центрифуга Z 32 НК, Hermle Labortechnik GmbH, Германия). Концентрацию белка определяли методом Лоури [26]. Использовали клинически здоровых (Санитарно-гигиеническое заключение № 33-48/500 от 28.09.2017 г., Центр гигиены и эпидемиологии Первомайского района г. Минск) аутбредных крыс линии Wistar, массой 140–160 г. Каждая экспериментальная группа включала 5–7 животных.

Митохондриальный мембранный потенциал. Потенциал митохондриальной мембраны измеряли спектрофлуориметрически (спектрофлуориметр Solar 2203, Беларусь), используя положительно заряженный липофильный флуоресцентный зонд сафранин О [27, 28]. Объем пробы составлял 3 мл. Среда содержала 0.125 М хлорид калия, 0.05 М сахарозы, 2.5 мМ KH_2PO_4 , 0.01 М Трис-НСl, 5 мМ Mg_2SO_4 , pH 7.5 при 27°C. Концентрация белка в пробе – 0.3 мг/см³. Субстрат – 0.005 М сукцинат.

Формирование митохондриальных пор высокой проницаемости. Исследование Ca^{2+} -индуцируемого набухания митохондрий печени крыс проводили в среде следующего состава: 0.25 М саха-

розы, 0.02 М Трис-НСl, 0.001 М дигидроортофосфата калия, 0.005 М сукцинат, pH 7.2 при 25°C. Концентрация белка в пробе – 0.5 мг/см³. Набухание митохондрий регистрировали спектрофотометрически по изменению оптической плотности суспензии митохондрий во времени при длине волны 520 нм, используя спектрофотометр V-650 (Jasco, Япония) [29].

Респираторная активность митохондрий. Респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс регистрировали полярографически при 26°C, используя электрод Кларка, встроенный в герметическую термостатируемую ячейку объемом 2 мл, измерения проводили с помощью полярографа Hansatech oxytherm+ chamber (Великобритания) [30]. Калибровку полярографического электрода осуществляли, используя сульфит натрия. Образцы суспензии митохондрий, концентрация белка в которых составляла 1 мг/мл, вносили в ячейку со средой, содержащей 0.05 М сахарозы, 0.01 М Трис-НСl, 0.125 М KCl, 2.5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, pH 7.2. В качестве субстратов дыхания использовали сукцинат (5 мМ) или глутамат (5 мМ) + малат (2 мМ), концентрация АДФ – 180 мкМ.

Статистический анализ. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием критерия Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Функциональное состояние изолированных митохондрий печени крыс в присутствии салициловой и ацетилсалициловой кислот. СК в концентрации 0.5–2.0 мМ эффективно ингибировала респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс, энергизованных смесью «малат + глутамат» или сукцинатом: в присутствии возрастающих концентраций салицилата скорость субстрат-зависимого потребления кислорода V_2 возрастала, скорость АДФ-стимулируемого потребления кислорода V_3 выражено уменьшалась, коэффициенты дыхательного контроля V_3/V_2 и фосфорилирования АДФ/О также уменьшались (рис. 2а–г), свидетельствуя о нарушении сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования (субстрат дыхания – малат + глутамат). Эффект АСК на респираторную активность митохондрий был значительно менее выражен по сравнению с СК.

Мы рассмотрели эффект ионов кальция на регуляторную активность салицилатов в митохондриях печени крыс. Рис. 3а–г демонстрирует эффекты СК и АСК на параметры респираторной активности митохондрий в присутствии ионов

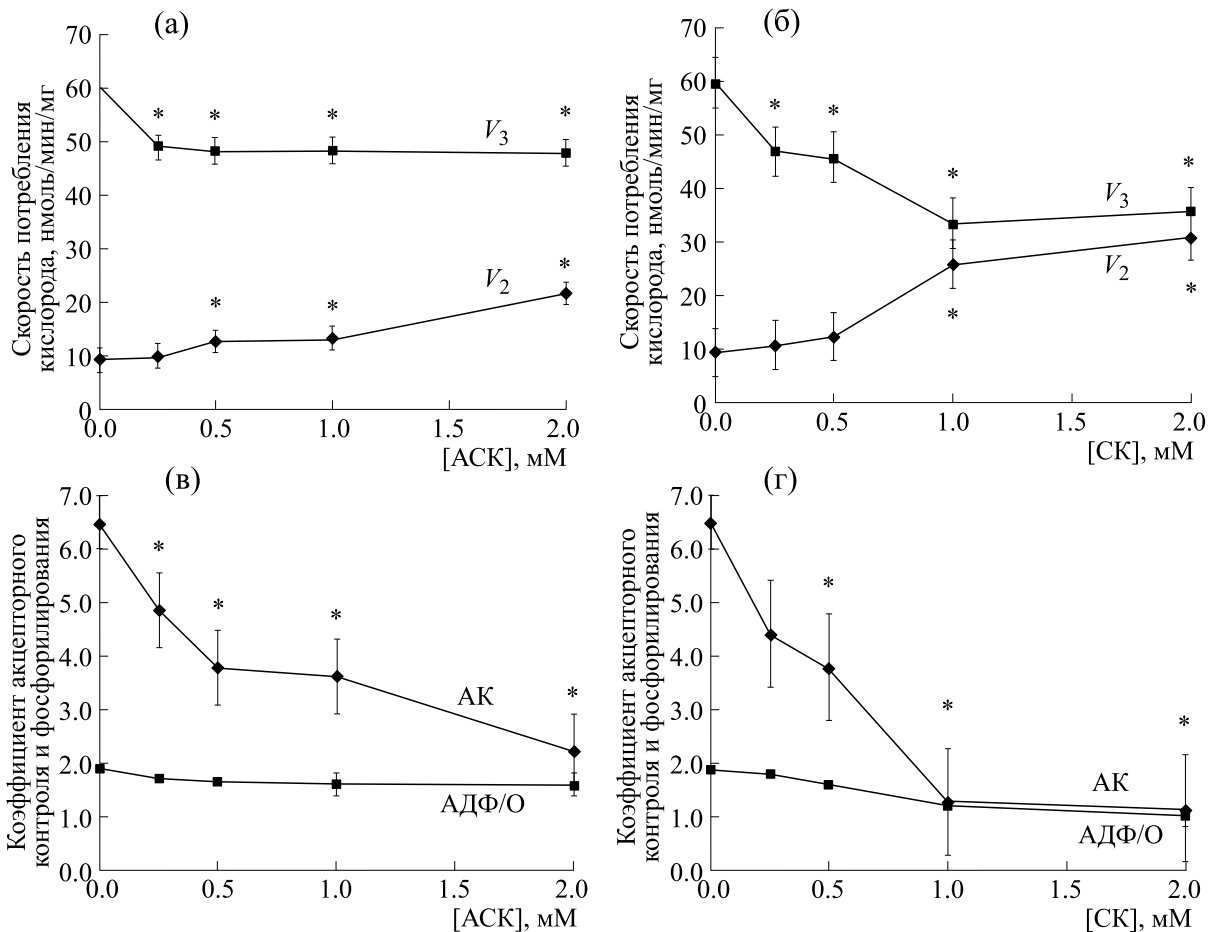


Рис. 2. Эффект СК и АСК на респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс (0.5 мг белка/мл): (а) – скорость потребления кислорода V_2 и V_3 в присутствии АСК, (б) – скорость потребления кислорода V_2 и V_3 в присутствии СК, (в) – коэффициенты акцепторного контроля V_3/V_2 и фосфорилирования АДФ/О в присутствии АСК, (г) – коэффициенты акцепторного контроля V_3/V_2 и фосфорилирования АДФ/О в присутствии СК. Состав среды: 0.05 М сахарозы, 0.01 М Трис-НСl, 0.125 М КCl, 2.5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgSO_4 , pH 7.2, 25°C; энергетические субстраты – 5 мМ L-глутамата + 2 мМ малата. * – Достоверное отличие по отношению к контролю, $p < 0.05$.

Ca^{2+} (30 мкМ). В исследуемой концентрации ионы Ca^{2+} ингибировали респираторную активность митохондрий и достоверно усиливали разобщающий эффект СК и АСК (рис. 3). (Использовали среды, не содержащие хелатора ионов Ca^{2+} – ЭГТА, субстрат дыхания – 5 мМ сукцинат.)

Мы оценили также эффекты АСК и СК на скорость Ca^{2+} -индуцируемого формирования МРТР. Рис. 4 представляет репрезентативные кинетические кривые формирования МРТР при внесении в суспензию митохондрий ионов Ca^{2+} , АСК и СК, а также при совместном внесении АСК/СК + Ca^{2+} . Рис. 4б и 4в демонстрируют эффекты RuR и CsA на процессы формирования МРТР соответственно. Внесение ионов Ca^{2+} (30–150 мкМ) концентрационно-зависимо индуцировало формирование МРТР в митохондриях

печени крыс, энергизованных сукцинатом (рис. 4). При этом предварительное внесение циклоспорина А, ингибитора поры, или рутения красного, конкурентного антагониста митохондриального кальциевого унипортера (MCU), полностью предотвращало Ca^{2+} -индуцируемое формирование МРТР.

СК и АСК (500 мкМ) в отсутствие ионов Ca^{2+} также индуцировали процесс формирования МРТР и стимулировали Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий (рис. 4). Регистрируемая скорость открытия МРТР в присутствии различных концентраций СК была значительно выше по сравнению с АСК. CsA и RuR частично ингибировали процесс формирования МРТР, индуцируемый АСК и СК, как в отсутствие, так и в присутствии ионов Ca^{2+} (рис. 4).

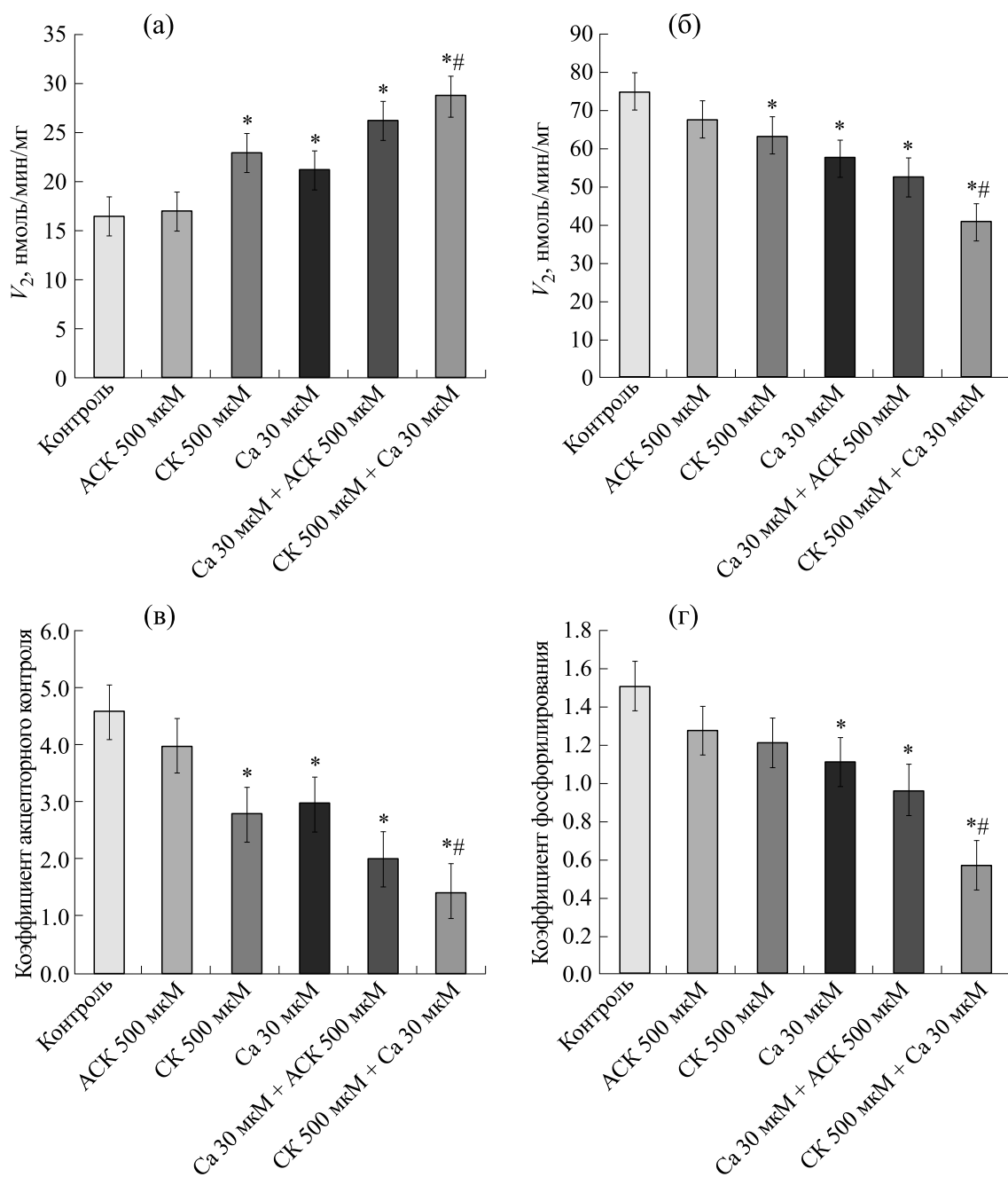


Рис. 3. Эффекты СК и АСК на респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс (0.5 мг белка/мл) в отсутствие и в присутствии ионов Ca^{2+} (30 мкМ): (а) – скорость субстрат-зависимого потребления кислорода V_2 , (б) – скорость АДФ-стимулируемого потребления кислорода V_3 , (в) – коэффициент акцепторного контроля, (г) – коэффициент фосфорилирования (АДФ/О). Состав среды: 0.05 М сахарозы, 0.01 М Трис-НСl, 0.125 М КСl, 2.5 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgSO_4 , рН 7.2, 25°C, субстрат – 5 мМ сукцината. * – Достоверное отличие по отношению к контролю, $p < 0.05$; # – по отношению к Ca^{2+} (30 мкМ), $p < 0.05$.

Возможным результатом нарушения респираторной активности митохондрий и эффективности потребления кислорода, формирования МРТР, а также нарушения протонной проводимости митохондриальной мембраны в присутствии СК/АСК будет диссипация мембранного потенциала митохондрий. В наших условиях ис-

следуемые концентрации СК/АСК (0.5 мМ) не вызывали достоверной деполяризации мембран митохондрий. Внесение в среду ионов Ca^{2+} (30 мкМ) также не влияло на мембранный митохондриальный потенциал. (Более высокие концентрации ионов кальция (70 мкМ) вызывали выраженную диссипацию митохондриального

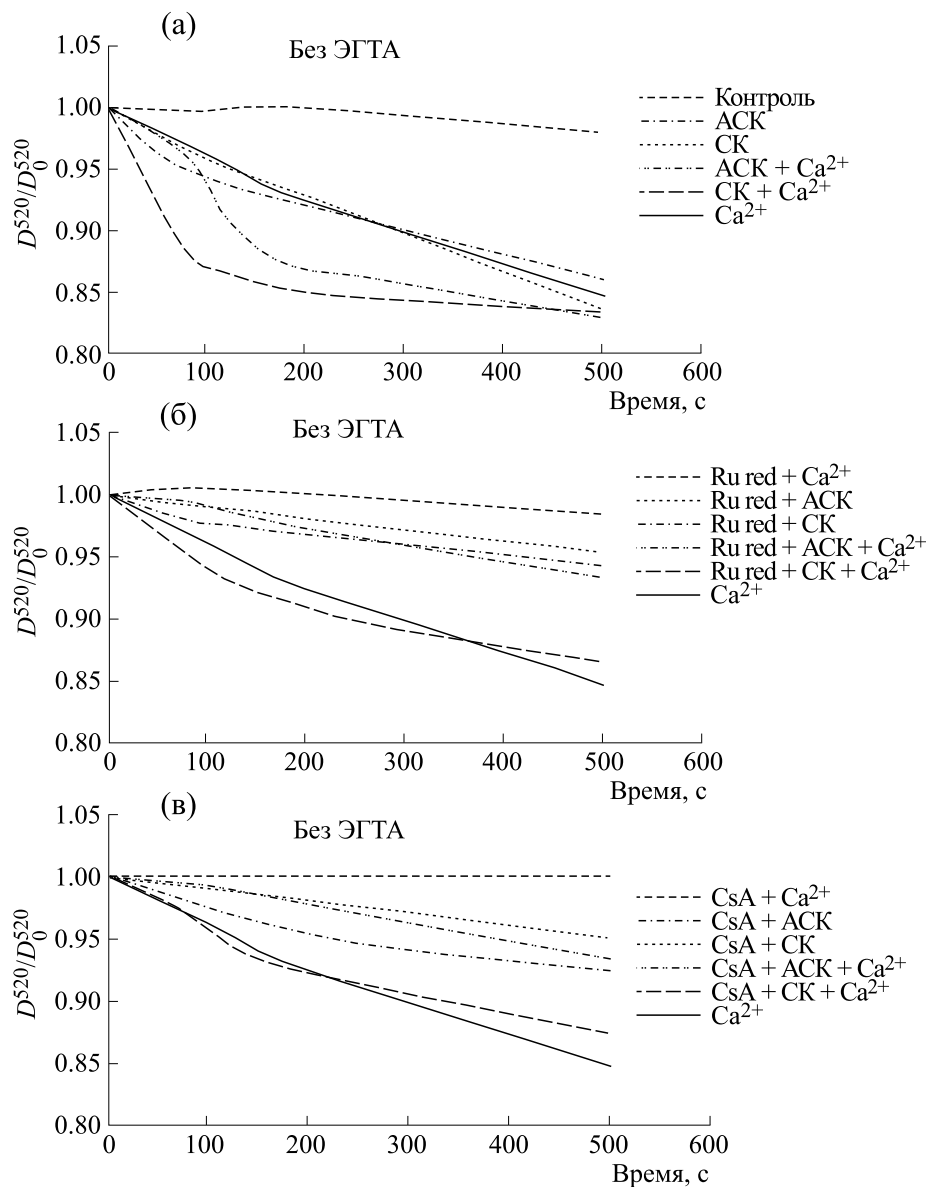


Рис. 4. Репрезентативные кинетические кривые осмотического набухания митохондрий печени крыс, регистрируемые по изменению интенсивности светорассеяния суспензии митохондрий, измеряемой как величина оптической плотности при 520 нм в отсутствие и в присутствии ионов Ca^{2+} (концентрация свободных ионов Ca^{2+} 30 мкМ): (а) – формирование МРТР в присутствии АСК (500 мкМ), СК (500 мкМ), Ca^{2+} (30 мкМ) и совместном внесении СК + Ca^{2+} , АСК + Ca^{2+} ; (б) – влияние рутения красного (Ru red, 1 мкМ) на формирование МРТР в присутствии АСК (500 мкМ), СК (500 мкМ), Ca^{2+} (30 мкМ), СК + Ca^{2+} , АСК + Ca^{2+} ; (в) – влияние циклоспорина А (CsA, 1 мкМ) на формирование МРТР в присутствии АСК (500 мкМ), СК (500 мкМ), Ca^{2+} (30 мкМ) и совместном внесении СК + Ca^{2+} , АСК + Ca^{2+} . В суспензию митохондрий (0.5 мг белка/мл) в среде, содержащей 0.25 М сахарозы, 0.02 М Трис-НСl и 0.001 М KH_2PO_4 , pH 7.2, в присутствии 5 мМ сукцината, вносили ионы Ca^{2+} (30 мкМ) и СК/АСК (500 мкМ).

потенциала, данные не представлены.) Внесение АСА (0.5 мМ) и, в большей степени, СК (0.5 мМ) в присутствии ионов Ca^{2+} (30 мкМ) приводило к выраженной деполяризации митохондриальных мембран (рис. 5). Интерес представляет тот факт, что RuR, ингибитор MCU, предотвращает деполяризацию мембран, вызванную совместным

внесением СК/АСК (0.5 мМ) и Ca^{2+} (30 мкМ), указывая на роль MCU в эффектах СК/АСК (рис. 5). Совместный деполяризующий эффект СК + Ca^{2+} на митохондриальный потенциал был значительно более выражен по сравнению с АСК + Ca^{2+} .

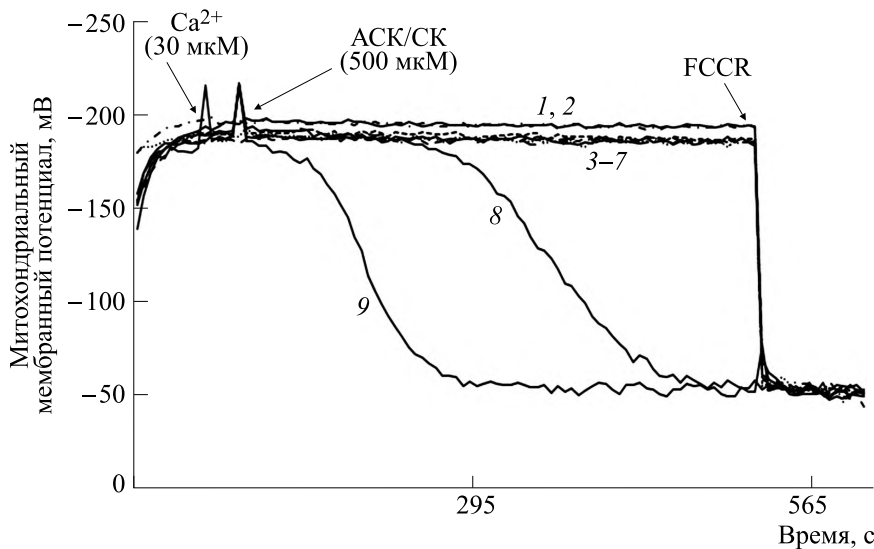


Рис. 5. Репрезентативные кинетические кривые диссипации мембранного потенциала в митохондриях печени крыс, регистрируемые по изменению интенсивности флуоресценции зонда сафранина O: кривая 1 – в отсутствие эффекторов (контроль), кривая 2 – Ca^{2+} (30 мкМ), кривая 3 – Ca^{2+} (30 мкМ) + CsA (1 мкМ), кривая 4 – Ca^{2+} (30 мкМ) + RuR (1 мкМ), кривая 5 – 500 мкМ СК/АСК, кривая 6 – 500 мкМ СК/АСК + Ca^{2+} (30 мкМ) + RuR, кривая 7 – СК/АСК + Ca^{2+} + CsA, кривая 8 – 500 мкМ АСК + Ca^{2+} (30 мкМ), кривая 9 – 500 мкМ СК + Ca^{2+} (30 мкМ). В суспензию митохондрий (0.5 мг белка/мл) в среде, содержащей 0.25 М сахарозы, 0.02 М Трис-НСl и 0.001 М $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4$, рН 7.2, в присутствии 5 мМ сукцината, вносили ионы Ca^{2+} (30 мкМ) и СК/АСК.

Мембранные эффекты СК и АСК в эритроцитах человека. Учитывая известный протонфорный эффект СК и АСК, мы оценили возможность воздействия СК и АСК на устойчивость эритроцитов человека к кислотному гемолизу, связанному с переносом протонов в цитоплазму эритроцитов. Рис. 6 представляет репрезентативные кинетические кривые лизиса эритроцитов, регистрируемые при внесении красных клеток крови в среду с рН 3.2 в присутствии СК (рис. 6а) и АСК (рис. 6б). СК в используемых концентрациях (180–360 мкМ) выражено ускоряла лизис эритроцитов человека (рис. 6а,в). Более гидрофильная АСК оказывала более сложный и менее выраженный эффект: при меньших концентрациях (180 мкМ) АСК уменьшала скорость гемолиза и увеличивала при более высоких концентрациях (360 мкМ), но менее эффективно по сравнению с СК (рис. 6б,в). Вероятно, помимо переноса в цитоплазму литического агента, протонов, АСК взаимодействует с мембраной, повышая ее устойчивость к повреждающему воздействию, при более высоких концентрациях преобладает протонфорный эффект АСК, менее выраженный по сравнению с СК.

Далее мы оценили изменение электрического мембранного потенциала эритроцитов в присутствии СК и АСК (рис. 7). Мембранный потенциал эритроцитов при рН 7.4 (полученное нами значение потенциала равно -14.0 ± 1.7 мВ) существенно не изменяется в присутствии

возрастающих концентраций СК и АСК (0.5–3.0 мМ). Вероятно, при этом значении рН не происходит существенного перемещения ионов в цитоплазму эритроцитов в присутствии салицилатов. При рН 5.5 мы наблюдали определенную деполяризацию мембран эритроцитов (полученное нами значение потенциала равно -4.9 ± 0.6 мВ) по сравнению с рН 7.4. Внесение возрастающих концентраций СК (0.5–3.0 мМ) приводит к существенной гиперполяризации мембраны эритроцитов при рН 5.5. Эффект АСК на электрический потенциал эритроцитарных мембран был менее выражен (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С целью лучшего понимания молекулярных и клеточных механизмов фармакологических и токсических эффектов ацетилсалициловой и салициловой кислот и поиска их молекулярных мишеней мы изучили закономерности взаимодействия АСК и СК с митохондриальными и эритроцитарными мембранами, оценили роль ионов кальция/протонов в эффектах салицилатов, что является необходимым условием эффективного применения НПВП, в том числе при планировании длительного лечения сердечно-сосудистых заболеваний и ряда других патологий, связанных с митохондриальной дисфункцией, нарушением гомеостаза Ca^{2+} .

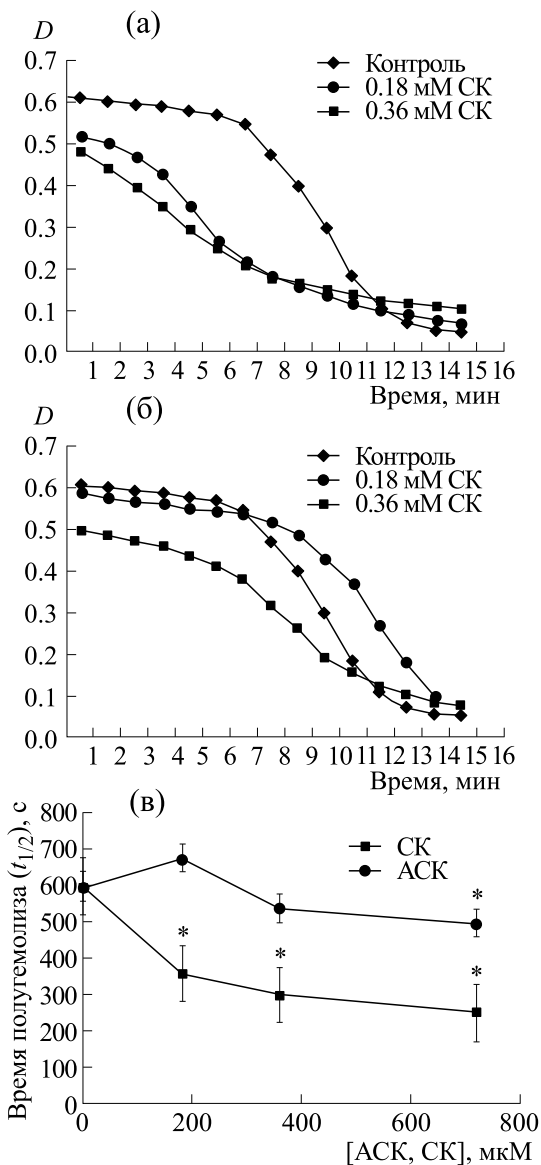


Рис. 6. Протон-индуцируемый лизис эритроцитов человека в присутствии СК и АСК. Лизис регистрировали по изменению интенсивности интегрального светорассеяния суспензии клеток, измеряемой как оптическая плотность суспензии при 700 нм. Эритроциты вносили в 2 мл среды (конечный гематокрит – 0.3%), содержащей 0.05 М цитратно-фосфатный буфер (рН 3.2) + 0.14 М NaCl, и различные концентрации СК или АСК, 22°C. (а) – Репрезентативные кинетические кривые лизиса эритроцитов в отсутствие (контроль) и в присутствии 180 и 360 мкМ СК; (б) – репрезентативные кинетические кривые лизиса эритроцитов в отсутствие (контроль) и в присутствии 180 и 360 мкМ АСК; (в) – зависимости характеристического времени лизиса половины эритроцитов $t_{1/2}$ от концентрации СК и АСК. * – Достоверное отличие по отношению к контролю, $p < 0.05$.

СК – продукт метаболизма и регулятор роста растений, который во многом определяет устойчивость растений к действию патогенов. В ин-

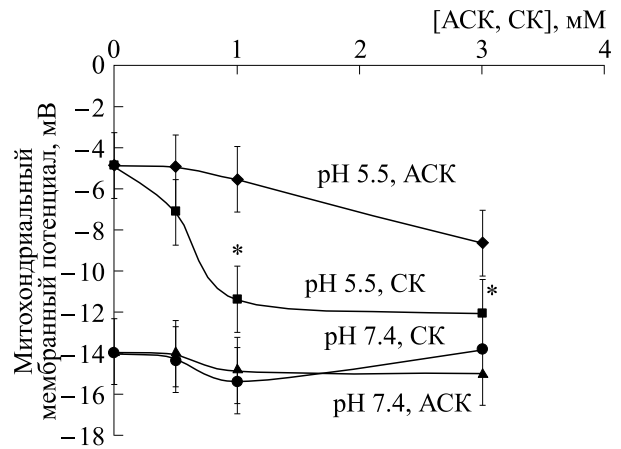


Рис. 7. Влияние СК и АСК на электрический потенциал мембран эритроцитов человека при рН 7.4 и 5.5. Эритроциты (гематокрит 0.2 %) суспендировали в 1 мл изотонического раствора, содержащего 10 мМ Трис-НСl и 150 мМ (KCl + NaCl), 22°C.

тактных клетках томата СК (1 мМ) вызвала рост продукции активных форм кислорода и азота, дезорганизацию митохондриальных крист, дезинтеграцию и вакуолизацию митохондрий, ингибирование митохондриальной гексокиназы, что приводило к гибели клеток [31]. В клетках табака СК в концентрации всего 20 мкМ ингибировала синтез АТФ и респираторную активность, при этом стимулировала альтернативные пути потребления кислорода [32].

В наших экспериментах СК и, менее эффективно, АСК в концентрациях 0.5–2.0 мМ, несколько превышающих фармакологические дозы, эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс в среде, не содержащей хелатор ионов Ca^{2+} ЭГТА, нарушая сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования. Ионы кальция (концентрация свободных ионов – 30 мкМ) также нарушают митохондриальное сопряжение в отсутствие салицилатов и потенцируют разобщающий эффект АСК и СК (0.5 мМ).

Одним из механизмов повреждающего воздействия салицилатов может быть индукция окислительных процессов в митохондриях, присутствие ионов Ca^{2+} может усилить этот процесс. Можно предположить роль окислительно-восстановительных превращений фенольной группы СК в генерации активных форм кислорода. Ранее мы показали, что присутствие ионов Ca^{2+} достоверно увеличивало степень повреждения митохондрий при окислительном воздействии органическим гидропероксидом [33].

Ионы кальция дозозависимо индуцирует формирование МРТР, неселективного высокопроводящего CsA-чувствительного канала во

внутренней митохондриальной мембране, который играет критическую роль в кальциевом обмене между митохондриями и цитоплазмой клетки и регуляции функциональной активности митохондрий и клеток; молекулярная природа канала полностью не выяснена. Предполагают участие АТФазы и адениннуклеотидтранслоказы в формировании этой высокопроводящей поры [34]. Оцененное нами ранее значение константы Михаэлиса K_M взаимодействия ионов Ca^{2+} с мембраной митохондрий печени крыс в процессе формирования МРТР равно 75 ± 20 мкМ [35].

В экспериментах авторов работы [13] взаимодействие салицилата (0.5 мМ) с электрон-транспортной цепью митохондрий печени крыс (предполагают участие Fe-S кластера комплекса I) сопровождалось образованием перекиси водорода и окислительным стрессом, окислением тиоловых групп белков и глутатиона, что далее приводило к индукции МРТР в присутствии ионов Ca^{2+} , истечению цитохрома *c* и проапоптотических факторов, коллапсу митохондриального мембранного потенциала, нарушению окислительного фосфорилирования и β -окисления. Авторы обсуждают несколько механизмов индукции салицилатом формирования МРТР: взаимодействие салицилата непосредственно с порообразующей структурой, интеркалирование в митохондриальную мембрану, что будет способствовать открытию пор, генерация активных форм кислорода [13]. Авторы работы [36] показали, что АСК (1–10 мМ), как и диклофенак (0.01–0.1 мМ), обратимо ингибировали глюконеогенез и стимулировали гликогенолиз и гликолиз в перфузируемой печени крыс, что связано с разобщающим воздействием на окислительное фосфорилирование и коллапсом митохондриального потенциала (при 5 мМ аспирина). В то же время меньшие концентрации АСК (250 мкМ) не влияли на параметры сукцинат-зависимого потребления кислорода в отсутствие ионов кальция и выражено ингибировали потребление кислорода, фосфорилирование АДФ в присутствии 150 мкМ Ca^{2+} [22, 37]. Уже в ранних работах было показано, что СК и АСК увеличивали проницаемость внутренней митохондриальной мембраны [37], выражено нарушали потребление кислорода в состоянии 3 в результате как ингибирования ключевого фермента цикла Кребса, α -кетоглутаратдегидрогеназы, так и разобщения митохондрий. При этом СК конкурирует с α -кетоглутаратом за центр связывания, в то время как ацетилсалицилат ингибирует фермент неконкурентно, ацетилируя активный центр [38].

В нашем эксперименте СК и АСК (0.5 мМ) потенцировали разобщающий и деполяризующий эффекты ионов Ca^{2+} , стимулировали Ca^{2+} -инду-

цируемое формирование МРТР в изолированных митохондриях печени крыс. RuR, специфический ингибитор MCU, при этом предотвращал формирование митохондриальной поры (частично) и деполяризацию мембран (полностью), индуцируемые СК/АСК + Ca^{2+} . Тот факт, что в нашем эксперименте СК и, в меньшей степени, АСК индуцируют процесс открытия МРТР в отсутствие ионов Ca^{2+} , свидетельствует о том, что стимуляция открытия пор салицилатами происходит не только за счет переноса ионов кальция в матрикс, но и за счет иных механизмов. Следует учитывать возможный протонофорный эффект салицилатов и присутствие Ca^{2+} в следовых концентрациях в средах, не содержащих ЭГТА. Частичное ингибирование CsA салицилат-индуцируемого формирования МРТР позволяет предположить участие CsA-независимого механизма набухания митохондрий в присутствии СК/АСК или СК/АСК + Ca^{2+} . Ранее авторы работы [39] предположили существование двух типов каналов, формируемых в присутствии ионов Ca^{2+} – CsA-зависимого канала и CsA-независимого. Ингибирование RuR активации Ca^{2+} -индуцированного открытия МРТР в присутствии СК или АСК можно рассматривать как указание на роль стимулирования салицилатами митохондриального кальциевого унипортера наряду с прямым переносом ионов Ca^{2+} через мембрану. Подобным образом CsA, блокатор формирования МРТР, предотвращает диссипацию митохондриального потенциала, указывая на роль МРТР как причину деполяризации митохондриальной мембраны. В то же время недавно высказано предположение, что индуцируемая ионами кальция CsA-зависимая деполяризация митохондриальной мембраны может быть не связана с молекулярными компонентами МРТР, а предшествует открытию МРТР и происходит в результате активации мембранной поры с низкой проводимостью [34].

На следующем этапе нашей работы мы оценили роль протонофорной активности салицилатов в эффектах СК и АСК, рассмотрев взаимодействие последних с эритроцитами человека. Салицилаты в высоких концентрациях (360–720 мкМ) выражено ускоряли протон-индуцируемый лизис эритроцитов человека при pH 3.2, обеспечивая, вероятно, перенос протонов в цитоплазму.

Ранее было показано, что салицилат натрия, но не более гидрофильная ацетилсалициловая кислота, индуцирует обратимые изменения формы эритроцитов с насыщением при концентрации более 10 мМ [40]. Авторы предполагают, что встраивание фенольной кислоты во внешний монослой мембраны приводит к растяжению и изгибу мембраны, ведущему к эхиноцитозу и уменьшению текучести мембраны [40]. В одной

из наших ранних работ мы показали, что кислотному (протон-индуцируемому) лизису эритроцитов (рН 2.2–3.5) в изотонической среде предшествует структурная перестройка мембранных белков (спектрина), дестабилизация мембраны, набухание клеток, при этом лизис протекает не по осмотическому механизму [41]. Ранее в работе [42] было показано, что салицилат натрия, выступая эффективным протонифором, стимулирует гемолиз, индуцируемый HCl, а скорость лизиса определяется скоростью переноса кислотных эквивалентов в цитоплазму эритроцита.

Механизмы транспорта протонов СК и рядом ее производных в бислойных фосфолипидных и митохондриальных мембранах детально исследованы в работах [43, 44]. Было предположено, что салицилат и, в значительно меньшей степени, аспирин и бензоат действуют как переносчики протонов типа HA_2^- (анионный димер) при значениях рН, сравнимых с рК СК, и как липофильный анион A^- при нейтральных значениях рН, значительно увеличивая мембранную проводимость [43, 44]. Автор этих работ также предположил, что в митохондриях салицилат увеличивает пассивное поступление протонов в матрикс митохондрий в результате комбинации входа протонированной кислоты HA (по концентрационному градиенту) и истечения A^- (по электрическому и концентрационному градиентам) [43, 44]. Известные значения рК, равные 2.9 в случае СК и 3.5 в случае АСК, определяют протонифорную активность СК и АСК [43–45]. Мы предполагаем, что причиной деполяризации митохондриальной мембраны в первую очередь является индуцируемое СК/АСК формирование неселективных МРТР. Возрастание содержания протонированной формы СК и соотношение скоростей поступления и истечения анионной и нейтральной форм СК [43, 44] объясняет обнаруженную нами гиперполяризацию плазматических мембран эритроцитов в присутствии СК при рН 5.5, но не 7.4. В терапевтических и токсических концентрациях салицилат вызывает общий пассивный «вход» H^+ в митохондрии, достаточный для разобщения и набухания митохондрий и нарушения энергетического метаболизма. Эффект СК, сильной кислотой, объясняют внутримолекулярной водородной связью, которая обеспечивает делокализацию отрицательного заряда, стабилизирует салицилат-анион и увеличивает его мембранную проницаемость [45]. СК существенно и селективно повышает протонную проводимость биологических и искусственных мембран, значительно превышая (в 500–1500 раз) активность АСК [43, 44].

Ранее мы показали, что АСК и синтезированные нами бутирил-СК и пропионил-СК умень-

шают подвижность липидного бислоя изолированных мембран эритроцитов человека и эффективно ацилируют поли-L-лизин [46]. В то же время было обнаружено [47, 48], что АСК встраивается между полярными группами молекул фосфолипидов, формирует водородные связи в липидном бислое, локально нарушает структурную организацию мембран, претовращает формирование рафтов, увеличивает текучесть мембран.

Таким образом, в наших исследованиях *in vitro* АСК и СК (0.5–2.0 мМ) демонстрируют выраженные мембранотропные эффекты, изменяют ионную проницаемость митохондриальных и эритроцитарных мембран, нарушают сопряжение реакций дыхания и фосфорилирования, стимулируют формирование пор высокой проницаемости и диссипацию митохондриального мембранного потенциала (в отсутствие ЭГТА, хелатора ионов кальция), ускоряют протон-индуцируемый лизис эритроцитов человека. Полученные результаты согласуются с предложением осторожного применения салицилатов у пациентов с митохондриальной дисфункцией [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие фармакологические и токсические эффекты СК и АСК объясняют действием на функциональную активность, стабильность и структуру митохондриальных и плазматических мембран. В настоящей работе проведен сравнительный анализ воздействия салицилатов на респираторную активность, мембранный потенциал, процесс формирования МРТР в изолированных митохондриях печени крыс в присутствии и в отсутствие ионов Ca^{2+} , и мембранный потенциал и устойчивость эритроцитов человека к протон-индуцируемому лизису. СК (0.5–2.0 мМ) и, в меньшей степени, АСК эффективно ингибировали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс, нарушая сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования, индуцировали формирование МРТР в отсутствие ионов Ca^{2+} и стимулировали Ca^{2+} -индуцируемое коллоидно-осмотическое набухание митохондрий, вызывали деполяризацию митохондриальных мембран. Ионы Ca^{2+} (30 мкМ) достоверно усиливали разобщающий и деполяризующий эффект СК и АСК, что можно объяснить переносом ионов Ca^{2+} /протонов в матрикс. Циклоспорин А и рутений красный частично ингибировали процесс открытия МРТР, индуцируемый АСК и СК, как в отсутствие, так и в присутствии ионов Ca^{2+} и диссипацию мембранного потенциала. СК (180–720 мкМ) выражено ускоряла протон-индуцированный лизис эритроцитов человека и вызывала гиперполяризацию мембран эритроцитов (при рН 5.5, но не рН 7.4), вероятно, в результате

переноса протонов в цитоплазму. Полученные нами результаты позволяют предположить в качестве мишеней действия салицилатов липидный бислой мембран, комплексы электрон-транспортной цепи митохондрий, митохондриальный кальциевый унипортер.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований-Министерства образования Республики Беларусь № Б22МВ-003 и проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № М23КИ-014.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными, выполняемые в эксперименте, были выполнены с соблюдением общепринятых норм гуманного обращения с лабораторными животными, одобрены этическим комитетом Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно (Протокол от 23.05.2019 г. № 29/19) и соответствовали ГОСТу 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Межгосударственный стандарт, введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hawley S. A., Fullerton M. D., Ross F. A., Schertzer J. D., Chevtzoff C., Walker K. J., Pegg M. W., Zibrova D., Green K. A., Mustard K. J., Kemp B. E., Sakamoto K., Steinberg G. R., and Hardie D. G. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science*, **336** (6083), 918–922 (2012). DOI: 10.1126/science.1215327
- Tewari D., Majumdar D., Vallabhaneni S., and Bera A. K. Aspirin induces cell death by directly modulating mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC). *Sci. Rep.*, **22** (7), 45184 (2017). DOI: 10.1038/srep45184
- Smith B. K., Ford R. J., Desjardins E. M., Green A. E., Hughes M. C., Houde V. P., Day E. A., Marcinko K., Crane J. D., Mottillo E. P., Perry C. G. R., Kemp B. E., Tarnopolsky M. A., and Steinberg G. R. Salicylate (Salicylate) uncouples mitochondria, improves glucose homeostasis, and reduces liver lipids independent of AMPK- β 1. *Diabetes*, **65** (11), 3352–3361 (2016). DOI: 10.2337/db16-0564
- Lapshina E. A., Sudnikovich E. J., Maksimchik J. Z., Zabrodskaya S. V., Zavodnik L. B., Kubyshev V. L., Nocun M., Kazmierczak P., Dobaczewski M., Watala C., and Zavodnik I. B. Antioxidative enzyme and glutathione S-transferase activities in diabetic rats exposed to long-term ASA treatment. *Life Sci.*, **79** (19), 1804–1811 (2006). DOI: 10.1016/j.lfs.2006.06.008
- Suwalsky M., Belmar J., Villena F., Gallardo M. J., Jemioła-Rzeminska M., and Strzalka K. Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid interaction with the human erythrocyte membrane bilayer induce in vitro changes in the morphology of erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **539** (1), 9–19 (2013). DOI: 10.1016/j.abb.2013.09.006
- Norman C., Howell K. A., Millar A. H., Whelan J. M., and Day D. A. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.*, **134** (1) 492–501 (2004). DOI: 10.1007/s10725-009-9416-6
- Poór P. Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants. *Biomolecules*, **10** (2), 341 (2020). DOI: 10.3390/biom10020341
- Ordan O., Rotem R., Jaspers I., and Flescher E. Stress-responsive JNK mitogen-activated protein kinase mediates aspirin-induced suppression of B16 melanoma cellular proliferation. *Br. J. Pharmacol.*, **138** (6), 1156–1162 (2003). DOI: 10.1038/sj.bjp.0705163
- Penniall R. The effects of salicylic acid on the respiratory activity of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **30** (2), 247–251 (1958). DOI: 10.1016/0006-3002(58)90047-7
- Brody T. M. Action of sodium salicylates and related compounds on tissue metabolism in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **117**, 39–51 (1956).
- Zhao L., Zhang W., Chen M., Zhang J., Zhang M., and Dai K. Aspirin induces platelet apoptosis. *Platelets*, **24** (8), 637–642 (2013). DOI: 10.3109/09537104.2012.754417
- Yoshida Y., Singh I., and Darby C. P. Effects of salicylic acid and calcium on mitochondrial functions. *Acta Neurol. Scand.*, **85** (3), 191–196 (1992). DOI: 10.1111/j.1600-0404.1992.tb04026.x
- Battaglia V., Salvi M., and Toninello A. Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **280** (40), 33864–33872 (2005). DOI: 10.1074/jbc.M502391200
- Folmes C. D. L., Dzeja P. P., Nelson T. J., and Terzic A. Mitochondria in control of cell fate. *Circ. Res.*, **110** (4), 526–529 (2012). DOI: 10.1161/RES.0b013e31824ae5c1
- Zavodnik I. B. Mitochondria, calcium homeostasis and calcium signaling. *Biomeditsinskaya khimiya*, **62** (3), 311–317 (2016). DOI: 10.18097/PBMC20166203311

16. Contreras L., Drago I., Zampese E., and Pozzan T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 607–618 (2010). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.05.005
17. Rasola A. and Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, **50** (3), 222–233 (2011). DOI: 10.1016/j.ceca.2011.04.007
18. Rossi A., Pizzo P., and Filadi R., Calcium, mitochondria and cell metabolism: a functional triangle in bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1866** (7), 1068–1078 (2019). DOI: 10.1016/j.bbamer.2018.10.016
19. Fujikawa I., Ando T., Suzuki-Karasaki M., Suzuki-Karasaki M., Ochiai T., and Suzuki-Karasaki Y. Aspirin induces mitochondrial Ca^{2+} remodeling in tumor cells via ROS–depolarization–voltage-gated Ca^{2+} entry. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (13), 4771 (2020). DOI: 10.3390/ijms21134771
20. Trost L. C. and Lemasters J. J. Role of the mitochondrial permeability transition in salicylate toxicity to cultured rat hepatocytes: implications for the pathogenesis of Reye's syndrome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147**, 431–441 (1997). DOI: 10.1006/taap.1997.8313
21. Doi H. and Horie T. Salicylic acid-induced hepatotoxicity triggered by oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.*, **183** (3), 363–368 (2010). DOI: 10.1016/j.cbi.2009.11.024
22. Tomoda T., Takeda K., Kurashige T., Enzan H., and Miyahara M. Acetylsalicylate (ASA)-induced mitochondrial dysfunction and its potentiation by Ca^{2+} . *Liver*, **14** (2), 103–108 (1994). DOI: 10.1111/j.1600-0676.1994.tb00056.x
23. Schummer U., Schiefer H.-G., and Gerhardt U. Mycoplasma membrane potentials determined by potential-sensitive fluorescent dyes. *Curr. Microbiol.*, **2**, 191–194 (1979).
24. Augustyniak K., Zawodnik I., Palecz D., Szosland K., and Bryszewska M. The effect of oxidizing agents and diabetes mellitus on the human red blood cell membrane potential. *Clin. Biochem.*, **29** (3), 283–286 (1996). DOI: 10.1016/0009-9120(95)02045-n
25. Johnson D. and Lardy H. A. Isolation of rat liver and kidney mitochondria. *Methods Enzymol.*, **10**, 94–101 (1967). DOI: 10.1016/0076-6879(67)10018-9
26. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** (1), 265–275 (1951).
27. Akerman K. E. Qualitative measurements of the mitochondrial membrane potential in situ in Ehrlich ascites tumour cells using the safranin method. *Biochim. Biophys. Acta.*, **546** (2), 341–347 (1979). DOI: 10.1016/0005-2728(79)90051-3
28. Moore A. L. and Bonner W. D. Measurements of membrane potentials in plant mitochondria with the safranin method. *Plant Physiol.*, **70**, 1271–1276 (1982). DOI: 10.1104/pp.70.5.1271
29. Petronilli V., Cola C., Massari S., Colonna R., and Bernardi P. Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21939–21945 (1993).
30. Dremza I. K., Lapshina E. A., Kujawa J., and Zawodnik I. B. Oxygen-related processes in red blood cells exposed to tert-butyl hydroperoxide. *Redox Report*, **11** (4), 185–192 (2006). DOI: 10.1179/135100006X116709
31. Poór P., Patyi G., Takács Z., and Szekeres A. Salicylic acid-induced ROS production by mitochondrial electron transport chain depends on the activity of mitochondrial hexokinases in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Plant Res.*, **132** (2), 273–283 (2019). DOI: 10.1007/s10265-019-01085-y
32. Xie Z. and Chen Z. Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells. *Plant Physiol.*, **120** (1), 217–226 (1999).
33. Zawodnik I. B., Dremza I. K., Cheshchevik V. T., and Lapshina E. A. Oxidative damage of rat liver mitochondria during exposure to t-butyl hydroperoxide. Role of Ca^{2+} ions in oxidative processes. *Life Sci.*, **92**, 1110–1117 (2013).
34. Neginskaya M. A., Morris S. E., and Pavlov E. V. Both ANT and ATPase are essential for mitochondrial permeability transition but not depolarization. *Science*, **25**, 105447 (2022). DOI: 10.1016/j.isci.2022.105447
35. Golovach N. G., Cheshchevik V. T., Lapshina E. A., Ilyich T. V., and Zawodnik I. B. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca^{2+} ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents. *Membrane Biol.*, **250** (2), 225–236 (2017). DOI: 10.1007/s00232-017-9953-2
36. Petrescu I. and Tarba C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1318** (3), 385–394 (1997). DOI: 10.1016/s0005-2728(96)00109-0
37. Martens M. E. and Lee C. P. Reye's syndrome: salicylates and mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.*, **33** (18), 2869–2876 (1984). DOI: 10.1016/0006-2952(84)90209-0
38. Nulton-Persson A. C., Szweda L. I., and Sadek H. A. Inhibition of cardiac mitochondrial respiration by salicylic acid and acetylsalicylate. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **44** (5), 591–595 (2004). DOI: 10.1097/00005344-200411000-00012
39. Jonas E. A., Jr Porter C. A., Beutner G., Mnatsakanyan N., and Alavian K. N. Cell death disguised: the mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F1FO ATP synthase. *Pharmacol. Res.*, **99**, 382–392 (2015).
40. Li A., Seipelt H., Müller C., Shi Y., and Artmann M. Effects of salicylic acid derivatives on red blood cell

- membranes. *Pharmacol. Toxicol.*, **85** (5), 206–211 (1999). DOI: 10.1111/j.1600-0773.1999.tb02010.x
41. Zavodnik I. B. and Piletskaia T. P. Acid-induced hemolysis of human erythrocytes. *Biofizika*, **42** (5), 1106–1112 (1997).
 42. Ivanov I. T. The low pH-induced hemolysis of erythrocytes is preceded by entry of acid into cytosole and oxidative stress on cellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1415**, 349–360 (1999).
 43. Gutknecht J. Salicylates and proton transport through lipid bilayer membranes: a model for salicylate-induced uncoupling and swelling in mitochondria. *J. Membr. Biol.*, **115** (3), 253–260 (1990). DOI: 10.1007/BF01868640
 44. Gutknecht J. Aspirin, acetaminophen and proton transport through phospholipid bilayers and mitochondrial membranes. *Mol. Cell Biochem.*, **114** (1–2), 3–8 (1992). DOI: 10.1007/BF00240290
 45. Dunn G. E. and Penner T. S. Effect of intramolecular hydrogen bonding on the relative acidities of substituted salicylic acids in benzene solution. *Can. J. Chem.*, **45**, 1699–1706 (1967). DOI: 10.1139/v67-274
 46. Zavodnik I. B., Lapshina E. A., Sudnikovich E., Boncler M., Luzak B., Rózalski M., Helińska M., and Watala C. Structure, stability, and antiplatelet activity of O-acyl derivatives of salicylic acid and lipophilic esters of acetylsalicylate. *Pharm. Reports.*, **61**, 476–489 (2009).
 47. Alsop R. J., Topozini L., Marquardt D., Kučerka N., Harroun T. A., and Rheinstädter M. C. Aspirin inhibits formation of cholesterol rafts in fluid lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes*, **1848** (3), 805–812 (2015).
 48. Alsop R. J., Himbert S., Dhaliwal A., Schmalzl K., and Rheinstädter M. C. Aspirin locally disrupts the liquid-ordered phase. *R. Soc. Open Sci.*, **5** (2), 171710 (2018). DOI: 10.1098/rsos.171710

Effects of Salicylic and Acetylsalicylic Acids in Mitochondrial and Erythrocyte Membranes

T.V. Ilyich*, A.I. Savko*, T.A. Kovalenya*, E.A. Lapshina*, and I.B. Zavodnik*

**Yanka Kupala State University of Grodno, bulvar Leninskogo Komsomola 5, Grodno, 230009 Belarus*

For further clarification of the mechanisms of pharmacological effects of salicylic and acetylsalicylic acids, the interactions of these acids with mitochondrial and erythrocyte membranes were studied and the role of calcium ions in the effects of salicylic and acetylsalicylic acids was examined. Salicylic acid and to a lesser extent acetylsalicylic acid at 0.5–2.0 mM concentration effectively inhibited the respiratory activity of isolated rat liver mitochondria, by uncoupling respiration and phosphorylation processes, induced depolarization of the mitochondrial membrane and potentiated Ca^{2+} -stimulated formation of mitochondrial permeability transition pores in EGTA-free media. Cyclosporine A and ruthenium red partially inhibited the mitochondrial pore opening process induced by salicylic and acetylsalicylic acids both in the absence and presence of Ca^{2+} ions. Salicylic acid (180–360 μM) markedly accelerated proton-induced lysis of human erythrocytes (at pH 3.2) and caused hyperpolarization of erythrocyte membranes (at pH 5.5, but not at pH 7.4), probably as a result of proton transfer to the cytoplasm of the cell. Thus, salicylic and acetylsalicylic acids interact with mitochondrial and plasma membranes, act as effective proton/ Ca^{2+} ionophores and stimulate the mitochondrial calcium uniporter.

Keywords: acetylsalicylic acid, salicylic acid, rat liver mitochondria, human erythrocytes, calcium ions

НАЛИЧИЕ БЕЛКОВ СЕПТИНОВ В ЗОНЕ НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСОВ СОМАТИЧЕСКОЙ МЫШЦЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *Lumbricus terrestris*

© 2024 г. Л.Ф. Нуруллин*, **, #, Е.М. Волков**, ##

*Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», ул. Лобачевского, 2/31, Казань, 420111, Россия

#E-mail: leniz2001@mail.ru

**Казанский государственный медицинский университет, ул. Бутлерова, 49, Казань, 420012, Россия

##E-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 15.09.2023 г.

После доработки 25.09.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Методами флуоресцентной конфокальной микроскопии показано присутствие в соматической мышце дождевого червя *Lumbricus terrestris* семейства белков септинов типов 2, 3, 5, 7 и 9. У септинов типов 2 и 9 отсутствует их специфическая концентрация в зоне холинергического синапса, тогда как септины типов 3 и 5 и особенно типа 7 имеют количественно выраженную привязку по своей локализации к зоне двигательной концевой пластинки. Предполагается, что септины типов 3 и 5 и, прежде всего, типа 7 могут быть участниками в механизмах модуляции квантовой секреции медиатора.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, соматическая мышца, кольчатые черви, септины.

DOI: 10.31857/S0006302924050088, EDN: MKFQWM

Высококонсервативные ГТФ-связывающие белки семейства септинов широко представлены в клеточных структурах, начиная с простейших одноклеточных организмов и заканчивая высшими позвоночными животными [1]. Являясь обязательными компонентами микротрубочкового цитоскелета, они участвуют в поддержании формы клеток, ее полярности, цитокинезе, внутриклеточных транспортных процессах [2]. Следует особо подчеркнуть участие белков данного семейства в синаптическом везикулярном транспорте [3]. Необходимо также отметить, что септины играют важную роль в регуляции внутриклеточного Ca^{2+} -гомеостаза [4]. Последние оказывают модулирующее влияние на входящий кальциевый ток через депо-управляемые Ca^{2+} -каналы, известные как $Orai$ -каналы плазматической мембраны [5, 6]. Таким образом, показана роль септинов в механизмах везикулярного цикла квантовой секреции медиатора как в межнейронных, так и периферических нервно-мышеч-

ных синапсах [7, 8]. Соматическая мышца дождевого червя содержит возбуждающие холинергические синапсы [9]. Квантовая секреция ацетилхолина осуществляется Ca^{2+} -управляемым механизмом синаптического везикулярного цикла [10]. В настоящее время отсутствуют данные о присутствии белков семейства септинов в нервно-мышечных синапсах соматической мышцы дождевого червя и, следовательно, неизвестна их возможная роль в процессах квантовой секреции медиатора. Важно подчеркнуть, что тип *Annelida*, к которому относится дождевой червь, является филогенетически древней группой животных [11]. У представителей этого типа впервые эволюционно возникали способности активного управления движением соматической мускулатуры при участии ГАМК- и холинергической иннервации [9, 12, 13]. Таким образом, целью настоящей работы стало определение методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии белков семейства септинов в зоне нервно-мышечных холинергических синапсов соматической мышцы дождевого червя.

Сокращения: АХР – ацетилхолиновые рецепторы, ТМР- α -Б – тетраметилродамин- α -бунгаротоксин.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для приготовления препарата дождевого червя *Lumbricus terrestris* разрезали сбоку по всей длине, отрезали головной и хвостовой концы, раскрывали, удаляли внутренние органы и перегородки между сегментами [14]. Далее фрагменты кожно-мышечного мешка дождевого червя длиной 10–15 сегментов закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древесы–Пакса (состав в мМ: NaCl – 77, KCl – 4, Na₂SO₄ – 43, CaCl₂ – 6, Трис – 2, сахароза – 167, рН 7.4) около 30 мин при комнатной температуре (22 ± 1°С). Затем в течение 30 мин препараты фиксировали в 2%-м растворе *p*-формальдегида и отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатном буфере. Препарат последовательно инкубировали в 0.5%-м растворе Тритона X-100 30 мин, в растворе, содержащем 5% нормальной козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% Тритона X-100 – 15 мин и еще 15 мин в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% Тритона X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на фосфатном буфере.

Далее препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4°С в растворе А с поликлональными антителами к септинам 2, 3, 5, 7, 9 и синаптофизину (все в разведении 1 : 100). Антитела к септинам 2, 3, 5, 7, 9 и синаптофизину были выработаны в кролике и козе, что позволяло проводить двойное иммуномечение исследуемых белков. Препараты отмывали в растворе А 3 раза по 30 мин и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 488 или 647 (разведение 1 : 200) в растворе А. Для подтверждения специфичности связывания антител с соответствующими белками проводили контрольные эксперименты. Для негативного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля проводили инкубацию препарата с первичными антителами в присутствии иммуногенного пептида, на который вырабатывались первичные антитела. Отсутствие мечения антителами в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами. Мечение постсинаптических никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (АХР) проводили с помощью тетраметилпродамин- α -бунгаротоксина (ТМР- α -Б, 20 мкг/мл) в течение 50 мин.

После отмывки в фосфатном буфере препараты помещали в раствор фосфатного буфера с гли-

церинном (1 : 1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США) с применением масляно-иммерсионного объектива 63 \times /1.4. Для возбуждения эмиссии флуорофоров применялся Ar- и He–Ne-лазеры. Длины волн возбуждения: для флуорофоров Alexa 488 – 488 нм, ТМР – 543 нм, Alexa 647 – 633 нм. Анализ полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (НИН, США).

Использовали следующие реактивы: *p*-формальдегид, Трис, фосфатный буфер (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 4.3 мМ Na₂SO₄, 1.4 мМ KH₂PO₄, рН 7.2), Тритон X-100, нормальную козью сыворотку, бычий сывороточный альбумин, ТМР- α -Б, глицерин (Sigma-Aldrich, США); первичные кроличьи поликлональные антитела к септинам 2, 3, 5, 7, 9 (Cohesion Biosciences, Великобритания); первичные кроличьи поликлональные антитела к синаптофизину (Abcam, Великобритания); иммуногенные пептиды, соответствующие поликлональным антителам; антитела вторичные конъюгированные с Alexa 488 или Alexa 647 (Invitrogen, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мечение мышечного препарата иммуофлуоресцентными антителами против септина 2 типа показало диффузное присутствие данного белка как в синаптической, так и во внесинаптической зонах (рис. 1). Эти данные говорят об отсутствии значимой специфической концентрации септина 2 типа в зоне холинергического нервно-мышечного контакта. Выявление септина 3 типа показало иную картину. Так, мечение антителами препарата на данный вариант белка септина значительно перекрывалось с окрашиванием на нейрональный белок синаптофизин и АХР постсинаптической мембраны, хотя в последнем случае несколько в меньшей степени (рис. 2). Следовательно, септин 3 типа демонстрирует четко выраженную связь по своей локализации с зоной холинергического синапса, что может указывать на его возможную функциональную роль в механизмах нервно-мышечной передачи возбуждения. Эксперименты с антителами к белку септину 5 типа показали следующую картину. Как и в случае с септином 3 типа, окрашивание на септин 5 типа перекрывалось с окрашиванием на синаптофизин и АХР (рис. 3). Однако такое окрашивание было менее насыщенным. Более того, в некоторых участках оно не сопрягалось с метками,

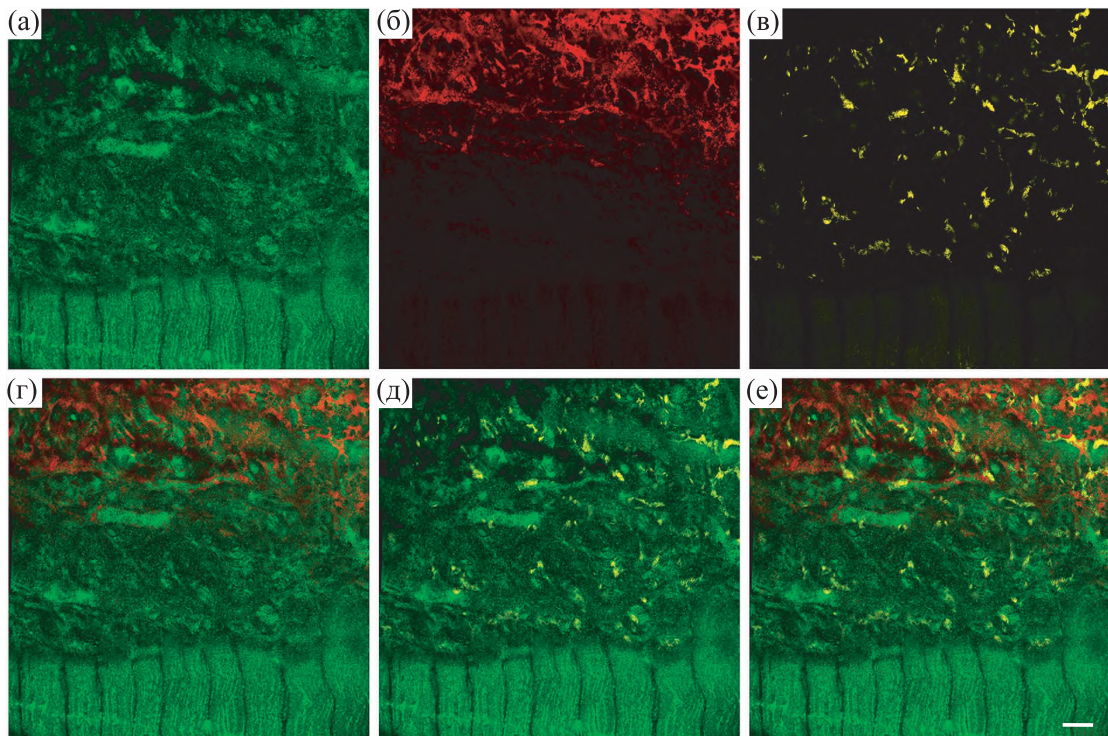


Рис. 1. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата соматических мышечных волокон дождевого червя *Lumbricus terrestris*. (а) – Окрашивание антителами септина 2 (зеленый цвет); (б) – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) – окрашивание ТМР- α -Б постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); (г) – наложение изображений (а) и (в); (д) – наложение изображений (а) и (б); (е) – наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.

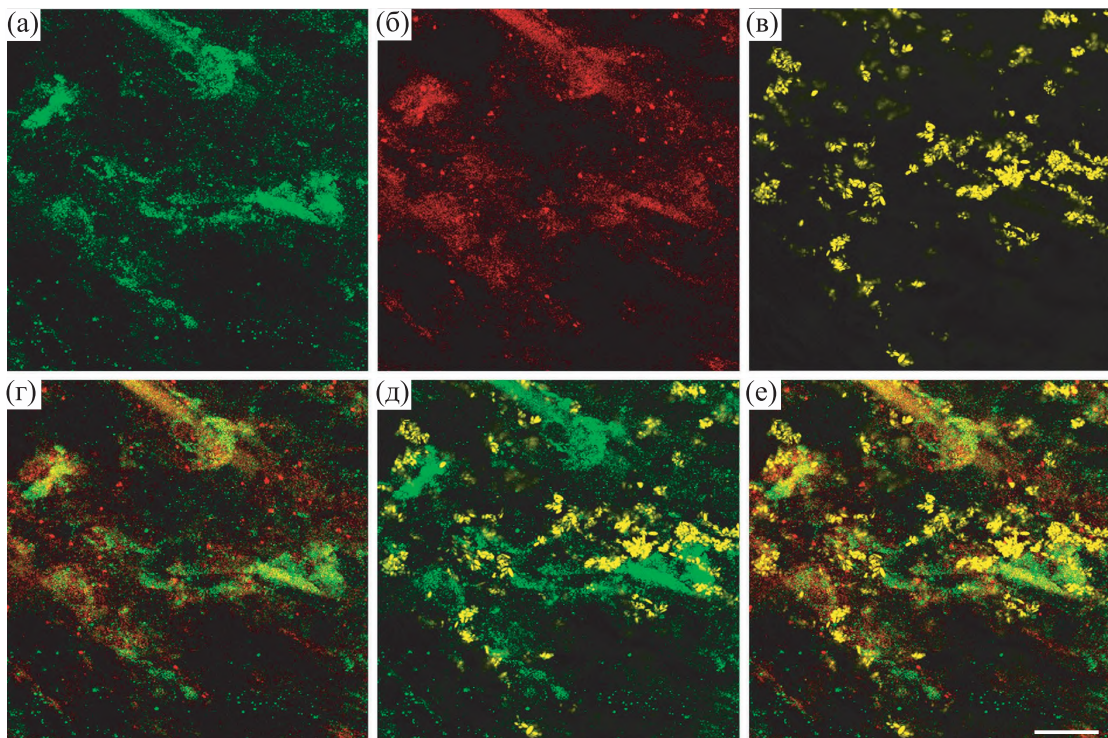


Рис. 2. Выявление септина 3 при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. (а) – Окрашивание антителами септина 3 (зеленый цвет); (б) – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) – окрашивание постсинаптических никотиновых АХР при помощи ТМР- α -Б (желтый цвет); (г) – наложение изображений (а) и (в); (д) – наложение изображений (а) и (б); (е) – наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.

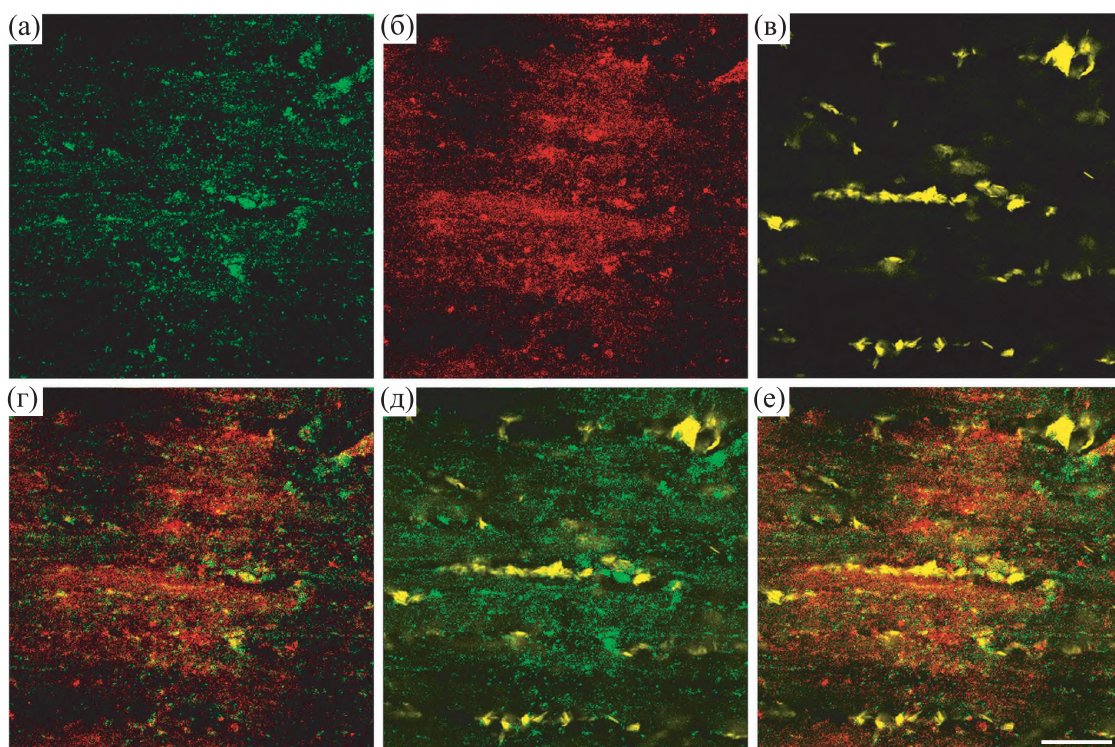


Рис. 3. Наличие септина 5 при тройном флуоресцентном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. (а) – Окрашивание антителами септина 5 (зеленый цвет); (б) – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) – окрашивание TMR- α -B постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); (г) – наложение изображений (а) и (б); (д) – наложение изображений (а) и (в); (е) – наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.

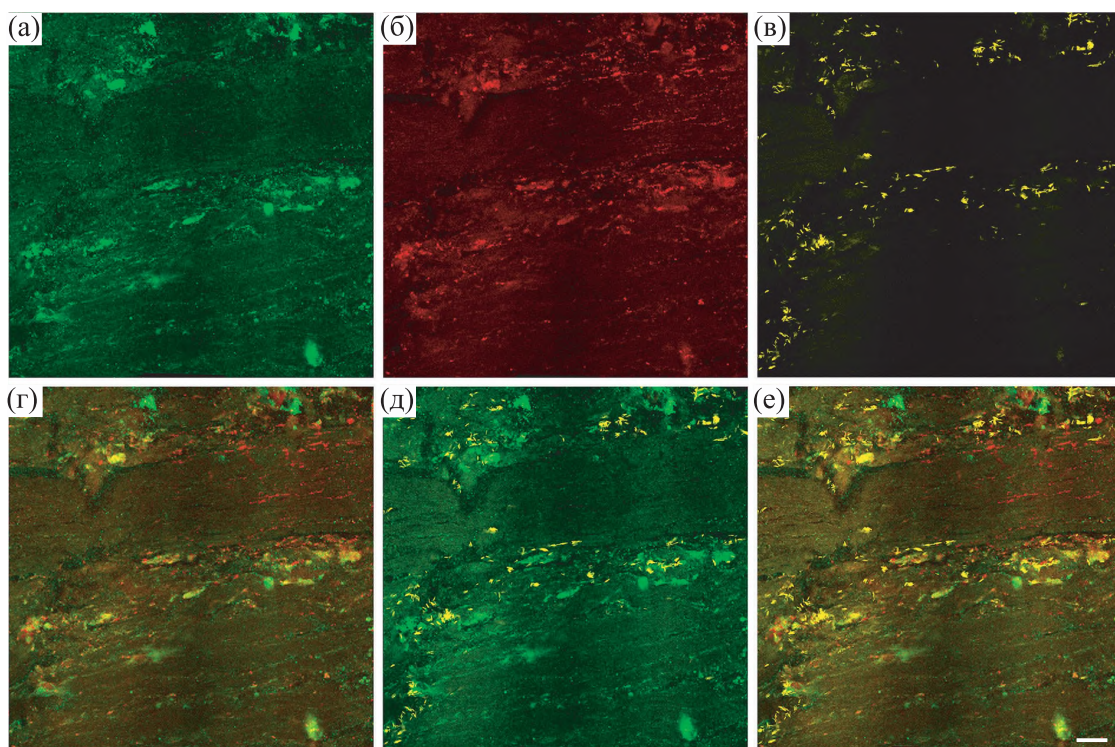


Рис. 4. Обнаружение септина 7 при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. (а) – Окрашивание антителами септина 7 (зеленый цвет); (б) – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) – окрашивание TMR- α -B постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); (г) – наложение изображений (а) и (б); (д) – наложение изображений (а) и (в); (е) – наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.

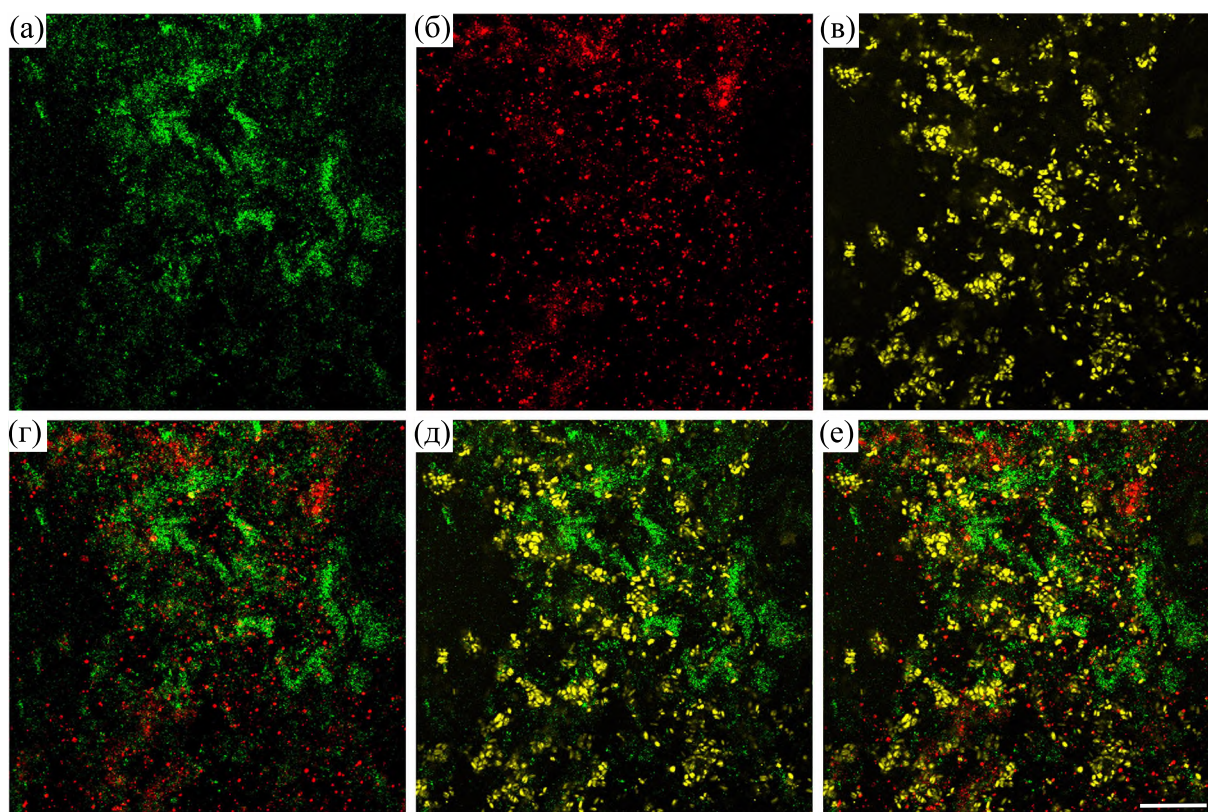


Рис. 5. Выявление септина 9 при флуоресцентном тройном окрашивании препарата соматических мышечных волокон дождевого червя. (а) – Окрашивание антителами септина 9 (зеленый цвет); (б) – окрашивание антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красный цвет); (в) – окрашивание TMR- α -B постсинаптических никотиновых АХР (желтый цвет); (г) – наложение изображений (а) и (б); (д) – наложение изображений (а) и (в); (е) – наложение изображений (а), (б) и (в). Масштабная линейка: 20 мкм.

привязанными к зоне нервно-мышечного контакта. Таким образом, картина локализации белка септина 5 типа не столь однозначна, как в случае с септином 3 типа. Наибольшую связь по своей локализации с зоной холинергического синапса показало мечение антителами на белок септин 7 типа, поскольку оно полностью повторяло окрашивание на синаптофизин и АХР мышечной мембраны (рис. 4). Выявление белка септина 9 типа показало прямо противоположную картину в сравнении с септином 7 типа. Свечение на септин 9 типа не перекрывалось с мечением на синаптофизин и АХР концевой пластинки (рис. 5).

Проведенные эксперименты позволяют утверждать следующее. В мышечном препарате соматической мышцы дождевого червя методами конфокальной иммунофлуоресцентной микроскопии выявляются белки семейства септинов 2, 3, 5, 7 и 9 типов. Окрашивание септинов 2 и 9 типов не выявило их специфического присутствия в зоне холинергического синапса. Таким образом, нельзя говорить об их возможной существенной роли

в процессах передачи возбуждающего сигнала на двигательную мышцу дождевого червя. С другой стороны, септины 3, 5 и 7 типов имеют количественно выраженную привязку по своей локализации к зоне концевой пластинки холинергического синапса. Наиболее выраженную такую связь имеет септин 7 типа, наименьшую – септин 5 типа. Можно выдвинуть гипотезу, что септины 3 и 5 типов и особенно 7 типа могут участвовать в модуляции входящих Ca^{2+} токов [4–6], а также иных процессах везикулярного цикла в двигательных синапсах аннелид, как это показано для животных других видов [8, 15–18]. Полученные данные существенно дополняют картину структурно-функциональной организации холинергического нервно-мышечного синапса соматической мышцы кольчатых червей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования «Коллективного спектро-аналитического центра физико-химических исследований

строения, свойств и состава веществ и материалов ФИЦ КазНЦ РАН».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00239, <https://rscf.ru/project/23-24-00239/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, выполнены с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и были одобрены комиссией по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (протокол №23/5 от 12.05.2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Grupp B. and Gronemeyer T. A biochemical view on the septins, a less known component of the cytoskeleton. *Biol. Chem.*, **404** (1), 1–13 (2022). DOI: 10.1515/hsz-2022-0263
- Cavini I. A., Leonardo D. A., Rosa H. V. D., Castro D. K. S. V., D'Muniz Pereira H., Valadares N. F., Araujo A. P. U., and Garratt R. C. The structural biology of septins and their filaments: an update. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 765085 (2021). DOI: 10.3389/fcell.2021.765085
- Kartmann B. and Roth D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J. Cell. Sci.*, **114** (Pt 5), 839–844 (2001). DOI: 10.1242/jcs.114.5.839
- Deb B. K. and Hasan G. Regulation of store-operated Ca²⁺ entry by septins. *Front. Cell Dev. Biol.*, **4**, 142 (2016). DOI: 10.3389/fcell.2016.00142
- Deb B. K. and Hasan G. SEPT7-mediated regulation of Ca²⁺ entry through Orai channels requires other septin subunits. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **76** (1), 104–114 (2019). DOI: 10.1002/cm.21476
- Deb B. K., Chakraborty P., Gopurappilly R., and Hasan G. SEPT7 regulates Ca²⁺ entry through Orai channels in human neural progenitor cells and neurons. *Cell Calcium*, **90**, 102252 (2020). DOI: 10.1016/j.ceca.2020.102252
- Werner B. and Yadav S. Phosphoregulation of the septin cytoskeleton in neuronal development and disease. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **80** (7–8), 275–289 (2023). DOI: 10.1002/cm.21728
- Nurullin L. F., Khuzakhmetova V. F., Khaziev E. F., Samigullin D. V., Tsentsevitsky A. N., Skorinkin A. I., Bukharaeva E. A., and Vagin O. Reorganization of septins modulates synaptic transmission at neuromuscular junctions. *Neuroscience*, **404**, 91–101 (2019). DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.01.060
- Volkov E. M. and Nurullin L. F. Effects of cholinergic receptor agonists and antagonists on miniature stimulatory postsynaptic ionic currents in somatic muscle cells of *lumbricus terrestris*. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **139** (3), 360–362 (2005). DOI: 10.1007/s10517-005-0294-2
- Bennett M. R., Farnell L., and Gibson W. G. The probability of quantal secretion near a single calcium channel of an active zone. *Biophys. J.*, **78** (5), 2201–2221 (2000). DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76769-5
- Parry L., Tanner A., and Vinther J. The origin of annelids. *Front. Palaeontol.*, **57** (6), 1091–1103 (2014). DOI: 10.1111/pala.12129
- Purschke G. and Müller M. C. Evolution of body wall musculature. *Integr. Comp. Biol.*, **46** (4), 497–507 (2006). DOI: 10.1093/icb/icj053
- Nurullin L. F., Almazov N. D., and Volkov E.M. Immunofluorescent identification of GABAergic structures in the somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A Membr. Cell. Biol.*, **17** (3), 208–213 (2023). DOI: 10.1134/S1990747823040074, EDN: GMIYPL
- Volkov E. M., Nurullin L. F., Svandová I., and Vyskocil F. Participation of electrogenic Na⁺-K⁺-ATPase in the membrane potential of earthworm body wall muscles. *Physiol. Res.*, **49** (4), 481–484 (2000). EDN: LGGZWJ
- Grigoryev P. N., Khisamieva G. A., and Zefirov A.L. Septin polymerization slows synaptic vesicle recycling in motor nerve endings. *Acta Naturae.*, **11** (2), 54–62 (2019). DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-54-62, EDN: UWFOQK
- Beites C. L., Campbell K. A., and Trimble W. S. The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochem. J.*, **385** (Pt 2), 347–353 (2005). DOI: 10.1042/BJ20041090
- Ito H., Atsuzawa K., Morishita R., Usuda N., Sudo K., Iwamoto I., Mizutani K., Katoh-Semba R., Nozawa Y., Asano T., and Nagata K. Sept8 controls the binding of vesicle-associated membrane protein 2 to synaptophysin. *J. Neurochem.*, **108** (4), 867–880 (2009). DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05849.x
- Maimaitiyiming M., Kobayashi Y., Kumanogoh H., Nakamura S., Morita M., and Maekawa S. Identification of dynamin as a septin-binding protein. *Neurosci. Lett.*, **534**, 322–326 (2013). DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.002

The Presence of Septin Proteins in the Neuromuscular Junction of Somatic Muscle in the Earthworm *Lumbricus terrestris*

L.F. Nurullin*, ** and E.M. Volkov**

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, ul. Lobatchevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

**Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420012 Russia

Using fluorescent confocal microscopy it has been shown that proteins belonging to the septin family such as Septin 2, 3, 5, 7, and 9 are present in the somatic muscle of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Septins 2 and 9 are associated with the lack of their specific concentrations in a cholinergic synapse, while septins 3, 5, and especially 7 levels correlate with quantitatively expressed binding in their localization to the motor end plate. It is assumed that Septins 3, 5 and, mostly, 7 can be involved in the mechanisms of modulation of quantal release of neurotransmitters.

Keywords: neuromuscular junction, somatic muscle, annelids, septins

УДК 615.277.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА, СИНТЕЗИРОВАННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСКУССТВЕННОГО МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩЕГО ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА W8-3C

© 2024 г. Н.В. Позднякова*, **, Ю.К. Бирюкова***, З.А. Соколова*, М.А. Барышникова*, Е.С. Щербакова**, ****, #, М.С. Смирнова**, А.Б. Шевелев**

*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина Минздрава России, Каширское шоссе, 24, Москва, 115522, Россия

**Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 119991, Россия

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

****НИЛ «Генетика» Курского государственного университета, ул. Радищева, 33, Курск, 305000, Россия

#E-mail: ledera@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.02.2024 г.

После доработки 02.02.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Впервые создана и описана конструкция pW8-3C, кодирующая искусственный опухоль-специфичный белок W8-3C с добавлением трех остатков свободного цистеина на С-конце. С использованием очищенного белка W8-3C впервые получены и охарактеризованы дисперсии наночастиц диаметром 75.24 нм при индексе полидисперсности Pd_i , равном 0.064, с содержанием селена 1566 мкг/мл. Дисперсии сохраняли стабильность при хранении в течение 6 месяцев при 4°C. Для сравнения: максимальное содержание селена в составе дисперсии наночастиц, полученных в присутствии белка W8-3C и плуроника F-127, составляло 399 мкг/мл. Исследована цитотоксическая активность полученных наночастиц на перевиваемых клетках опухолевых линий человека: HeLa (карцинома шейки матки), U-87 MG (глиобластома), MCF-7 (карцинома молочной железы) и HCT-116 (карцинома толстой кишки) в сравнении с диплоидной линией фибробластов человека WI-38 *in vitro*. Показано, что IC_{50} наночастиц селена, полученных с использованием белка W8-3C, для опухолевых линий колеблется в диапазоне от 5.25 до 8.37 мкг/мл, тогда как IC_{50} для нормальных фибробластов составила 14.3 мкг/мл (отличие в 1.7–2.7 раза).

Ключевые слова: селен, наночастицы, рекомбинантный белок, опухоль, цитотоксичность, IC_{50} , цистеин.

DOI: 10.31857/S0006302924050096, EDN: MKBKU

Наночастицы доказали свою эффективность в качестве носителей пролекарств в качестве средства доставки терапевтических молекул [1]. Наночастицы различных металлов, таких как Ag, Au, Se, Fe, Ti и Zn, и их оксидов обладают биологической активностью, не свойственной этим элементам в виде солей [2]. Селен (Se) является важным микроэлементом, входящим в состав белков в форме селеноцистеина [3]. Замена цистеина на селеноцистеин существенно влияет на активность, протеолитическую стабильность и биораспределение ферментов, регуляторных факторов и структурных белков [3, 4]. Известны селенопротеины с оксидоредуктазной активно-

стью, присутствие которых в клетках необходимо для поддержания естественного окислительно-восстановительного баланса (нормального функционирования дыхательной цепи и недопущения накопления избытка активных форм кислорода) [5]. Se в металлической форме имеет узкое терапевтическое окно, обусловленное выраженной концентрационной зависимостью его токсичности [6]. Напротив, наночастицы металлического Se (SeNP) обладают сниженной токсичностью [7]. Наночастицы SeNP рассматриваются в качестве кандидата лекарственного средства для лечения ряда заболеваний, связанных с окислительным стрессом и воспалением: ревматоидного артрита, рака, сахарного диабета, нефропатии и других [1, 2]. За счет способности образовывать с атомами серы в белках и низкомолекулярных соединениях прочные связи, аналогичные дисуль-

Сокращения: SeNP — наночастицы металлического Se, ICP-OES — оптико-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой.

фидным, SeNP представляют собой привлекательную платформу для создания новых методов визуализации и направленной доставки лекарств в очаги патогенеза при различных заболеваниях [10, 11]. Однако развитие этого направления в фармакологии ограничивается недостаточной устойчивостью SeNP, полученных без использования пассивирующих агентов: при хранении они быстро подвергаются необратимой агрегации, что делает невозможным их применение *in vivo* [12]. Для стабилизации SeNP традиционно применяют различные биополимеры и малые биомолекулы: куркуму [13], глутатион [14], сывороточный альбумин [15], галовую [16] и фолиевую кислоты [17]. Наиболее популярным классом соединений, применяемым для стабилизации SeNP, являются полисахариды (хитин, хитозан, дрожжевые или грибные β -1,3-глюканы) [18–22].

Из числа синтетических полимеров наиболее активно используются пльороники (полосамеры – тройные блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида) [23] и производные полиэтиленгликоля [24]. Однако предложенные методики получения SeNP с применением этих агентов не обладают необходимой воспроизводимостью, а получаемые с их помощью дисперсии SeNP сохраняют устойчивость только при невысоких концентрациях, недостаточных для практического применения [25].

В литературе неоднократно высказывалось мнение, что SeNP обладают противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами [26, 27]. По всей видимости, SeNP по-разному влияют на окислительно-восстановительный механизм раковых и нормальных клеток [28, 29]. Механизмы цитотоксического действия наночастиц Se в различных линиях раковых клеток человека исследовались ранее [30]. Так, в работе [31] методом лазерной абляции в жидкости были получены SeNP размером 100 нм и были исследованы цитотоксические эффекты и механизмы гибели ряда опухолевых клеток. Авторы показали, что обработка в течение 24 ч клеток A-172 и DU-145 10 мкг/мл SeNP приводила к снижению их пролиферативных свойств на 70–80%, а для клеток Caco-2 и MCF-7 этот показатель составлял примерно 50–60% через 24 ч после их обработки 1 мкг/мл и 5 мкг/мл SeNP. С помощью флуоресцентной микроскопии были обнаружены признаки апоптотической гибели раковых клеток всех изученных линий при обработке их 5 мкг/мл SeNP, также SeNP усиливали экспрессию проапоптотических генов почти во всех линиях раковых клеток, за исключением Caco-2, и активировали различные пути адаптивных и проапоптотических сигнальных путей UPR [31].

Наряду с проапоптотической и цитотоксической активностью у SeNP описана антиоксидантная и иммуностимулирующая активность [32]. Так, в работе [33] описан способ синтеза SeNP со средним диаметром от 64.1 до 110.1 нм с использованием в качестве стабилизатора дрожжевого β -1,3-глюкана, а в качестве агента, вызывающего формирование ковалентных связей между селеном и биполимером, – облучение рентгеновскими лучами с помощью источника излучения на основе ^{60}Co . Биологические испытания синтезированных таким образом частиц показали, что при внутрибрюшинном введении в дозировке 6 мг/кг живой массы SeNP вызывают частичное восстановление содержания в крови и костном мозге лейкоцитов (с 19 до 42% от нормы), лимфоцитов (с 14 до 28% от нормы), нейтрофилов (с 0.2 до 2.5% от нормы), В-лимфоцитов (с 0.3 до 1.8% от нормы), натуральных киллеров (с 0.5 до 3.8% от нормы), лимфоцитов с фенотипом CD4⁺ (с 0.2 до 6.1% от нормы) и иммуноглобулинов (с 600 до 1700 мкг/мл) у мышей, подвергшихся действию распространенного химиопрепарата цитоксан (циклофосфамид), для которого характерно угнетающее действие на активность иммунной системы. При этом содержание в крови интерферона γ (цитокина иммунного ответа Th1-типа) после введения SeNP оставалось неизменным. В работе [34], напротив, сообщается о стимуляции SeNP иммунного ответа Th1-типа в ущерб ответу Th2-типа.

Имеются сообщения об использовании для синтеза SeNP живой культуры пробиотического штамма *Lactobacillus casei*: диаметр частиц, полученных таким способом, составил ~360 нм, обработка клеточных линий рака толстой кишки этими наночастицами приводила к появлению маркеров гибели клеток за счет апоптоза [35].

Ранее авторами настоящей работы была разработана линейка искусственных белков W4, W8 и W12, несущих металлсвязывающий центр (сформирован из фрагментов Ca²⁺-связывающего центра кальмодулина человека и ELP-повторов), а также белковые лиганды, связывающие онкомаркеры: RGD-мотив (лиганд $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -интегрина) и F3 (лиганд нуклеолина). В отличие от большинства природных белков, данные белки не имеют гидрофобного кора и не обладают глобулярной структурой, постоянно находясь в состоянии расплавленной глобулы. Предыдущие исследования показали высокую эффективность белков W4, W8 и W12 в качестве носителей для доставки ионов Gd³⁺ в опухолевые клетки (в том числе карциномы молочной железы, легкого, толстой кишки и глиобластомы), что позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для разработок препаратов для контрастирования опухолей при проведении

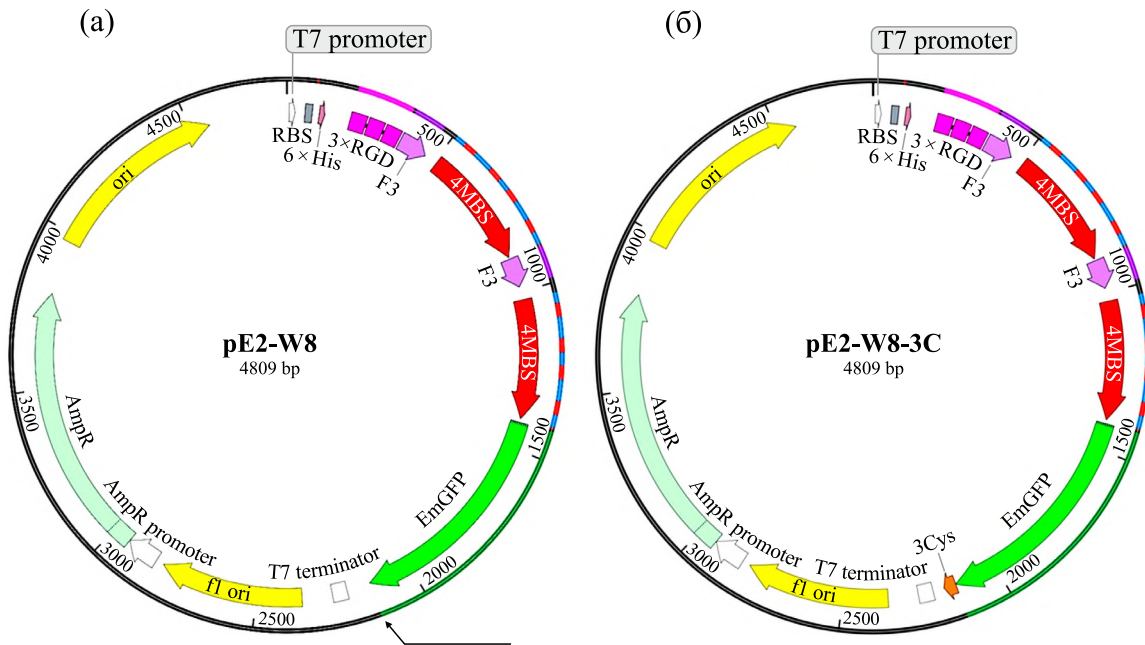


Рис. 1. Карта базовой конструкции pE2-W8, использованной для модификации белка W8 (а), и полученной конструкции pE2-W8-3C (б). Карты созданы с помощью SnapGene Viewer. Стрелкой указано место вставки участка гена, кодирующего С-концевой Cys-обогащенный пептид. Условные обозначения основных элементов: 3 × RGD – три RGD-содержащих пептида, F3 – F3-пептид, 4MBS – металлсвязывающий участок, EmGFP – зеленый флуоресцентный белок, 3Cys – С-концевой Cys-обогащенный пептид.

диагностики методом магнитно-резонансной томографии [3].

При планировании настоящей работы было высказано предположение о том, что белки W4, W8 и W12, в силу своей высокой гидрофильности, нехарактерной для природных белков и близкой к нейтральной изоэлектрической точки, а также в силу доказанной тропности к опухолям, могут быть эффективным средством для пассивирования SeNP. Однако отсутствие в них свободных остатков Cys (не участвующих в образовании дисульфидных связей) было признано их недостатком. Для устранения этого недостатка было предложено модифицировать белок W8, добавив на его С-конец синтетический мотив из 13 а.о., обогащенный остатками Cys и Gly: этот вариант белка получил обозначение W8-3C. После этого в качестве цели работы стало рассматриваться исследование возможности получения наночастиц селена с использованием белка W8-3C, оценка стабильности полученных наночастиц при хранении и сравнительная оценка их цитотоксической активности на опухолевых и нормальных клетках человека *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наработка образца рекомбинантного белка W8-3C. Получение генетической (плазмидной) кон-

струкции pW8-3C. В качестве основы для конструирования была взята плаزمида pE2-W8, описанная ранее [36] (рис. 1а). В данную конструкцию сразу после гена флуоресцентного белка был добавлен небольшой участок размером 39 п.н., кодирующий Cys-содержащий гибкий пептид из 12 а.о. (GGGCGGGCGGGC) и стоп-кодон. Данный фрагмент гена был собран из комплементарных олигонуклеотидов C3-for (gatccgggtggcggttgcg-gtggcggttggtggcggttgtaac) и C3-rev (tcgagttaacaaccgssaccsaaccgssaccg) (Синтол, Россия), генерирующих после образования дуплекса липкие концы, характерные для сайтов рестрикции BamHI и XhoI, и вставлен по соответствующим сайтам в вектор pE2-W8. Последовательность гена белка W8-3C в составе экспрессионной конструкции была подтверждена рестрикционным картированием, полимеразной цепной реакцией со специфичными праймерами и секвенированием по Сэнгеру («Евроген», Россия).

Получение и очистка белка W8-3C. Плазмидная конструкция pW8-3C была использована для трансформации экспрессионного штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3). Полученный штамм BL21 (DE3, pW8-3C) затем культивировали на полноценной среде LB (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л) с добавлением 100 мг/л ампицилина в течение 24 ч при 37°C.

Собранная биомасса использовалась для очистки рекомбинантного белка методом, описанным ранее [36]. Процедура получения белка включала в себя этап металл-хелатной хроматографии (ИМАС) на смоле HisPur™ Ni-NTA, а также обязательный этап удаления ионов металлов из металлсвязывающих участков с помощью интенсивного диализа раствора белка после обработки ЭДТА. Гомогенность препарата белка W8-3C подтверждали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Концентрацию белка измеряли с помощью модифицированного метода Лоури с использованием бичинхоновой кислоты (BCA assay kit, Sigma, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Синтез наночастиц селена, стабилизированных белком W8-3C. *Реагенты:* NaBH_4 (Sigma-Aldrich, CAS:16940-66-2), Na_2SeO_3 (Sigma-Aldrich, CAS:10102-18-8), Плюроник® F-127 (Sigma-Aldrich, CAS:9003-11-6), азотная кислота для проведения элементного анализа (Sigma-Aldrich, CAS:7697-37-2), стерильный физиологический раствор 0.15 М NaCl (pH 7.4) (ПанЭко, Россия), очищенный раствор белка W8-3C.

Протокол получения наночастиц № 1 (с белком W8-3C). К 2 мл белка W8-3C (3 мг/мл в стерильном физиологическом растворе) добавили 100 мкл 1 М водного раствора Na_2SeO_3 при перемешивании в течение 1 мин (итоговая концентрация иона селенита 50 мМ). Затем перенесли полученный раствор в пробирку с навеской NaBH_4 в 19.1 мг, интенсивно перемешали на вортексе в течение 30 с до полного растворения (итоговая концентрация иона боргидрида 13.5 мМ), после чего перемешивали на встряхивателе Eppendorf при 37°C, 900 об/мин, в течение 15 мин до образования оранжево-красного цвета. Раствор образовавшихся наночастиц диализовали против 1 л стерильного физиологического раствора дважды по 24 ч со сменой буфера при комнатной температуре.

Протокол получения наночастиц № 2 (с белком W8-3C и плюронином F-127). К 2 мл белка W8-3C (3 мг/мл в стерильном физиологическом растворе) добавили 100 мкл 1 М водного раствора Na_2SeO_3 (до 50 мМ) и 40 мкл 0.5% водного раствора F-127 (до 0.01%) при перемешивании. Раствор перенесли в пробирку с навеской NaBH_4 в 20.1 мг (13.5 мМ) и перемешали в течение 30 с до полного растворения на вортексе, далее перемешивали на встряхивателе Eppendorf при 37°C, 900 об/мин, в течение 45 мин до образования оранжево-красного цвета (образование окраски идет медленнее, чем при использовании Протокола 1). Дисперсию наночастиц диализовали против 1 л стерильного физиологического раствора

дважды по 24 ч со сменой буфера. По окончании диализа полученные растворы хранились при 4°C с соблюдением правил асептики.

Элементный анализ методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES). Образцы для ICP-OES готовили путем добавления 2 объемов концентрированной азотной кислоты и нагреванием при 60°C в течение 30 мин, после чего растворы разбавляли деионизированной водой и фильтровали через фильтр Millex 0.45 мкм (Merck, Германия). Калибровочные стандарты готовили из исходного одноэлементного калибровочного ICP-стандарта (10000 мг/л, Se, HNO_3 , кат. №: CGSE10-500ML, Inorganic Ventures, США) путем разведения в 2% (масс.) HNO_3 . В качестве холостого образца использовали 2%-й водный раствор HNO_3 . Измерения проводили на ICP-OES-спектрометре PlasmaQuant 9100 series (Analytik Jena, Германия).

Распределение частиц по размеру. Распределение частиц по размерам исследовали методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) с использованием Zetasizer Software V.7.12. В качестве растворителя использовали воду MilliQ высокой чистоты (сопротивление не менее $16 \text{ МОм}\cdot\text{см}^{-1}$).

Клеточные линии и условия их культивирования. В работе использовали следующие клеточные линии человека (приобретенные из коллекции ATCC – American Type Culture Collection): HeLa (ATCC CRM-CCL-2) – рак шейки матки, U-87 MG (ATCC HTB-14) – злокачественная глиома, MCF-7 (ATCC HTB-22) – аденокарцинома протоков молочной железы, HCT-116 (ATCC CCL-247) – колоректальная карцинома, WI-38 (ATCC CCL-75) – линия первичных фибробластов человека.

Клетки выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO_2 и при температуре 37°C.

Оценка цитотоксичности с помощью МТТ-теста. В лунки 96-луночного культурального планшета Costar вносили по 5–10 тыс. клеток и культивировали в стандартной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% сыворотки эмбриональной телячьей крови (Gibco), 2 мМ L-глутамин и раствор пенициллина-стрептомицина (5000 ЕД/мл пенициллина и 5000 ЕД/мл стрептомицина, ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 24 ч. Затем к клеткам добавляли раствор наночастиц селена Se-W8-3C в диапазоне от 0.3 до 78 мкг/мл по селену и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 24 ч и 48 ч. Перед добавлением раствора МТТ планшеты с клетками центрифугировали 5 мин

при 1500 об/мин, отбирали среду с раствором частиц Se-W8-3C, один раз отмывали 200 мкл полной питательной среды, после чего добавляли в лунки 200 мкл раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5 дифенилтетразолий бромида) в полной ростовой среде и инкубировали 4 ч при 37°C в 5% CO₂. После образования кристаллов формазана планшеты с клетками центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли в 150 мкл диметилсульфоксида. Интенсивность поглощения измеряли при $\lambda = 570$ нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США).

Процентную долю живых клеток (B , %) определяли по формуле:

$$B = (O_0/O_K) \times 100,$$

где O_K – оптическая плотность в контрольных лунках, O_0 – оптическая плотность в опытных лунках.

Цитотоксичность (C , %) определяли по формуле:

$$C = (1 - (O_0/O_K)) \times 100\%.$$

Каждое измерение проводилось в трех независимых технических повторностях, результаты усреднялись.

Расчет концентрации полумаксимального ингибирования роста IC_{50} методом линейной экстраполяции. По полученным данным о выживших клетках после воздействия разной концентрации Se-W8-3C в течение 24 и 48 ч (результаты МТТ-теста, выраженные в процентных долях выживших клеток от контроля – интактных клеток, для которых установлено значение 100%), где каждая

величина представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение (SD) ($n \geq 3$, $p < 0.05$) (рис. 4) методом линейной экстраполяции был проведен математический расчет концентрации полумаксимального ингибирования роста IC_{50} (табл. 1). Для каждой группы (клеточной линии) была выстроена линия тренда и выведена формула зависимости $Y(X)$ с величиной достоверности аппроксимации R^2 с использованием пакета Microsoft Excel (Microsoft, США). По полученным формулам для каждой группы клеток проведен расчет Y – концентрации исследуемого вещества, при которой процентная доля выживших клеток составляет 50 (X). Коэффициент достоверности аппроксимации R^2 показывает степень соответствия трендовой модели исходным данным. Его значение может лежать в диапазоне от 0 до 1. Чем ближе R^2 к 1, тем точнее модель описывает имеющиеся данные.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение конструкции, кодирующей белок W8-3C, и его продуцента на основе *E. coli*. Полученная экспрессионная конструкция pE2-W8-3C (рис. 1б) путем введения в базовую конструкцию pE2-W8 (рис. 1а) фрагмента, кодирующего пептид из 12 а.о. (GGGCGGGCGGGC) и стоп-кодона. Последовательность гена белка W8-3C в составе данной конструкции была подтверждена рестрикционным картированием, полимеразной цепной реакцией со специфичными праймерами и секвенированием по Сэнгеру.

Культивирование продуцента белка W8-3C и его очистки. В результате культивирования и очистки

Таблица 1. Данные по цитотоксической активности SeNP, стабилизированных белком W8-3C, в отношении опухолевых линий и нормальных фибробластов человека, полученные с помощью МТТ-теста через 24 ч и 48 ч

Название клеточной линии	Формула аппроксимации, величина достоверности аппроксимации R^2	IC_{50} мкг/мл	
		24 ч	48 ч
WI-38 – нормальные диплоидные фибробласты человека	(24 ч) $y = -1.6284x + 81.751$, $R^2 = 0.9177$ (48 ч) $y = -1.8874x + 76.955$, $R^2 = 0.7108$	19.5	14.3
HCT-116 – колоректальная карцинома человека	(24 ч) $y = -1.4581x + 97.257$, $R^2 = 0.1765$ (48 ч) $y = -3.1082x + 69.431$, $R^2 = 0.9366$	32.41*	5.25
U-87 MG – злокачественная глиома человека	(24 ч) $y = -3.4453x + 90.127$, $R^2 = 0.8946$ (48 ч) $y = -4.7280x + 75.856$, $R^2 = 0.9191$	11.65	5.47
HeLa – рак шейки матки человека	(24 ч) $y = -1.5005x + 75.102$, $R^2 = 0.2685$ (48 ч) $y = -3.8960x + 74.220$, $R^2 = 0.9292$	16.73*	6.22
MCF-7 – аденокарцинома протоков молочной железы человека	(24 ч) $y = -4.1562x + 91.943$, $R^2 = 0.7940$ (48 ч) $y = -3.0345x + 75.394$, $R^2 = 0.9648$	10.09	8.37

Примечание. В ячейках таблицы приведены концентрации полумаксимального ингибирования роста IC_{50} , рассчитанные методом линейной экстраполяции; R^2 – величина достоверности аппроксимации; * – данные недостоверны.

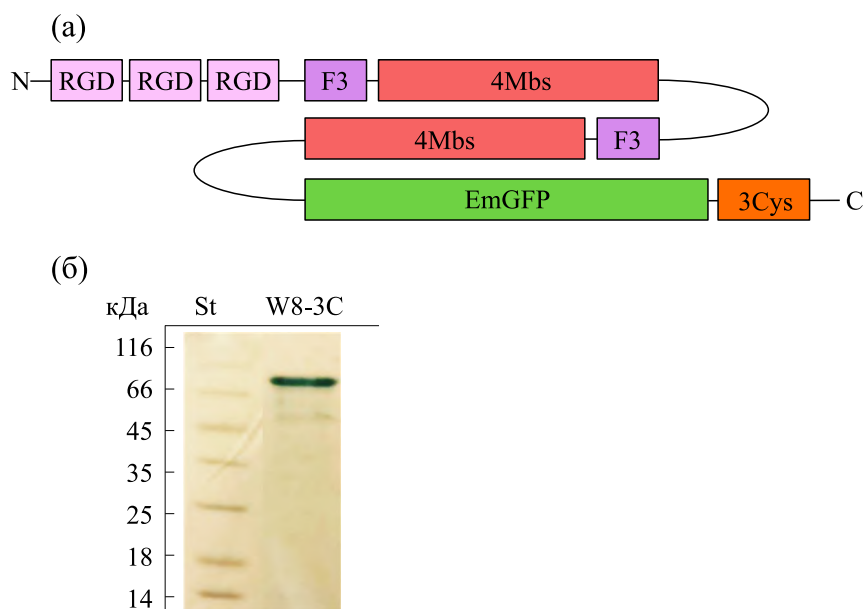


Рис. 2. (а) – Условная схема расположения основных функциональных элементов в белке W8-3C. Условные обозначения те же, что на рис. 1. N- и C-концы белка обозначены соответствующими буквами. (б) – Электрофореграмма очищенного белка W8-3C в SDS-ПААГ после переноса на мембрану и окраски Амидовым черным. St – стандарт молекулярной массы (Fermentas, Канада).

получен белок W8-3C с выходом очищенного белка 18–20 мг/л культуры. Условная схема расположения основных функциональных элементов белка W8-3C показана на рис. 2а. Молекулярная масса белка составила 68.4 кДа, чистота по электрофорезу – не менее 95% (рис. 2б), концентрация 3 мг/мл (43.86 мкМ).

Исследование физико-химических характеристик дисперсий наночастиц Se, полученных в присутствии плуроника F-127 и белка W8-3C. На предварительной стадии эксперимента были опробованы несколько протоколов получения наночастиц Se (данные не приводятся). Наиболее эффективными с точки зрения выхода частиц оказались методы получения частиц с применением в качестве пассивирующего агента либо только белка W8-3C, либо белка с добавлением плуроника F-127 [36]. Однако дисперсии SeNP, полученные в присутствии белка W8-3C и плуроника, характеризовались неудовлетворительной стабильностью: при хранении при 4°C в течение 10–15 суток они агрегировали и выпадали в осадок. По данным ICP-OES, максимальное содержание Se в составе свежеполученной в присутствии плуроника F-127 дисперсии наночастиц составляла 399 мкг/мл.

Напротив, дисперсия наночастиц Se, полученных в присутствии только белка W8-3C, не претерпела каких-либо видимых изменений при хранении в течение 6 месяцев при 4°C (рис. 3). По данным ICP-OES, максимальное содержание Se в

составе наночастиц, полученных в присутствии только белка W8-3C, составляла 1566 мкг/мл.

По данным спектроскопии динамического рассеяния света, средний диаметр наночастиц, полученных в присутствии белка W8-3C, составлял 75.24 нм при индексе полидисперсности $Pdi = 0.064$ (рис. 3).

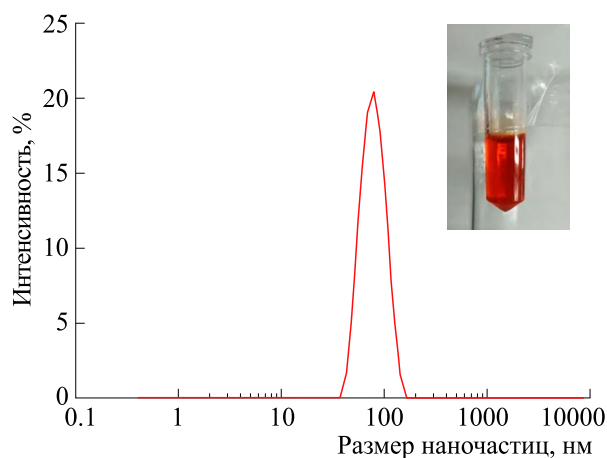


Рис. 3. Распределение по размеру наночастиц SeNP, полученных в присутствии W8-3C. Данные получены методом динамического рассеяния света. На врезке фотография раствора SeNP, полученных в присутствии W8-3C, через 6 месяцев хранения при 4°C после синтеза.

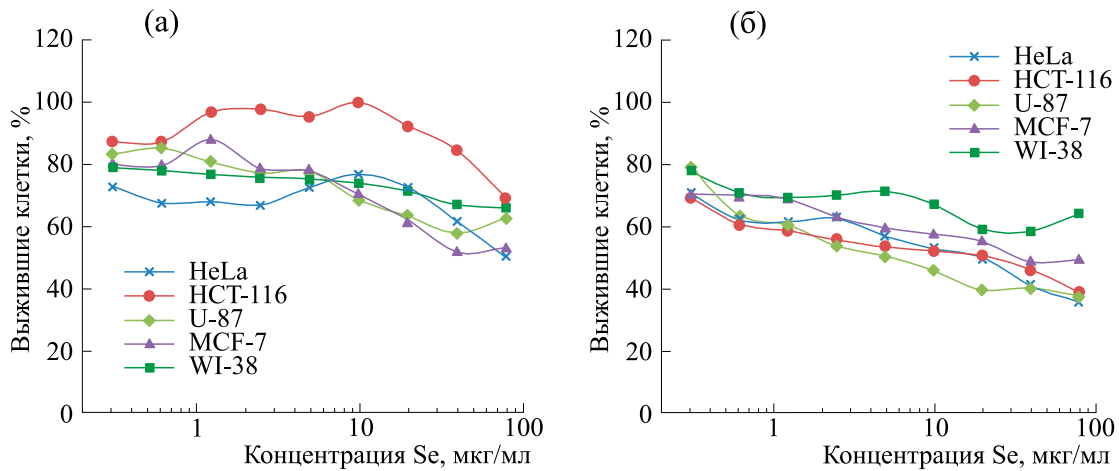


Рис. 4. Анализ по результатам МТТ-теста доли выживших клеток, подвергшихся в течение 24 (а) и 48 ч (б) воздействию разной концентрации наночастиц SeNP, полученных в присутствии W8-3С. Результаты представлены как процентная доля выживших клеток по отношению к контролю (интактным клеткам той же линии, не подвергавшимся воздействию цитотоксических веществ). На графике показаны значения, полученные по результатам усреднения трех независимых экспериментов.

Оценка цитотоксической активности наночастиц Se, полученных в присутствии белка W8-3С, на опухолевых клетках *in vitro*. Цитотоксичность исследуемых наночастиц Se, полученных в присутствии белка W8-3С, на различные опухолевые клетки человека (HeLa, U-87 MG, MCF-7, HCT-116) в сравнении с диплоидной линией фибробластов человека (WI-38) оценивали с помощью колориметрического МТТ-теста, позволяющего оценить общую метаболическую активность культуры. Клетки инкубировали с дисперсиями частиц SeNP, стабилизированных белком W8-3С, в диапазоне концентраций (по Se) от 0.3 до 78 мкг/мл. Оценку метаболической активности клеток с помощью МТТ-теста проводили через 24 и 48 ч (рис. 4). Полученные значения использовали для расчета величин полумаксимального ингибирования роста IC_{50} методом линейной экстраполяции (табл. 1).

Установлено, что инкубация клеток с дисперсией SeNP, полученных в присутствии белка W8-3С, приводила к снижению пролиферативной активности клеток. Однако даже при максимальной концентрации наночастиц (78 мкг/мл по Se) часть клеток сохраняла жизнеспособность. Воздействие на опухолевые клетки в течении 48 ч наночастиц Se, полученных в присутствии белка W8-3С, приводило к существенному нарастанию цитотоксического эффекта. Так, для U-87 MG (злокачественная глиома человека) расчетная концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) через 24 ч эксперимента составила 11.65 мкг/мл, а через 48 ч этот показатель упал до 5.47 мкг/мл. При этом нормальные клетки (диплоидные фибробласты человека) проявляли большую устойчивость к действию частиц, чем

все исследованные опухолевые линии. Клетки опухолевой линии HCT-116 (колоректальная карцинома человека) также показали высокую чувствительность к наночастицам Se, полученным в присутствии белка W8-3С: IC_{50} через 48 ч эксперимента для них составила 525 мкг/мл Se. Можно предположить, что высокая эффективность действия в отношении клеток глиомы SeNP, полученных с помощью белка W8-3С, обусловлена наличием на их поверхности $\alpha\beta 3$ -интегринов и нуклеолина [37], являющихся рецепторами лигандов, входящих в состав W8-3С.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках настоящей работы впервые было описано создание и использование для наработки белкового продукта конструкции pW8-3С (рис. 2). Продуктивность штамма BL21(DE3, pW8-3С) по выходу очищенного белкового продукта составила 18–20 мг/л, что практически совпадает с продуктивностью штамма на основе конструкции pE2-W8. Данный показатель позволяет считать вновь созданный продуцент перспективным для практического использования. Белок W8-3С был очищен до гомогенного состояния с использованием ранее описанной методики [36], позволяющей применять металлоаффинную хроматографию для очистки белков, несущих центры прочного связывания двухвалентных катионов, к которым относится W8-3С.

Использование белка W8-3С для синтеза SeNP дало хороший выход частиц по включению в них Se. Реакция протекала при комнатной температуре в течение ~1 ч. Об окончании реакции можно было следить по развитию характерной оранже-

вой окраски. При этом необходимо отметить, что введенный в реакцию боргидрид натрия присутствовал в недостатке по сравнению с селенитом натрия (13.5 мМ против 50 мМ). Полученные результаты позволяют предполагать, что белок W8-3C в будущем может быть использован не только для синтеза SeNP, но и для функционализации наночастиц золота, с которыми свободные остатки Cys, имеющиеся в составе деструктурированной последовательности на С-конце этого белка, могут образовывать прочные ковалентные связи [38].

Наиболее значимым результатом настоящей работы является демонстрация высокой эффективности искусственного белка W8-3C в качестве средства для пассивирования поверхности наночастиц Se, что обеспечивает устойчивость дисперсии SeNP при хранении. Показатель устойчивости наночастиц Se — сохранность гранулометрических характеристик дисперсии диаметром ~75 нм в течение 6 мес. хранения при 4°C — не был достигнут ни в одной из ранее опубликованных работ по этой теме. При этом содержание Se в дисперсии составляет ~1.5 мг/мл, что в 3.75 раза превышает показатель, достигнутый в нашей работе при использовании сочетания W8-3C с плюроником F-127, и в 5–7 раз выше максимальных показателей, приведенных в опубликованных работах [33]. Столь высокий показатель устойчивости частиц в растворе позволяет в будущем провести весь необходимый цикл работ по изучению механизма цитотоксического действия наночастиц селена, который, несмотря на высокий интерес, до настоящего времени остается малоизученным. Основной причиной сложности расшифровки этого механизма, очевидно, является трудность воспроизведения биологических экспериментов с участием SeNP, полученных при использовании ранее предложенных пассивирующих агентов, ввиду быстрого изменения свойств дисперсий при хранении. Мы предполагаем, что эффективность действия W8-3C в качестве агента, стабилизирующего наночастицы Se при хранении, является низкой гидрофобность, нехарактерная для природных белков, близкая к нейтральной изоэлектрическая точка, а также наличие трех свободных остатков Cys, эффективно участвующих в формировании ковалентных связей с атомами Se, входящими в кристаллическую решетку наночастиц.

Помимо этого, важным результатом нашей работы является демонстрация избирательности цитотоксического действия SeNP, полученных в присутствии белка W8-3C, в отношении четырех опухолевых линий, в том числе такой устойчивой к химиопрепаратам линии, как U-87 MG (злокачественная глиома человека). Через 48 ч инкубации с SeNP IC_{50} для нормальных фибробластов

оказалась в 1.7–2.7 раз выше, чем для опухолевых линий карцином толстой кишки, шейки матки и молочной железы, а также глиобластомы.

Мы предполагаем, что избирательность действия наночастиц в отношении опухолевых линий достигнута, в первую очередь, за счет оптимального размера наночастиц ~75 нм, достигнутого при выбранных соотношениях концентраций селенита натрия, белка W8-3C и боргидрида натрия во время синтеза наночастиц. Кроме того, вероятно, сыграло роль присутствие в составе белка W8-3C белковых мотивов F3 и RGD, обладающих тропностью к поверхностным онкомаркерам, представленным на большинстве типов опухолей. Не исключено также, что обнаруженная избирательность цитотоксического действия наночастиц Se обусловлена различиями в функционировании дыхательной цепи митохондрий и систем антиоксидантной защиты по сравнению с нормальными клетками, в частности проявляющейся в виде склонности опухолевых линий к анаэробному метаболизму (эффект Варбурга) [39].

Эффективность предложенного способа синтеза наночастиц Se по выходу продукта и обнаруженные соотношения их токсичности в отношении опухолевых линий и нормальных фибробластов позволяет планировать эксперименты по тестированию наночастиц в качестве цитотоксического агента для сдерживания роста опухолевых очагов и метастаз [7]. Известные данные позволяют предполагать, что при правильном подборе терапевтической дозы наночастицы Se будут обладать достаточно низкой побочной токсичностью, эффективно сдерживая рост опухолей. Так, в работах [40, 41] сообщается, что LD_{50} SeNPs для мышей составляет примерно 91.2–258.2 мг Se на кг массы тела, тогда как LD_{50} метилселеноцистеина составила 22.0 мг/кг, а LD_{50} H_2SeO_3 — 14.6 мг/кг.

Кроме того, наночастицы Se могут быть использованы в качестве вектора для адресной доставки в опухоли цитотоксических агентов, содержащих сульфгидрильные группы (в том числе искусственно вводимые в рекомбинантные белки): ризицина, вискумина, дифтерийного токсина, цисплатина и других [42–44]. Вероятно, эти частицы могут быть использованы и для доставки гидрофобных цитостатиков, обладающих недостаточной растворимостью в плазме крови, в том числе таких популярных, как доксорубин, винкристин, таксаны, блеомицин, метотрексат и другие [45, 46].

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лаборатории радионуклидных и

лучевых технологий в экспериментальной онкологии НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России В.А. Скрибичкому и К.Е. Шпаковой за неоценимую помощь с проведением элементного анализа методом оптико-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jan N., Shah H., Khan S., Nasar F., Madni A., Badshah S. F., Ali A., and Bostanudin M. F. Old drug, new tricks: polymer-based nanoscale systems for effective cytarabine delivery. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **397**, 3565–3584 (2024). DOI: 10.1007/s00210-023-02865-z
- Bareja S. and Sharma R. K. Comparative effects of chemical and green zinc oxide nanoparticles in caprine testis: ultrastructural and steroidogenic enzyme analysis. *Ultrastruct. Pathol.*, **48** (1), 42–55, (2024). DOI: 10.1080/01913123.2023.2286963
- Barchielli G., Capperucci A., and Tanini D. The role of selenium in pathologies: an updated review. *Antioxidants (Basel)*, **11** (2), 251 (2022). DOI: 10.3390/antiox11020251
- Mesalam N. M., Ibrahim M. A., Mousa M. R., and Said N. M. Selenium and vitamin E ameliorate lead acetate-induced hepatotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, mRNA of Heat shock proteins, and NF- κ B production. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **79**, 127256 (2023). DOI: 10.1016/j.jtemb.2023.127256
- Anghinoni J. M., Birmann P. T., da Rocha M. J., Gomes C. S., Davies M. J., Brüning C. A., Savegnago L., and Lenardão E. J. Recent advances in the synthesis and antioxidant activity of low molecular mass organoselenium molecules. *Molecules (Basel)*, **28**, 7349 (2023). DOI: 10.3390/molecules28217349
- Dogaru C.B., Muscurel C., Duță C., and Stoian I. “Alphabet” selenoproteins: their characteristics and physiological roles. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15992 (2023). DOI: 10.3390/ijms242115992
- Hosnedlova B., Kepinska M., Skalickova S., Fernandez C., Ruttikay-Nedecky B., Peng Q., Baron M., Melcova M., Opatrilova R., Zidkova J., Björklund G., Sochor J., and Kizek R. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int. J. Nanomedicine*, **2018** (13), 2107–2128 (2018). DOI: 10.2147/IJN.S157541
- Davis S. S. Biomedical applications of nanotechnology – implications for drug targeting and gene therapy. *Trends Biotechnol.*, **15**, 217–224 (1997). DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01036-6
- Khurana A., Tekula S., Saifi M. A., Venkatesh P., and Godugu C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed. Pharmacother.*, **111**, 802–812 (2019). DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.146
- Pehlivan Ö., Waliczek M., Kijewska M., and Stefanowicz P. Selenium in peptide chemistry. *Molecules (Basel)*, **28**, 3198 (2023). DOI: 10.3390/molecules28073198
- Zhao J., Wang Z., Zhong M., Xu Q., Li X., Chang B., and Fang J. Integration of a diselenide unit generates fluorogenic camptothecin prodrugs with improved cytotoxicity to cancer cells. *J. Med. Chem.*, **64**, 17979–17991 (2021). DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01362
- Selmani A., Ulm L., Kasemets K., Kurvet I., Erceg I., Barbir R., Pem B., Santini P., Marion I. D., Vinković T., Krivohlavek A., Sikirić M. D., Kahru A., and Vrček I. V. Stability and toxicity of differently coated selenium nanoparticles under model environmental exposure settings. *Chemosphere*, **250**, 126265 (2020). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126265
- Kumari M., Ray L., Purohit M. P., Patnaik S., Pant A. B., Shukla Y., Kumar P., and Gupta K. C. Curcumin loading potentiates the chemotherapeutic efficacy of selenium nanoparticles in HCT116 cells and Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **117**, 346–362 (2017). DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.05.003
- Wang Y., Chen P., Zhao G., Sun K., Li D., Wan X., and Zhang J. Inverse relationship between elemental selenium nanoparticle size and inhibition of cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem. Toxicol. Int. J.*, **85**, 71–77 (2015). DOI: 10.1016/j.fct.2015.08.006
- Peng D., Zhang J., Liu Q., and Taylor E. W. Size Effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 1457–1463 (2007). DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2007.06.021
- Zhou Y., Xu M., Liu Y., Bai Y., Deng Y., Liu J., and Chen L. Green synthesis of Se/Ru alloy nanoparticles using gallic acid and evaluation of their anti-invasive effects in HeLa cells. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **144**, 118–124 (2016). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.04.004
- Liu T., Zeng L., Jiang W., Fu Y., Zheng W., and Chen T. Rational design of cancer-targeted selenium nanoparticles to antagonize multidrug resistance in cancer cells.

- Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **11**, 947–958 (2015). DOI: 10.1016/j.nano.2015.01.009
18. Hien N. Q., Tuan P. D., Van Phu D., Lan N. T. K., Duy N. N., and Hoa T. T. Gamma Co-60 ray irradiation synthesis of dextran stabilized selenium nanoparticles and their antioxidant activity gamma Co-60 ray irradiation synthesis of dextran stabilized selenium nanoparticles and their antioxidant activity. *Mater. Chem. Phys.*, **205**, 29–34 (2018). DOI: 10.1016/j.matchemphys.2017.11.003
 19. Jia X., Liu Q., Zou S., Xu X., and Zhang L. Construction of selenium nanoparticles/ β -glucan composites for enhancement of the antitumor activity. *Carbohydr. Polym.*, **117**, 434–442 (2015). DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.09.088
 20. Nguyen D. N., Van Dang P., Le Q. A., Kim Nguyen L. T., Nguyen H. Q., Thu Tran N. T., Le Bao Tran H., Phan T. D., and Bui H. M. Preparation and effect of selenium nanoparticles/oligochitosan on the white blood cell recovery of mice exposed to gamma-ray radiation. *J. Chem.*, **2021**, e6635022 (2021). DOI: 10.1155/2021/6635022
 21. Yang F., Tang Q., Zhong X., Bai Y., Chen T., Zhang Y., Li Y., and Zheng W. Surface decoration by spirulina polysaccharide enhances the cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Int. J. Nanomed.*, **7**, 835–844 (2012). DOI: 10.2147/IJN.S28278
 22. Bai K., Hong B., He J., Hong Z., and Tan R. Preparation and antioxidant properties of selenium nanoparticles-loaded chitosan microspheres. *Int. J. Nanomed.*, **12**, 4527–4539 (2017). DOI: 10.2147/IJN.S129958
 23. Wang Z., Ji L., Ren Y., Liu M., Ai X., and Yang C. Preparation and anti-tumor study of dextran 70,000-selenium nanoparticles and poloxamer 188-selenium nanoparticles. *AAPS Pharm.SciTech*, **23**, 29 (2021). DOI: 10.1208/s12249-021-02141-4
 24. Mekki A. I., Fathy M., and Mohamed H. B. Evaluation of different surface coating agents for selenium nanoparticles: enhanced anti-inflammatory activity and drug loading capacity. *Drug Des. Devel. Ther.*, **16**, 1811–1825 (2022). DOI: 10.2147/DDDT.S360344
 25. Lin Z.-H. and Wang C.-R. Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.*, **92**, 591–594 (2005). DOI: 10.1016/j.matchemphys.2005.02.023
 26. Hoffmann P. R. and Berry M. J. The Influence of selenium on immune responses. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 1273–1280 (2008). DOI: 10.1002/mnfr.200700330
 27. Zeng H. and Combs G. F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J. Nutr. Biochem.*, **19**, 1–7 (2008). DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.02.005
 28. Noè R., Inglese N., Romani P., Serafini T., Paoli C., Calciolari B., Fantuz M., Zamborlin A., Surdo N. C., Spada V., Spacci M., Volta S., Ermini M. L., Di Benedetto G., Frusca V., Santi C., Lefkimmiatis K., Dupont S., Voliani V., Sancineto L., and Carrer A. Organic selenium induces ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Redox Biol.*, **68**, 102962 (2023). DOI: 10.1016/j.redox.2023.102962
 29. Philipp T. M., Scheller A. S., Krafczyk N., Klotz L.-O., and Steinbrenner H. Methanethiol: a scent mark of dysregulated sulfur metabolism in cancer. *Antioxidants*, **12** (9), 1780 (2023). DOI: 10.3390/antiox12091780
 30. Fang L., Zhang R., Shi L., Xie J., Ma L., Yang Y., Yan X., and Fan K. Protein-nanocaged selenium induces t(8;21) leukemia cell differentiation via epigenetic regulation. *Adv. Sci.*, **10** (35), e2300698 (2023). DOI: 10.1002/adv.202300698
 31. Varlamova E. G., Goltyaev M. V., Mal'tseva V. N., Turovsky E. A., Sarimov R. M., Simakin A. V., and Gudkov S. V. Mechanisms of the cytotoxic effect of selenium nanoparticles in different human cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7798 (2021). DOI: 10.3390/ijms22157798
 32. Pelyhe C. and Mezes M. Myths and facts about the effects of nano selenium in farm animals - mini-review. *Eur. Chem. Bull.*, **2**, 1049–1052 (2013).
 33. Dung N. T., Trong T. D., Vu N. T., Binh N. T., Minh T. T. L., and Luan L. Q. Radiation synthesis of selenium nanoparticles capped with β -glucan and its immunostimulant activity in cytoxan-induced immunosuppressed mice. *Nanomaterials*, **11** (9), 2439 (2021). DOI: 10.3390/nano11092439
 34. Yazdi M. H., Mahdavi M., Faghfuri E., Faramarzi M. A., Sepehrizadeh Z., Hassan Z. M., Gholami M., and Shahverdi A. R. Th1 immune response induction by biogenic selenium nanoparticles in mice with breast cancer: preliminary vaccine model. *Iran. J. Biotechnol.*, **13** (2), 1–9 (2015). DOI: 10.15171/ijb.1056
 35. Spyridopoulou K., Aindelis G., Pappa A., and Chlichlia K. Anticancer activity of biogenic selenium nanoparticles: apoptotic and immunogenic cell death markers in colon cancer cells. *Cancers*, **13**, 5335 (2021). DOI: 10.3390/cancers13215335
 36. Pozdniakova N. V., Ryabaya O. V., Semkina A. S., Skribitsky V. A., and Shevelev A. B. Using ELP repeats as a scaffold for de novo construction of gadolinium-binding domains within multifunctional recombinant proteins for targeted delivery of gadolinium to tumour cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3297 (2022). DOI: 10.3390/ijms23063297
 37. Koutsoumpa M., Polyarchou C., Courty J., Zhang Y., Kieffer N., Mikelis C., Skandalis S. S., Hellman U., Iliopoulos D., and Papadimitriou E. Interplay between Av β 3 Integrin and nucleolin regulates human endothelial and glioma cell migration. *J. Biol. Chem.*, **288**, 343–354 (2013). DOI: 10.1074/jbc.M112.387076
 38. Zhu X., Liu H., Dai Y., Wang X., Luo C., and Wei Q. Enhanced electrochemiluminescence of luminol based on

- Cu₂O-Au heterostructure enabled multiple-amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.*, **151**, 111970 (2020). DOI: 10.1016/j.bios.2019.111970
39. Lin J., Liu Y., Liu P., Qi W., Liu J., He X., Liu Q., Liu Z., Yin J., Lin J., Bao H., and Lin J. SNHG17 alters anaerobic glycolysis by resetting phosphorylation modification of PGK1 to foster pro-tumor macrophage formation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **42**, 339 (2023). DOI: 10.1186/s13046-023-02890-z
40. Zhang J., Wang X., and Xu T. Elemental selenium at nano size (nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with Selenomethylselenocysteine in mice. *Toxicol. Sci.*, **101**, 22–31 (2008). DOI: 10.1093/toxsci/kfm221
41. Zhai X., Zhang C., Zhao G., Stoll S., Ren F., and Leng X. Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. *J. Nanobiotechnol.*, **15**, 4 (2017). DOI: 10.1186/s12951-016-0243-4
42. Bidkar A. P., Sanpui P., and Ghosh S. S. Efficient induction of apoptosis in cancer cells by paclitaxel-loaded selenium nanoparticles. *Nanomed.*, **12**, 2641–2651 (2017). DOI: 10.2217/nnm-2017-0189
43. Felenda J. E., Turek C., and Stintzing F. C. Antiproliferative potential from aqueous *Viscum Album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and puromycin on human cancer cells. *J. Ethnopharmacol.*, **236**, 100–107 (2019). DOI: 10.1016/j.jep.2019.02.047
44. Nazari M., Emamzadeh R., Jahanpanah M., Yazdani E., and Radmanesh R. A recombinant affibody derived from a HER3 affibody and diphtheria-toxin has potent and selective antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, **219**, 1122–1134 (2022). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.150
45. Shah N., Mohammad A. S., Saralkar P., Sprowls S. A., Vickers S. D., John D., Tallman R. M., Lucke-Wold B. P., Jarrell K. E., Pinti M., Nolan R. L., and Lockman P. R. Investigational chemotherapy and novel pharmacokinetic mechanisms for the treatment of breast cancer brain metastases. *Pharmacol. Res.*, **132**, 47–68 (2018). DOI: 10.1016/j.phrs.2018.03.021
46. Ali I., Rahis-Uddin, Salim K., Rather M. A., Wani W. A., and Haque A. Advances in nano drugs for cancer chemotherapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **11** (2), 135–146 (2011). DOI: 10.2174/156800911794328493

Study of Cytotoxicity of Selenium Nanoparticles Synthesized Using Artificial Metal-Binding Tumor-Specific Protein W8-3C

N.V. Pozdnyakova*, **, Yu.K. Biryukova***, Z.A. Sokolova*, M.A. Baryshnikova*, E.S. Shcherbakova**, ****, M.S. Smirnova**, and A.B. Shevelev**

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115522 Russia

**N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

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

****Research Laboratory "Genetics", Kursk State University, ul. Radishcheva 33, Kursk, 305000 Russia

For the first time, the pW8-3C construct encoding the artificial tumor-specific protein W8-3C with the addition of 3 residues of free Cys at the C end was created and described. Using purified W8-3C protein, dispersions of nanoparticles 75.24 nm in diameter at polydispersity index (Pdi) of 0.064 and Se content of 1566 µg/mL were obtained and characterized for the first time. The dispersions remained stable upon storage for 6 months at +4°C. For comparison, the maximum Se content in the nanoparticle dispersion obtained in the presence of W8-3C protein and Pluronic F-127 was 399 µg/ml. The cytotoxic activity of the obtained nanoparticles was studied on transplanted cells of human tumor lines: HeLa (cervical carcinoma), U-87 MG (glioblastoma), MCF-7 (breast carcinoma) and HCT-116 (colon carcinoma) and compared with that on the diploid human fibroblast line WI-38 *in vitro*. It was shown that the *IC*₅₀ of Se nanoparticles obtained using the W8-3C protein for tumor lines ranged from 5.25 to 8.37 µg/ml, while the *IC*₅₀ for normal fibroblasts was 14.3 µg/ml (difference in values by a factor of 1.7–2.7 times).

Keywords: selenium, nanoparticles, recombinant protein, tumor, cytotoxicity, *IC*₅₀, cysteine

ПАРАМЕТРИЗАЦИЯ МОДЕЛИ ВРЕМЕНИ ЦВЕТЕНИЯ ОБРАЗЦОВ ДИКОГО НУТА С ПЕРЕНОСОМ ЗНАНИЙ ОТ НЕСКОЛЬКИХ ИСТОЧНИКОВ

© 2024 г. З.А. Саранин*, М.Г. Самсонова*, К.Н. Козлов*.*#

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

#E-mail: kozlov_kn@spbstu.ru

Поступила в редакцию 05.09.2023 г.

После доработки 05.09.2023 г.

Принята к публикации 20.09.2023 г.

Построение прогноза времени цветения позволяет исследователям создавать сорта, достигающие максимальной эффективности и ценности в условиях изменения климата. В данной работе предложен алгоритм параметризации модели времени цветения образцов дикого нута, который использует метод машинного обучения «перенос знаний» (transfer learning) для комбинирования нескольких наборов исходных данных и целевых данных. Построенная модель, используя генетические и климатические данные только за первые 20 суток после посева, предсказывает время цветения образцов с высокой точностью – средняя абсолютная ошибка составляет чуть больше 5 суток, коэффициент корреляции Пирсона – 0.93. Было обнаружено, что максимальная и минимальная температура оказывают наиболее сильное влияние на время цветения. При этом все погодные факторы на 7–10-е сутки после посева оказывают влияние на решение модели.

Ключевые слова: климатические факторы, нут, математическое моделирование, перенос знаний.

DOI: 10.31857/S0006302924050108, EDN: MJZCUO

Совершенствование селекции зернобобовых культур и прогнозирование их фенотипических признаков в частности является важным условием для обеспечения продовольственной безопасности растущего населения земного шара. Нут (*Cicer arietinum* L.) – вторая по распространенности зернобобовая культура, богатая пищевым белком [1]. Дикий нут, *Cicer reticulatum*, является растением длинного дня (LD) и проявляет чувствительность к яровизации [2, 3]. Однако окультуривание этого растения привело к появлению генотипов, не требующих яровизации и пригодных для весеннего посева [3, 4].

Факторами, устанавливающими предел времени для достижения нутом репродуктивной фазы, являются температурный режим, продолжительность светового дня, доступность воды [2, 5]. Условием стабильного урожая является соответствие продолжительности роста доступному вегетационному периоду [6]. Сорта нута, различающиеся по продолжительности роста, получают путем селекции. Различие в продолжительности роста сортов позволяет адаптировать их к разным широтам и режимам посева [3, 7–9].

Для прогнозирования фенотипических признаков может быть использовано математическое моделирование. Распространенные математические модели бобовых культур SSM [11, 12], DSSAT [13–17], APSIM [18] и др. [19, 20] описывают фотосинтез, поглощение воды и другие биофизические и биохимические процессы с помощью дифференциальных уравнений. Скорость перехода к следующей фенофазе в зависимости от погодных условий вычисляется с использованием таких характеристик, как индекс тепловых единиц (HUI) [20], единицы тепла (CHU), тепловые дни (DD) или биологические дни (BD) [21]. Адаптация существующих моделей к новым сортам или погодным условиям требует значительных усилий и времени [22–27]. Таким образом, разработка новых гибких моделей, которые легко могут адаптироваться к новому сорту, остается актуальной задачей.

В данной работе предложен алгоритм параметризации модели времени цветения образцов дикого нута с использованием переноса знаний (transfer learning) – метода машинного обучения, позволяющего комбинировать несколько наборов исходных и целевых данных.

ПЕРЕНОС ЗНАНИЙ ОТ НЕСКОЛЬКИХ ИСТОЧНИКОВ

Перенос знаний (transfer learning) — прием в машинном обучении, который использует информацию о хорошо изученном наборе объектов (исходной области) для описания целевой области: нового набора данных, сходного по каким-то параметрам с объектами исходной области. При построении агроклиматических моделей часто встает вопрос об использовании данных из нескольких экспериментов для увеличения количества образцов при обучении модели. В алгоритме обучения с переносом знаний знания из исходной области переносятся на целевую область. При таком обучении точность предсказаний в значительной степени зависит от сходства исходной и целевой областей. Использование нескольких источников при описании целевой области позволяет полнее использовать разнообразие данных.

ОБРАЗЦЫ РАСТЕНИЙ И ПОЛЕВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Авторами работы [28] коллекция образцов дикого нута *Cicer reticulatum* L. и *Cicer echinospermum* была собрана в 21 географической локации вокруг 10 населенных пунктов в 5 регионах Турции. В районах сбора имеется значительный перепад высот, при этом наблюдения за климатом показывают, что на небольших высотах температуры выше, а количество осадков в среднем ниже по сравнению с более высокими точками. Отмечено, что популяции *C. echinospermum* обычно встречаются на более низких высотах, чем популяции *C. reticulatum*. Самые низкие среднемесячные температуры (от -4.8 до -2.2°C по сравнению с -2.2 до -0.6°C) зимой отмечаются на трех наиболее восточных и высокогорных участках. Весной на этих участках чаще бывают заморозки в вегетационный период. В ходе полевых экспериментов в Шанлыурфе и Анкаре (Турция) и Перте (Австралия) были исследованы 2174 образца с посевом во второй половине года на 270, 290, 294, 305, 325 или 339 суток от его начала. Время цветения для этого набора данных колеблется от 117 до 221 суток. Эти данные были использованы в обучении с переносом знаний как источники 1 (турецкие образцы) и 2 (австралийские образцы) соответственно.

Были также проведены полевые эксперименты с 2088 образцами, высеванными на 32, 36, 78, 95, 161 сутки календарного года; время цветения для этого набора данных составило от 64 до 152 суток. Этот набор данных был использован в обучении с переносом знаний как целевая область.

КОМБИНИРОВАННАЯ МОДЕЛЬ СИМВОЛЬНОЙ РЕГРЕССИИ

Для прогнозирования времени цветения построим модель Q (1) как линейную комбинацию методом LASSO моделей символьной регрессии Q_k :

$$Q = b_0 Q_0 + b_1 Q_1 + \dots + b_k Q_k + \dots, \quad (1)$$

где b_k — коэффициенты, полученные методом LASSO, а каждая из моделей Q_k строится как суперпозиция элементарных функций «+», «-», «*», «/», связывающих переменные, описывающие генетические и климатические факторы.

Шесть однонуклеотидных полиморфизмов, предположительно связанных со временем цветения, были идентифицированы как лучшие однонуклеотидные полиморфизмы после запуска смешанной линейной модели (MLM) в TASSEL, которая ассоциировала время цветения (фенотип) с генотипами, используя место/год/сезон в качестве фактора для учета их влияния на фенотип.

В моделях используются переменные SNP1AA–SNP6RR, принимающие значения 0 или 1 для обозначения альтернативных (ALT) и референсных (REF) аллелей растений (ALT/ALT, REF/ALT и REF/REF) [27].

Данные о климатических условиях на каждые сутки, начиная с посева до 20 суток ($a = 0, \dots, 19$), взяты с общедоступного сайта «Радар погоды» (https://rp5.ru/Weather_in_the_world) и проекта POWER исследовательского центра NASA в Лэнгли (LaRC) [29]:

- $D(a)$ — длина дня;
- $T_n(a)$ — минимальная температура;
- $T_x(a)$ — максимальная температура;
- $P(a)$ — количество осадков;
- $R(a)$ — солнечное излучение.

АЛГОРИТМ ПАРАМЕТРИЗАЦИИ МОДЕЛИ

Будем строить комбинированную модель символьной регрессии Q , учитывающую климатические и генетические факторы и минимизирующую среднее относительное отклонение решения модели от данных (MAPE). Общая схема алгоритма представлена на рис. 1. Пусть исходные наборы данных $S_j = \{(x_i, y_i)_j, i = 1, \dots, N_j\}$, $j = 1, \dots, N$, а целевой набор данных $T = \{(x_i, y_i)_T, i = 1, \dots, N_T\}$ и L — число моделей символьной регрессии для каждого источника. Параметризация модели проводится для части целевого набора данных, от которого предварительно отделена часть для проверки — независимого тестирования финального результата.

1. Случайно разделим целевой набор на две равные половины: U, V .

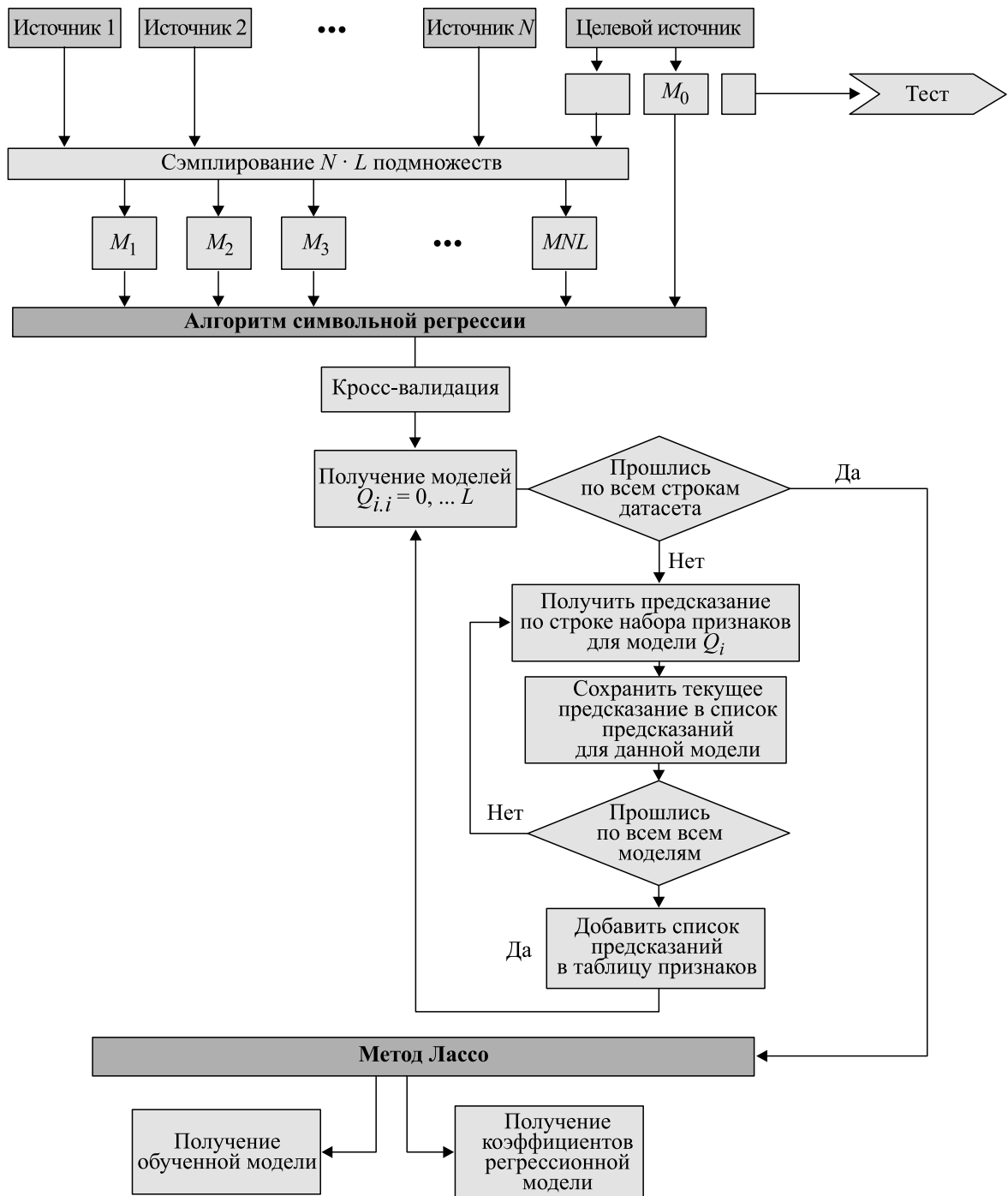


Рис. 1. Блок-схема алгоритма обучения с переносом знаний от нескольких источников.

2. Для каждого источника $j = 1, \dots, N$ создадим объединение половины набора целевых данных V и всех данных из других источников. Выберем из этого объединения L подмножества W_k для обучения моделей символьной регрессии случайной выборкой N_T образцов. Таким образом, $k = 0, \dots, NL, W_0 = U$.

3. По каждому набору данных W_k построим модель символьной регрессии Q_k , используя кросс-валидацию с разбиением 4 : 1 на обучающую и валидационную выборки.

4. С помощью метода LASSO [30] получим комбинированную модель Q как линейную комбинацию моделей Q_k .

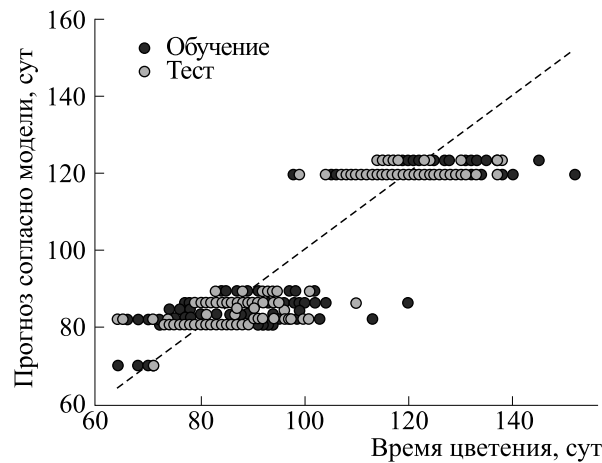


Рис. 2. Сравнение решения модели с данными для обучающей и тестовой выборок.

Из целевого набора данных тестовая выборка для проверки финальной модели составила 417 образцов (примерно 20% от общего числа 2088), таким образом объем множеств U и V равен 835 и 836 записей соответственно. Для кросс-валидации моделей символьной регрессии было использовано 8 разбиений, для метода LASSO – 10. Число моделей для каждого источника L было выбрано равным 15 в ходе тестирования, таким образом, общее число моделей на шаге 3 составляет $NL + 1 = 2 \times 15 + 1 = 31$ модель.

МОДЕЛЬ ДЛИНЫ ПЕРИОДА ПОСЕВ–ЦВЕТЕНИЕ

В данной работе построена модель (2) длины периода от посева до цветения в зависимости от ежедневных погодных факторов в первые 20 суток после посева ($a = 0, \dots, 19$) и заданных однонуклеотидных полиморфизмов:

$$Q = 0.025 Q_8 + 0.05 Q_9 + 0.50 Q_{14} + 0.26 Q_{23},$$

где

$$\begin{aligned} Q_8 &= T_n^2(5) + (\text{SNP4AA} - \text{SNP4AA}/(D(4)T_x(0)(\text{SNP2RR} + D(17)))) + \\ &+ (D(4) - \text{SNP4AA})/(D(7)T_x(6)) + (D(4) - \text{SNP4AA})/(D(2)T_x(6)) + \\ &+ (\text{SNP4AA} - D(4))(T_n(16) - R(3))/D(17))^2, \\ Q_9 &= D(7)T_x(5) - P(17)R(14) - 2P(4) + P(6) + R(2), \\ Q_{14} &= (\text{SNPAA}(4) + T_x(1))(R(9) + (D(17) - D(14)) - P(13)), \\ Q_{23} &= D(3)T_n(8) + 2D(4) + P(17)^2 + T_x(16), \end{aligned} \quad (2)$$

где $D(a)$ – длина дня, $T_n(a)$ – минимальная температура, $T_x(a)$ – максимальная температура, $P(a)$ – количество осадков, $R(a)$ – солнечное излучение.

Данная модель с оптимизированными параметрами описывает данные обучения и проверки с коэффициентом корреляции Пирсона, равным приблизительно 0.93 (см. рис. 2), коэффициент детерминации составил примерно 0.85. Для валидационной и тестовой выборок средняя абсолютная ошибка составляет 5.14 и 5.24 суток, максимальная абсолютная ошибка – 33.43 и 23.34, среднеквадратическая ошибка – 6.70 и 6.71 суток соответственно.

Надо отметить, что результирующие формулы являются нелинейными, используют дробно-рациональные функции, произведения предикторов и возведение в квадрат. При этом результиру-

ющая модель зависит от всех климатических показателей в разное время после посева.

Среди 31 модели символьной регрессии, построенной на шаге 3 алгоритма, в результате применения метода LASSO на шаге 4 было отобрано только 4 модели. Модель Q_0 , которая строится без использования данных источников, не вошла в результирующее выражение (2).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ТОЧНОСТЬ МОДЕЛИ

Использование математических моделей позволяет выявить факторы, наиболее влияющие на точность прогнозов. Для оценки важности каждого фактора из имеющихся в наборе данных будем применять разработанный алгоритм параметризации к набору данных, из которого

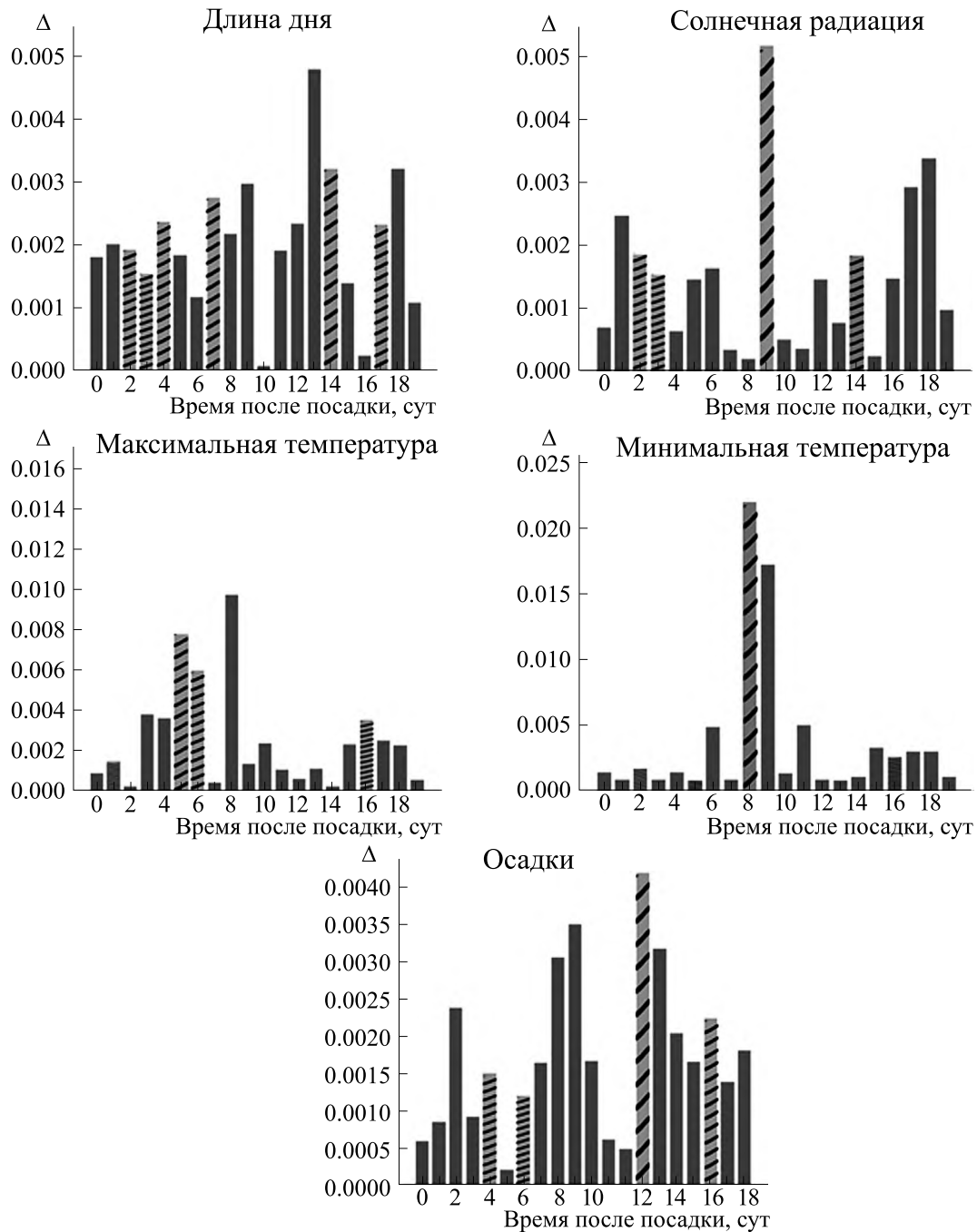


Рис. 3. Влияние климатических факторов на решение модели, вычисленное методом исключения.

интересующий нас фактор удален. Таким образом, модель будет обучаться в условиях полного отсутствия информации о рассматриваемом факторе, что является более сильным ограничением, чем широко используемый метод пермутации, в котором значения оцениваемого фактора переставляются между наблюдениями. Важность фактора будем оценивать по изменению ошибки решения модели.

Согласно полученным результатам, можно сделать вывод о том, что все погодные факторы на 7–10 сутки после посадки оказывают влияние на решение модели (см. рис. 3). Максимальное влияние оказывает минимальная температура на 8 и 9 сутки, и максимальная температура на 4 и 8 сутки. В том случае, когда данный фактор входит в итоговую модель Q (2), соответствующий ему столбик имеет штриховку (см. рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование математических моделей для прогнозирования хозяйственно ценных характеристик растений, таких как длины периодов между такими фенологическими фазами, как посев и цветение, закладывает научную основу селекционного улучшения сортов в условиях глобальных изменений климата.

В данной работе была рассмотрена параметризация модели времени цветения образцов дикого нута, которая использует метод машинного обучения перенос знаний (transfer learning) для комбинирования нескольких наборов исходных и целевых данных. Расчеты по имеющимся экспериментальным данным показали высокую точность моделирования.

Полученные результаты о виде функциональных зависимостей и влиянии погодных факторов согласуются с ранее опубликованными данными [21, 27, 28], однако понимание роли температуры и продолжительности дня в адаптации к различным типам среды обитания все еще неполное и требует дальнейших исследований для проверки модельных решений [31].

ВЫВОДЫ

Использование данных полевых экспериментов, проведенных в различных средах, определяемых сочетанием локации, времени и других внешних факторов, с применением методов машинного обучения, таких как перенос знаний и символьная регрессия, позволило построить модель, с высокой точностью описывающую длину периода от посева до цветения у образцов дикого нута.

Показано, что максимальная и минимальная температура оказывают наиболее сильное влияние на время цветения. Полученные результаты о виде функциональных зависимостей и влиянии погодных факторов согласуются с ранее опубликованными данными.

БЛАГОДАРНОСТИ

Вычисления были проведены в Суперкомпьютерном центре «Политехнический» СПбПУ. Авторы выражают благодарность М.П. Банкину, С.Ю. Сурковой, С.В. Нуждину, Э.Дж. Бишопу-фон Веттбергу, А. Кахраману, А. Айдогану, Д. Куку и М.А. Вишняковой.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Varshney R. K., Song C., Saxena R. K., Azam S., Yu S., Sharpe A. G., Cannon S., Baek J., Rosen B. D., Tar'an B., Millan T., Zhang X., Ramsay L. D., Iwata A., Wang Y., Nelson W., Farmer A. D., Gaur P. M., Soderlund C., Penmetza R. V., Xu C., Bharti A. K., He W., Winter P., Zhao S., Hane J. K., Carrasquilla-Garcia N., Condie J. A., Upadhyaya H. D., Luo M. C., Thudi M., Gowda C. L., Singh N. P., Lichtenzweig J., Gali K. K., Rubio J., Nadarajan N., Dolezel J., Bansal K. C., Xu X., Edwards D., Zhang G., Kahl G., Gil J., Singh K. B., Datta S. K., Jackson S. A., Wang J., and Cook D. R. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature Biotechnol.*, **31** (3), 240–246 (2013). DOI: 10.1038/nbt.2491
2. Smithson J. B., Thompson J. A., and Summerfield R. J. Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). In *Grain Legume Crops*. Ed. by R.J. Summerfield and R.E. Roberts (Collins, London, UK, 1985), pp. 312–390.
3. Abbo Sh., Berger J., and Turner N. C. Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Funct. Plant Biol.*, **30**, 1081–1087 (2003). DOI: 10.1071/FP03084
4. Kumar J. and Abbo Sh. Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in the semi-arid environments. *Adv. Agron.*, **72**, 107–138 (2001).
5. Roberts E. H., Hadley P., and Summerfield R. J. Effects of temperature and photoperiod on flowering in chickpeas (*Cicer Arietinum* L.). *Ann. Botany*, **55** (6), 881–892 (1985).
6. Ellis R. H., Lawn R. J., Summerfield R. J., Qi A., Roberts E. H., Chay P. M., Brouwer J. B., Rose J. L., Yeates S. J., and Sandover S. Towards the reliable prediction of time to flowering in six annual crops. iv. cultivated and wild mung bean. *Exp. Agricult.*, **30** (3), 271–282 (1994).
7. Upadhyaya H. D., Bajaj D., Das S., Saxena M. S., Bandoni S., Kumar V., Tripathi S., Gowda C. L., Sharma S., Tyagi A. K., and Parida S. K. A genome-scale integrated approach aids in genetic dissection of complex flowering time trait in chickpea. *Plant Mol. Biol.*, **89** (4), 403–420 (2015). DOI: 10.1007/s11103-015-0377-z
8. Kumar V., Singh A., Mithra S. V., Krishnamurthy S. L., Parida S. K., Jain S., Tiwari K. K., Kumar P.,

- Rao A. R., Sharma S. K., Khurana J. P., Singh N. K., and Mohapatra T. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza Sativa*). *DNA Res.*, **22** (2), 133–145 (2015). DOI: 10.1093/dnares/dsu046
9. Berger J., Milroy S., Turner N., Siddique K., Imtiaz M., and Malhotra R. Chickpea evolution has selected for contrasting phenological mechanisms among different habitats. *Euphytica*, **180**, 1–15 (2011).
 10. Zhang X. and Cai X. Climate change impacts on global agricultural land availability. *Environ. Res. Lett.*, **6** (1), 014014 (2011).
 11. Soltani A., Hammer G. L., Torabi B., Robertson M. J., and Zeinali E. Modeling chickpea growth and development: phenological development. *Field Crops Res.*, **99** (1), 1–13 (2006).
 12. Soltani A., Robertson M. J., Mohammad-Nejad Y., and Rahemi-Karizaki A. Modeling chickpea growth and development: leaf production and senescence. *Field Crops Res.*, **99** (1), 14–23 (2006b).
 13. Jones J. W., Antle J. M., Basso B., Boote K. J., Conant R. T., Foster I., Godfray H. C. J., Herrero M., Howitt R. E., Janssen S., Keating B. A., Munoz-Carpena R., Porter Ch. H., Rosenzweig C., and Wheeler T. R. Toward a new generation of agricultural system data, models, and knowledge products: state of agricultural systems science. *Agricult. Syst.*, **155**, 269–288 (2017). DOI: 10.1016/j.agry.2016.09.021
 14. Jones J. W., Antle J. M., Basso B., Boote K. J., Conant R. T., Foster I., Godfray H. C. J., Herrero M., Howitt R. E., Janssen S., Keating B. A., Munoz-Carpena R., Porter C. H., Rosenzweig C., and Wheeler T. R. Brief history of agricultural systems modeling. *Agricultural Systems*, **155**, 240–254 (2016). DOI: 10.1016/j.agry.2016.05.014
 15. Jones J. W., Hoogenboom G., Porter C. H., Boote K. J., Batchelor W. D., Hunt L. A., Wilkens P. W., Singh U., Gijsman A. J., and Ritchie J. T. The DSSAT cropping system model. *Eur. J. Agronomy*, **18** (3–4), 235–265 (2003).
 16. Boote J., Jones K. W., and Pickering N. B. Potential uses and limitations of crop models. *Agronomy J.*, **88**, 704–716 (1996).
 17. Boote K. J., Jones J. W., White J. W., Asseng S., and Lizaso J. I. Putting mechanisms into crop production models: putting mechanisms into crop production models. *Plant, Cell & Environment*, **36** (9), 1658–72 (2013).
 18. Keating B., Carberry P. S., Hammer G., Probert M. E., Robertson M. J., Holzworth D., Huth N. I., Hargreaves J. N. G., Meinke H., Hochman Z., McLean G., Verburg K., Snow V., Dimes J. P., Silburn M., Wang E., Brown S., Bristow K. L., Asseng S., Chapman S., McCown R. L., Freebairn D. M., and Smith C. J. An overview of APSIM, a model designed for farming systems simulation. *Eur. J. Agronomy*, **18**, 267–288 (2003). DOI: 10.1016/S1161-0301(02)00108-9
 19. Battisti R., Sentelhas P. C., and Boote K. J. Sensitivity and requirement of improvements of four soybean crop simulation models for climate change studies in Southern Brazil. *Int. J. Biometeorol.*, **62** (5), 823–832 (2018).
 20. Williams J. R., Jones C. A., Kiniry J. R., and Spanel D. A. The EPIC crop growth model. *Transactions of the ASAE*, **32** (2), 497–511 (1989).
 21. Vadez V., Soltani A., and Sinclair T. R. Crop simulation analysis of phenological adaptation of chickpea to different latitudes of India. *Field Crops Res.*, **146**, 1–9 (2013).
 22. Lal M., Singh K. K., Srinivasan G., Rathore L. S., Naidu D., and Tripathi C. N. Growth and yield responses of soybean in Madhya Pradesh, India to climate variability and change. *Agricult. Forest Meteorol.*, **93** (1), 53–70 (1999).
 23. Chung U., Kim Y. U., Seo B. S., and Seo M. C. Evaluation of variation and uncertainty in the potential yield of soybeans in South Korea using multi-model ensemble climate change scenarios. *Agrotechnology*, **06** (02), 1000158 (2017). DOI: 10.4172/2168-9881.1000158
 24. Mohammed A., Tana T., Singh P., Molla A., and Seid A. Identifying best crop management practices for chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Northeastern Ethiopia under climate change condition. *Agricult. Water Management*, **194**, 68–77 (2017). DOI: 10.1016/j.agwat.2017.08.022
 25. Patil D. and Patel H. R. Calibration and validation of CROPGRO (DSSAT 4.6) model for chickpea under Middle Gujarat agroclimatic region. *Int. J. Agricult. Sci.*, **9** (27), 4342–4344 (2017).
 26. Urgaya M. L. Modeling the impacts of climate change on chickpea production in Adaa Woreda (East Showa Zone) in the semi-arid Central Rift Valley of Ethiopia. *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, **7**, 288 (2016).
 27. Ageev A., Aydogan A., Bishop-von Wettberg E., Nuzhdin S. V., Samsonova M., and Kozlov K. Simulation model for time to flowering with climatic and genetic inputs for wild chickpea. *Agronomy*, **11**, 1389 (2021).
 28. von Wettberg E. J. B., Chang P. L., Bağdemir F., Carrasquilla-Garcia N., Korbu L. B., Moenga S. M., Bedada G., Greenlon A., Moriuchi K. S., Singh V., Cordeiro M. A., Noujdina N. V., Dineged K. N., Shah Sani S. G. A., Getahun T., Vance L., Bergmann E., Lindsay D., Mamo B. E., Warschefsky E. J., Dacosta-Calheiros E., Marques E., Yilmaz M. A., Cakmak A., Rose J., Migneault A., Krieg C. P., Saylak S., Temel H., Friesen M. L., Siler E., Akhmetov Z., Ozcelik H., Kholova J., Can C., Gaur P., Yildirim M., Sharma H., Vadez V., Tesfaye K., Woldemedhin A. F., Tar'an B., Aydogan A., Bukun B., Penmetza R. V., Berger J., Kahraman A., Nuzhdin S. V., and Cook D. R. Ecology and genomics of an important crop wild relative as a prelude to agricultural innovation. *Nature Commun.*, **9** (1), 649 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-02867-z

29. Stackhouse P. W., Perez R., Sengupta M., Knapp K., Mikovitz J. C., Schlemmer J., Scarino B., Zhang T., and Cox S. J. An assessment of new satellite data products for the development of a long-term global solar resource at 10–100 km. In *Proc. of the Solar 2016 Conf.* (San Francisco, CA, USA, 2016), pp. 1–6.
30. van der Laan M. J., Polley E. C., and Hubbard A. E. Super learner. *Stat. Applic. in Genetics and Mol. Biology*, **6** (1), Article 25 (2007).
31. Vadez V., Berger J., Warkentin T., Asseng S., Ratnakumar P., Rao K., Gaur P., Munier-Jolain N., Larmure A., Voisin A.-S., Sharma H. C., Pande S., Sharma M., Krishnamurthy L., and Zaman-Allah M. Adaptation of grain legumes to climate change: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, **32** (1), 31–44 (2012).
DOI: 10.1007/s13593-011-0020-6

Parameterization of a Model for Wild Chickpea Flowering Time by Transferring the Knowledge Learned from Multiple Sources

Z.A. Saranin*, M.G. Samsonova*, and K.N. Kozlov*

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

Building forecasting the flowering time helps researchers to create varieties with maximum efficiency and value under a changing climate. This paper proposes an algorithm for parameterization of the wild chickpea flowering time model by using machine learning through knowledge transfer to combine multiple input-target sets. The resulting model showed high accuracy based on genetic and climatic data on only the first 20 days after sowing – the average absolute error is slightly greater than 5 days, the Pearson correlation coefficient is 0.93. It was found that maximum and minimum temperatures have the strongest effect on the timing of flowering. At the same time, all weather factors by the 7–10 day from the date of sowing affect a solution of the model.

Keywords: climatic factors, chickpea, mathematical modeling, transfer learning

МОДЕЛИ ГЕННЫХ СЕТЕЙ ЦВЕТЕНИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ АДАПТАЦИИ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕХАНИЗМОВ ЯРОВИЗАЦИИ У БОБОВЫХ

© 2024 г. В.В. Гурский*, М.А. Дук*, **, М.П. Банкин**, М.Г. Самсонова**, С.Ю. Суркова**, #

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

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

#E-mail: surkova_syu@spbstu.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023 г.

После доработки 29.08.2024 г.

Принята к публикации 04.09.2024 г.

Время цветения — важнейший агрономический признак, используемый в селекции и определяющий урожайность. Яровизация, или долговременное воздействие холода, ускоряет зацветание и увеличивает урожаи многих культур. Молекулярные механизмы влияния яровизации на переход к цветению хорошо изучены у *Arabidopsis thaliana*, однако остаются во многом неясными для бобовых. Математическое моделирование является действенным инструментом для выявления регуляторных взаимодействий в генных сетях на основе данных по экспрессии генов. В данном обзоре мы рассматриваем ранее разработанные подходы к моделированию генных сетей цветения и перспективы их адаптации для анализа механизмов яровизации у бобовых.

Ключевые слова: математическое моделирование, генные сети, цветение, яровизация, бобовые.

DOI: 10.31857/S0006302924050112, EDN: MJUAIS

Цветение является важнейшим агрономическим признаком, который напрямую связан с урожайностью. Раннее цветение сельскохозяйственных культур позволяет избежать действия неблагоприятных погодных условий, таких как холод или засуха, в конце вегетационного периода [1]. Яровизация (или вернализация) — это воздействие низких положительных температур, ускоряющее рост и переход к цветению. Изучение молекулярных механизмов влияния яровизации на время цветения бобовых является крайне важным в условиях изменяющегося климата. Это актуальная проблема, которая получила наибольшее развитие в последние годы [2–6].

Механизмы яровизации в наибольшей степени изучены для модельного организма *Arabidopsis thaliana* [7–9], а также для некоторых злаков, в частности пшеницы и ячменя [8, 10, 11]. До воздействия холода экспрессия основных регуляторов цветения репрессируется на молекулярном уровне. Низкие температуры подавляют эту репрессию, что приводит к зацветанию [9].

Несмотря на изученность механизмов яровизации у некоторых культур, целостной картины молекулярных механизмов действия яровизации на зацветание до сих пор не существует ни для од-

ного вида бобовых. Как известно, дикие виды бобовых умеренного климата, такие как нут, горох, люцерна, люпин, чечевица, чувствительны к яровизации. При этом, как было показано на примере нута, культурные сорта также не полностью утратили эту чувствительность [12, 13]. В настоящее время активно внедряется расширение генетического разнообразия современных сортов бобовых за счет введения генов и аллелей от диких видов, отвечающих, в частности, за реакцию на яровизацию [14–16]. Этот процесс требует детального понимания соответствующих молекулярно-генетических механизмов.

Математическое моделирование — важное направление, позволяющее на основе данных по экспрессии генов предсказывать регуляторные взаимодействия и строить гипотезы для дальнейшей экспериментальной проверки. Модели также позволяют проводить эксперименты *in silico*, дающие возможность избежать продолжительного и дорогостоящего анализа экспрессии генов у мутантов, а также более прицельно сформулировать цели и задачи дальнейшей экспериментальной работы. Масштабы применения моделей для анализа экспрессии генов цветения во многом определяются изученностью вида растений.

Наибольшее количество таких моделей разработано для *Arabidopsis*. В данном обзоре мы рассматриваем модели регуляции в сетях генов цветения, разработанные для *Arabidopsis* и бобовых, и обсуждаем перспективы включения в такие модели механизмов ответа на яровизацию.

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ЦВЕТЕНИЯ ПРИ ЯРОВИЗАЦИИ У *Arabidopsis* И БОБОВЫХ

Цветение у растений контролируется большим количеством сигнальных путей, объединяющих действие как эндогенных регуляторов, так и факторов окружающей среды. Основными экзогенными факторами, активирующими процесс зацветания, являются фотопериод и температура окружающей среды. У *Arabidopsis* ген *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) является главным интегратором сигналов, поступающих из окружающей среды. Ген *FT* кодирует белок, функционирующий как мобильный сигнал цветения – «флориген» [17]. При условиях, индуцирующих цветение, этот белок экспрессируется в листьях, а затем движется по флоэме к апикальной части побега, где активирует гены, ответственные за идентичность цветковых меристем, такие как *API* (*APETALA 1*) и *LFY* (*LEAFY*) [18, 19].

Вторым важнейшим геном-интегратором сигнальных путей является *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) [20].

Ген *TFL1* (*TERMINAL FLOWER 1*) у *Arabidopsis*, кодирующий близкий гомолог *FT* и принадлежащий к тому же семейству, в отличие от *FT* является репрессором. Ген *TFL1* экспрессируется в меристеме соцветия, подавляя в этой зоне экспрессию *API* и *LFY* [19]. Таким образом, *TFL1* действует как «антифлориген».

Гены *LFY* и *API* экспрессируются на краях меристемы соцветия, активируя экспрессию друг друга. В этих областях меристемы обретают цветковую идентичность и впоследствии образуют цветки. *LFY* и *API* репрессируют *TFL1* в появившихся цветковых меристемах, тем самым допуская активацию генов, отвечающих за развитие цветков [19].

В отличие от *Arabidopsis*, бобовые имеют три субклады генов *FT* (*FTa*, *FTb* и *FTc*), которые в сумме включают четыре–шесть генов в зависимости от вида. Ортологи *SOC1* у бобовых чаще всего представлены двумя генами, однако люцерна *Medicago truncatula* имеет три гена *SOC1*. Семейство генов *TFL1* также существенно расширено [21–25].

Реакция на яровизацию у *Arabidopsis* контролируется геном *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*). Этот ген кодирует транскрипционный фактор, подавляющий зацветание посредством репрессии генов *FT* и *SOC1*. В ответ на яровизацию сни-

жается уровень продуктов экспрессии *FLC*, что активирует экспрессию *FT* и *SOC1* и запускает переход растения к цветению [26, 27].

Примечательно, что ген *FLC* отсутствует у бобовых умеренного климата, но, несмотря на это, яровизация оказывает стимулирующее действие на цветение [18, 21]. Исследования механизмов яровизации у бобовых пока только развиваются, однако недавние результаты позволяют предположить, что гены семейств *FT* и *SOC1* могут выступать основными мишенями регуляторных взаимодействий при воздействии холода [3, 11].

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ГЕННЫХ СЕТЕЙ ЦВЕТЕНИЯ У *Arabidopsis*

Методы математического моделирования широко применяются для анализа генных сетей. Для *Arabidopsis* в разные годы был разработан ряд моделей перехода к цветению. Модель, реализующая метод нейронных сетей, оперировала заданной структурой сети для описания взаимодействий основных генов, ответственных за различные сигнальные пути, инициирующие цветение [28]. При этом в модель были включены восемь генов фотопериода и автономного сигнального пути, и их взаимодействия приводили к активации абстрактного интегратора, что обозначало переход к цветению. Обучение модели проводило на значениях таких параметров, как длина светового дня и количество дней после посева [28]. Также была предложена модель активации экспрессии *FT* посредством базовых регуляторов сигнального пути фотопериода и циркадных ритмов [29]. Модель была разработана на базе обыкновенных дифференциальных уравнений и включала известные на тот момент молекулярные взаимодействия. Численные эксперименты проводили, чтобы выявить, как экспрессия *FT* может меняться при отключении различных компонентов сети [29].

Однако несмотря на то, что регуляция цветения у *Arabidopsis* была изучена намного лучше, чем у других растений, детали многих взаимодействий оставались неизвестными. Это заведомо привносило неточности в модели конкретных сигнальных путей.

Для решения этой проблемы был предложен обобщенный модельный подход, оперирующий не взаимодействиями внутри отдельных сигнальных путей, а сетями, состоящими из генов-интеграторов [30, 31]. Авторы проанализировали поведение нескольких сетей, включающих три основных регуляторных узла: *FT* (в комплексе с транскрипционным фактором *FD*), *LFY* и *API*. Таким образом, предполагалось, что экспрессия гена *FT* уже включала в себя всю информацию о входящих регуляторных сигналах, которая

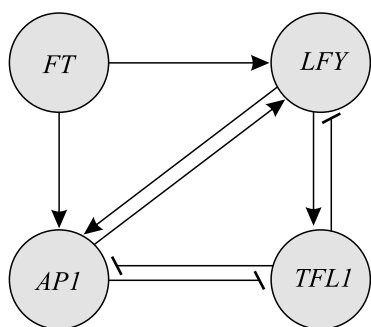


Рис. 1. Базовая сеть взаимодействий при переходе к цветению у *Arabidopsis*, включающая продукты четырех-генов интеграторов: *FT*, *TFL1*, *LFY* и *API* [30]. Белок FT образует комплекс с транскрипционным фактором FD (не показано на рисунке). Помимо этого, схема предполагает, что узлы сети могут объединять в себе действие многих генов. Обычными стрелками показаны активирующие взаимодействия, а T-образными – репрессирующие.

передавалась генам идентичности цветковых меристем. Было показано, что динамика инициации цветения может быть объяснена посредством разделения генной сети на несколько контуров прямой и обратной связи с определенными регуляторными функциями [31]. На основе этой базовой сети была создана динамическая модель, основанная на дифференциальных уравнениях. Помимо таких интеграторов, как FT–FD, LFY и API, моделируемая сеть включала репрессор TFL1, экспрессия которого уравнивала активирующий сигнал FT. Было показано, что такая сеть предсказывает характер перехода к цветению для разных генотипов *Arabidopsis* [30] (рис. 1).

Обоснованность обобщения взаимодействий в генных сетях была продемонстрирована в дальнейших исследованиях. В частности, было показано, что время цветения линейно зависит от уровней экспрессии генов-интеграторов [32].

Базовая сеть, представленная на рис. 1, может дополняться новыми элементами. Так, активация гена идентичности меристем LFY комплексом FT–FD была дополнена промежуточным активирующим контуром, включающим гены *SOC1* и *AGL24*. Подгонка такой модели к данным по экспрессии всех генов сети позволила протестировать различные гипотезы регуляции LFY посредством SOC1 и AGL24 и выявить нелинейную природу распространения возмущений в этой сети [33]. Тот же набор генов рассматривался в другой работе, где авторы исследовали различные приближения, используемые для формулирования уравнений модели. Далее производилось сравнение влияния этих приближений на эффективность модели при описании генной сети [34].

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ГЕННЫХ СЕТЕЙ ЦВЕТЕНИЯ У БОБОВЫХ

Особенности моделирования перехода к цветению у бобовых обусловлены наличием в их геноме большого числа ортологов основных генов-интеграторов *Arabidopsis*, таких как *FT*, *TFL1* и *SOC1*. При этом конкретная роль каждого гена зачастую еще не выявлена в эксперименте.

Многочисленные ранние исследования сформировали «классическую» концепцию инициации цветения гороха *Pisum sativum*. Основными регуляторами зацветания считали фотопериод и взаимодействие двух мобильных сигналов – стимулирующего и ингибирующего. Переход к цветению определялся пороговым значением отношения между этими сигналами. Обобщение существующих данных привело к созданию первой количественной модели цветения гороха [35]. Эта модель была использована для формулирования новых гипотез о сигналах, управляющих цветением. Дальнейшие экспериментальные исследования привели к накоплению более точных знаний о молекулярных взаимодействиях, ведущих к зацветанию гороха [22, 36]. Было показано, что цветение активируется по меньшей мере двумя мобильными стимулирующими сигналами, FTa1 и FTb2, которые взаимодействуют с геном *FTc*, а также с двумя гомологами гена *TFL1 Arabidopsis*. Итогом взаимодействий в генной сети являлась активация генов идентичности меристемы, включая API, ортолог гена *API Arabidopsis* [22, 36]. На базе такой обобщенной сети взаимодействий и данных по экспрессии генов цветения *Pisum sativum* были разработаны две модели – модель, использующая обыкновенные дифференциальные уравнения, на базе кинетики Михаэлиса–Ментен и модель, основанная на нейронных сетях [37]. С помощью этих моделей, во-первых, было протестировано соответствие между данными по динамике экспрессии генов и исходной схемой взаимодействий. Во-вторых, на основе модели нейронных сетей были предложены дополнительные взаимодействия по сравнению с исходной концепцией [37].

Также была создана динамическая модель генной сети цветения, которая использовалась для проверки различных гипотез о том, как FT- и TFL1-подобные гены взаимодействуют при регуляции генов идентичности меристемы у нута *Cicer arietinum* [38]. Так как для нута, в отличие от гороха, отсутствуют конкретные схемы взаимодействий многочисленных генов FT и TFL1 при переходе к цветению, за основу была взята обобщенная сеть, ранее предложенная для *Arabidopsis* [30] (рис. 1). Для моделирования использовали экспериментальные данные, ранее полученные для двух сортов нута [39]. В модели были протестированы различные гипотезы о регуляторных

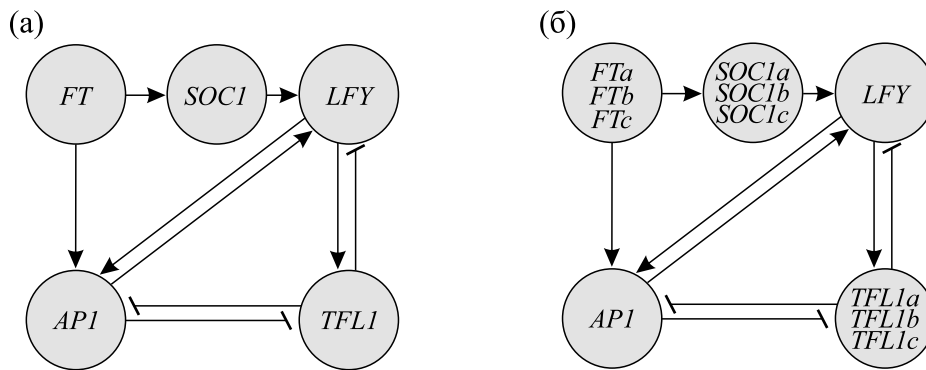


Рис. 2. Базовая сеть интеграторов из рис. 1, дополненная узлом *SOC1*: а) для *Arabidopsis*, б) для бобовых. Каждый из узлов *FT*, *TFL1* и *SOC1* бобовых представлен продуктами нескольких генов, которые в случае *FT* и *TFL1* объединены в субклады *FTa*, *FTb*, *FTc* и *TFL1a*, *TFL1b* и *TFL1c*. Помимо представленных взаимодействий, предполагаются регуляторные связи между отдельными представителями каждой субклады.

вкладах генов *FT*. При этом, моделирование показало хорошие результаты для быстро зацветающего сорта ICCV 96029, но оказалось не эффективным для более позднего сорта CDC Frontier. Для этого сорта был разработан и применен подход моделирования на основе машинного обучения, предсказавший различные архитектуры генной сети цветения в зависимости от фотопериода [40].

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ МОДЕЛЕЙ ЯРОВИЗАЦИИ У БОБОВЫХ

Архитектура генной сети в описанных выше моделях перехода к цветению у бобовых применима для моделирования влияния фотопериода, но недостаточна для изучения действия яровизации.

У *Arabidopsis* активация зацветания под действием низких температур происходит не только за счет активации экспрессии гена *FT* в листьях, но и гена *SOC1* в апексе побега. *FLC*, основной регулятор яровизации у *Arabidopsis*, напрямую взаимодействует с этими генами, присоединяясь к первому интрону гена *FT* и промотору гена *SOC1* [41]. Таким образом, при моделировании влияния яровизации следует непременно учитывать действие этих двух интеграторов (рис. 2а). Топология генной сети, включающая *FT* и *SOC1*, была ранее рассмотрена в двух работах по моделированию зацветания у *Arabidopsis* (см. выше, [33, 34]), однако без учета яровизации. Для бобовых, имеющих множество генов *FT*, *SOC1* и *TFL1*, топология сети интеграторов усложняется (рис. 2б).

Несмотря на недостаточность знаний по механизмам яровизации у бобовых, недавно было показано, что у люцерны *Medicago truncatula* воздействие холода при длинном световом дне приводило к значительному росту уровней экспрессии гена *MtFTa1* и всех трех ортологов *SOC1*

(*MtSOC1a*, *MtSOC1b* и *MtSOC1c*). При этом также существенно повышалась экспрессия предполагаемого гена — мишени сети зацветания *MtPIM* (*API*) [3]. Однако неочевидно, является ли активация экспрессии генов *MtSOC1* следствием регуляции исключительно со стороны *FT* или же гены *SOC1* чувствительны к яровизации независимо от *FT*, как в случае с *Arabidopsis*.

Таким образом, следует предположить, что основной регуляторный контур активации цветения при яровизации включает ген *FT*, который активирует гены идентичности меристемы напрямую, или через активацию гена *SOC1* (рис. 3а). Предполагаемая схема активации *API* в регуляторном контуре для бобовых показана на рис. 3б. Так как гены *FT* и *SOC1* интегрируют сигналы многих регуляторных путей, данную сеть можно рассматривать как обобщение множества

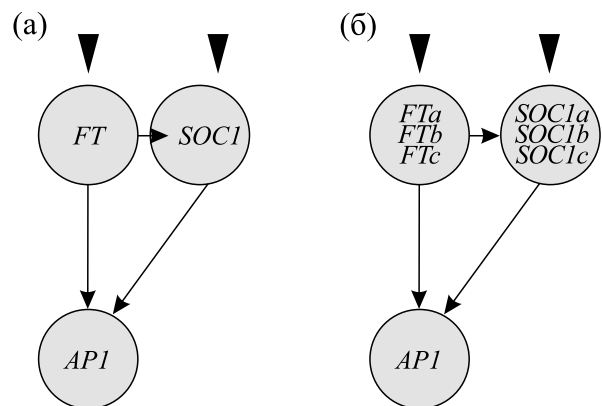


Рис. 3. Регуляторный контур, активирующий цветение при яровизации: а) для *Arabidopsis*, б) для бобовых. Действие факторов яровизации схематично обозначено черными треугольниками в верхней части рисунка.

взаимодействий, а также дополнять другими регуляторными контурами по мере появления экспериментальных данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные исследования продемонстрировали обоснованность построения моделей генных сетей цветения на базе взаимодействий интеграторов сигнальных путей. Базовые контуры взаимодействий интеграторов могут дополняться более детальной информацией по мере появления данных о регуляции в сетях. При моделировании активирующей роли яровизации для зацветания бобовых следует рассматривать регуляторные контуры, включающие оба семейства интеграторов внешних сигналов к зацветанию: *FT* и *SOC1*.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00203.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jung C. and Müller A. E. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends Plant Sci.*, **14** (10), 563–573 (2009). DOI: 10.1016/j.tplants.2009.07.005
- Taylor C. M., Kamphuis L. G., Zhang W., Garg G., Berger J. D., Mousavi-Derazmahalleh M., Bayer P. E., Edwards D., Singh K. B., Cowling W. A., and Nelson M. N. INDEL variation in the regulatory region of the major flowering time gene *LanFTc1* is associated with vernalization response and flowering time in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Plant Cell Environ.*, **42** (1), 174–187 (2019). DOI: 10.1111/pce.13320
- Fudge J. B., Lee R. H., Laurie R. E., Mysore K. S., Wen J., Weller J. L., and Macknight R. C. *Medicago truncatula* *SOC1* genes are up-regulated by environmental cues that promote flowering. *Frontiers in plant science*, **9**, 496 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.00496
- Gao B., Bian X. C., Yang F., Chen M. X., Das D., Zhu X. R., Jiang Y., Zhang J., Cao Y. Y., and Wu C. F. Comprehensive transcriptome analysis of faba bean in response to vernalization. *Planta*, **251** (1), 22 (2019). DOI: 10.1007/s00425-019-03308-x
- Yuan X., Wang Q., Yan B., Zhang J., Xue C., Chen J., Lin Y., Zhang X., Shen W., and Chen X. Single-molecule real-time and Illumina-based RNA sequencing data identified vernalization-responsive candidate genes in faba bean (*Vicia faba* L.). *Frontiers in genetics*, **12**, 656137 (2021). DOI: 10.3389/fgene.2021.656137
- Rychel-Bielska S., Plewiński P., Kozak B., Galek R., and Ksiażkiewicz M. Photoperiod and vernalization control of flowering-related genes: A case study of the narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Front. Plant Sci.*, **11**, 572135 (2020). DOI: 10.3389/fpls.2020.572135
- Sung S. and Amasino R. M. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7** (1), 4–10 (2004). DOI: 10.1016/j.pbi.2003.11.010
- Kim D. H., Doyle M. R., Sung S., and Amasino R. M. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.*, **25**, 277–299 (2009). DOI: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113411
- Sharma N., Geuten, K., Giri B. S., and Varma A. The molecular mechanism of vernalization in Arabidopsis and cereals: role of flowering locus C and its homologs. *Physiol. plantarum*, **170** (3), 373–383 (2020). DOI: 10.1111/ppl.13163
- Yan L., Fu D., Li C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Yasuda S., and Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** (51), 19581–19586 (2006). DOI: 10.1073/pnas.0607142103
- Surkova S. Y. and Samsonova M. G. Mechanisms of vernalization-induced flowering in legumes. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (17), 9889 (2022). DOI: 10.3390/ijms23179889
- Sharma S. and Upadhyaya H. D. Vernalization and photoperiod response in annual wild *Cicer* species and cultivated chickpea. *Crop Sci.*, **55** (5), 2393–2400 (2015). DOI: 10.2135/cropsci2014.09.0598
- Pinhasi van-Oss R., Sherman A., Zhang H. B., Vandemark G., Coyne C., and Abbo S. *Plant Breeding*, **135** (1), 102–110 (2016). DOI: 10.1111/pbr.12325
- Berger J. D., Buck R., Henzell J. M., and Turner N. C. Evolution in the genus *Cicer* – vernalisation response and low temperature pod set in chickpea (*C. arietinum* L.) and its annual wild relatives. *Austr. J. Agricult. Res.*, **56**, 1191–1200 (2005). DOI: 10.1071/ar05089
- Gaur P. M., Jukanti A. K., and Varshney R. K. Impact of genomic technologies on chickpea breeding strategies. *Agronomy*, **2** (3), 199–221 (2012). DOI: 10.3390/agronomy2030199
- Samineni S., Kamatam S., Thudi M., Varshney R. K., and Gaur P. M. Vernalization response in chickpea is controlled by a major QTL. *Euphytica*, **207**, 453–461 (2016). DOI: 10.1007/s10681-015-1571-4

17. Wigge P. A., Kim M. C., Jaeger K. E., Busch, W., Schmid M., Lohmann J. U., and Weigel D. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, **309** (5737), 1056–1059 (2005). DOI: 10.1126/science.1114358
18. Weller J. L. and Ortega R. Genetic control of flowering time in legumes. *Frontiers in plant science*, **6**, 207 (2015). DOI: 10.3389/fpls.2015.00207
19. Benlloch R., Berbel A., Ali L., Gohari G., Millán T., and Madueño F. Genetic control of inflorescence architecture in legumes. *Frontiers in plant science*, **6**, 543 (2015). DOI: 10.3389/fpls.2015.00543
20. Lee J. H., Hong S. M., Yoo S. J., Park O. K., Lee J. S., and Ahn J. H. Integration of floral inductive signals by flowering locus T and suppressor of overexpression of Constans 1. *Physiol. Plantarum*, **126** (4), 475–483 (2006). DOI: 10.1111/j.1399-3054.2006.00619.x
21. Hecht V., Foucher F., Ferrándiz C., Macknight R., Navarro C., Morin J., Vardy M. E., Ellis N., Beltrán J. P., Rameau C., and Weller J. L. Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model legumes. *Plant Physiol.*, **137** (4), 1420–1434 (2005). DOI: 10.1104/pp.104.057018
22. Hecht V., Laurie R. E., Vander Schoor J. K., Ridge S., Knowles C. L., Liew L. C., Sussmilch F. C., Murfet I. C., Macknight R. C., and Weller J. L. The pea *GIGAS* gene is a *FLOWERING LOCUS T* homolog necessary for graft-transmissible specification of flowering but not for responsiveness to photoperiod. *Plant Cell*, **23** (1), 147–161 (2011). DOI: 10.1105/tpc.110.081042
23. Laurie R. E., Diwadkar P., Jaudal M., Zhang L., Hecht V., Wen J., Tadege M., Mysore K. S., Putterill J., Weller J. L., and Macknight R. C. The *Medicago FLOWERING LOCUS T* homolog, *MtFTa1*, is a key regulator of flowering time. *Plant Physiol.*, **156** (4), 2207–2224 (2011). DOI: 10.1104/pp.111.180182
24. Nelson M. N., Książkiewicz M., Rychel S., Besharat N., Taylor C. M., Wyrwa K., Jost R., Erskine W., Cowling W. A., Berger J. D., Batley J., Weller J. L., Naganowska B., and Wolko B. The loss of vernalization requirement in narrow-leafed lupin is associated with a deletion in the promoter and de-repressed expression of a *Flowering Locus T (FT)* homologue. *New Phytologist*, **213** (1), 220–232 (2017). DOI: 10.1111/nph.14094
25. Weller J. L. and Macknight R. C. Functional genomics and flowering time in *Medicago truncatula*: An overview. *Methods Mol. Biol.*, **1822**, 261–271 (2018). DOI: 10.1007/978-1-4939-8633-0_17
26. Searle I., He Y., Turck F., Vincent C., Fornara F., Kröber S., Amasino R. A., and Coupland G. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Develop.*, **20** (7), 898–912 (2006). DOI: 10.1101/gad.373506
27. Mateos J. L., Madrigal P., Tsuda K., Rawat V., Richter R., Romera-Branchat M., Fornara F., Schneberger K., Krajewski P., and Coupland G. Combinatorial activities of SHORT VEGETATIVE PHASE and FLOWERING LOCUS C define distinct modes of flowering regulation in *Arabidopsis*. *Genome Biol.*, **16** (1), 31 (2015). DOI: 10.1186/s13059-015-0597-1
28. Welch S. M., Roe J. L., and Dong Z. A genetic neural network model of flowering time control in *Arabidopsis thaliana*. *Agron. J.*, **95** (1), 71–81 (2003). DOI: 10.2134/agronj2003.0071
29. Salazar J. D., Saithong T., Brown P. E., Foreman J., Locke J. C., Halliday K. J., Carré I. A., Rand D. A., and Millar A. J. Prediction of photoperiodic regulators from quantitative gene circuit models. *Cell*, **139** (6), 1170–1179 (2009). DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.029
30. Jaeger K. E., Pullen N., Lamzin S., Morris R. J., and Wigge P. A. Interlocking feedback loops govern the dynamic behavior of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **25** (3), 820–833 (2013). DOI: 10.1105/tpc.113.109355
31. Pullen N., Jaeger K. E., Wigge P. A., and Morris R. J. Simple network motifs can capture key characteristics of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.*, **8** (11), e26149 (2013). DOI: 10.4161/psb.26149
32. van Dijk A. D. J. and Molenaar J. Floral pathway integrator gene expression mediates gradual transmission of environmental and endogenous cues to flowering time. *Peer J.*, **5**, e3197 (2017). DOI: 10.7717/peerj.3197
33. Valentim F. L., van Mourik S., Posé D., Kim M. C., Schmid M., van Ham R. C., Busscher M., Sanchez-Perez G. F., Molenaar J., Angenent G. C., Immink R. G., and van Dijk A. D. A quantitative and dynamic model of the *Arabidopsis* flowering time gene regulatory network. *PLoS One*, **10** (2), e0116973 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0116973
34. Wang C. C., Chang P. C., Ng K. L., Chang C. M., Sheu P. C., and Tsai J. J. A model comparison study of the flowering time regulatory network in *Arabidopsis*. *BMC Systems Biol.*, **8**, 15 (2014). DOI: 10.1186/1752-0509-8-15
35. Wenden B., Dun E. A., Hanan J., Andrieu B., Weller J. L., Beveridge C. A., and Rameau C. Computational analysis of flowering in pea (*Pisum sativum*). *New Phytologist*, **184** (1), 153–167 (2009). DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02952.x
36. Sussmilch F. C., Berbel A., Hecht V., Vander Schoor J. K., Ferrándiz C., Madueño F., and Weller J. L. Pea *VEGETATIVE2* is an *FD* homolog that is essential for flowering and compound inflorescence development. *Plant Cell*, **27** (4), 1046–1060 (2015). DOI: 10.1105/tpc.115.136150
37. Pavlinova P., Samsonova M. G., and Gursky V. V. Dynamical modeling of the core gene network controlling transition to flowering in *Pisum sativum*. *Front. Genetics*, **12**, 614711 (2021). DOI: 10.3389/fgene.2021.614711
38. Gursky V. V., Kozlov K. N., Nuzhdin S. V., and Samsonova M. G. Dynamical modeling of the core gene network controlling flowering suggests cumulative acti-

- vation from the *FLOWERING LOCUS T* gene homologs in chickpea. *Front. Genetics*, **9**, 547 (2018). DOI: 10.3389/fgene.2018.00547
39. Ridge S., Deokar A., Lee R., Daba K., Macknight R. C., Weller J. L., and Tar'an B. The chickpea early flowering 1 (*Efl1*) locus is an ortholog of *Arabidopsis ELF3*. *Plant Physiol.*, **175** (2), 802–815 (2017). DOI: 10.1104/pp.17.00082
40. Подольный Б. С., Гурский В. В. и Самсонова М. Г. Анализ экспрессии генов цветения в сорте нута CDC Frontier методами машинного обучения. *Биофизика*, **65** (2), 263–276 (2020). DOI: 10.1134/S0006350920020189
41. Helliwell C. A., Wood C. C., Robertson M., Peacock J. W., and Dennis E. S. The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J.*, **46** (2), 183–192 (2006). DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02686.x

Models of Flowering Gene Networks and Their Adaptation for the Analysis of Vernalization Mechanisms in Legumes

V.V. Gursky*, M.A. Duk*, **, M.P. Bankin**, M.G. Samsonova**, and S.Yu. Surkova**

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

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

Flowering time is the most important agronomic trait which is used in breeding and determines the crop performance. Vernalization, or prolonged exposure to cold, accelerates flowering and increases yields in many crops. The molecular mechanisms of vernalization-induced flowering are well studied in *Arabidopsis thaliana*, but remain largely unknown for legumes. Mathematical modeling is a powerful tool to predict regulatory interactions in gene networks on the basis of gene expression patterns. This review concerns previously developed approaches to modeling gene regulatory networks of the flowering transition process and the prospects for their adaptation with the aim of conducting the analysis of the mechanisms of vernalization requirement in legumes.

Keywords: mathematical modeling, gene networks, flowering, vernalization, legumes

УДК 612.825 + 612.616.2

ТИПОВОЙ ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ПРИ ГЛУТАМАТНОЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ: РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ АЗОТА И КИСЛОРОДА

© 2024 г. В.П. Реутов^{*,#}, Н.В. Пасикова^{*,##}, Е.Г. Сорокина^{**,###}

^{*}Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, ул. Бутлерова, 5а, Москва, 117485, Россия

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

^{##}E-mail: natpas@mail.ru

^{**}Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Ломоносовский просп., 2, Москва, 119991, Россия

^{###}E-mail: sorokelena@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024 г.

После доработки 05.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Нарушение основных регуляторных механизмов на уровне нервных клеток может приводить к явлению нейротоксичности/эксайтотоксичности глутамата. Такие явления чаще всего происходят на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, активации иммунных и аутоиммунных реакций. Патологические изменения в мозге на ранних стадиях болезней носят неспецифический характер. Они мало отличаются от физиологической нормы. Такие типовые патологические процессы характерны для многочисленных заболеваний. Они также развиваются при ишемических и геморрагических инсультах. Основной задачей настоящей работы явился анализ некоторых физиологических и цитохимических процессов, которые связаны с нейромедиатором глутаматом, а также с высокореакционными и высокотоксичными соединениями – активными формами азота и кислорода. Активные формы азота ($\cdot\text{NO}$) и кислорода ($\cdot\text{O}_2^-$) могут воздействовать практически на все основные компоненты клеток и субклеточных структур. В низких концентрациях они выполняют регуляторную функцию. Анализ механизмов токсического воздействия глутамата, активных форм азота и активных форм кислорода как модели инсульта позволил предложить новые способы защиты от повреждающего воздействия указанных выше веществ, которые можно использовать при лечении ишемических и геморрагических инсультов.

Ключевые слова: глутамат, оксид азота, цикл оксида азота, супероксидный анион-радикал, цикл супероксидного анион-радикала, диоксид азота, $\cdot\text{OH}$ -радикалы, пероксинитриты.

DOI: 10.31857/S0006302924050122, EDN: MJPEXM

«Болезнь – это драма в двух актах, из которых первый разыгрывается в наших тканях при потушенных свечах, в глубокой темноте, даже без намека на болевые ощущения. Лишь во втором акте возникает боль, зажигаются свечи – предвестники пожара, потушить который в одних случаях трудно, в других – невозможно».

Рене Леруш (1879–1955)

Физиологические и патофизиологические явления в живом организме находятся между собой в динамическом равновесии при условии, если на различных структурно-функциональных уровнях не нарушены регуляторные механизмы. Нарушения регуляторных механизмов на уровне клеток, приводящие к их повреждению, являются одним из начальных звеньев в патогенезе болезни. В середине XIX века (1858 г.) Р. Вирхов обоб-

шил результаты анализа собственных исследований в книге «Целлюлярная патология как учение, основанное на физиологической и патофизиологической гистологии» [1]. «Всякое болезненное изменение в организме, – считал Вирхов, – связано с каким-то патологическим процессом в клетках, составляющих организм», – это основное положение позволило определить сам предмет «клеточная патология». Действительно, если

Сокращения: Glu – глутамат, АФА – активные формы азота, АФК – активные формы кислорода.

всякая клетка происходит из клетки, то ненормальная деятельность клеток является источником различных заболеваний для всего организма, поскольку организм — это совокупность здоровых и больных клеток. Самый известный вывод Вирхова состоит в следующем: «Не жизнь в ненормальных условиях, не нарушение как таковое вызывает болезнь, напротив, болезнь начинается с недостаточности регуляторного аппарата» [1]. Сохраняя преемственность связей между учеными разных поколений, Г.Н. Крыжановский сделал новое обобщение: любая болезнь представляет собой, прежде всего, «дизрегуляторную патологию» [2].

На протяжении XX века физиологи, патофизиологи и врачи пытались выявить специфические изменения клеток, субклеточных структур и мембран при нарушении кровообращения, развитии гипоксии/ишемии, активации воспалительных процессов, иммунных и аутоиммунных реакций [3, 4]. Однако патологические изменения органов и тканей *на ранних стадиях болезни/болезней* мало отличаются от физиологической нормы. Такие процессы и механизмы характерны для всех клеток, тканей и органов. В настоящее время структурные и цитохимические изменения, особенно в начальной стадии, позволяют говорить о существовании типовых неспецифических изменений и нарушений. В связи с этим можно отметить, что многие патологические процессы в начальной стадии отличаются от нормальных физиологических процессов лишь тем, что они развиваются не в том месте, не в то время, или протекают с другой интенсивностью [3].

Задачей настоящей работы является анализ некоторых физиологических и биохимических процессов, которые связаны с нейромедиатором глутаматом (Glu) и высокореакционными и высокотоксичными соединениями — активными формами азота (АФА) и кислорода (АФК). Первичные нарушения с участием этих веществ могут привести к переходу от нормальных физиологических процессов к развитию *типичного патологического процесса* в мозге. Некоторые типовые патологические процессы могут завершиться ишемическими и геморрагическими инсультами [5, 6]. Поэтому актуальным остается вопрос о том, что необходимо делать, чтобы избежать такого развития событий в организме, которые заканчиваются тяжелыми последствиями, в том числе инсультами и нейродегенеративными заболеваниями [7–15].

ГЛУТАМАТ — ОДИН ИЗ ОСНОВНЫХ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Важную роль в мозге, как известно, выполняет нейромедиатор Glu [16–19]. Медиаторная роль

Glu в центральной нервной системе млекопитающих была установлена более 50 лет тому назад [20–23]. В настоящее время общепризнано, что в норме функционирование нейронов и глиальных клеток в значительной степени связано с действием Glu [7, 9, 12]. Концентрация данного нейромедиатора возрастает в эволюционном ряду от кольчатых червей до иглокожих, моллюсков, членистоногих и вплоть до млекопитающих [24, 25]. Наибольшее распространение Glu получил в мозге млекопитающих. Известна его ведущая роль в регуляции нормальных физиологических процессов в мозге, включая процессы метаболической, биоэнергетической и нейрофизиологической регуляции [25]. На долю Glu в общей сложности приходится от 70 до 90% возбуждающих синаптических связей в мозге млекопитающих, в том числе и в мозжечке. Поэтому не удивительно, что, по мнению ряда ученых, Glu является одним из самых распространенных нейротрансмиттеров в мозге и мозжечке [24, 26–31]. Благодаря этому обстоятельству любое повреждение головного мозга — от инсультов до черепно-мозговых травм — будет приводить к Glu-нейротоксичности. Именно поэтому мозжечок и гранулярные (зернистые) клетки мозжечка стали излюбленным объектом исследований для ученых, изучающих механизмы развития Glu-нейротоксичности. Повышение концентрации Glu в мозге или в нервных клетках мозжечка выше физиологических показателей нарушает медиаторный баланс тормозных и возбуждающих веществ в мозге [2, 22, 23, 26–34]. Это приводит к повышению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и Na^{+} , существенному снижению энергетических субстратов в нервных клетках в результате разобщения окислительного фосфорилирования, значительному падению трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$) и нарушению механизмов высвобождения Glu из пресинаптической мембраны в синаптическую щель.

Согласно современным данным, описанное выше явление лежит в основе эксайтотоксичности Glu [24, 35–39]. В настоящее время в системе PubMed представлено свыше 5500 экспериментальных и клинических работ и более 930 обзоров, посвященных токсикологии Glu [26–35, 40–71]. Примеров эксайтотоксичности или нейротоксичности Glu при различных заболеваниях можно привести множество [2, 3, 12, 26–35, 40–50, 72]. Так, например, сравнительный анализ содержания Glu в сыворотке крови у практически здоровых лиц и у пациентов с рассеянным склерозом в зависимости от типа, течения, стадии, длительности заболевания и инвалидизации показал достоверные различия в содержании этой возбуждающей аминокислоты [40].

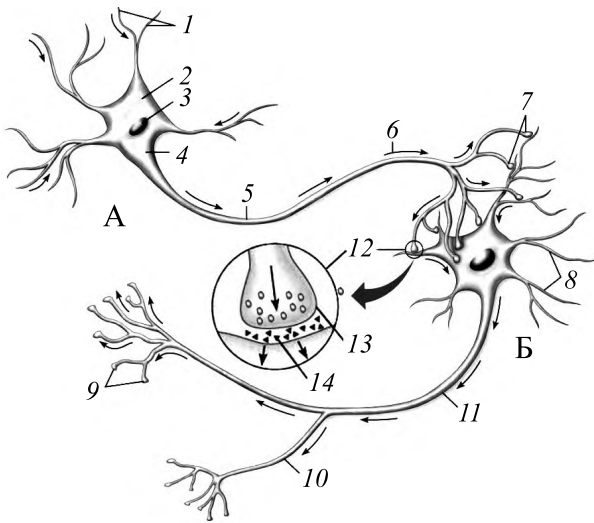


Рис. 1. Тело нейрона, аксон и дендрит – ключевые понятия в нейроморфологии и нейрофизиологии. Передача информации в мозге от пресинаптического (А) к постсинаптическому нейрону (Б) связана с работой синапсов и синаптических пузырьков за счет высвобождения из них медиаторов. Химический медиаторный тип связи между нейронами доминирует в центральной нервной системе, а синапсы являются той структурой, которая соединяет между собой пресинаптический и постсинаптический нейроны и позволяет им работать как единое целое. Цифрами обозначены: 1 – дендриты, 2 – тело нейрона, 3 – ядро нейрона, 4 – бугорок аксона, 5 – аксон, 6 – направление сигнала, 7 – терминали аксона пресинаптического нейрона, 8 – дендриты постсинаптического нейрона, 9 – терминали аксона, 10 – коллатеральный аксон, 13 – терминаль пресинаптического аксона, 14 – нейромедиатор после высвобождения (выброса) из пресинаптической терминали.

**GLU-ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТЬ:
НЕКОТОРЫЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ**

Центральным звеном передачи сигнала в мозге, как известно, является синапс [73]. Нейромедиатор (например, Glu) выделяется из аксонального расширения пресинаптического нейрона (рис. 1, 2). Выделяется он, как правило, в виде одинаковых порций/«квантов», состоящих из довольно большого числа молекул нейромедиатора [26–29, 43–50].

Процесс секреции «квантов» нейромедиатора происходит как спонтанно, в виде редких событий, так и синхронно, вслед за приходом нервного импульса [73]. Число синаптических везикул может варьировать от одной терминали к другой терминали (рис. 2). Объем синаптических везикул также может изменяться (рис. 3), как и расстояние между отдельными везикулами [29–31, 42–54]. Сложность структурно-функциональной организации аппарата выделения нейромедиатора делает его зависимым от множества факторов

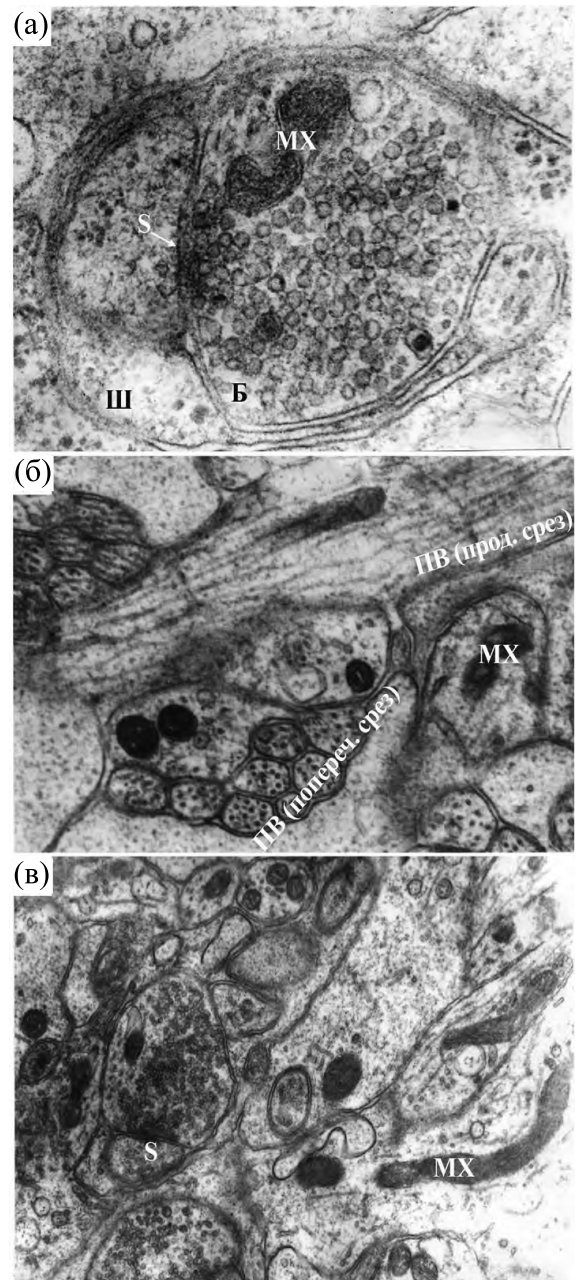


Рис. 2. (а) – В состав химического синапса, как правило, входят пресинаптический бутон, образованный варикозным расширением аксона пресинаптического нейрона с нейротрансмиттерами, и постсинаптическая область, представленная дендритным шипиком. В норме бутон равномерно заполнен синаптическими пузырьками и митохондриями (МХ). Составляющие двух частей синапса – бутон (Б) и шипик (Ш) – расположены почти параллельно, «лицом к лицу» (face to face) друг к другу. Бутон содержит синаптические пузырьки с нейромедиатором, равномерно расположенные по всему объему бутона, и митохондрии, шипик – активную зону синапса и цистерны гладкого эндоплазматического ретикула. (б) – Два рядом расположенных среза (продольный и поперечный) параллельных волокон (ПВ) – аксонов зернистых клеток, содержащих микротрубочки. (в) – Часть структуры мозжечка, на ней представлен синапс (S).

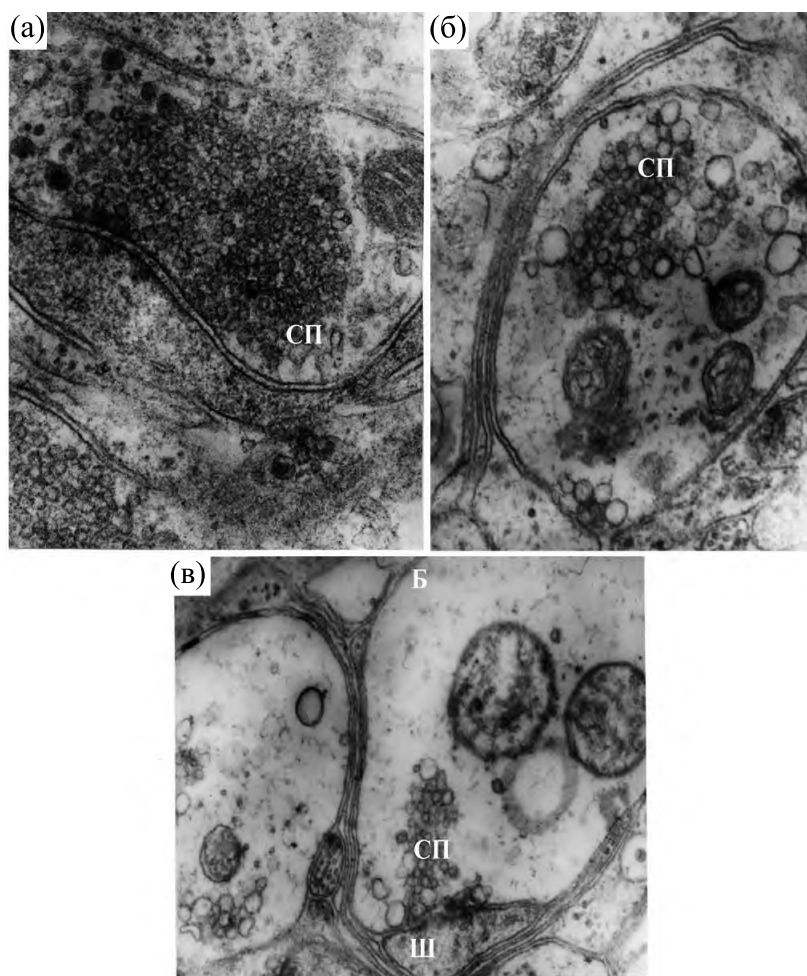


Рис. 3. Структура аксонального расширения пресинаптического нейрона (бутона) в присутствии NO-генерирующего соединения: (а) – в норме, размер синаптических пузырьков (СП) от 50 до 60 нм, равномерное распределение СП в бутоне; (б) и (в) – при воздействии NO-генерирующего соединения (1 мМ NaNO_2) наблюдается отек и повреждение структуры бутон (Б), в двух синапсах видны группы разбухших СП и митохондрий.

эндогенной и экзогенной природы. Механизмы, лежащие в основе синаптической пластичности, включают в себя факторы, изменяющие число квантов медиатора, синхронность их секреции или чувствительность постсинаптических рецепторов к агонистам, а также продолжительность действия нейромедиатора в синаптической щели [72–74]. При гипобарической гипоксии, нарушениях кровообращения, сосудистой патологии мозга, тромбообразованиях, анемиях или токсическом воздействии веществ, окисляющих гемоглобин в метгемоглобин, возникает состояние гипоксии или ишемии мозга [16, 19, 20, 22, 59, 75–79].

Состояние гипоксии или ишемии мозга характеризуется недостаточным поступлением к нейронам мозга кислорода и глюкозы, нарушениями синтеза АТФ, снижением мембранного потенциала митохондрий и уменьшением содержания высокоэнергетических субстратов в результате

ингибирования механизмов гликолиза, разобщения и ингибирования окислительного фосфорилирования, а также ряда других изменений, представленных на схеме (рис. 4) [3, 36]. Деполяризация нейронов и клеток глии, активация потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов и выделение во внеклеточное пространство избыточного количества Glu при инсультах происходит вследствие локального дефицита энергии [80, 81]. Энергодефицит является причиной подавления синтетических восстановительных процессов, снижения активности Ca^{2+} - и Na^+/K^+ -АТФаз, нарушения ионного гомеостаза, развития отеков, снижения активности ферментов антиоксидантной защиты, нарушения циклов оксида азота и супероксида, повышения содержания АФА и АФК, а вместе с ними – пероксинитритов и продуктов их распада ($\bullet\text{NO}_2$) и $\bullet\text{OH}$ -радикалов. Эти весьма реакционные соединения участвуют в



Рис. 4. Схема основных процессов, развивающихся при гипоксии/ишемии: от образования и накопления Glu до нарушения регуляторных процессов, повреждения мембран клеток и субклеточных структур, завершающихся нарушением метаболизма нейронов и гибелью нервных клеток.

повреждении основных компонентов клеток и субклеточных структур, а также ферментных систем, участвующих в регуляции внутриклеточных процессов (рис. 4) [24, 35, 82–86].

Современное понимание патофизиологии Glu-нейротоксичности было достигнуто в модельных исследованиях на мозжечке лягушки [26–31, 42–54] и на культурах зернистых клеток мозжечка крыс при воздействии токсических концентраций Glu на нейроны [32–35, 41, 55–70]. В связи с этим обзор содержит обобщения и анализ данных литературы и результатов собственных исследований на модели Glu-нейротоксичности, позволивших говорить о существовании типовых нарушений нейронов и глиальных клеток [3, 26–35, 41–54, 67–70]. Особое внимание уделено изменениям формы и протяженности активных зон синапса (рис. 5), а также локальным повреждениям мембран клеток и субклеточных структур в мозжечке (рис. 6) [42, 89].

Ультраструктурный и морфометрический анализ возбуждающих синапсов параллельных волокон на клетках Пуркинье мозжечка лягушки *Rana temporaria* (рис. 7) при Glu воздействии привел к следующим основным выводам [42–48]. Повышенная концентрация Glu вызывает значитель-

ные повреждения структуры молекулярного слоя мозжечка. При этом наблюдается уменьшение числа синапсов параллельных волокон по сравнению с нормой вследствие процесса десинаптации [35, 43, 69, 87, 88].

Отмечены два типа десинаптации. Первый – отрыв бутонов от шипиков и, как результат, появление свободных бутонов, второй – дегенерация шипиков по «черному» типу. Эти процессы напоминают те изменения клеток, которые наблюдали многие морфологи в XX веке, описывающие гибель нейронов по «светлому» (развитие отеков) и по «черному» типу (апоптоз). Второй процесс, по-видимому, является многоступенчатым, поскольку удалось проследить переходы от начальных стадий дегенерации шипиков до конечных стадий этого процесса [26–31, 87, 88]. В настоящее время общепризнано, что апоптоз, если он оказался запущенным, является многоступенчатым, многоходовым процессом, подчиняющимся программе клеточной гибели, которая присуща практически каждой клетке организма. Проведение сравнительного анализа локальных повреждений мембран нейронов и глиальных клеток мозжечка при Glu нейротоксичности (рис. 6а–г), а также при токсическом воздействии нитритов и

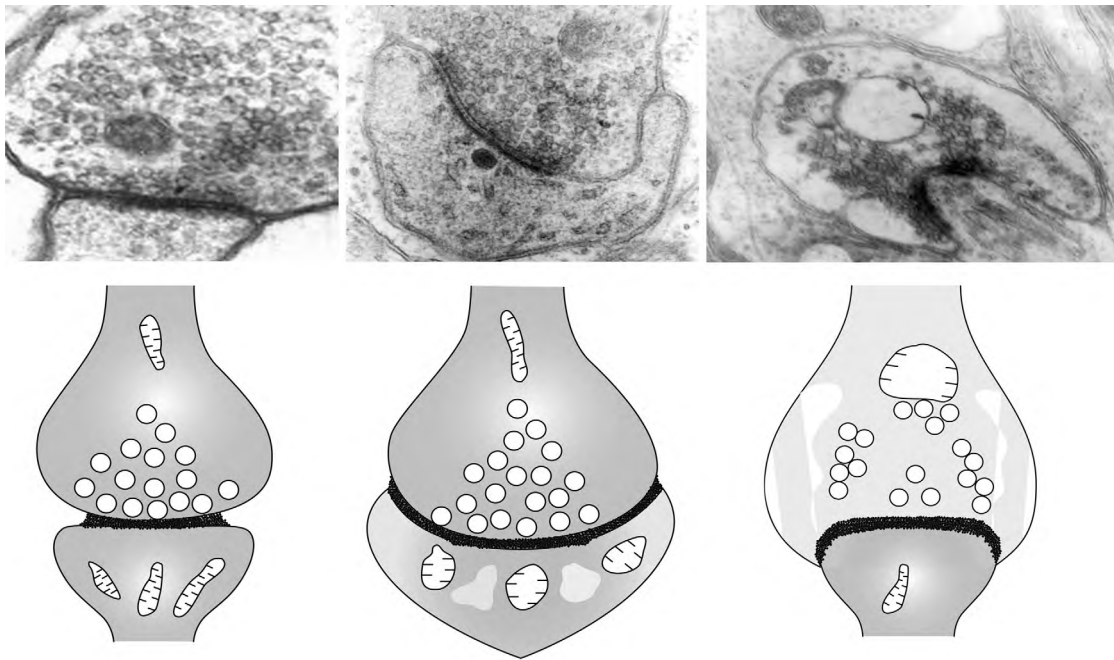


Рис. 5. Изменения формы и протяженности активных зон синапса: верхний ряд слева направо – контроль, в присутствии избытка Glu (1 мМ), в присутствии избытка NO-генерирующего вещества (NaNO₂, 1 мМ); нижний ряд слева направо – выделены наиболее характерные изменения, представленные в верхнем ряду. Протяженность активных зон синапса при этом, как правило, увеличивалась.

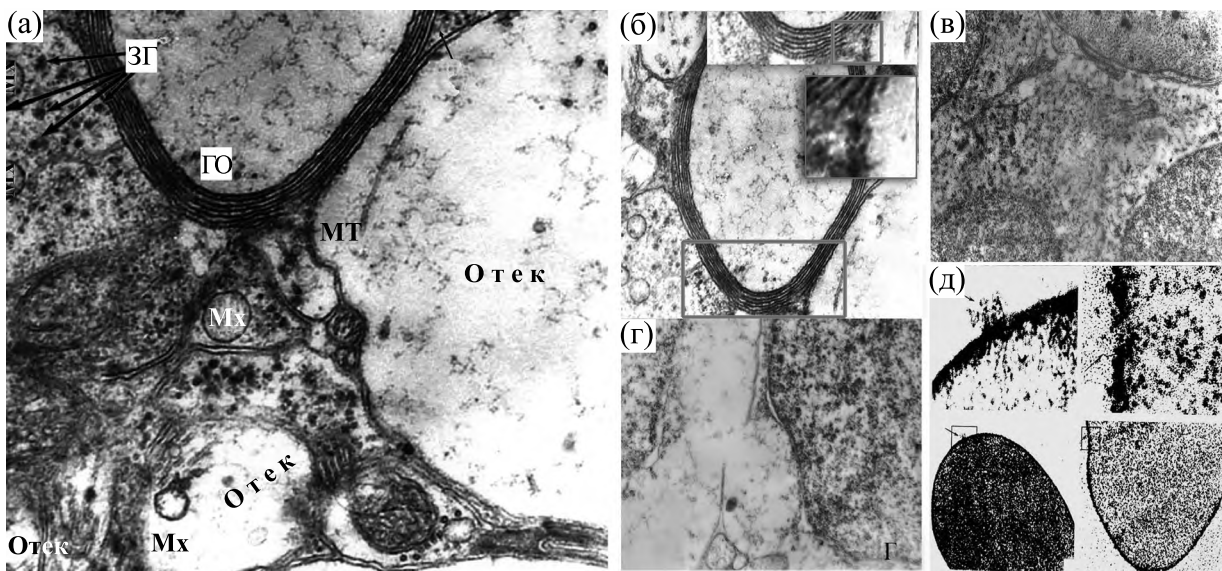


Рис. 6. Отек и локальные повреждения мембран нервных и глиальных клеток как проявления типового патологического процесса: (а) – отек; (б) – изменения глиальных клеток, которые образуют многослойные оболочки вокруг участков отека и повреждения нейронов (на вставках показаны участки повреждения); (в) и (г) – изменения слоя зернистых клеток мозжечка (от локальных поражений до слияний клеток); (д) – перераспределение белков из растворимого состояния в мембраносвязанное состояние в эритроцитах и локальное повреждение мембран эритроцитов при воздействии NO-генерирующего соединения – NaNO₂ (1 мМ). Образование NO происходит в результате восстановления ионов NO₂⁻ при участии гемсодержащих белков, находящихся в дезокси-форме.

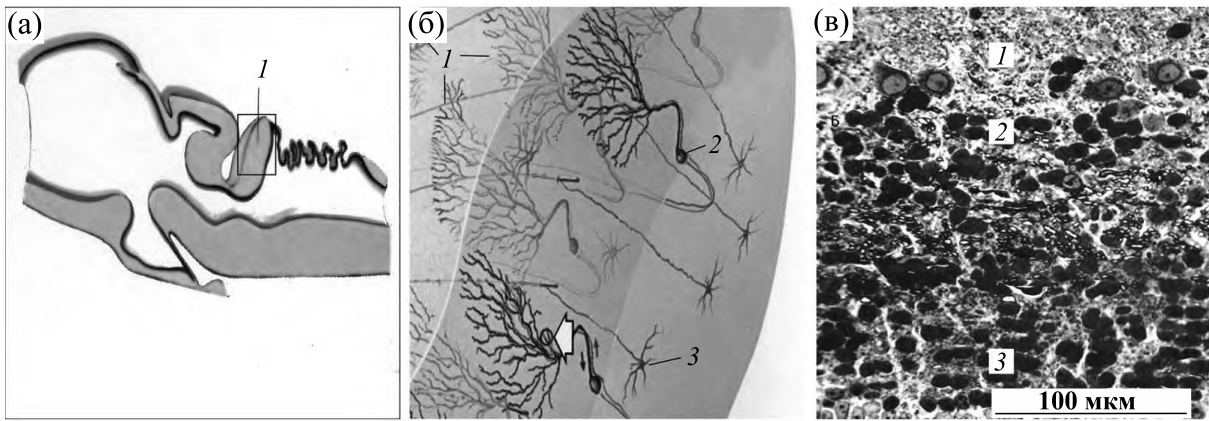


Рис. 7. Мозжечок лягушки *Rana temporaria* относится к простым моделям, которые, позволяют решать актуальные проблемы нейрофизиологии (а). Это преимущество, прежде всего, заключается в ограниченном числе типов нервных клеток и высокой пространственной упорядоченности мозжечковых связей (б) и (в). Показано, что структура коры мозжечка лягушки представлена следующими слоями: молекулярным (1), клетками Пуркинье (2) и зернистыми клетками (3). Молекулярный слой состоит из синапсов, образованных параллельными волокнами, — аксонами клеток-зерен и дендритами клеток Пуркинье. Ширина молекулярного слоя составляет около 300–400 мкм. В нем присутствуют звездчатые клетки, представляющие собой интернейроны молекулярного слоя коры мозжечка. Ниже молекулярного слоя находится слой, состоящий из тел клеток Пуркинье с диаметром от 20 до 30 мкм. Эти клетки ориентированы вертикально по отношению к поверхности коры мозжечка. Их дендриты ветвятся в молекулярном слое.

свободнорадикальных продуктов (NO/NO_2), которые образуются при восстановлении ионов NO_2^- (нитрозативный стресс) (рис. 6д), позволили обнаружить, что нервные клетки хотя и функционируют по собственным законам, в условиях Glu- и NO-воздействия морфологически проявляют *единые неспецифические черты нарушений и повреждений, которые заключаются в локальных повреждениях мембран клеток и субклеточных структур и в развитии отеков* (рис. 6) [2, 41–53]. Это позволило провести сравнительный анализ повреждений в нервных клетках и эритроцитах при воздействии NO-генерирующих соединений. Благодаря такому анализу удалось показать, что в присутствии NO-генерирующего соединения повышается контрастность отдельных элементов цитоскелета и тем самым улучшается их визуализация [47]. Так, например, в глиальных клетках в присутствии NO-генерирующего соединения становятся четко видными сети глиальных нитей и примембранного белка, которые практически не видны в нормальных физиологических условиях [47]. Обнаружено также, что контрастность элементов цитоскелета зависит от концентрации NO-генерирующего соединения: усиливается при умеренных концентрациях и снижается при высоких концентрациях этого соединения. На основании анализа данных литературы и результатов собственных исследований сделано предположение, что *усиление контрастности элементов цитоскелета может быть связано с переходом белка из растворимого состояния в состояние мембранно-связанное* [47, 89]. Важную роль в этих про-

цессах могут играть белок-белковые и белок-липидные взаимодействия, возникающие после образования парамагнитных центров на ненасыщенных жирных кислотах липидов/фосфолипидов мембран и на белках (SH-группах серосодержащих белков и OH-группах тирозиновых аминокислотных остатков) [89]. Образующиеся парамагнитные центры как на цитоплазматических, так и на мембранных белках могут стать центрами полимеризации белков цитоплазмы с мембранно-связанными белками и липидами, входящими в состав мембран [89].

Локальным повреждениям мембран клеток и субклеточных структур (рис. 6) предшествуют *изменения мембран нервных клеток, которые заключаются в улучшении их визуализации* (рис. 5). Улучшение визуализации центрального звена передачи сигнала между нейронами — синапса — при обучении, функциональной гипоксии, а также при гипоксии/ишемии наблюдал Н.С. Косицын [72]. Нобелевский лауреат по физиологии и медицине (1998 г.) Р. Фёрчготт (1916–2009), открывший вместе с Л. Игнаро (1941 г.р.) и Ф. Мурадом (1936–2023) механизм расслабления/релаксации сосудов и увеличения их объема при участии NO, стал всемирно известным ученым. Советский/российский ученый Николай Степанович Косицын (1934–2020), открывший явление увеличения объема (улучшение визуализации) центрального звена передачи сигнала между нейронами [72] при гипоксии/ишемии, а затем и механизм этого явления при участии NO [74], так и остался «бойцом невидимого фронта». Механизм

улучшения визуализации шипиков дендритов, а также аксоно-дендритных связей и активной зоны синапса, связанный с увеличением объема центрального звена нейротрансдачи, является одним из составляющих компонентов механизма памяти, активация которого происходит при обучении, функциональной гипоксии, а также при гипоксии/ишемии [72, 74]. Почему столь разные процессы (обучение, функциональная гипоксия, гипоксия/ишемия) вызывают увеличение объема центрального звена нейротрансдачи?

В простейшем случае нервный импульс, поступающий в пресинаптическое окончание, вызывает высвобождение в синаптическую щель медиатора Glu (рис. 1). Молекулы медиаторов, выделяющиеся в виде «квантов», реагируют со специфическими рецепторными белками клеточной мембраны постсинаптического нейрона [73]. Именно это подразумевают нейрофизиологи, когда говорят, что нейротрансмиттер Glu принимает участие в передаче сигнала от одного нейрона к другому [97, 102, 106, 113, 116, 118]. Эта передача сигнала чрезвычайно важна для реализации механизма памяти и обучения.

Известно, что оксид азота (NO) является важным регулятором неврологических процессов в мозге/мозжечке [138–140]. Оксид азота вызывает изменения в синапсе как посредством различных каскадов, так и путем прямого нитрозилирования белков-мишеней [139, 140]. Он воздействует непосредственно на пресинаптический нейрон и усиливает высвобождение нейротрансмиттеров (Glu) в синаптическую щель.

Приток ионов Ca^{2+} в постсинаптический нейрон активирует каскад биохимических реакций, влияющих на выработку NO с участием нейрональной NO-синтазы, в постсинаптическом нейроне [113, 115, 151–160, 164, 165]. В настоящее время считается общепризнанным, что NO, образующийся в постсинаптическом нейроне, воздействует на пресинаптический нейрон, выступая тем самым в качестве механизма отрицательной обратной связи между пресинаптическим и постсинаптическим нейронами [164, 165]. Оксид азота модулирует NMDA-рецептор по механизму отрицательной обратной связи и регулирует динамическое поведение постсинаптических компонентов [90–96, 99–101, 112, 137]. Получены данные, свидетельствующие о том, что биохимическая система демонстрирует колебания Ca^{2+} , а вместе с ионами Ca^{2+} в ограниченном диапазоне концентраций осциллируют и другие компоненты, включая $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$ [98, 137, 167]. За осцилляциями, т.е. периодическими изменениями концентраций веществ, всегда стоят циклические регуляторные системы. Это может свидетельствовать о важной роли тех циклов, кото-

рые в норме регулируют содержание $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$. Ранее мы указывали, что нарушение регуляторных механизмов на уровне клеток является одним из начальных звеньев в патогенезе болезни (Р. Вирхов, Г.Н. Крыжановский). Именно эти нарушения и повреждения могут стать своеобразным «общим знаменателем» многих патологических процессов, в том числе и причиной того, что Glu-нейротоксичность, а также ишемический и геморрагический инсульты развиваются как типовой патологический процесс на фоне гипоксии/ишемии, активации воспалительных процессов, иммунных и аутоиммунных реакций. Указанный выше фон поддерживает и усиливает синтез NO и $\bullet\text{O}_2^-$.

Возможность самоорганизации в окислительно-восстановительных модельных реакциях, выражающаяся в появлении осцилляций окислительно-восстановительного потенциала, была давно показана на примере реакций Белоусова–Жаботинского. Эти реакции представляют собой класс химических реакций, протекающих в колебательном режиме, при котором некоторые параметры реакции изменяются периодически, образуя сложную пространственно-временную структуру реакционной среды. В последние десятилетия осцилляторная динамика, как указывалось выше, была доказана для активных форм азота и кислорода [141–143], что еще раз свидетельствует о наличии циклической/периодической организации в системе этих соединений.

Вместе с выяснением циклической организации АФА и АФК появился громадный массив данных о том, что АФА и АФК абсолютно необходимы для процессов жизнедеятельности. Так, при пониженном содержании в атмосфере супероксидных радикалов животные и человек заболевают, а при длительном их отсутствии гибнут. На производство АФК в норме идет около 10–15% потребляемого организмом кислорода [141, 142]. При гипоксии/ишемии значительная часть молекул гемоглобина может переходить в дезокси-форму, в которой пигмент крови обладает нитритредуктазной способностью. Это обусловлено тем обстоятельством, что ионы NO_2^- могут акцептировать электроны с двухвалентного железа (Fe^{2+}) гема, когда гемоглобин, функционирующий в осцилляторном режиме, переходит из окси-формы в дезокси-форму. Впервые это явление было обнаружено в ИВНД и НФ АН СССР в 1983 г. [146]. Через 20 лет нитритредуктазная активность гемсодержащих белков была подтверждена в США, а результаты этих исследований были опубликованы в Nature Medicine и Nature Chem. Biol. [147, 148]. В настоящее время нитритредуктазная активность гемсодержащих белков, находящихся в дезокси-форме, является тем явлением, которое открыло новое направление в

исследовании проблемы NO, нитритов и нитратов в биологических системах [148].

Вместе с тем как механизм увеличения объема (улучшение визуализации) центрального звена передачи сигнала между нейронами при гипоксии/ишемии, так и нитритредуктазная активность гемоглобина, когда дополнительное количество NO начинает продуцироваться за счет восстановления ионов NO_2^- в NO, остается известным лишь узкому кругу специалистов. Это явление всегда сопряжено с локальным увеличением кровотока в работающей области головного мозга при сохранении интенсивности общего кровотока практически в неизменном виде. Увеличение локального кровотока в рабочей области головного мозга связано с переходом гемоглобина в дезокси-форму, активацией нитритредуктазной способности пигмента крови и усилением синтеза NO как за счет NO-синтазной активности, так и за счет нитритредуктазной активности *цикла оксида азота* [89].

В настоящее время, как указывалось выше, становится все более очевидным, что определенный физиологический «фон» АФА и АФК необходим для реализации действия на клетки биорегуляторных молекул, а сами эти молекулы могут имитировать действие многих из них [141–143]. Однако перепроизводство АФК и АФА приводит к нарушению регуляторных циклических процессов и грозит живым организмам гибелью [113, 142, 143]. Это обусловлено тем, что взаимодействие NO с $\bullet\text{O}_2^-$ приводит к образованию пероксинитритов, $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалов – чрезвычайно реакционных соединений, способных повреждать практически все низко- и высокомолекулярные компоненты, из которых состоят клетки живых организмов. Именно это явление реализуется при ишемическом и геморрагическом инсульте, когда на фоне реализации Glu-нейротоксичности, повышении концентрации ионов Ca^{2+} увеличивается активность нейрональной NO-синтазы и возрастает концентрация NO. Особенно активно эти процессы могут протекать при воспалительных (иммунных/аутоиммунных) процессах и значительном увеличении активности индуцибельной NO-синтазы.

Другие механизмы участия NO в процессах функционирования мозга представлены в работах [151–162]. Главный вывод, который можно сделать в результате анализа этих исследований, заключается в том, что *NO необходим как для формирования памяти, так и для ее стирания* [153, 154]. Авторы указанных работ предположили, что важную роль в этом процессе играет нитрозилирование SH-групп цистеина и активация внутриклеточных сигнальных путей через воздействие на гуанилатциклазу и повышенный синтез бел-

ков, влияющих на память. Можно предположить, что такие процессы играют важную роль в процессах формирования долговременной памяти, поскольку синтез новых белков необходим для реализации механизмов *долговременной памяти* [166].

В процессах формирования *кратковременной памяти* могут включаться другие механизмы, например образование на белках и липидах парамагнитных центров, которые обеспечивают взаимодействие между собой растворимые и мембранно-связанные белки и возникновение белок-белковых и белок-липидных комплексов. Благодаря этому явлению может происходить перераспределение белков из растворимого состояния в мембранно-связанное состояние [74]. Такие процессы могут приводить к образованию белок-белковых и белок-липидных комплексов в примембранной области нейронов. При ишемии/гипоксии аналогичные процессы могут вызывать перераспределение белков. Это перераспределение может осуществляться из растворимого состояния в мембранно-связанное состояние [72, 74]. Ранее мы неоднократно высказывали предположение, что такие явления могут приводить к увеличению объема центрального звена передачи сигнала между нейронами и могут улучшать визуализацию шипиков дендритов, аксоно-дендритных связей и увеличивать протяженность активной зоны синапса [72, 74, 99]. Аналогичные явления можно обнаружить при инкубации мозжечка лягушки *Rana temporaria* в присутствии Glu и NO-генерирующего соединения (NaNO_2) (рис. 5). Можно ожидать, что эти явления протекают однотипно у животных, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы, и носят универсальный характер. *Стирание памяти* может происходить тогда, когда появляется возможность для превращения NO в диоксид азота (NO_2), пероксинитриты, которые распадаются с последующим образованием $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалов, способных вызывать нарушения и повреждения различных компонентов нервных клеток. Подобные явления могут вести к развитию различных нейродегенеративных процессов при транзиторных ишемических атаках, переходящих в ишемические и геморрагические инсульты [8–10, 115].

В настоящее время установлено, что в мозге NO может передавать сигналы как от одного нейрона к другому, так и от нейронов к астроцитам или кровеносным сосудам [163]. Считается, что в основе разнообразного поведения NO лежат различные режимы работы нейронной сети. В одних случаях сигнал может передаваться между синаптическими партнерами (в ортоградном или ретроградном направлениях) [140, 164, 165]. В других случаях передача сигнала может быть объемного типа, при которой NO, синтезируемый

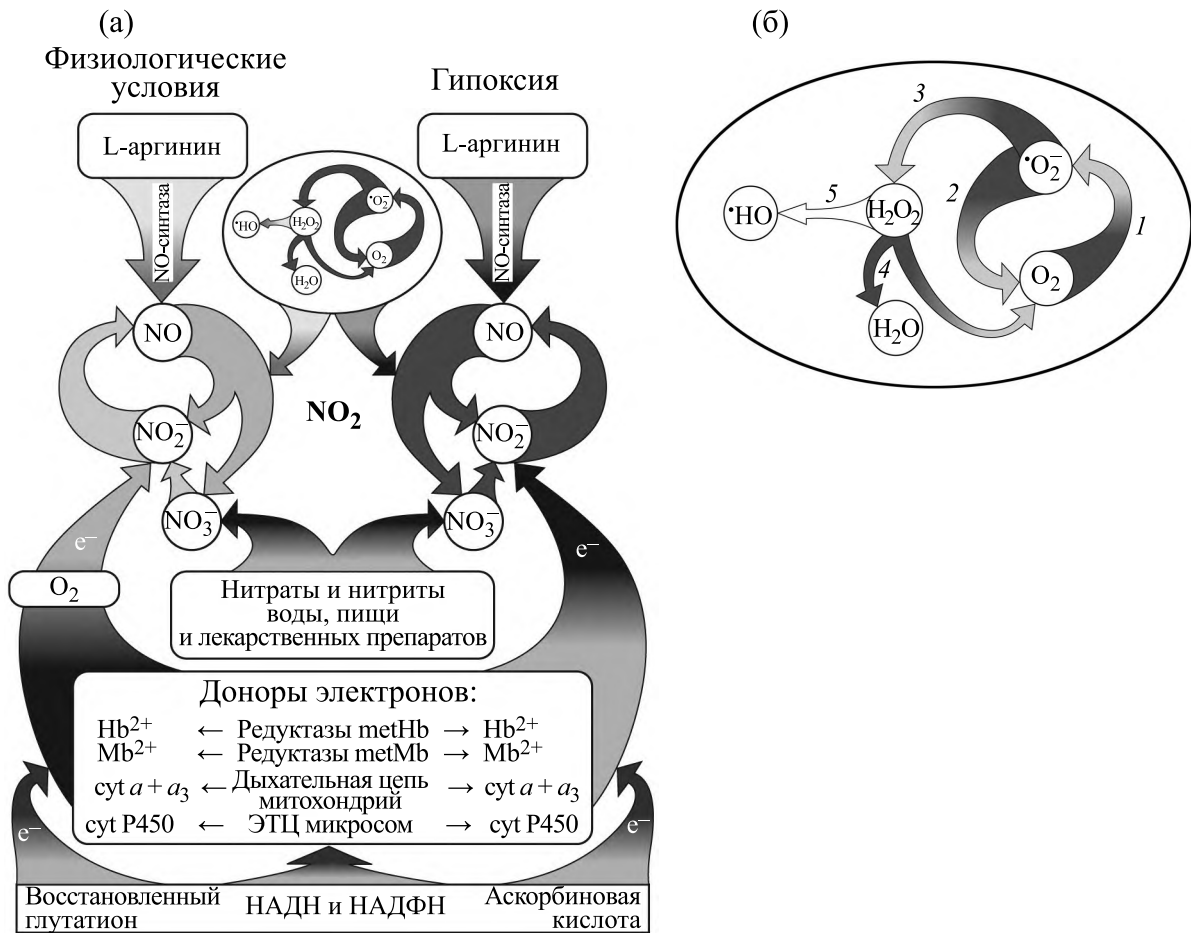


Рис. 8. Циклы оксида азота (а) и супероксидного анион-радикала (б).

несколькими синхронными источниками, суммируется в пространстве и времени, влияя на нейрональные и глиальные клетки [110, 161–165]. Образуясь в постсинаптическом нейроне, NO действует локально, вероятно, в основном в пределах того синапса, где он образуется. Тем не менее, соседние пресинаптические нейроны могут находиться в пределах досягаемости тех молекул NO, которые образуются в ближайшем постсинаптическом нейроне. Низкие концентрации NO способны стимулировать физиологическое (субмикромольное) увеличение концентрации cGMP в зависимости от активности растворимой гемсодержащей гуанилатциклазы, активности NO-синтаз и концентрации NO [111]. Если в определенной области ткани мозга одновременно активны многие нейроны или синапсы, выделяющие NO, то этот объемный вторичный посредник может действовать, влияя и координируя поведение клеток в этой области [107–109, 163–165, 167].

ЦИКЛЫ ОКСИДА АЗОТА (NO) И СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА (•O₂⁻)

Л.А. Орбели неоднократно отмечал: «Мы мало считаемся с тем, что все процессы осуществляются циклически и каждый процесс имеет свою цикличность». В основе типового патологического процесса лежат неспецифические нарушения циклических регуляторных процессов, когда одновременно повышается содержание активных форм азота и кислорода. Выход концентраций активных форм азота и кислорода за пределы регуляторных возможностей биохимических антиоксидантных систем приводит к нарушению циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала (рис. 8) [43–53].

Согласно развиваемым нами представлениям, поддержание концентрации активных форм азота и кислорода также обеспечивается функционированием циклов оксида азота (NO) и супероксидного анион-радикала (•O₂⁻). В цикле оксида азота можно выделить NO-синтазную

компоненту – «L-аргинин → NO», осуществляющую синтез NO в присутствии кислорода, и нитритредуктазную компоненту, активность которой резко возрастает в условиях дефицита кислорода (гипоксии или ишемии) [50]. Ионы NO_2^- , образующиеся из L-аргинина, могут вновь при участии нитритредуктазных систем, включающих в себя гемоглобин (Hb), миоглобин (Mb) и цитохромы (сyt a + a₃ и сyt P450), замыкать в цикл цепочку «L-аргинин → NO → NO_2^- / NO_3^- ». Кислород, связываясь с гемом, ингибирует нитритредуктазную активность этих белков. При гипоксии и функциональной нагрузке, когда гемсодержащие белки переходят в дезокси-форму, ионы NO_2^- начинают активно восстанавливаться, акцептируя электроны с этих гемсодержащих белков. В цикле супероксидного анион-радикала происходят: 1 – восстановление O_2 и образование супероксидного анион-радикала ($\bullet\text{O}_2^-$); 2 и 3 – реакции дисмутации супероксида, катализируемые супероксиддисмутазой; 4 – разложение пероксида водорода (H_2O_2) на воду (H_2O) и молекулярный кислород (O_2), осуществляемое ферментом каталазой; 5 – пероксид водорода (H_2O_2) также разлагается с образованием двух $\bullet\text{OH}$ -радикалов. Циклическая регуляция активных форм азота и кислорода обеспечивает превращение этих активных, высокорекреационных соединений в менее активные вещества. При нарушении циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала появляются еще более активные молекулы диоксида азота и пероксинитритов, вновь распадающихся на NO_2 и $\bullet\text{OH}$ -радикалы, которые повреждают основные биохимические компоненты живых организмов [43–53].

Почему циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала играют ключевую роль в защите клеток, тканей и органов от повреждений при глутаматной нейротоксичности и развитии инсультов? Анализ данных литературы о реакциях взаимодействия NO с O_2 и $\bullet\text{O}_2^-$ [3, 168, 169] позволил сделать следующие выводы.

1. Скорость реакции убывания NO при взаимодействии с O_2 относительно невелика и соответствует скорости реакции первого порядка ($k = 0.124 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$) [169].

2. С гемсодержащими белками NO может взаимодействовать, образуя нитрозильный комплекс с Fe^{2+} в активном центре. Константа скорости взаимодействия, как правило, варьирует в пределах 10^3 – $10^7 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$ в зависимости от состояния железа (Fe^{2+} или Fe^{3+}) и окружения гема [168–170].

3. Одновременное повышение содержания активных форм азота (NO и продуктов его превращения) с продуктами превращения кислорода ($\bullet\text{O}_2^-$)

приводит к тому, что они начинают взаимодействовать друг с другом в общих местах их образования со скоростью в 100000 раз выше, чем с известными природными антиоксидантами, входящими в состав живых организмов. Скорость реакции NO с $\bullet\text{O}_2^-$ настолько высокая, что она ограничена только скоростью диффузии молекул друг к другу. Константы скоростей реакций для взаимодействия NO и $\bullet\text{O}_2^-$ $(6.7 \pm 0.9) \cdot 10^9 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$, что в 10^5 (или в 100000) раз выше, чем с известными природными фенольными антиоксидантами [3, 168–170].

Согласно данным, полученным в последние десятилетия, константы скорости взаимодействия фенольных природных антиоксидантов в реакциях с супероксидным анион-радикалом находятся в интервале $(6.8$ – $11.0) \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$) [171–173]. Учитывая тот факт, что NO и $\bullet\text{O}_2^-$ могут взаимодействовать друг с другом со скоростью в 100000 раз выше, чем с известными антиоксидантами, можно сделать следующий вывод.

При одновременном появлении достаточного количества для непосредственного взаимодействия NO и $\bullet\text{O}_2^-$ практически все антиоксидантные системы живых организмов оказываются выключенными, и открывается возможность для возникновения новых молекул $\bullet\text{NO}_2$, $\bullet\text{OH}$ -радикалов, пероксинитритов, которые, в свою очередь, могут образовывать патогенетический цикл, где эти же соединения начинают воспроизводить сами себя. Именно поэтому инсульты развиваются стремительно в течение 1.5–3.0 час. В этот период необходимо предпринять экстренные меры по лечению пациентов. Поэтому этот временной отрезок получил название «терапевтическое окно».

Подобные реакции могут протекать при токсическом воздействии избыточного Glu в случаях развития ишемических и геморрагических инсультов, а также при эпилепсии и кровоизлияниях, связанных с травмами головного мозга и сильными ушибами [75–78, 56–66, 174–181]. Эти реакции и процессы протекают особенно быстро в течение 60–90 мин, пока не произойдет истощение аминокислоты L-аргинина, которая является основным субстратом для функционирования конститутивных и индуцибельной NO-синтаз [89].

С точки зрения этой концепции повреждение мембран клеток и субклеточных структур при токсическом воздействии Glu является следствием образования при указанных выше нарушениях высокорекреационного соединения – диоксида азота ($\bullet\text{NO}_2$), способного участвовать в цепных свободно радикальных реакциях и окислять основные биохимические компоненты, входящие в состав живых организмов: ДНК/РНК (гуанино-



Рис. 9. Чл.-корр. АН СССР Николай Григорьевич Колосов (30.04.1897–01.03.1979).

вые основания в первую очередь), жирные кислоты (ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов мембран), белки (SH-группы серосодержащих аминокислот и OH-группы тирозиновых остатков белков), с последующим образованием феноксильного радикала и нитрованием тирозина – образованием нитротирозина [89]. Эта концепция хорошо согласуется с представлениями о том, что «любая болезнь начинается с недостаточности регуляторных механизмов» (Р. Вирхов) и представляет собой, прежде всего, «дизрегуляторную патологию» (Г.Н. Крыжановский).

ПРЕЕМСТВЕННОСТЬ ИДЕЙ И СВЯЗЕЙ В НЕЙРОБИОЛОГИИ МЕЖДУ УЧЕНЫМИ РАЗНЫХ ПОКОЛЕНИЙ

Изучая морфологию нервной системы, чл.-корр. АН СССР Н.Г. Колосов (рис. 9) обратил пристальное внимание на синапсы центральной и вегетативной нервной системы, а также их изменения (усиление окрашивания) при гипоксии. Механизмы этого явления были неизвестны. Более того, в 1968 г. Колосов отметил: «Морфология синапсов является не только не разработанной, но и почти не исследованной областью науки». Это показывает, как много осталось нерешенных вопросов и как эти последние умножились в процессе морфологического исследования. Н.Г. Колосов обращал внимание морфологов на необходимость внимательного отношения ко всем деталям, «которые кажутся второстепенными, но которые, в конце концов, найдут себе объяснение и могут быть применены для разъяснения биологических явлений» [226].

Действительно, спустя несколько лет Н.С. Косицын (рис. 10), ученик Н.Г. Колосова, методом электронной микроскопии установил изменения



Рис. 10. Заслуженный деятель науки РФ, профессор Николай Степанович Косицын (16.05.1934–19.08.2020).

протяженности активных зон синапсов, аксонодендритных связей и количества шипиков дендритов (улучшение их визуализации) в условиях гипоксии/ишемии, вызванной частичным и кратковременным пережатием сонных артерий у крыс [72, 74, 182–184]. В это время механизм объемных изменений в центральном звене передачи сигнала от пресинаптического нейрона к шипикам дендритов и постсинаптическому нейрону был неизвестен. Вместе с тем было известно, что количество импульсов, пришедших к аксональной терминали нейрона (бутону), в конечном счете определяет количество выделяемого медиатора. Было высказано предположение, что изменения длины, ширины и объема шипиков дендритов, а также их формы, связаны с эффективностью синаптической передачи сигнала и зависят от количества медиатора, выделяемого в синаптическую щель [73, 166]. Однако было неизвестно, может ли основной причиной объемных изменений в центральном звене передачи сигнала в мозге быть увеличение количества выделяемого медиатора или эти морфологические изменения опосредованы другим/другими биохимическими факторами.

Исследования показали, что ультраструктурные изменения в шипиках, как при гипоксии/ишемии, с одной стороны, наблюдаются у животных при обучении и выработке условных рефлексов. С другой стороны, животные, которые подвергались кратковременным воздействиям гипоксии/ишемии, были способны обучаться быстрее, чем контрольные животные. В связи с этим можно было ожидать, что дефицит кислорода, с одной стороны, регулирует системы внутри-



Рис. 11. Чл.-корр. РАН Левон Михайлович Чайлахян (21.06.1928–23.02.2009).

и межклеточной сигнализации, которые можно использовать для лечения когнитивной дисфункции и нейродегенеративных изменений в мозге у людей. С другой стороны, можно было думать, что *шипик* дендритов являются одними из структурных элементов хранения памяти [72, 74, 225]. Такие предположения можно было сделать в связи с тем, что все события (изменения длины, ширины и объема шипиков дендритов) проходят рядом с синапсом. Поэтому можно было ожидать, что изменения шипиков дендритов связаны с синаптической эффективностью передачи сигнала между нейронами. Вопрос заключался в том, какое вещество или соединение, а, возможно, и каскад реакций, может или могут претендовать на роль регулятора, изменяющего ультраструктуру шипиков дендритов (длину, ширину и их объем), аксо(но)-дендритических связей и ультраструктуру активной зоны синапса [72, 74, 225, 226].

Когда стало известно, что гемоглобин, находящийся в дезокси-форме, способен восстанавливать ионы NO_2^- [146], которые постоянно присутствуют в крови в концентрации 10^{-5} – 10^{-6} М, возник новый вопрос: не может ли NO, образующийся при восстановлении ионов NO_2^- , быть тем фактором, который вызывает объемные изменения в центральном звене передачи сигнала в мозге? В дальнейшем учениками и коллегами Н.С. Косицына было показано, что NO, образуя парамагнитные центры на белках и ненасыщенных жирных кислотах, входящих в состав фосфолипидов мембран, может индуцировать образование белок-белковых и белок-липидных комплексов [74, 89]. Такие комплексы, образуящиеся в центральном звене передачи сигнала нейрона — активных зонах синапса, способны вызывать перераспределение белков из растворимого со-

стояния в состояние мембранно-связанное. Поскольку в мембранно-связанном состоянии белки образуют надмолекулярные функционально активные ферментные комплексы — метаболонны, катализирующие последовательные стадии метаболического пути в структурных элементах клеток, активация процессов в этих комплексах-метаболонах ни у кого не вызвала сомнений.

Ситуация в еще большей степени прояснилась, когда при поддержке чл.-корр. АН СССР Л.М. Чайлахяна (рис. 11) стали моделировать события, происходящие в мозжечке лягушки *Rana temporaria* в присутствии различных концентраций Glu и NO-генерирующего соединения [26–31, 43–54].

Было показано, что Glu способен изменять форму активных зон синапса таким образом, что за счет увеличения объема постсинаптического нейрона возникает структура, внешне напоминающая «улыбку» (рис. 5). Противоположная картина наблюдалась в присутствии NO-генерирующего соединения: форма активной зоны синапса уже не напоминала «улыбку». Скорее можно было подумать, что форма активной зоны синапса демонстрирует «анти-улыбку» или удрученный вид. Такие противоположные изменения формы активных зон синапса были обусловлены тем, что под влиянием Glu объем аксонального расширения пресинаптического нейрона (так называемый бутон) практически не менялся. В пресинаптическом нейроне содержатся синаптические везикулы/пузырьки с нейромедиатором Glu. Эта нейрональная часть активной зоны синапса адаптирована к изменяющимся концентрациям Glu. В то же время в постсинаптическом нейроне после того, как Glu вступил во взаимодействие с Glu-рецепторами, развиваются события, связанные с изменением концентраций ионов Ca^{2+} и Na^+ . Известно, что ионы Na^+ увеличивают содержание молекул H_2O , за счет которых увеличивается объем постсинаптического нейрона. При этом увеличивается длина активной зоны синапса, а центральная зона передачи сигнала внешне начинает напоминать «улыбку» (рис. 5). Оксид азота (NO) нейрофизиологи рассматривают как элемент отрицательной обратной связи, который образуется в постсинаптическом нейроне, а затем, диффузно распространяясь, влияет на ближайшее окружение нейронов. Недаром это соединение называют объемным нейромедиатором. NO может воздействовать на синаптические везикулы (рис. 3) и белковые структуры, которые служат направляющими для транспорта везикул/пузырьков. Сами везикулы содержат около 5000 молекул нейромедиатора.

К явлению *объемных изменений сосудов* при ускорении кровотока проф. П.А. Мотавкин (1922–2015) (рис. 12) и проф. В.М. Черток

(р. 1947) подошли через управление мозговой гемодинамикой – интимальный и нейро-эндокринный механизмы регуляции [114]. С.Г. Калинин и П.А. Мотавкин в своем фундаментальном труде, посвященном коре мозжечка, привели в единую систему современные достижения по структуре, функции и нейрохимии мозжечка [139]. На примере организации коры мозжечка они проанализировали и обсудили общие принципы организации и функционирования нервной системы. В наших совместных работах с сотрудниками П.А. Мотавкина и В.М. Чертока мы пришли к выводу о том, что *циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала* могут играть интегративную роль в реализации функционального единства нейронов, глии и кровеносных сосудов в глутаматергической системе мозжечка [149, 150]. В работах [149, 150] предложена новая концепция регуляции мозгового кровообращения, согласно которой цикл оксида азота, поставляющий и регенерирующий объемный нейротрансмиттер NO для осуществления механизмов глутаматергической и NO-ергической передачи, играет важную роль интегрирующего элемента в функциональной системе, представляющей единство нейронов, глии и кровеносных сосудов, включая капилляры мозга. В результате такого взаимодействия нейроны, глия, а также нервная, гуморальная, межклеточная и внутриклеточная регуляция мозга оказываются оптимально взаимосвязанными с системой кровообращения в радиусе 25 мкм [139, 149, 150]. В отсутствие механизма цикла оксида азота система кровообращения, включая капилляры мозга, работала бы менее эффективно при гипоксии/ишемии, более субстратно-дефицитна (по L-аргинину) и требовала бы более близкого расположения капилляров мозга от нейронов и глиальных клеток. Благодаря наличию механизма цикла оксида азота в функционально активных областях мозга, включающих глутаматергические и другие системы, при нормальных физиологических процессах на фоне повышения активности нейронов и глии происходит расширение сосудов, включая капилляры мозга [149, 150]. Кроме того, система доставки кислорода и глюкозы оказывается более адекватной тем запросам, которые испытывают нейроны и глиальные клетки в функционально активных отделах/участках мозга. Это связано с тем, что чем выше активность глутаматергической системы, тем больше NO и продуктов его превращения ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) образуется в нейронах и глии. Эти соединения могут сразу диффундировать за пределы тех клеток, где они образуются. Во многом благодаря циклу оксида азота NO оказывается эффективным регулятором нейронов, глии и сосудов, включая капилляры мозга, обеспечивая нормальную работу всех систем модульной нейроархитектоники мозга и их струк-



Рис. 12. Заслуженный деятель науки РФ Павел Александрович Мотавкин (28.07.1922–27.05.2015).

турно-функциональное единство [139, 149, 150]. Без циклической организации в системах генерации $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$ происходили бы взаимодействия между этими чрезвычайно активными соединениями с образованием пероксинитритов и продуктов их распада – $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$. Эти высокорекреационные продукты неминуемо вели бы к некротической гибели нейронов и увеличивали бы гибель пациентов при нарушениях мозгового кровообращения [132, 133, 149, 150].

Объемные изменения в центральном звене передачи сигналов при гипоксии/ишемии (Н.С. Косицын и соавторы) [72, 74, 89]; *Нитритредуктазная активность гемоглобина, находящегося в дезоксиформе* [146]; *Объемные изменения в области синапса при токсическом воздействии Glu и NO-генерирующих соединений* (Л.М. Чайлахян и соавторы) [26–31, 43–54]; *Объемные изменения сосудов при ускорении кровотока* (П.А. Мотавкин и В.М. Черток) [114] – все перечисленные исследования существенно дополняли друг друга. Они отражали разные грани одного открытия – явления, которое в 1998 г. было отмечено Нобелевской премией по физиологии и медицине. Этой высокой наградой, как указывалось выше, были удостоены американские ученые Р. Фёрчготт (1916–2009), Ф. Мурад (1936–2023), Л. Игнаро (р. 1941). Как гласит официальное заключение Нобелевского комитета, американские ученые награждены за «открытие роли оксида азота как сигнальной молекулы в регуляции сердечно-сосудистой системы».

Отдавая дань достижениям зарубежных ученых, мы не можем не вспомнить академика П.Г. Костюка [185, 186]. Этот выдающийся ученый

впервые использовал микроэлектродную технику в изучении деятельности нервных клеток. Он впервые в мировой науке разработал методику внутриклеточного диализа сомы нервной клетки и применил ее для исследования мембранных и молекулярных механизмов нейронов [185, 186].

ОТ МОРФОЛОГИИ К ЦИТОХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ПРОЦЕССА ВНУТРИ- И МЕЖКЛЕТОЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

Внутриклеточный транспорт — это перемещение везикул/пузырьков и веществ внутри клеток. Внутриклеточный транспорт необходим для поддержания гомеостаза внутри клеток путем реагирования на физиологические сигналы. Белки, синтезируемые в цитозоле, распределяются по соответствующим органеллам в соответствии с последовательностью сортировки их конкретных аминокислот. Поскольку внутриклеточный транспорт в значительной степени зависит от движения микротрубочек, компоненты цитоскелета играют важную роль в перемещении везикул между органеллами и плазматической мембраной.

В 2013 г. трое американских ученых (Р. Шекман (Randy W. Schekman, родился в 1948 г. в США), Дж. Ротман (James E. Rothman, родился в 1950 г. в США) и Т. Зюдхоф (Thomas C. Südhof, родился в 1955 г. в Германии, но работал в США) были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за раскрытие механизмов везикулярного транспорта — главной транспортной системы в клетках живых организмов.

О существовании внутриклеточного транспорта было известно с начала XX века. Однако с молекулярной точки зрения детали этого процесса начали проясняться только после выхода работ Р. Шекмана, опубликованных в журналах *PNAS* и *Cell* [255–257]. В совместных работах Дж. Ротмана и Р. Шекмана [258, 259] было установлено, что белки NSF и SNAP — продукты генов *sec17* и *sec18* — ассоциированы с везикулами, участвуют в везикулярном транспорте и способствуют узнаванию мест доставки везикул. Продолжая работу по выделению ассоциированных с везикулами белков, Ротман обнаружил еще три ключевых белка — синаптобrevин, SNAP-25 и синтаксин. Эти белки были ранее найдены другими учеными в синапсах, однако их функции оставались неизвестными. Ротман объединил их в группу SNARE (soluble NSF-attachment protein receptors). Синаптобrevин был ассоциирован с везикулами, а SNAP-25 и синтаксин — с клеточными мембранами. Это открытие позволило Дж. Ротману сформулировать SNARE-гипотезу — ключевую гипотезу, которая объясняет, почему

везикулы сливаются с клеточными мембранами именно в тех местах, где это необходимо [259]. Согласно этой модели, слияние регулируется двумя группами рецепторов — t-(target)-SNARE (синтаксины) и v-(vesicle)-SNARE (синаптобrevины), то есть молекулами, находящимися на мембране и на везикулах соответственно. Таким образом, SNARE-гипотеза — это гипотеза об универсальной «единице докирования и слияния». В настоящее время считают, что SNARE-белки представляют собой совокупность интегральных мембранных белков, снабженных мембранным (или иногда липидным) якорем, расположенным на С-концевом участке. N-терминальный домен этих белков открывается в цитоплазму. Существует большая группа белков SNARE (около 60 белков в клетках млекопитающих), осуществляющих слияние внутриклеточных транспортных везикул с клеточной мембраной или органеллой-мишенью (например, лизосомой). Таким образом, основная роль белков SNARE заключается в опосредовании слияния везикул с мембраной-мишенью [258, 259]. В чем же состоял вклад в решение проблемы Т. Зюдхофа?

Т. Зюдхоф по образованию и опыту работы нейрофизиолог. Он изучал, каким образом происходит передача сигнала в синапсах между нейронами. Его интересовал сам процесс выброса нейромедиатора в синаптическую щель. Он знал, что молекулы нейромедиатора упаковываются в везикулы и точно в определенное время должны выделиться в пространство между мембранами двух нейронов. Оказалось, что этот процесс зависит от колебаний внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Зюдхоф сосредоточил свое внимание на двух белках — комплексине и синаптотагмине [258]. Изучая мышей с нарушенной функцией генов, кодирующих комплексин или синаптотагмин, он определил, что эти два белка реагируют на концентрацию Ca^{2+} и являются своеобразными контролерами, предотвращающими постоянное неконтролируемое образование везикул. Оказалось, что синаптотагмин, с одной стороны, является сенсором Ca^{2+} , а с другой стороны, взаимодействует со SNARE-белками и запускает механизм формирования везикулы [260]. Зюдхоф также идентифицировал белок Munc18, мутация в котором соответствовала дрожжевому фенотипу *sec1-1*, описанному Шекманом. Этот белок и семейство, к которому он принадлежит, получили общее название SM-белков (от Sec/Munc). Оказалось, что вместе со SNARE-белками они участвуют в процессе формирования везикул [260, 261]. Таким образом, работы Шекмана, Ротмана и Зюдхофа стали частями одного большого достижения, которое описывало транспортную систему клетки с участием пузырьков-везикул [255–261]. Благодаря работам

этих ученых стало ясно, как пузырьки формируются, как они находят свое место доставки и каким образом регулируется их образование точно в определенном месте и в определенное время.

ОТ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ТИПОВОГО ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРИ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ К ИХ ЛЕЧЕНИЮ

Цереброваскулярные заболевания в XXI веке являются основной причиной смертности в развитых странах [187–195]. Именно на эти заболевания приходится более четверти зарегистрированных смертей во всем мире [196–201]. Нарушения мозгового кровообращения и инсульты существенно сокращают среднюю продолжительность жизни и, как ни одно другое заболевание, ухудшают ее качество [134, 202–204]. В связи с изменением возрастной структуры населения имеются основания предполагать, что по мере старения людей – жителей нашей планеты – количество случаев инсультов в мире будет возрастать. Знания о механизмах развития типового патологического процесса и умение их предотвратить в начальной стадии развития или затормозить тогда, когда процессы стали развиваться, могут в значительной степени снизить количество летальных исходов.

В настоящее время выявлено, что при инсультах различного генеза развивается каскад следующих основных реакций и механизмов:

а) прекращение или сокращение кровоснабжения;

б) повышение содержания глутамата (Глу-нейротоксичность);

в) нарушение энергетических механизмов участка ткани мозга и ионного гомеостаза, прежде всего, содержания ионов Ca^{2+} и Na^+ ; нитрозативного и оксидативного стресса (резкое повышение содержания активных форм азота и кислорода); состояние острого кислородного голодания (гипоксия/ишемия);

г) развитие воспалительных процессов (на фоне активации индуцибельной NO-синтазы и образования $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалов); интоксикация продуктами метаболизма, необратимые изменения в ядре инсульта/инфаркта, которые происходят в течение первых 15–30 мин или становятся настолько масштабными, что это всегда отражается на нейронах и глиальных клетках [87, 88]. Ведущая роль в защите нервных клеток принадлежит регуляторным механизмам, обеспечивающим поддержание активных форм азота и кислорода в пределах физиологической нормы [3].

Самые первые минуты и часы во время инсультов, как правило, остаются вне поля зрения исследователей и врачей. Однако именно в это время происходит необратимая гибель нервных клеток, которые будут влиять на функциональные исходы и определять выживаемость после инсульта. За последние десятилетия (1990–2020 гг.), как указывалось выше, абсолютное число случаев инсульта в мире увеличилось на 70%, число больных после перенесших инсультов повысилось на 85%, смертность от инсульта возросла на 43%, а DALY (Disability Adjusted Life Years) – интегральный медико-экономический показатель вследствие инсульта – поднялся на 32% [192, 193, 205, 206].

В течение XX века (особенно с 1990 по 2000 гг.) общее число смертей от инсультов снизилось среди населения, где была проведена предварительная работа по обучению людей выявлению признаков нарушения мозгового кровообращения (НМКО) [131, 136, 205–209]. Однако доля смертельных случаев, происходящих до того, как пациента доставят в больницы, увеличилась почти до 50% всех смертей от инсульта [204]. Одной из задач многих стран мира в области здравоохранения на 2010–2025 гг. явилось увеличение количества лиц, осведомленных о признаках инсульта при первых его симптомах [135, 136, 210, 211]. Чтобы оценить осведомленность общественности и знания о надлежащем реагировании на чрезвычайные ситуации, были созданы центры за контролем и предупреждением инсультов (Centers for Disease Control and Prevention (CDCP)), которые проанализировали данные из Системы наблюдения за поведенческими факторами риска в 17 штатах и Виргинских островах США [204, 212–214]. Анализ этих результатов показал, что осведомленность белого населения США о некоторых признаках нарушения мозгового кровообращения, которые предшествуют инсульту, достаточно высока. К таким признакам относятся сильная и стойкая головная боль, сонливость и апатия, резкая слабость. Острое нарушение мозгового кровообращения может протекать в виде *транзиторной ишемической атаки, микроинсульта или инсульта*.

Об инсульте говорят в том случае, если неврологическая симптоматика сохраняется более суток [215]. При наличии *проходящего нарушения мозгового кровообращения*, как и при *микроинсульте*, признаки расстройств функций организма проходят самостоятельно в течение 24 ч. После них не остается морфологических изменений в клетках головного мозга. В результате *микроинсульта* образуются очаги некроза вещества головного мозга. При инсульте наблюдаются а) нарушение речи (невнятная, слишком замедленная, бессмысленная); б) тошнота и рвота; в) сильная головная боль (возникает резко); г) нарушение

координации; д) проблемы со зрением (двоение в глазах, слепота на один или оба глаза); е) слабость в конечностях; ж) нарушение чувствительности одной половины тела. Возможны: з) потеря сознания; и) повышенная чувствительность вплоть до полного неприятия яркого света и громких звуков; к) парез конечностей с одной стороны тела и нарушение двигательной координации; л) появление асимметрии лица. Если эти симптомы сохраняются в течение 24 ч или нарастают, речь идет об *инсульте*. Иногда симптомы *микроинсульта* можно перепутать с реакцией на стресс или хронической усталостью [215]. Однако способность распознавать основные предупредительные признаки инсульта в среднем среди представителей разных стран мира низка [212, 215, 216]. В связи с этим необходимы образовательные кампании для повышения осведомленности общественности о признаках инсульта [210] и необходимости звонить в службу 103 в России [201, 216]. Номер круглосуточной службы скорой помощи, например, в Китае – 120 [219–221].

При необходимости можно также позвонить на номер спасательной службы 110 или в свой полицейский участок – оператор переведет вас на нужную линию. С целью повышения осведомленности общественности и знаний о распознавании признаков инсульта в Китае (Шанхае) была разработана специальная программа «Инсульт 1-2-0» – адаптированный инструмент распознавания «Face, Arm, Speech» для оперативного реагирования на начало инсульта [221–224]. С этой целью два сообщества с численностью населения не менее 100 000 человек были отобраны в одном и том же округе Шанхая. Они были включены в «Систему оценки государственной образовательной программы» на сокращение случаев инсульта среди взрослых по сравнению с обычным уходом [221–224]. Анализ результатов этой деятельности показал, что осведомленность пациентов о необходимости оперативного реагирования на начало инсульта сокращает смертность и инвалидизацию.

ОТ ЦИКЛОВ ОКСИДА АЗОТА И СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА К ТИПОВОМУ ПАТОЛОГИЧЕСКОМУ ПРОЦЕССУ

Важную роль в поддержании гомеостаза играют циклические регуляторные процессы, о чем писали Р. Вирхов, Л.А. Орбели и Г.Н. Крыжановский. Согласно развиваемой нами концепции, *циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала* в существенной степени удерживают клетки тканей от начала развития *типового патологического процесса* при многих заболеваниях, характеризующихся гипоксией/ишемией, воспалитель-

ными процессами, иммунными и аутоиммунными реакциями. Молодые и здоровые люди обладают высокой стабильностью по отношению к развитию любого заболевания, поскольку возможность поддерживать гомеостаз (постоянство переменных показателей внутренней среды) – это свойство здорового организма [103–105]. Это положение хорошо согласуется с основным выводом Вирхова: «Не жизнь в ненормальных условиях, не нарушение как таковое вызывает болезнь, напротив, болезнь начинается с недостаточности регуляторного аппарата». Однако до наших исследований и обоснования *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала* никто не задавался вопросом о том, *в чем суть того регуляторного аппарата, от недостаточности которого зависит, начнется ли развитие патологического процесса или заболевания*. После обоснования *принципа цикличности как фундаментального и универсального механизма живых и неживых систем* [227–229] появилась возможность предположить, что развитие типового патологического процесса подчиняется *всеобщему принципу цикличности, а циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала* являются неотъемлемыми компонентами, защищающими клетки и организм в целом от любых нарушений и повреждений [227–229, 234, 236].

Привело ли такое знание к существенным изменениям в лечении ишемических и геморрагических инсультов, а также нейродегенеративных заболеваний? Перевод пациентов в состояние медикаментозного сна, использование регуляторных пептидов, повышающих устойчивость мозговой ткани к ишемии/гипоксии, применение оксигенации крови и контроля температуры как нейропротекторной стратегии, снижающей содержание *активных форм азота* ($\bullet\text{NO}/\bullet\text{NO}_2$) и *кислорода*, ($\bullet\text{O}_2^-/\bullet\text{OH}$ -радикалы) не только подтвердили высказанные выше положения, но и стали стандартами лечения инсультов и цереброваскулярных заболеваний [9, 10, 86, 106, 145, 208, 209, 230]. По сути дела, это те инструменты лечащих врачей, которые способны влиять на содержание активных форм азота и кислорода, в том числе на содержание $\bullet\text{NO}_2$, $\bullet\text{O}_2^-$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалов [119–130]. Однако длительное время в качестве основной догоспитальной помощи при гипертоническом кризе, который часто является одной из существенных причин развития инсультов, использовали *димедрол, корвалол, валидол и сульфат магнезии*. Потом к схеме лечения был добавлен нифедипин, который увеличивает коронарный кровоток, уменьшает спазм и расширяет коронарные и периферические (главным образом артериальные) сосуды, снижая при этом артериальное давление и общее периферическое сосу-

дистое сопротивление. Указанные выше препараты также оказывали защитное действие при нарушениях мозгового кровообращения или при болезнях коронарных артерий [209, 217, 218]. Тем не менее, в течение XX века 13 из 15 президентов США (от Теодора Рузвельта до Рональда Рейгана) умерли именно от нарушения мозгового кровообращения или болезней коронарных артерий. В XXI веке военный, государственный и политический деятель, премьер-министр Израиля А. Шарон (1928–2014) умер в результате последствий нарушения мозгового кровообращения, вызванных несколькими инсультами, которые врачи Израиля не смогли предупредить, несмотря на высокие стандарты лечения в этой стране [132, 144, 145, 207, 231]. Анализируя жизнь известных государственных и политических деятелей, ученые и врачи едиными остаются во мнении: *необходима глобальная модификация существующего образа жизни людей.*

КАК СНИЖЕНИЕ СРЕДНЕЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ В СССР СПОСОБСТВОВАЛО ВЫЯСНЕНИЮ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКИХ И ГЕМОМРАГИЧЕСКИХ ИНСУЛЬТОВ?

В 60–70-х годах XX века в СССР было отмечено снижение средней продолжительности жизни. Это явление, прежде всего, было связано с ростом социально значимых заболеваний. Известно, что заболевания этой нозологической группы представляют значительную угрозу здоровью и жизни населения. В первую очередь к этим заболеваниям относятся сердечно-сосудистые заболевания; заболевания, связанные с нарушением мозгового кровообращения; и, наконец, онкологические заболевания. Более 60% онкологических заболеваний выявляются после 60–65 лет на фоне развития гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, развития иммунных и аутоиммунных реакций. Таким образом, все указанные выше социально значимые заболевания развиваются в одинаковых или сходных условиях с теми, которые характерны для ишемических и геморрагических инсультов.

Долгое время причины снижения средней продолжительности жизни были неизвестны. Поэтому преодолеть снижение средней продолжительности жизни в СССР стремились именно за счет увеличения количества врачей, больниц и поликлиник. За 69 лет в СССР (1922–1991) количество докторов в стране выросло более чем в 60 раз, с 10.9 тыс. в 1921 г. до 667.3 тыс. в 1990 г. Перед Великой Отечественной войной на 10000 человек населения страны приходилось 7 врачей, перед развалом СССР – 45 [241]. В 70-х годах XX века, после того как число врачей на территории

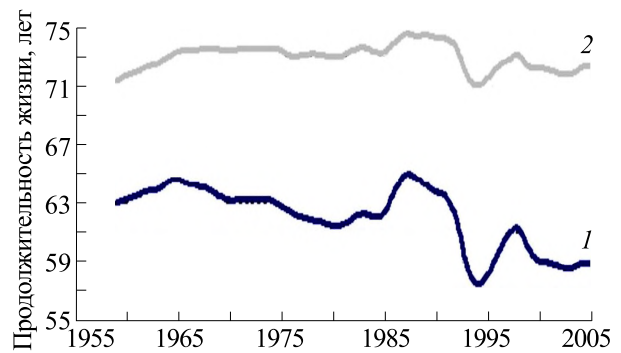


Рис. 13. Динамика продолжительности жизни в СССР и России с 1960 по 2002 гг.: кривая 1 – мужчины, кривая 2 – женщины.

СССР стало составлять 20–25% мировых показателей, а проблема продолжала усугубляться, потребовались новые идеи.

С 1974 по 1978 г. были получены данные, которые позволили предположить, что восстановление нитратов и нитритов в NO и образование $\bullet\text{NO}_2$ может стать причиной окисления ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов мембран, которое может вести к гибели клеток [89, 150]. В связи с этим стало ясно, что нельзя допускать избыточного образования этих весьма активных соединений, способных повреждать практически все компоненты, входящие в состав клеток и субклеточных структур живых организмов. Высказанные идеи были доложены в присутствии вице-президента АН СССР, академика АН СССР Ю.А. Овчинникова, академика АН СССР Н.М. Эмануэля и академика АМН СССР В.В. Закусова. Положительная оценка ведущих ученых АН СССР и поддержка этих исследований вице-президентом АН СССР академиком Ю.А. Овчинниковым способствовали тому, что был остановлен 15–18-летний тренд снижения средней продолжительности жизни в СССР (рис. 13, 14).

В эти годы (1980–1990) также приостановился рост социально значимых заболеваний, а средняя продолжительность жизни и численность населения СССР стали постепенно увеличиваться. В 1983 г. практическая реализация высказанных идей была признана одним из важнейших достижений Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР/РАН за 20-летний период деятельности Отделения физиологических наук АН СССР (рис. 15) [242]. Результаты работы неоднократно были представлены на выставках АН СССР/РАН (рис. 16). В чем же состояла суть этого достижения?

На основании анализа данных литературы и результатов собственных исследований было высказано предположение, что причиной снижения

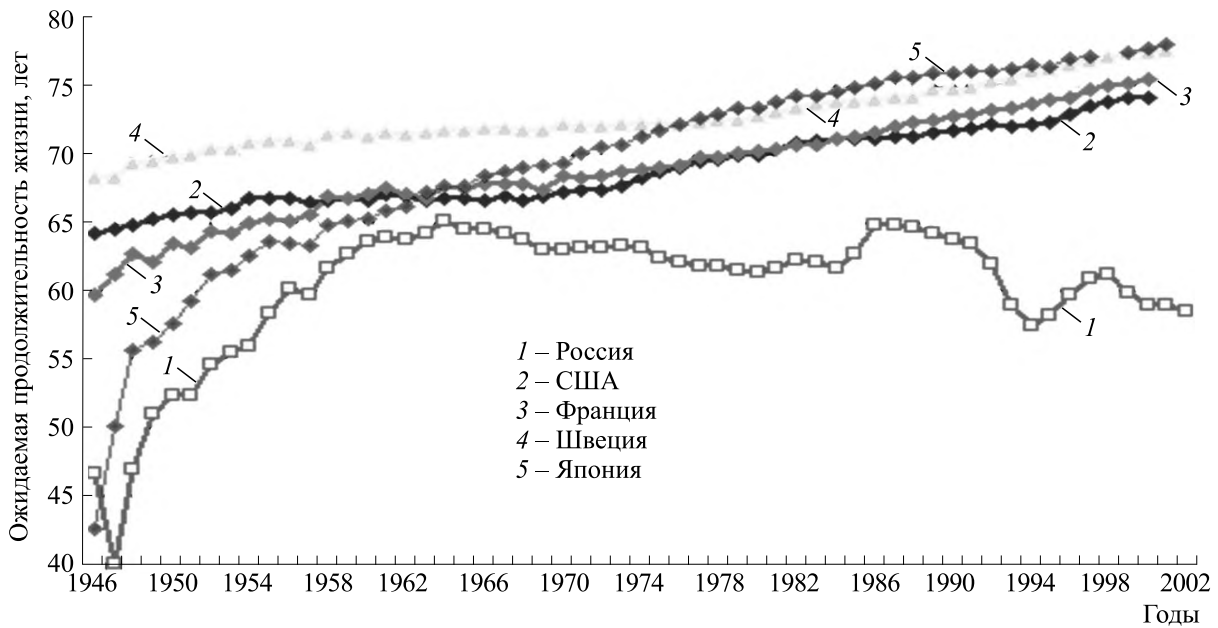


Рис. 14. Продолжительность жизни мужчин в СССР/России, США, Франции, Швеции и Японии (1946–2002 гг.).
Источник: Human Mortality Database, http://c.avsim.su/i?u=http://www.demoscope.ru/weekly/2004/0169/img/t_graf01_1.gif.

средней продолжительности жизни населения СССР в 60–80-х годах XX в. явилось решение руководителя государства Н.С. Хрущева повысить урожайность сельскохозяйственных культур — кормовой базы для мелкого, крупного рогатого скота и птиц — за счет химизации сельского хозяйства. Целью решений Н.С. Хрущева было догнать и обогнать Америку по производству мяса, масла и молока. Эту задачу лидер СССР решал с помощью минеральных удобрений, прежде всего за счет использования азотных удобрений. Однако в 60-х гг. XX века не обратили внимания на то, что азотные удобрения могут быть источником, как указывалось выше, весьма активных соединений — $\bullet\text{NO}_2$. Эти соединения, как известно, способны развигать цепные свободно радикальные реакции, которые участвуют в процессах, связанных с горением и взрывами. Недаром селитра (соли азотной кислоты) является одним из основных компонентов взрывчатых веществ. Поэтому дополнительное воздействие $\bullet\text{NO}_2$ на организм людей в дозах, значительно превышающих физиологически допустимые концентрации этих веществ, на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, иммунных/аутоиммунных заболеваний могло стать весьма неблагоприятным фактором для пожилых людей и людей с хроническими заболеваниями.

Поэтому проблема воздействия нитросоединений на организм человека по-прежнему остается одной из наиболее актуальных проблем совре-

менной биологии и медицины. От решения этой проблемы зависит качество жизни, здоровье и продолжительность жизни населения. Особенно если учесть, что повышенный фон свободных радикалов — активных форм кислорода и азота в крови и тканях у пожилых пациентов и людей с хроническими формами заболеваний, могут быть причиной снижения их средней продолжительности жизни. Таким образом, суть этого достижения состояла в том, что предложенные меры по снижению нитратно-нитритного фона, активности нитритредуктазных систем, а вместе с ними и существенное уменьшение концентрации молекул $\bullet\text{NO}_2$, которые участвуют в процессах повреждения практически всех компонентов клеток в живых организмах, остановило снижение средней продолжительности жизни населения СССР. В дальнейшем наметилось повышение в разных регионах на 3–5 лет средней продолжительности жизни населения СССР. В конечном итоге научное достижение Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР/РАН (ИВНД и НФ АН СССР/РАН) способствовало тому, что в тяжелые годы перестройки численность населения за 10 лет (1980–1990) выросла на 24.1 млн. человек (с 264.5 в 1980 г. до 288.6 млн. в 1990 г.). К началу 1991 г. численность населения (по текущей оценке) возросла до 289.2 млн. человек. Это был самый высокий прирост численности населения за 69 лет существования СССР.

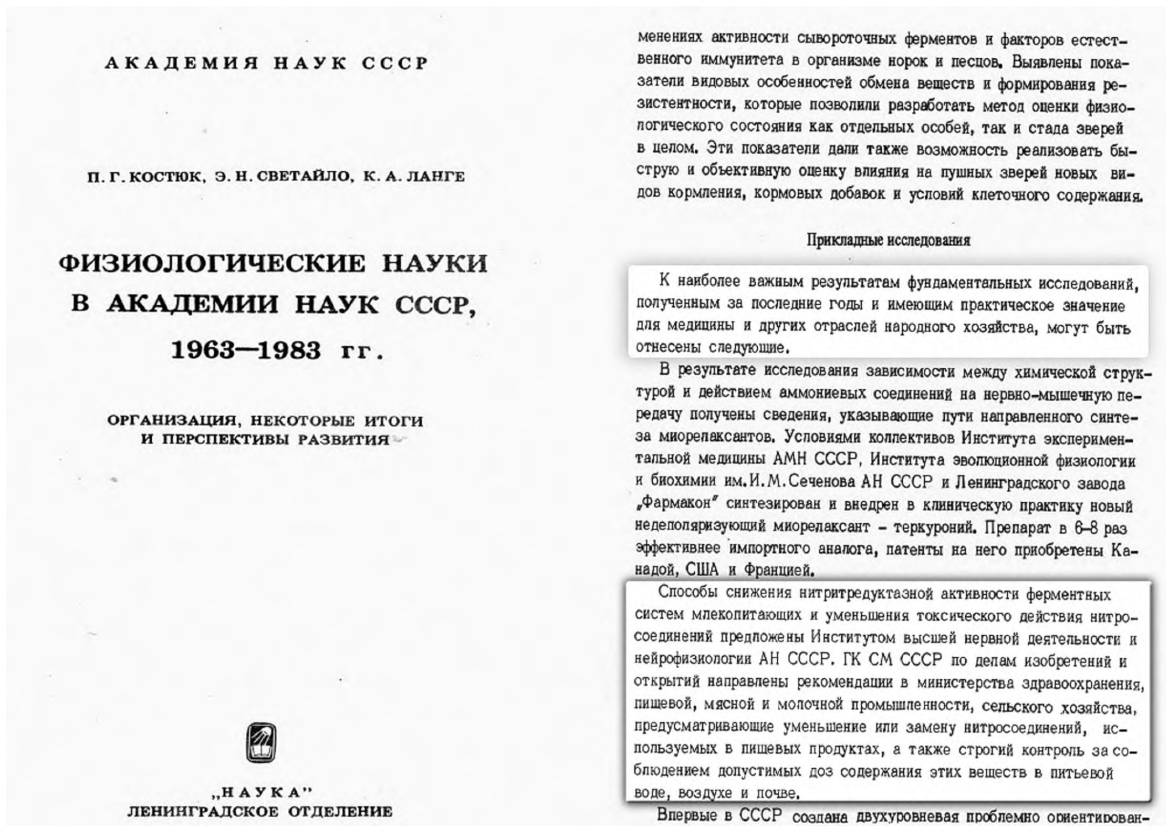


Рис. 15. Отчет по Отделению физиологии АН СССР (1963–1983 гг.) академиков АН СССР П.Г. Костюка, Э.Н. Светайло и К.А. Ланге. В этом отчете отмечено, что «к наиболее важным результатам фундаментальных исследований, полученным за последние годы и имеющим практическое значение для медицины и других отраслей народного хозяйства, могут быть отнесены способы снижения нитритредуктазной активности ферментных систем млекопитающих и уменьшения токсического действия нитросоединений, которые были предложены Институтом высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР. Государственным комитетом Совета Министров СССР по делам изобретений и открытий направлены рекомендации в министерства здравоохранения, пищевой, мясной и молочной промышленности, сельского хозяйства, предусматривающие уменьшение или замену нитросоединений, используемых в пищевых продуктах, а также строгий контроль за соблюдением допустимых доз содержания этих веществ в питьевой воде, воздухе и почве».



Рис. 16. Работа, выполненная в ИВНДиНФ АН СССР/РАН, неоднократно была представлена на выставках АН СССР и РАН. Однако после смерти вице-президента АН СССР Ю.А. Овчинникова (1934–1988), несмотря на поддержку академика РАН П.В. Симонова (1926–2002) и академика РАМН и АН Беларуси В.Н. Гурина (1938–2007), достичь успеха 1983–1990 гг. не удалось.

Результаты, полученные в 70–90-х гг. XX в., мы неоднократно проверяли в работе с сотрудниками других НИИ. Всего за 45–50-летний период соавторами наших статей стали более 250 исследователей. Совместно с сотрудниками Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России были проведены исследования, которые позволили подойти к механизмам образования атеросклеротических бляшек при сердечно-сосудистых заболеваниях, предшествующих развитию инфарктов миокарда [243–252]. Известно, что образование атеросклеротических бляшек, как правило, наблюдается в местах бифуркации сосудов. Именно в этих местах сосудистой системы наиболее активно работает эндотелиальная NO-синтаза, продуцирующая повышенные количества NO [117]. Это необходимо для регуляции тонуса сосудов, чтобы обеспечить расслабление гладкомышечных элементов там, где крупный сосуд разветвляется на более мелкие сосуды. Активная работа эндотелиальных NO-синтаз создает предпосылки для появления весьма активных молекул $\bullet\text{NO}_2$ и возникновения повреждений эндотелия и интимы сосудов. При этом также страдает симпатический отдел вегетативной нервной системы и возникает нервно-дистрофический процесс, предшествующий развитию кардиоваскулярной патологии [244–250]. Таким образом, нарушение нормальных регуляторных механизмов на фоне снижения медиаторов симпатической нервной системы – норадреналина и адреналина, обладающих антиоксидантными свойствами, наблюдаются изменения в интимах сосудов. Эти изменения усиливаются, если повреждается эндотелий кровеносных сосудов [117] и развиваются воспалительные процессы, на фоне которых активируется индуцибельная NO-синтаза [89, 243]. Образованию атеросклеротических бляшек предшествуют оксидативный и нитрозативный стресс и формирование в интимах сосудов липопротеиновых комплексов. Исследователи и врачи также отмечают важную роль нейрогенных факторов в возрастных изменениях интимы сосудов и в феномене ранней инволюции симпатического отдела вегетативной нервной системы при развитии кардиоваскулярной патологии [246–252]. Для того чтобы защитить человека от воздействия нитратов, нитритов и оксидов азота, содержащихся в пищевых продуктах, воде, лекарственных препаратах и в воздухе, необходима длительная и продуманная работа государственных медицинских служб. Сам человек может уменьшить воздействие указанных выше вредных факторов, если будет вести здоровый образ жизни, рационально и умеренно питаться, обеспечить себя полноценным сном, физическими упражнениями, закаливанием и максимально доброжелательным отношением к окружающим его людям.

Когда врачи говорят, что человек практически здоров, это не значит абсолютное отсутствие болезней. Здоровье – это, прежде всего, возможность организма поддерживать гомеостаз (постоянство переменных показателей внутренней среды) на протяжении всей жизни. Сохранение гомеостатической способности организма до глубокой старости позволяет организму достичь долголетия. Современная статистика демонстрирует, что для всех основных заболеваний характерен экспоненциальный рост смертности с возрастом. Причиной такого лавинообразного прогрессирования заболеваний являются повторяющиеся циклы реакций, многократно усиливающие вред первоначально не критичных изменений в организме. Предполагается, что увеличение продолжительности жизни не изменит сам принцип циклов с положительной обратной связью как основы экспоненциального прогрессирования зависимых от возраста заболеваний [253]. Постепенное умирание организма – это та цена, которую человек платит за относительно долгие годы жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всякое обобщение до известной степени предполагает веру в единство и простоту природы. Что касается единства, то ученые, как правило, не встречают каких-либо затруднений. Неизвестным остается вопрос, каким образом природа является единой (А. Пуанкаре). Применительно к медицине всегда при развитии разных по этиологии патологических процессов необходимо выявление общих закономерностей. Это может послужить основой для теоретических обобщений и построения новых концепций. Патологические изменения органов и тканей *на ранних стадиях болезней*, протекающих на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных, иммунных и аутоиммунных процессов, носят неспецифический характер. Они мало отличаются от физиологической нормы. Такие процессы могут осуществляться при различных заболеваниях. Некоторые исследователи относят такие патологические процессы к *типovým патологическим процессам*. Они как своеобразный «общий знаменатель» развития многих заболеваний. Влияя на механизмы развития такого *типového патологического процесса*, можно воздействовать и на основное заболевание. Задачей настоящей работы явился анализ некоторых физиологических и цитохимических процессов, которые связаны с нейромедиатором Glu, а также с высокорекреционными и высокотоксичными соединениями – активными формами азота и кислорода. Активные формы азота ($\bullet\text{NO}$) и кислорода ($\bullet\text{O}_2^-$) могут воздействовать практически на все основные компоненты клеток и субклеточных структур. В низких

концентрациях они выполняют регуляторную функцию. Однако превышение физиологических концентраций $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$ приводит к образованию анионов пероксинитрита, которые после протонирования распадаются с образованием NO_2 и $\bullet\text{OH}$ -радикалов. Эти соединения вызывают повреждения практически всех компонентов клеток, в том числе мембран нервных клеток, которые завершаются их гибелью (некрозом). Уменьшение концентрации $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$ может способствовать снижению образования пероксинитритов и продуктов их распада – $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалов. Благодаря этому будет уменьшаться или нивелироваться повреждающее воздействие высокорекреационных соединений, и, вследствие этого, будет повышаться выживаемость пациентов при различных заболеваниях, в том числе связанных с Glu-нейротоксичностью, проявляющейся в виде активной и пассивной составляющих нейронального возбуждения и его глиального сопровождения [121–130, 254].

В наших исследованиях мы стремились установить преемственную связь между учеными разных поколений и найти то общее, что объединяло между собой очень известных и менее известных классиков биологии и медицины. Так, среди этих ученых оказались рядом имена Р. Вирхова, Л. Траубе и Р. Лериша, идеи которых перекликались с плодотворными высказываниями Л.А. Орбели и наших современников, которые были либо нашими учителями – Н.С. Косицын [72, 225], либо учителями наших учителей и руководителей – Н.Г. Колосов [226]. С некоторыми известными учеными нам удалось опубликовать совместные работы – с Л.М. Чайлахяном [28–31, 43, 50, 54] – или вместе обсудить и написать о них биографические статьи [232, 233] и воспоминания – о П.Г. Костюке [185] и П.А. Мотавкине [235]. Глубокая благодарность и признательность к трудам, идеям и памяти этих ученых лежит в основе как этой обобщающей статьи, так и других наших публикаций.

Благодаря работам этих ученых нам удалось показать, что важнейшую роль в поддержании циклических регуляторных механизмов играли и продолжают играть простейшие соединения – анионы нитритов (NO_2^-) и кислород (O_2) [89, 239]. Эти молекулы в процессе эволюции жизни на Земле выполняли функцию акцепторов электронов в электронно-транспортной цепи митохондрий. Следовательно, они были причастны к фундаментальным механизмам – дыханию и энергетике клеток. Многие организмы до сих пор используют нитраты и нитриты в качестве акцепторов электронов в условиях ограниченного доступа к кислороду. Переход от нитратно-нитрит-

ного к кислородному дыханию позволил повысить эффективность энергетических механизмов [237, 238]. Гипотеза о нитратно-нитритном дыхании как предшественнике кислородного дыхания и теория эндосимбиотического происхождения митохондрий рассматриваются всегда вместе [237, 238]. По мнению А. Ленинджера [262], исходный эндосимбионт мог возникнуть из внутриклеточного паразита с нитратным дыханием, который сумел избежать переваривания в ходе ускоренной эволюции жизни на Земле. Подобные случаи известны и среди современных организмов. Так, бактерии рода *Rhizobium* проникают в клетки корней бобовых и вступают с ними в симбиотические отношения, ассимилируя свободный азот.

Благодаря этому первые живые организмы, которые вели неподвижный/малоподвижный образ жизни (растения и микроорганизмы), получили возможность иметь более эффективные энергетические механизмы. Вместе с эволюцией энергетических механизмов появились виды животных, которые обладали огромной физической силой, и могли быстро передвигаться, т.е. могли *бегать, плавать и летать*, а продукты превращения нитритных ионов – $\bullet\text{NO}/\bullet\text{NO}_2$ и кислорода – $\bullet\text{O}_2^-$ стали играть регуляторную роль, участвуя в *циклах оксида азота и супероксидного анион-радикала* [228, 229, 239, 240].

Таким образом, история кислорода – это история жизни (Л. Траубе). Она позволяет более глубоко понять клеточную/целлюлярную патологию Р. Вирхова и то, что *ничто в эволюции жизни не исчезает бесследно*. Любое решение, удачно найденное в процессе эволюции жизни на нашей планете, никогда не исчезает. Оно адаптируется к новым условиям и используется по мере необходимости. «Поэтому мы должны стремиться к тому, чтобы каждую функцию рассмотреть с точки зрения истории ее формирования. Это есть вопрос об изучении эволюции функций. В одном случае мы просто прослеживаем исторический путь развития тех или иных функциональных отношений, а во втором случае, мы подходим к пониманию того, в чем заключается эволюционный процесс, почему именно так протекал эволюционный процесс на основе тех функциональных превращений, которые возникали в живых организмах» (Л.А. Орбели). Ведь любое биологическое исследование оправдано лишь тогда, когда оно имеет «более близкий или далекий, но обязательно эволюционный выход» (Н.В. Тимофеев-Ресовский).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sudhoff K. Rudolf Virchow und die deutschen Naturwissenschaftler. *Leipzig: Akad. Verl.*, 93 (1922).
- Kryzhanovskii G. N. Some general pathological and biological categories: health, disease, homeostasis, sanogenesis, adaptation, immunity. New approaches and definitions. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.*, № 3, 3–7 (2004). PMID: 15446411
- Реутов В. П., Самосуева Н. В. и Сорокина Е. Г. Модель глутаматной нейротоксичности и механизмы развития типового патологического процесса. *Биофизика*, **64** (2), 316–336 (2019). DOI: 10.1134/S000630291902011X
- Zeng J., Bao T., Yang K., Zhu X., Wang S., Xiang W., Ge A., Zeng L., and Ge J. The mechanism of microglia-mediated immune inflammation in ischemic stroke and the role of natural botanical components in regulating microglia. *Front. Immunol.*, **13**, 1047550 (2023). DOI: 10.3389/fimmu.2022.1047550
- Kuzenkov V. S., Krushinskii A. L., and Reutov V. P. Effect of cation type and concentration of nitrates on neurological disorders during experimental cerebral ischemia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **155** (6), 748–751 (2013).
- Kuropteva Z. V., Reutov V. P., Baider L. M., and Krushinsky A. L. Complexes of nitric oxide with hemoglobin and paramagnetic metalloenzymes in the brain and blood of mammals after intermittent hypoxia. *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S. S. Korsakova*, **116** (8, Pt. 2), 9–16 (2016). DOI: 10.17116/jnevro2016116829-16
- Блинов Д. В. Объективные методы определения тяжести и прогноза перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС. *Акушерство, гинекология и репродукция*, **5** (2), 5–12 (2011).
- Виленский Б. С. *Инсульт: профилактика, диагностика и лечение* (Фолиант, СПб., 2002.)
- Ворлоу Ч. П., Денис М. С., Гейн Ж. Ван, Ханкий Г. Ж., Сандеркок П. А., Бамфорд Ж. М. и Вордлау Ж. *Инсульт. Практическое руководство для ведения больных* (Политехника, СПб., 1998).
- Мокрушин А. А. и Павлинова Л. И. *Геморрагический инсульт. Механизмы повреждения нейронов и возможность восстановления их активности* (LAMBERT Acad. Publ., 2011).
- Мысин И. Е., Попова И. Ю. и Осипов А. А. Математическая модель нарушения энергетического метаболизма в мозге при развитии нейродегенеративных заболеваний: новый предполагаемый механизм гибели клеток. *Математическая биология и биоинформатика*, **13** (2), 591–608 (2018). DOI: <https://doi.org/10.17537/2018.13.591>
- Намазова-Баранова Л. С. *Нейробиологические основы возникновения и восстановительного лечения перинатального поражения центральной нервной системы у детей* («ПедиатрЪ», М., 2016).
- Hoffman H., Jalal M. S., and Chin L. S. Prediction of mortality after evacuation of supratentorial intracerebral hemorrhage using NSQIP data. *J. Clin. Neurosci.*, **77**, 148–156 (2020). DOI: 10.1016/j.jocn.2020.04.118
- Sihvonen A. J., Leo V., Ripollés P., Lehtovaara T., Ylönen A., Rajanaro P., Laitinen S., Forsblom A., Saunavaara J., Autti T., Laine M., Rodríguez-Fornells A., Tervaniemi M., Soinila S., and Särkämö T. Vocal music enhances memory and language recovery after stroke: pooled results from two RCTs. *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **7** (11), 2272–2287 (2020). DOI: 10.1002/acn3.51217
- Sihvonen A. J., Pitkäniemi A., Leo V., Soinila S., and Särkämö T. Resting-state language network neuroplasticity in post-stroke music listening: A randomized controlled trial. *Eur. J. Neurosci.*, **54** (11), 7886–7898 (2021). DOI: 10.1111/ejn.15524
- Surin A. M., Gorbacheva L. R., Savinkova I. G., Shapirov R. R., Khodorov B. I., and Pinelis V. G. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. *Biochemistry (Moscow)*, **79** (2), 146–157 (2014). DOI: 10.1134/S0006297914020084
- Maluly H. D. B., Ariseto-Bragotto A. P., and Reyes F. G. R. Monosodium glutamate as a tool to reduce sodium in foodstuffs: Technological and safety aspects. *Food Sci. Nutr.*, **5** (6), 1039–1048 (2017). DOI: 10.1002/fsn3.499.
- Brosnan J. T. and Brosnan M. E. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*, **45** (3), 413–418 (2013). DOI: 10.1007/s00726-012-1280-4
- Reiner A. and Levitz J. Glutamatergic signaling in the central nervous system: ionotropic and metabotropic receptors in concert. *Neuron*, **98** (6), 1080–1098 (2018). DOI: 10.1016/j.neuron.2018.05.018
- Curtis D. R. and Watkins J. C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J. Neurochem.*, **6** (2), 117–141 (1960). DOI: 10.1111/j.1471-4159.1960.tb13458.x
- Takagaki G. The dawn of excitatory amino acid research in Japan. The pioneering work by professor Takashi Hayashi. *Neurochem. Int.*, **29** (3), 225–229 (1996). DOI: 10.1016/0197-0186(95)00112-3
- Olney J. W. and Sharpe L. G. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science*, **166** (3903), 386–388 (1969). DOI: 10.1126/science.166.3903.386

23. Olney J. W., Sharpe L. G., and Feigin R. D. Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **31** (3), 464–488 (1972). DOI: 10.1097/00005072-197207000-00006
24. Mosharova I. V., Sapetskii A. O., and Kositsin N. S. The general physiological mechanisms of glutamate influence on the central nervous system. *Usp. Fiziol. Nauk*, **35** (1), 20–42 (2004). PMID: 15027171
25. Zhou Y. and Danbolt N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, **121** (8), 799–817 (2014). DOI: 10.1007/s00702-014-1180-8
26. Larionova N. P., Reutov V. P., Samosudova N. V., and Chailakhyan L. M. Comparative analysis of plasticity of neuro-neuronal and neuroglial encapsulating interactions of molecular layer of isolated frog cerebellum exposed to excess L-glutamate and NO-generating compound. *Dokl. Biol. Sci.*, **393** (5), 515–519 (2003). DOI: 10.1023/b:dobs.0000010311.04616.8d
27. Larionova N. P., Reutov V. P., Samosudova N. V., and Chailakhyan L. M. Two types of reactions of glial cells to the stimulation of parallel fibers in the presence of an NO-generating compound as a morphological expression of the physiological activity of two types of astrocytes in the frog cerebellum. *Dokl. Biol. Sci.*, **401**, 95–99 (2005). DOI: 10.1007/s10630-005-0054-5
28. Ларионова Н. П., Реутов В. П., Самосудова Н. В. и Чайлахян Л. М. Glu- и NO-комплементарность межклеточного взаимодействия в главных синапсах изолированного мозжечка лягушки. *Морфология*, **129** (2), 53–54 (2006). DOI: 10.1007/s10630-005-0054-5
29. Larionova N. P., Reutov V. P., Samosudova N. V., and Chailakhyan L. M. Neuroglial chemical synapses in the cerebellum of adult frog. *Dokl. Biol. Sci.*, **432**, 171–175 (2010). DOI: 10.1134/S0012496610030026
30. Ларионова Н. П., Самосудова Н. В., Реутов В. П. и Чайлахян Л. М. Сравнительное исследование изменения количественных характеристик структуры молекулярного слоя мозжечка лягушки *Rana temporaria* под влиянием L-глутамата и NO-генерирующего соединения. *Докл. РАН*, **369** (6), 836–839 (1999).
31. Ларионова Н. П., Самосудова Н. В., Реутов В. П. и Чайлахян Л. М. Сравнительное исследование изменений структуры нейрон-нейронного взаимодействия в молекулярном слое мозжечка под влиянием L-глутамата и NO-генерирующего соединения. *Докл. РАН*, **376** (5), 701–706 (2001).
32. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **86** (2), 279–351 (2004). DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002
33. Khodorov B., Pinelis V., Storozhevykh T., Yuravichus A., Khaspekhov L. Blockade of mitochondrial Ca^{2+} uptake by mitochondrial inhibitors amplifies the glutamate-induced calcium response in cultured cerebellar granule cells. *FEBS Lett.*, **458** (2), 162–166 (1999). DOI: 10.1016/s0014-5793(99)01130-8
34. Khodorov B., Pinelis V., Storozhevykh T., Vergun O., and Vinskaya N. Dominant role of mitochondria in protection against a delayed neuronal Ca^{2+} overload induced by endogenous excitatory amino acids following a glutamate pulse. *FEBS Lett.*, **393** (1), 135–138 (1996). DOI: 10.1016/0014-5793(96)00873-3
35. Сурин А. М., Горбачева Л. Р., Савинкова И. Г., Шарипов Р. Р. и Пинелис В. Г. Изменения pH в матриксе митохондрий и цитозоле при индуцированной глутаматом дисрегуляции Ca^{2+} -гомеостаза в культивируемых нейронах гиппокампа крысы. *Биол. мембраны*, **39** (4), 307–318 (2022). DOI: 10.31857/S0233475522040089, EDN: FHFVZG
36. Arundine M. and Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, **34** (4–5), 325–337 (2003). DOI: 10.1016/s0143-4160(03)00141-6
37. Efremov Y. M., Grebenik E. A., Sharipov R. R., Krasilnikova I. A., Kotova S. L., Akovantseva A. A., Bakaeva Z. V., Pinelis V. G., Surin A. M., and Timashev P. S. Viscoelasticity and volume of cortical neurons under glutamate excitotoxicity and osmotic challenges. *Biophys J.*, **119** (9), 1712–1723 (2020). DOI: 10.1016/j.bpj.2020.09.022
38. Iovino L., Tremblay M. E., and Civiero L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: the role of glial cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **144** (3), 151–164 (2020). DOI: 10.1016/j.jphs.2020.07.011
39. Pramila B., Kalaivani P., Anita A., and Saravana Babu C. L-NAME combats excitotoxicity and recovers neurological deficits in MCAO/R rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **135**, 246–253 (2015). DOI: 10.1016/j.pbb.2015.06.006
40. Рязанцева А. А., Алифирова В. М., Иванова С. А., Бойко А. С. и Кротенко Н. М. Глутаматная эксайтотоксичность при рассеянном склерозе. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*, **7** (2), 16–19 (2013).
41. Salykina M. A., Sorokina E. G., Krasilnikova I. A., Reutov V. P., and Pinelis V. G. Effects of selective inhibitors of neuronal and inducible NO-synthase on ATP content and survival of cultured rat cerebellar neurons during hyperstimulation of glutamate receptors. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **155** (1), 40–43 (2013). DOI: 10.1007/s10517-013-2075-7
42. Samosudova N. V. and Reutov V. P. Ultrastructural changes in the frog brain in the presence of high concentrations of glutamate and an NO-generating compound. *Biophysics*, **63** (3), 402–415 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918030211
43. Самосудова Н. В., Ларионова Н. П., Реутов В. П. и Чайлахян Л. М., Изменение молекулярного слоя мозжечка лягушки *Rana temporaria* под влиянием NO-генерирующего соединения. *Докл. РАН*, **361** (5), 704–708 (1998).
44. Самосудова Н. В. и Реутов В. П. Аутотипические септальные контакты глиальных клеток мозжечка как компенсаторно-приспособительная реакция в

- условиях токсического воздействия глутамата и NO-генерирующего соединения. *Биол. мембраны*, **30** (1), 14–20 (2013).
45. Самосудова Н. В. и Реутов В. П. Пластические перестройки ультраструктуры мозжечка при токсическом воздействии глутамата и NO-генерирующего соединения. *Морфология*, **148** (5), 32–37 (2015).
 46. Samosudova N. V., Reutov V. P., Krushinsky A. L., Kuzenkov V. S., and Sorokina E. G. Effect of locomotor activity on ultrastructure of cerebellar neurons, neurological disturbances, and survival of Krushinsky-Molodkina rats with hemorrhagic stroke. *Exp. Biol. Med.*, **153** (6), 831–835 (2012). DOI: 10.1007/s10517-012-1837-y
 47. Samosudova N. V., Reutov V. P., and Larionova N. P. Nitric oxide as a contrast modulator of basic elements of the cytoskeleton. *Tsitologiya*, **42** (1), 72–78 (2000). PMID: 10709256
 48. Самосудова Н. В., Реутов В. П. и Ларионова Н. П. Нейрон-нейронные взаимодействия в условиях повреждения нейронной сети мозжечка под влиянием глутамата и оксида азота. *Изв. ТГПУ*, № 4, 369–370 (2001).
 49. Самосудова Н. В., Реутов В. П. и Ларионова Н. П. Нейро-глиальные контакты в молекулярном слое мозжечка при стимуляции параллельных волокон в присутствии оксида азота (модель инсульта). *Морфология*, **129** (2), 84–88 (2006).
 50. Самосудова Н. В., Реутов В. П., Ларионова Н. П. и Чайлахян Л. М. Нейро-глиальные контакты, образующиеся в мозжечке при электрической стимуляции в присутствии NO-генерирующего соединения. *Морфология*, **131** (2), 53–58 (2007).
 51. Samosudova N. V., Reutov V. P., Larionova N. P., and Chailakhyan L. M. Neuron-glia contacts formed in the cerebellum during electrical stimulation in the presence of an NO-generating compound. *Neurosci. Behav. Physiol.*, **38** (4), 363–368 (2008). DOI: 10.1007/s11055-008-0051-x
 52. Самосудова Н. В., Реутов В. П. и Ларионова Н. П. Роль гликогена отростков глиальных клеток в условиях его повреждения нитритом натрия. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **150** (8), 212–215 (2010).
 53. Самосудова Н. В., Реутов В. П. и Ларионова Н. П. Слияние клеток-зерен мозжечка лягушки при токсическом воздействии глутамата и NO-генерирующего соединения. *Морфология*, **140** (4), 13–17 (2011).
 54. Самосудова Н. В., Ларионова Н. П. и Чайлахян Л. М. Изучение действия глутамата на структуру молекулярного слоя лягушки *in vitro*. *Докл. РАН*, **343** (5), 699–702 (1995).
 55. Сорокина Е. Г., Карасева О. В., Иванова Т. Ф., Семенова Ж. Б., Реутов В. П., Пинелис В. Г. и Рошаль Л. М. Содержание эритропоэтина в крови детей, перенесших черепно-мозговую травму. *Рос. нейрохирургич. журн. им. про. А.Л. Поленова*, **6** (4), 378–380 (2014).
 56. Сорокина Е. Г., Пинелис В. Г., Базарная Н. А., Семенова Ж. Б., Реутов В. П., Карасева О. В. и Рошаль Л. М. Нейроиммунологические аспекты острого и отдаленного периода черепно-мозговой травмы. *Нейроиммунология*, **3** (2), 152–153 (2005).
 57. Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Винская Н. П. и Пинелис В. Г. Частичное ингибирование цитохромоксидазы митохондрий в нейронах мозжечка защищает их от повреждений при действии токсических доз глутамата и нитрита. *Вести нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед.-биол. наук*, № 2, 59–63 (2003).
 58. Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Гранстрем О. К. и Пинелис В. Г. Возможная роль оксида азота в повреждении глутаматных рецепторов при эпилепсии. *Изв. нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед.-биол. наук*, № 1, 18–22 (2002).
 59. Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Гранстрем О. К. и Пинелис В. Г. Изучение механизмов образования аутоантител при эпилепсии и гипоксии. *Нейроиммунология*, **1** (2), 137–138 (2003).
 60. Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Пинелис В. Г. и Коршунова Т. С. Взаимосвязь между содержанием окиси азота, циклического гуанозинмонофосфата и эндотелина в крови при нитритной гипоксии. *Успехи физиол. наук*, **25** (4), 70–71 (1994).
 61. Сорокина Е. Г., Реутов В. П. и Пинелис В. Г. Роль оксида азота в образовании аутоантител к рецепторам глутамата. *Нейроиммунология*, **1** (1), 267–269 (2002).
 62. Сорокина Е. Г., Реутов В. П. и Пинелис В. Г. Механизм потенцирующего действия альбумина при токсическом воздействии глутамата: возможная роль окиси азота. *Биол. мембраны*, **16** (3), 318–323 (1999).
 63. Сорокина Е. Г., Реутов В. П. и Сенилова Я. Е. Изменение содержания АТФ в зернистых клетках мозжечка при гиперстимуляции глутаматных рецепторов: возможное участие NO и нитритных ионов. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, № 4, 419–422 (2007).
 64. Сорокина Е. Г., Семенова Ж. Б. и Гранстрем О. К. Белок S100B и аутоантитела к нему в диагностике повреждений мозга при черепно-мозговой травме у детей. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **110** (8), 25–30 (2010).
 65. Sorokina E. G., Semenova Z. B., Averianova N. S., Karaseva O. V., Arsenieva E. N., Luk'yanov V. I., Reutov V. P., Asanov A. Y., Roshal L. M., and Pinelis V. G. APOE gene polymorphism and markers of brain damage in the outcomes of severe traumatic brain injury in children. *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S. S. Korsakova*, **120** (4), 72–80 (2020). DOI: 10.17116/jnevro202012004172
 66. Сорокина Е. Г., Черненко М. А., Красильникова И. А., Реутов В. П., Пинелис В. Г. и Сурин А. М. Влияние ингибирования поли (ADP-рибозо) полимеразы-1 на уровень внутриклеточного кальция, АТФ и выживаемость культивируемых нейронов мозжечка крысы при гиперстимуляции глутаматных рецепторов. *Патогенез*, **16** (4), 168–173 (2018).

67. Surin A. M., Gorbacheva L. R., Savinkova I. G., Sharipov R. R., Khodorov B. I., and Pinelis V. G. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. *Biochemistry (Moscow)*, **79** (2), 146–157 (2014). DOI: 10.1134/S0006297914020084
68. Сурин А. М. В кн.: «*Нейробиологические основы возникновения и восстановительного лечения перинатального поражения центральной нервной системы у детей*». Под ред. Л. С. Намазовой-Барановой («Педиатр», М., 2016), сс. 9–76.
69. Weidinger A., Milivojev N., Hosmann A., Duvigneau J. C., Szabo C., Törö G., Rauter L., Vaglio-Garro A., Mkrtchyan G. V., Trofimova L., Sharipov R. R., Surin A. M., Krasilnikova I. A., Pinelis V. G., Tretter L., Moldzio R., Bayır H., Kagan V. E., Bunik V. I., and Kozlov A. V. Oxoglutarate dehydrogenase complex controls glutamate-mediated neuronal death. *Redox Biol.*, **62**, 102669 (2023). DOI: 10.1016/j.redox.2023.102669
70. Сурин А. М., Красильникова И. А., Пинелис В. Г. и Ходоров Б. И. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca^{2+} -дизрегуляции и последующей гибелью нейронов. *Патогенез*, **12** (4), 40–46 (2014).
71. Dong X. X., Wang Y., and Qin Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.*, **30** (4), 379–387 (2009). DOI: 10.1038/aps.2009.24
72. Косицын Н. С. *Микроструктура дендритов и аксо-дендритических связей в центральной нервной системе*. (Наука, М., 1976).
73. Зефирова А. Л. и Петров А. М. *Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора (экзо-эндоцитозный везикулярный цикл)* (Казань, 2010).
74. Косицын Н. С., Реутов В. П., Свинов М. М., Ионкина Е. Г. и Сорокина Е. Г. Механизм морфо-функциональных изменений клеток тканей млекопитающих при гипоксии. *Молекуляр. биология*, **32** (2), 369–371 (1998).
75. Кошелев В. Б., Крушинский А. Л., Кузенков В. С., Сорокина Е. Г. и Реутов В. П. Снижение под влиянием ингибитора NO-синтазы защитного эффекта от барокамерной адаптации к гипоксии у крыс линии К–М. *Новости мед.-биол. наук*, № 1, 41–43 (2004).
76. Крушинский А. Л., Кузенков В. С., Дьяконова В. Е. и Реутов В. П. Ингибиторы нейрональной и индуцибельной NO-синтазы усиливают протекторный эффект кратковременной адаптации к гипоксии у крыс линии Крушинского–Молодкиной. *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 1, 77–85 (2015).
77. Крушинский А. Л., Кузенков В. С., Кошелев В. Б. и Реутов В. П. Ингибиторы нейрональной и индуцибельной NO-синтазы усиливают протекторный эффект кратковременной адаптации к гипоксии у крыс линии КМ в условиях акустической экспозиции. *Патогенез*, № 3, 68–69 (2008).
78. Крушинский А. Л., Реутов В. П., Кузенков В. С., Сорокина Е. Г., Кошелев В. Б., Фадюкова О. Е., Байдер Л. М., Куроптева З. В., Жумабаева Т. Т., Комисарова Л. Х., Рясина Т. М., Косицын Н. С., Пинелис В. Г. Оксид азота участвует в защитном эффекте от акустического стресса при кратковременной адаптации крыс линии Крушинского–Молодкиной к гипоксии. *Изв. РАН. сер. биол.*, № 3, 329–335 (2007).
79. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Самосудова Н. В. и Захарчук Н. В. Гемодинамика мозга: глутаматергическая система и цикл оксида азота в регуляции мозгового кровообращения. Новая концепция. *Тихоокеанский мед. журн.*, № 3, 38–46 (2017). DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.3.00-00
80. Иванов К. П. Жизнь при минимальных расходах энергии. *Успехи физиол. наук.*, **39** (1), 42–54 (2008).
81. Сорокина Е. Г., Реутов В. П., Карасева О. В., Семенова Ж. Б., Пинелис В. Г. и Смирнов И. Е. Влияние NO-генерирующих соединений на содержание аденозинтрифосфата в лимфоцитах и связи с уровнями аутоантител к рецепторам глутамата у детей, перенесших черепно-мозговую травму. *Рос. педиатрич. журн.*, **27** (3), 161–167 (2024). DOI: 10.46563/1560-9561-2024-27-3-161-167
82. Экклз Д. К. *Физиология синапсов* (Мир, М., 1966).
83. Аверочкин А. И., Аверьянов Ю. Н., Алексеев В. В., Артемьев Д. В., Белова А. Н., Вейн А. М., Голубев В. Л., Гусев Е. И., Дамулин И. В., Дюкова Г. М., Захаров В. В., Зенков Л. Р., Иванова-Смоленская И. А., Иллариошкин С. Н., Карахан В. Б., Кардашев Б. А., Карлов В. В., Корниенко В. А., Коршунов А. Г., Крылов В. В., Лебедев В. В., Левин Я. И., Мельничук П. В., Мальберг С. А., Мозолевский Ю. В., Парфенов В. А., Пирадов М. А., Попелянский Я. Ю., Пронин С. Н., Скоромец А. А., Смулевич А. Б., Шмидт Т. Е., Штульман Д. Р. и Яхно Н. Н. *Болезни нервной системы: руководство для врачей*. В 2-х т. Под ред. Н. Н. Яхно (Медицина, М., 2022), т. 2
84. Bowie D. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **7**, 129 (2008). DOI: 10.2174/187152708784083821
85. Ratcliffe P. J., O'Rourke J. F., Maxwell P. H., and Pugh C. W. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.*, **201** (Pt 8), 1153–1162 (1998). DOI: 10.1242/jeb.201.8.1153.
86. Хама-Мурад А. Х., Павлинова Л. И. и Мокрушин А. А. Геморрагический инсульт: молекулярные механизмы патогенеза и перспективные терапевтические мишени. *Успехи физиол. наук*, **39** (3), 45–65 (2008).
87. Самосудова Н. В., Ларионова Н. П. и Чайлахян Л. М. Патологическое слияние зернистых клеток мозжечка лягушки под влиянием L- глутамата *in vitro*. *Докл. РАН*, **336** (3), 406–409 (1994).
88. Larionova N. P., Samosudova N. V., and Reutov V. P. Comparative investigations of nitric oxide and L-gluta-

- mate influence on cerebellum cellular communication. *Eur. J. Neurosci.*, **12** (Suppl. 11), 13–14 (2000).
89. Ларионова Н. П., Самосудова Н. В. и Чайлахян Л. М. Влияние L- глутамата на структуру зернистых клеток мозжечка лягушки. *Докл. РАН*, **333** (2), 127–130 (1993).
 90. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е. и Косицын Н. С. *Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих* (Наука, М., 1998).
 91. *Biology of the NMDA Receptor*. Ed. by A. M. Van Dongen (CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2009).
 92. Cheng F., Du L., Kim J. J., Zhu F., He H., and Dai N. NMDA and AMPA receptor physiology and role in visceral hypersensitivity: a review. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **34** (5), 471–477 (2022).
 93. Aoki C. and Sherpa A. D. Making of asynapse: recurrent roles of drebrin a at excitatory synapses throughout life. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1006**, 119–139 (2017). DOI: 10.1007/978-4-431-56550-5
 94. Lau A. and Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.*, **460** (2), 525–542 (2010). DOI: 10.1007/s00424-010-0809-1
 95. Nakagawa T. The biochemistry, ultrastructure, and subunit assembly mechanism of AMPA receptors. *Mol. Neurobiol.*, **42** (3), 161–184 (2010). DOI: 10.1007/s12035-010-8149-x
 96. Тихонов Д. Б. Каналоблокаторы ионотропных рецепторов глутамата. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **107** (4–5), 403–416 (2021).
 97. Khodorov V. I. Mechanisms of destabilization of Ca^{2+} -homeostasis of brain neurons caused by toxic glutamate challenge. *Membr. Cell Biol.*, **14** (2), 149–162 (2000).
 98. Фонсова Н. А., Дубынин В. А. и Сергеев И. Ю. *Анатомия центральной нервной системы* (Изд-во «Юрайт», М., 2022).
 99. French E. D., Mura A., and Wang T. MK-801, phencyclidine (PCP), and PCP-like drugs increase burst firing in rat A10 dopamine neurons: comparison to competitive NMDA antagonists. *Synapse*, **13** (2), 108–116 (1993). DOI: 10.1002/syn.890130203
 100. Hatt H. Modification of glutamate receptor channels: molecular mechanisms and functional consequences. *Naturwissenschaften*, **86** (4), 177–186 (1999). DOI: 10.1007/s001140050593
 101. Selig D. K., Hjelmstad G. O., Herron C., Nicoll R. A., and Malenka R. C. Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses. *Neuron*, **15** (2) 417–426 (1995). DOI: 10.1016/0896-6273(95)90045-4
 102. Siesjo B. K. *Brain energy metabolism* (Wiley & Sons, N.Y., 1978).
 103. Кузенков В. С., Крушинский А. Л. и Реутов В. П. Влияние нитрата натрия на развитие неврологического дефицита у крыс при неполной глобальной ишемии мозга. *Вестн. МГУ. Биология*, **16** (1), 3–6 (2011). DOI: 10.1234/XXXX-XXXX-2011-1-3-B
 104. Кузенков В.С., Крушинский А.Л., Реутов В.П. Нитрат натрия снижает развитие стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского-Молодкиной. *Вестн. МГУ. Биология*, **16** (4), 36–41 (2012). DOI: 10.1234/XXXX-XXXX-2012-1-3-B
 105. Кузенков В. С., Реутов В. П., Крушинский А. Л., Кошелев В. Б., Сорокина Е. Г., Байдер Л. М., Куроптева З. В. и Комиссарова Л. Х. Оксид азота вносит положительный вклад в протективное действие кратковременной адаптации к гипоксии на развитие стрессовых повреждений у крыс линии Крушинского-Молодкиной. *Вестник МГУ. Биология*, **16** (1), 3–7, (2010). DOI: 10.1234/XXXX-XXXX-2010-1-3-B
 106. Ivanov K. P. Brain hypoxia and the role of active forms of oxygen and of energy deficit in the neuron degeneration. *Usp. Fiziol. Nauk*, **43** (1), 95–110 (2012). PMID: 22567831
 107. Gusakova S. V., Kovalev I. V., Smaglyi L. V., Birulina Y. G., Nosarevi A. V., Petrova I. V., Medvedev M. A., Orlov S. N., and Reutov V. P. Gas signalling in mammalian cells. *Usp. Fiziol. Nauk*, **46** (4), 53–73 (2015). PMID: 27183784
 108. Gusakova S. V., Smaglyi L. V., Birulina Y. G., Kovalev I. V., Nosarevi A. V., Petrova I. V., and Reutov V. P. Molecular mechanisms of action of gas transmitters NO, CO and H₂S in smooth muscle cells and effect of NO-generating compounds (nitrates and nitrites) on average life expectancy. *Usp. Fiziol. Nauk*, **48** (1), 24–52 (2017). PMID: 29283238
 109. Сукманский О. И. и Реутов В. П. Газотрансмиттеры: физиологическая роль и участие в патогенезе заболеваний. *Успехи физиол. наук*, **47** (3), 30 – 58 (2016).
 110. Dahlmanns M., Dahlmanns J. K., Savaskan N., Steiner H. H., and Yakubov E. Glial glutamate transporter-mediated plasticity: system $x_c^-/xCT/SLC7A11$ and EAAT1/2 in brain diseases. *Front. Biosci.*, **28** (3), 57–69 (2023). DOI: 10.31083/j.fbl2803057.
 111. French E. D., Mura A., and Wang T. MK-801, phencyclidine (PCP), and PCP-like drugs increase burst firing in rat A10 dopamine neurons: comparison to competitive NMDA antagonists. *Synapse*, **13** (2), 108–116 (1993). DOI: 10.1002/syn.890130203. PMID: 8446919
 112. Копысова И. Л., Корогод С. М., Дуранд Ж., и Тус-Думонт С. Local mechanisms of phase-dependent postsynaptic modifications of NMDA-induced oscillations in the abducens motoneurons: a simulation study. *J. Neurophysiol.*, **76** (2), 1015–1024 (1996). DOI: 10.1152/jn.1996.76.2.1015
 113. Дудылина А. Л., Иванова М. В., Калатанова А. В., Калеников Е. И., Макаров В. Г., Макарова М. Н., Шумаев К. Б. и Рууге Э. К. Генерация супероксидных радикалов митохондриями сердца и антиоксидантное действие водорастворимой формы убихинола-10. *Биофизика*, **64** (2), 282–289 (2019).
 114. Мотавкин П. А. и Черток В. М. *Гистофизиология сосудистых механизмов мозгового кровообращения* (Медицина, М., 1980).

115. Павлинова Л. И. и Мокрушин А. А. Регуляция активности мембранных рецепторов как механизм повышения устойчивости мозга для защиты от геморрагического инсульта. *Мол. медицина*, **4**, 18–24 (2012).
116. Мокрушин А. А. Улучшение кислотно-щелочного состава среды для длительного и обратимого криосохранения срезов мозга крыс. *Цитология*, **64** (1), 96–102 (2022).
117. Гайнуллина Д. К., Кирюхина О. О., Тарасова О. С. и Виноградова О. Л. Оксид азота в эндотелии сосудов: регуляция продукции и механизмы действия. *Успехи физиол. наук*, **44** (4), 88–102 (2013).
118. Afshari A. R., Fanoudi S., Rajabian A., Sadeghnia H. R., Mollazadeh H., and Hosseini A. Potential protective roles of phytochemicals on glutamate-induced neurotoxicity: a review. *Iran J. Basic. Med. Sci.*, **23** (9), 1113–1123 (2020). DOI: 10.22038/ijbms.2020.43687.10259
119. Qin S., Tang H., Li W., Gong Y., Li S., Huang J., Fang Y., Yuan W., Liu Y., Wang S., Guo Y., Guo Y., and Xu Z. AMPK and its activator berberine in the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.*, **26** (39), 5054–5066 (2020). DOI: 10.2174/1381612826666200523172334
120. Song J. H., Kang K. S., and Choi Y. K. Protective effect of casuarinin against glutamate-induced apoptosis in HT22 cells through inhibition of oxidative stress-mediated MAPK phosphorylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27** (23), 5109–5113 (2017). DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.10.075
121. Song J. H., Shin M. S., Hwang G. S., Oh S. T., Hwang J. J., and Kang K. S. Chebulinic acid attenuates glutamate-induced HT22 cell death by inhibiting oxidative stress, calcium influx and MAPKs phosphorylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **28** (3), 249–253 (2018). DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.12.062
122. Song J. H., Kim S. Y., Hwang G. S., Kim Y. S., Kim H. Y., and Kang K. S. Sanguin H-11 from *Sanguisorbae radix* protects HT22 murine hippocampal cells against glutamate-induced death. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **29** (2), 252–256 (2019). DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.11.042
123. Phoraksa O., Chimkerd C., Thiyajai P., Judprasong K., Tuntipopipat S., Tencomnao T., Charoenkiatkul S., Muangnoi C., and Sukprasansap M. Neuroprotective effects of *Albizia lebbek* (L.) Benth. leaf extract against glutamate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human microglial cells. *Pharmaceuticals (Basel)*, **16** (7), 989–998 (2023). DOI: 10.3390/ph16070989
124. Arboix A., Oliveres M., Massons J., Pujades R., and Garcia-Eroles L. Early differentiation of cardioembolic from atherothrombotic cerebral infarction: a multivariate analysis. *Eur. J. Neurol.*, **6** (6), 677–683 (1999). DOI: 10.1046/j.1468-1331.1999.660677.x
125. Sanossian N., Ohanian A. G., Saver J. L., Kim L. I., and Ovbiagele B. Frequency and determinants of nonpublication of research in the stroke literature. *Stroke*, **37** (10), 2588–2592 (2006). DOI: 10.1161/01.STR.0000240509.05587.a2
126. Rosamond W., Flegal K., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Hailpern S.M., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lloyd-Jones D., McDermott M., Meigs J., Moy C., Nichol G., O'Donnell C., Roger V., Sorlie P., Steinberger J., Thom T., Wilson M., and Hong Y. Heart disease and stroke statistics – 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, **117** (4), e25–146 (2008). DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187998
127. Saver J. L. and Wasiak H. Stroke Council and American Stroke Association update. *Stroke*, **42** (3), 830–1001 (2011). DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.611335
128. Derdeyn C. P., Broderick J. P., and Furie K. Organizational Update: American Stroke Association Stroke Council Update. *Stroke*, **47** (1), e16–e17 (2016). DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.011517
129. Dichgans M., Sandset E.C., Kelly P. Organizational update from the European Stroke Organisation. *Stroke*, **52** (8), e517–e519 (2021). DOI: 10.1161/STROKEAHA.121.035358 PMID: 34310179
130. Fewel M. E., Thompson B. G. Jr., and Hoff J. T. Spontaneous intracerebral hemorrhage: a review. *Neurosurg. Focus*, **15** (4), E1 (2003). PMID: 15344894
131. Rudilosso S., Rodríguez-Vázquez A., Urrea X., and Arboix A. The potential impact of neuroimaging and translational research on the clinical management of lacunar stroke. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (3), 1497–1506 (2022). DOI: 10.3390/ijms23031497S
132. Reutov V. P. and Sorokina E. G. Hemorrhagic stroke: why can a low-intensity stroke lead to extensive cerebral hemorrhage. *J. Surg.*, **3** (1), 1083 (2023).
133. Reutov V. P. and Sorokina E. G. General trends in the prevention and treatment of cerebrovascular disease in the XXI century. *Open J. Clin. Med. Case Reports*, **9** (17), 2043 (2023).
134. Сарибекян А. С. Хирургическое лечение геморрагического инсульта методом пункционной аспирации и локального фибринолиза (М., 2009).
135. Gállego J., Herrera M., Jericó I., Muñoz R., Aymerich N., and Martínez-Vila E. Stroke in the XXI century. Emergency care. *An Sist. Sanit. Navar.*, **31** (Suppl. 1), 15–29 (2008). PMID: 18528441
136. Weiss Y. G., Mor-Yosef S., Sprung C. L., Weissman C., and Weiss Y. Caring for a major government official: challenges and lessons learned. *Crit. Care Med.*, **35** (7), 1769–1772 (2007). DOI: 10.1097/01.CCM.0000269937.91957.44
137. Sharma B., Koren D. T., and Ghosh S. Nitric oxide modulates NMDA receptor through a negative feedback mechanism and regulates the dynamical behavior of neuronal postsynaptic components. *Biophys. Chem.*, **303**, 107114 (2023). DOI: 10.1016/j.bpc.2023.107114
138. Gainutdinov K. L., Andrianov V. V., Yafarova G. G., Bazan L. V., Bogodvid T. K., Pashkevich S. G., and Kulchitsky V. A. Changes in nitric oxide and copper con-

- tent in rat liver and hippocampus after brain ischemia modeling. *Technical Physics*, **65** (9), 1421–1426 (2020). DOI:10.1134/s1063784220090182
139. Калининченко С. Г. и Мотавкин П. А. *Кора мозжечка* (Наука, М., 2005).
 140. Саульская Н. Б., Бурмакина М. А. и Трофимова Н. А. Оксид азота тормозит функциональную активацию серотониновой системы медиальной префронтальной коры при формировании страха и уменьшает его генерализацию. *Нейрохимия*, **38** (3), 249 (2021).
 141. Воейков В. Л., Колдунов В. В. и Кононов Д. С. Длительные колебания хемилюминесценции в ходе аминокарбонильной реакции в водных растворах. *Журн. физ. химии*, **75** (9), 1579–1585. (2001).
 142. Воейков В. Л. Активные формы кислорода – патогенны или целители? *Клинич. геронтология*, **9** (3), 27–40 (2003).
 143. Philippu A. Nitric oxide: a universal modulator of brain function. *Curr. Med. Chem.*, **23** (24), 2643–2652 (2016). DOI: 10.2174/0929867323666160627120408
 144. Dubler N. N. and Kalkut G. E. Caring for VIPs in the hospital: the ethical thicket. *Isr. Med. Assoc. J.*, **8** (11), 746–750 (2006). PMID: 17180823
 145. Naparstek Y. Ariel Sharon's illness: should we dedicate a medical journal issue to a single case study? *Isr. Med. Assoc. J.*, **8** (11), 739 (2006). PMID: 17180820
 146. Реутов В. П., Ажипа Я. И. и Каюшин Л. П. Кислород как ингибитор нитритредуктазной активности гемоглобина. *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, № 3, 408–418 (1983).
 147. Cosby K., Partovi K. S., Crawford J. H., Patel R. P., Reiter C. D., Martyr S., Yang B. K., Waclawiw M. A., Zalos G., Xu X., Huang K. T., Shields H., Kim-Shapiro D. B., Schechter A. N., Cannon R. O. 3rd, and Gladwin M. T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat. Med.*, **9** (12), 1498–1505 (2003). DOI: 10.1038/nm954
 148. Lundberg J. O., Gladwin M. T., Ahluwalia A., Benjamin N., Bryan N. S., Butler A., Cabrales P., Fago A., Feelisch M., Ford P. C., Freeman B. A., Frenneaux M., Friedman J., Kelm M., Kevil C. G., Kim-Shapiro D. B., Kozlov A. V., Lancaster J. R. Jr., Lefer D. J., McColl K., McCurry K., Patel R. P., Petersson J., Rassaf T., Reutov V. P., Richter-Addo G. B., Schechter A., Shiva S., Tsuchiya K., van Faassen E. E., Webb A. J., Zuckerbraun B. S., Zweier J. L., and Weitzberg E. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat. Chem. Biol.*, **5** (12), 865–869 (2009). DOI: 10.1038/nchembio.260
 149. Реутов В. П. и Черток В. М. Новые представления о роли вегетативной нервной системы и систем генерации оксида азота в сосудах мозга. *Тихоокеанский мед. журн.*, № 2, 10–20 (2016).
 150. Reutov V. P., Azhipa I. A., and Kaiushin L. P. Electron paramagnetic resonance study of the products of the reaction between nitrogen oxides and several organic compounds. *Bull. Eksp. Biol. Med.*, **86** (9), 299–301 (1978). PMID: 212136
 151. Malyshev A. Y. and Balaban P. M. Synaptic facilitation in Helix neurons depends upon postsynaptic calcium and nitric oxide. *Neurosci. Lett.*, **261** (1–2), 65–68 (1999). DOI: 10.1016/s0304-3940(98)01010-6
 152. Balaban P. M., Roshchin M. V., and Korshunova T. A. Two-faced nitric oxide is necessary for both erasure and consolidation of memory. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im. I.P. Pavlova*, **61** (3), 274–280 (2011). PMID: 21861383
 153. Balaban P. M. and Korshunova T. A. Network, cellular and molecular mechanisms of plasticity in simple nervous systems. *Usp. Fiziol. Nauk*, **42** (4), 3–19 (2011). PMID: 22145308
 154. Korshunova T. A. and Balaban P. M. Nitric oxide is necessary for long-term facilitation of synaptic responses and for development of context memory in terrestrial snails. *Neuroscience*, **266**, 127–135 (2014). DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.004T
 155. Balaban P. M., Roshchin M., Timoshenko A. K., Gainutdinov K. L., Bogodvid T. K., Muranova L. N., Zuzina A. B., Korshunova T. A. Nitric oxide is necessary for labilization of a consolidated context memory during reconsolidation in terrestrial snails. *Eur J Neurosci.*, **40** (6), 2963–2970 (2014). DOI: 10.1111/ejn.12642
 156. Bal N. V., Rysakova M. P., Vinarskaya A. K., Ivanova V., Zuzina A. B., and Balaban P. M. Cued memory reconsolidation in rats requires nitric oxide. *Eur. J. Neurosci.*, **45** (5), 643–647. (2017) DOI: 10.1111/ejn.13503
 157. Maltsev A. V., Bal N. V., and Balaban P. M. LTP suppression by protein synthesis inhibitors is NO-dependent. *Neuropharmacology*, **146**, 276–288 (2019). DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.12.009A
 158. Ivanova V. O., Balaban P. M., and Bal N. V. Modulation of AMPA receptors by nitric oxide in nerve cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (3), 981 (2020). DOI: 10.3390/ijms21030981
 159. Maltsev A. V., Nikiforova A. B., Bal N. V., and Balaban P. M. Amyloid A β_{25-35} aggregates say “NO” to long-term potentiation in the hippocampus through activation of stress-induced phosphatase 1 and mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (19), 11848 (2022). DOI: 10.3390/ijms231911848
 160. Balaban P. M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in simple nervous systems. *Neurosci. Behav. Physiol.*, **38** (5), 453–459 (2008). DOI: 10.1007/s11055-008-9002-9
 161. Tishkina A., Rukhlenko A., Stepanichev M., Levshina I., Pasikova N., Onufriev M., Moiseeva Y., Piskunov A., and Gulyaeva N. Region-specific changes in activities of cell death-related proteases and nitric oxide metabolism in rat brain in a chronic unpredictable stress model. *Metab. Brain Dis.*, **27** (4), 431–441 (2012). DOI: 10.1007/s11011-012-9328-4
 162. Gulyaeva N. V., Onufriev M. V., and Stepanichev M. Yu. NO synthase and free radical generation in brain regions of old rats: correlations with individual behaviour. *Neurore-*

- port*, **6** (1), 94–96 (1994).
DOI: 10.1097/00001756-199412300-00025
163. Garthwaite G., Hampden-Smith K., Wilson G. W., Goodwin D. A., and Garthwaite J. Nitric oxide targets oligodendrocytes and promotes their morphological differentiation. *Glia*, **63** (3) 383–399 (2015).
DOI: 10.1002/glia.22759
164. Garthwaite J. From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide. *J. Physiol.*, **594** (1), 9–18 (2016). DOI: 10.1113/JP270297
165. Garthwaite J. NO as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status. *Br. J. Pharmacol.*, **176** (2), 197–211 (2019). DOI: 10.1111/bph.14532
166. Николс Дж. Г., Мартин А. Р., Валлас Б. Дж. и Фукс П. А. *От нейрона к мозгу* (Едиториал УРСС, М., 2003).
167. Сидоров А. В., Каравай Т. В. и Чумак А. Г. Вклад свободнорадикальных форм азота и кислорода в формирование активности нервных центров. *Вестник БГУ*, **2** (1), 61–66 (2009).
168. Osipov A. N., Borisenko G. G., and Vladimirov Y. A. Biological activity of hemoprotein nitrosyl complexes. *Biochemistry (Moscow)*. **72** (13), 1491–1504 (2007).
DOI: 10.1134/s0006297907130068
169. *Справочник химика*, в 7 томах. Под ред. чл.-корр. АН СССР Б. П. Никольского (Химия, М., 1962–1966).
170. Осипов А. Н., Борисенко Г. Г. и Владимиров Ю. А. Биологическая роль нитрозильных гемопротеинов. *Успехи биол. химии*, **47**, 259–292 (2007).
171. Зиматкин С. М., Бонь Е. И. и Максимович Н. Е. Роль нейроглобина при церебральной ишемии/гипоксии и другой нейропатологии. *Журн. Гродненского гос. мед. ун-та*, **16** (6), 639–648 (2018).
DOI: 10.25298/2221-8785-2018-16-6-643-647
172. Huie R. E. and Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.*, **18** (4), 195–199 (1993). DOI: 10.3109/10715769309145868
173. Зиятдинова Г. К., Захарова С. П. и Будников Г. К. Реакции фенольных антиоксидантов с электрогенерированным супероксид анион-радикалом и их аналитическое применение. *Ученые записки Казанского ун-та*, **157** (2), 129–142 (2015).
174. Крушинский А. Л., Кузенков В. С., Дьяконова В. Е. и Реутов В. П. Влияние ингибиторов индуцибельной и нейрональной NO-синтазы на развитие аудиогенных стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского–Молодкиной. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **150** (7), 38–41 (2010).
175. Крушинский А. Л., Кузенков В. С., Дьяконова В. Е. и Реутов В. П. Влияние ингибиторов индуцибельной и нейрональной NO-синтазы на развитие геморрагического инсульта в эксперименте. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **114** (8-2), 21–27 (2014).
176. Крушинский А. Л., Кузенков В. С., Дьяконова В. Е. и Реутов В. П. Ингибиторы индуцибельной и нейрональной NO-синтазы усиливают протекторный эффект кратковременной адаптации к гипоксии у крыс линии Крушинского–Молодкиной. *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 1, 77–85 (2015).
177. Крушинский А. Л., Реутов В. П. и Кузенков В. С. Оксид азота участвует в защитном эффекте от акустического стресса при кратковременной адаптации крыс линии Крушинского–Молодкиной к гипоксии. *Изв. РАН. Сер. биол.*, **3**, 329–335 (2007).
178. Крушинский А. Л., Реутов В. П. и Кузенков В. С. Влияние NO-генерирующего соединения и ингибитора NO-синтазы на реализацию механизмов кратковременной адаптации к гипоксии у крыс линии Крушинского–Молодкиной. *Актуальные проблемы транспортной медицины*, **10** (4), 117–123. (2007).
179. Кошелев В. Б., Крушинский А. Л., Кузенков В. С., Сорокина Е. Г. и Реутов В. П. Снижение под влиянием ингибитора NO-синтазы защитного эффекта от барокамерной адаптации к гипоксии у крыс линии К–М. *Новости мед.-биол. наук*, № 1, 41–43 (2004).
180. Кузенков В. С., Реутов В. П. и Крушинский А. Л. Оксид азота вносит положительный вклад в протекторное действие кратковременной адаптации к гипоксии на развитие стрессорных повреждений у крыс линии Крушинского–Молодкиной. *Вестн. МГУ, Сер. 16. Биология*, **16** (1), 3–7 (2010).
181. Фадюкова О. Е., Кузенков В. С., Реутов В. П., Крушинский А. Л., Буравков С. В. и Кошелев В. Б. Антистрессорное и ангиопротекторное влияние оксида азота на крыс линии Крушинского–Молодкиной, генетически предрасположенных к аудиогенной эпилепсии. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **90** (1), 89–96 (2005).
182. Kositsyn N. S. Axo-dendritic relations in the brain stem reticular formation. *The Journal of Comparative Neurology*, **122** (1), 9–17 (1964).
183. Kositsyn N. S. On the modes of distribution of the synaptic ends of a separate axon system on a single neuron. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **159**, 648–651 (1964).
184. Kositsyn N. S. and Eliseeva Z. V. Axo-dendritic association of the pyramidal neurons of the sensorimotor cortex in the cat. *Bull. Eksp. Biol. Med.*, **62** (8), 101–103 (1966).
185. Розенштраух Л. В. и Реутов В. П. Памяти выдающегося физиолога, нейрофизиолога и биофизика Платона Григорьевича Костюка (20.08.1924–10.05.2010). *Успехи физиол. наук*, **41** (4), 103–105 (2010).
186. *Механизмы памяти*. Под ред. П. Г. Костюка (Наука, М., 1987).
187. Gállego J., Herrera M., Jericó I., Muñoz R., Aymerich N., and Martínez-Vila E. Stroke in the XXI century. Emergency care. *An. Sist. Sanit. Navar.*, **31** (Suppl. 1), 15–29 (2008). PMID: 18528441
188. GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol.*, **20** (10), 795–820 (2021). DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0

189. Gibson E., Koh C. L., Eames S., Bennett S., Scott A. M., and Hoffmann T.C. Occupational therapy for cognitive impairment in stroke patients. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **3** (3), CD006430 (2022). DOI: 10.1002/14651858.CD006430.pub3
190. Go A. S., Mozaffarian D., Roger V. L., Benjamin E. J., Berry J. D., Borden W. B., Bravata D. M., Dai S., Ford E. S., Fox C. S., Franco S., Fullerton H. J., Gillespie C., Hailpern S. M., Heit J. A., Howard V. J., Huffman M. D., Kissela B. M., Kittner S. J., Lackland D. T., Lichtman J. H., Lisabeth L. D., Magid D., Marcus G. M., Marelli A., Matchar D. B., McGuire D. K., Mohler E. R., Moy C. S., Mussolino M. E., Nichol G., Paynter N. P., Schreiner P. J., Sorlie P. D., Stein J., Turan T. N., Virani S. S., Wong N. D., Woo D., and Turner M. B. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, **127** (1), 143–152 (2013). DOI: 10.1161/CIR.0b013e318282ab8f
191. Groc L., Choquet D., Stephenson F. A., Verrier D., Manzoni O. J., Chavis P. NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J. Neurosci.*, **27** (38), 10165–10175 (2007). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1772-07.2007
192. Lees K. R., Caso V., and Michel P. Organizational update: European stroke organisation. *Stroke*, **46** (3), e67–e68 (2015). DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.007734
193. Lees K. R., Caso V., and Fischer U. Organizational update: report from the european stroke organisation. *Stroke*, **46** (9), e214–e215 (2015). DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.009631
194. Gusev E. I. and Skvortsova V. I. *Brain Ischemia* (Springer Science & Business Media, 2003).
195. Han Y. and Lin N. Systemic inflammatory response index and the short-term functional outcome of patients with acute ischemic stroke: a meta-analysis. *Neurol. Ther.*, (2024). Online ahead of print. DOI: 10.1007/s40120-024-00645-2
196. Benjamin E. J., Muntner P., Alonso A., Bittencourt M. S., Callaway C. W., Carson A. P., Chamberlain A. M., Chang A. R., Cheng S., Das S. R., Delling F. N., Djousse L., Elkind M. S. V., Ferguson J. F., Fornage M., Jordan L. C., Khan S. S., Kissela B. M., Knutson K. L., Kwan T. W., Lackland D. T., Lewis T. T., Lichtman J. H., Longenecker C. T., Loop M. S., Lutsey P. L., Martin S. S., Matsushita K., Moran A. E., Mussolino M. E., O'Flaherty M., Pandey A., Perak A. M., Rosamond W. D., Roth G. A., Sampson U. K. A., Satou G. M., Schroeder E. B., Shah S. H., Spartano N. L., Stokes A., Tirschwell D. L., Tsao C. W., Turakhia M. P., VanWagner L. B., Wilkins J. T., Wong S. S., and Virani S. S. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, **139** (10), e56–e528 (2019). DOI: 10.1161/CIR.0000000000000659
197. Martin S. S., Aday A. W., Almarzooq Z. I., Anderson C. A. M., Arora P., Avery C. L., Baker-Smith C. M., Barone Gibbs B., Beaton A. Z., Boehme A. K., Commodore-Mensah Y., Currie M. E., Elkind M. S. V., Evenson K. R., Generoso G., Heard D. G., Hiremath S., Johansen M. C., Kalani R., Kazi D. S., Ko D., Liu J., Magnani J. W., Michos E. D., Mussolino M. E., Navaneethan S. D., Parikh N. I., Perman S. M., Poudel R., Rezk-Hanna M., Roth G. A., Shah N. S., St-Onge M. P., Thacker E. L., Tsao C. W., Urbut S. M., Van Spall H. G. C., Voeks J. H., Wang N. Y., Wong N. D., Wong S. S., Yaffe K., and Palaniappan L. P. 2024 Heart disease and stroke statistics: A report of US and global data from the American Heart Association. *Circulation*, **149** (8), e347–e913 (2024). DOI: 10.1161/CIR.0000000000001209
198. Johnston S. C., Easton J. D., Farrant M., Barsan W., Conwit R. A., Elm J. J., Kim A. S., and Palesch Y. Y. Clopidogrel and aspirin in acute ischemic stroke and high-risk TIA. *N. Engl. J. Med.*, **379** (3), 215–225 (2018). DOI: 10.1056/nejmoa1800410
199. Klochikhina O. A. and Stakhovskaya L. V. An analysis of epidemiological indices of stroke based on the data of a regional population register from 2009 to 2012. *Zhurn. Nevrologii i Psikhatrii im. S.S. Korsakova*, **114** (6), 63–69 (2014).
200. Knight-Greenfield A., Nario J. J. Q., and Gupta A. Causes of acute stroke: a patterned approach. *Radiol. Clin. North Am.*, **57** (6), 1093–1108 (2019). DOI: 10.1016/j.rcl.2019.07.007
201. Vereshchagin N. V. and Piradov M. A. Stroke: assessment of the problem. *Neurolog. J.*, N 5, 4–7 (1999).
202. Montaña A., Hanley D. F., and Hemphill J. C. 3rd. Hemorrhagic stroke. *Handb. Clin. Neurol.*, **176**, 229–248 (2021). DOI: 10.1016/B978-0-444-64034-5.00019-5.A
203. Shamalov N. A., Stakhovskaya L. V., Klochikhina O. A., Polunina O. S., and Polunina E. A. An analysis of the dynamics of the main types of stroke and pathogenetic variants of ischemic stroke. *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova*, **119** (3–2), 5–10 (2019). DOI: 10.17116/jnevro20191190325
204. Thom T., Haase N., Rosamond W., Howard V. J., Rumsfeld J., Manolio T., Zheng Z. J., Flegal K., O'Donnell C., Kittner S., Lloyd-Jones D., Goff D. C. Jr., Hong Y., Adams R., Friday G., Furie K., Gorelick P., Kissela B., Marler J., Meigs J., Roger V., Sidney S., Sorlie P., Steinberger J., Wasserthiel-Smoller S., Wilson M., and Wolf P. Heart disease and stroke statistics – 2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, **113** (6), e85–e151 (2006). DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.171600
205. Clark B., Whittall J., Kwakkel G., Mehrholz J., Ewings S., and Burridge J. The effect of time spent in rehabilitation on activity limitation and impairment after stroke. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **10** (10), CD012612 (2021). DOI: 10.1002/14651858.CD012612.pub2

206. Gállego J., Herrera M., Jericó I., Muñoz R., Aymerich N., and Martínez-Vila E. Stroke in the XXI century. Emergency care. *An. Sist. Sanit. Navar.*, **31** (Suppl. 1), 15–29 (2008).
207. Blachar Y. and Borow M. The health of leaders: information, interpretation and the media. *Isr. Med. Assoc. J.*, **8** (11), 741–743 (2006).
208. Caprio F. Z. and Sorond F. A. Cerebrovascular disease: primary and secondary stroke prevention. *Med. Clin. North. Am.*, **103** (2), 295–308 (2019). DOI: 10.1016/j.mcna.2018.10.001
209. Sarikaya H. and Ferro J., Arnold M. Stroke prevention – medical and lifestyle measures. *Eur Neurol.*, **73** (3–4), 150–157 (2015). DOI: 10.1159/000367652
210. Ravenell J., Leighton-Herrmann E., Abel-Bey A., De-Sorbo A., Teresi J., Valdez L., Gordillo M., Gerin W., Hecht M., Ramirez M., Noble J., Cohn E., Jean-Louis G., Spruill T., Waddy S., Ogedegbe G., and Williams O. Tailored approaches to stroke health education (TASHE): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, **19** (16), 176 (2015). DOI: 10.1186/s13063-015-0703-4
211. Mozaffarian D., Benjamin E. J., Go A. S., Arnett D. K., Blaha M. J., and Cushman M. (2016) Heart Disease and Stroke Statistics – 2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, **133**, e38–e360 (2016), DOI: 10.1161/CIR.0000000000000350
212. Yaghi S., Willey J. Z., Cucchiara B., Goldstein J. N., Gonzales N. R., Khatri P., Kim L. J., Mayer S. A., Sheth K. N., and Schwamm L. H. Treatment and outcome of hemorrhagic transformation after intravenous alteplase in acute ischemic stroke: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, **48** (12), e343–e361 (2017). DOI: 10.1161/STR.0000000000000152
213. Schwamm L., Fayad P., Acker J. E. 3rd, Duncan P., Fonarow G. C., Girgus M., Goldstein L. B., Gregory T., Kelly-Hayes M., Sacco R. L., Saver J. L., Segrest W., Solis P., and Yancy C. W. Translating evidence into practice: a decade of efforts by the American Heart Association/American Stroke Association to reduce death and disability due to stroke: a presidential advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, **41** (5), 1051–1065 (2010). DOI: 10.1161/STR.0b013e3181d2da7d
214. Mozaffarian D., Benjamin E. J., Go A. S., Arnett D. K., Blaha M. J., Cushman M., de Ferranti S., Despres J. P., Fullerton H. J., and Howard V. J. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, **131** (4), e29–322 (2015). DOI: 10.1161/CIR.0000000000000152
215. Tobaldini E., Proserpio P., Oppo V., Figorilli M., Fiorelli E. M., Manconi M., Agostoni E. C., Nobili L., Montano N., Horvath T., and Bassetti C. L. Cardiac autonomic dynamics during sleep are lost in patients with TIA and stroke. *J. Sleep. Res.*, **29** (3), e12878 (2020). DOI: 10.1111/jsr.12878
216. Stakhovskaia L. V., Klochikhina O. A., Bogatyreva M. D., and Kovalenko V. V. Epidemiology of stroke in the Russian Federation: results of territory's population registry (2009–2010). *Zh. Nevrol. Psikiatr. im. S.S. Korsakova*, **113** (5), 4–10 (2013).
217. Virani S. S., Alonso A., Benjamin E. J., Bittencourt M. S., Callaway C. W., Carson A. P., Chamberlain A. M., Chang A. R., Cheng S., Delling F. N., Djousse L., Elkind M. S. V., Ferguson J. F., Fornage M., Khan S. S., Kissela B. M., Knutson K. L., Kwan T. W., Lackland D. T., Lewis T. T., Lichtman J. H., Longenecker C. T., Loop M. S., Lutsey P. L., Martin S. S., Matsushita K., Moran A. E., Mussolino M. E., Perak A. M., Rosamond W. D., Roth G. A., Sampson U. K. A., Satou G. M., Schroeder E. B., Shah S. H., Shay D. C., Spartano N. L., Stokes A., Tirschwell D. L., VanWagner L. B., and Tsao C. W. Heart Disease and Stroke Statistics – 2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, **141** (9), e139–e596 (2020). DOI: 10.1161/CIR.0000000000000757
218. Yaghi S., Willey J. Z., Cucchiara B., Goldstein J. N., Gonzales N. R., Khatri P., Kim L. J., Mayer S. A., Sheth K. N., and Schwamm L. H. Treatment and outcome of hemorrhagic transformation after intravenous alteplase in acute ischemic stroke: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, **48** (12), e343–e361 (2017). DOI: 10.1161/STR.0000000000000152
219. Liu S., Li Y., Zeng X., Wang H., Yin P., Wang L., Liu Y., Liu J., Qi J., Ran S., Yang S., and Zhou M. Burden of cardiovascular diseases in China, 1990–2016: findings from the 2016 global burden of disease study. *JAMA Cardiol.*, **4** (4), 342–352 (2019). DOI: 10.1001/jamacardio.2019.0295
220. Wang Y. J., Li Z. X., and Gu H. Q. Chronic and non-communicable disease control and prevention. *Stroke Vasc. Neurol.*, **5** (3), 211–239 (2020). DOI: 10.1136/svn-2020-000457
221. Wang Y., Liu Y., Liu R., and Zhao J. Cluster-randomised controlled trial of Stroke 1-2-0 education programme to reduce stroke prehospital delay in China: a study protocol. *BMJ Open*, **11** (5), e048064 (2021). DOI: 10.1136/bmjopen-2020-048064, PMID: 34035108
222. Wu S., Wu B., Liu M., Chen Z., Wang W., Anderson C. S., and Zhang S. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management. *Lancet Neurol.*, **18**, 394–405 (2019). DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30500-3
223. Zhao J. and Liu R. Stroke 1-2-0: a rapid response programme for stroke in China. *Lancet Neurol.*, **16** (1), 27–28 (2017). DOI: 10.1016/S1474-4422(16)30283-6.
224. Zhou M., Wang H., and Zeng X. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet*, **394**, 1145–1158 (2019).
225. Косицын Н. С. *Нервная клетка здоровая и больная* (М., 1987).

226. Колосов Н. Г. *Морфология межнейронных связей. К морфологии межнейронных связей* (М.–Л., 1961).
227. Реутов В. П. и Шехтер А. Н. Как в XX веке физики, химики и биологи отвечали на вопрос: что есть жизнь? *Успехи физ. наук*, **180** (4), 393–414 (2010). DOI: 10.3367/UFNг.0180.201004d.0393
228. Реутов В. П. Биохимическое предопределение NO-синтазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота. *Биохимия*, **64** (5), 634–651 (1999).
229. Реутов В. П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности. *Биохимия*, **67** (3), 353–376 (2002).
230. Li J., Wang J., Shen Y., Dai C., Chen B., Huang Y., Xu S., Wu Y., and Li Y. Hyperoxygenation with cardiopulmonary resuscitation and targeted temperature management improves post-cardiac arrest outcomes in rats. *J. Am. Heart Assoc.*, **9** (19), e016730 (2020). DOI: 10.1161/JAHA.120.016730
231. Dasenbrock H. H., Smith T. R., Rudy R. F., Gormley W. B., Aziz-Sultan M. A., and Du R. Reoperation and readmission after clipping of an unruptured intracranial aneurysm: a National Surgical Quality Improvement Program analysis. *J. Neurosurg.*, **128** (3), 756–767 (2018). DOI: 10.3171/2016.10.JNS161810
232. Базян А. С., Реутов В. П. Физиолог, биофизик и эмбриолог Левон Михайлович Чайлахян. *Биофизика*, **55** (3), 554–556 (2010).
233. Базян А. С. и Реутов В. П. Памяти члена-корреспондента РАН Левона Михайловича Чайлахяна – ученого и мыслителя. *Успехи физиол. наук*, **41** (1), 103–109 (2010).
234. Реутов В. П. К вопросу о механизме ультраструктурных изменений в центральном звене передачи сигнала между нейронами – синапсе – при обучении, функциональной гипоксии, а также при ишемии/гипоксии. Восстанавливая традиции посмертной славы: памяти Н.С. Косицына (16.05.1934–19.08.2020) – неординарного ученого, человека, педагога и популяризатора науки. *Евразийское научное объединение*, **10** (68), 183–214 (2020). DOI: 10.5281/zenodo.4287468
235. Черток В. М., Реутов В. П. и Охотин В. Е. Павел Александрович Мотавкин – человек, педагог, ученый. *Тихоокеанский мед. журн.*, **2**, 7–8 (2012).
236. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е. и Свинов М. М., Николай Степанович Косицын (К 75-летию со дня рождения). *Успехи физиол. наук*, **40** (4), 94–95 (2009).
237. Брода Э. *Эволюция биоэнергетических процессов* (Мир, М., 1978).
238. Маргелис Л. *Роль симбиоза в эволюции клетки* (Мир, М., 1983).
239. Реутов В. П. Цикл окиси азота. *Успехи биол. химии*, **35**, 189–228 (1995).
240. Реутов В. П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала. *Вестн. Рос. акад. мед. наук*, № 4, 35–41 (2000).
241. Реутов В. П., Давыдова Л. А. и Сорокина Е. Г. Тканеинженерные конструкции в биофизике, неврологии, и других областях, отраслях и разделах биофизики. *Биофизика*, **67** (5), 1009–1029 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050209
242. Костюк П. Г., Светайло Э. Н. и Ланге К. А. *Физиологические науки в Академии наук СССР (1963–1983)* (М.–Л., 1983).
243. Реутов В. П., Охотин В. Е., Шуклин А. В., Сорокина Е. Г., Косицын Н. С. и Гурин В. Н. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты. *Успехи физиол. наук*, **38** (4), 39–58 (2007).
244. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Швалев В. Н., Космачевская О. В., Свинов М. М., Крушинский А. Л., Кузенков В. С. и Косицын Н. С. Возможная роль диоксида азота, образующегося в местах бифуркации сосудов в процессах их повреждения при геморрагических инсультах и образовании атеросклеротических бляшек. *Успехи физиол. наук*, **43** (4), 73–93 (2012).
245. Швалев В. Н., Реутов В. П., Рогоза А. Н., Сергиенко В. Б., Аншелес А. А. и Ковалев В. П. Развитие современных представлений о нейрогенной природе кардиологических заболеваний. *Тихоокеанский мед. журн.*, № 1, 10–14 (2014).
246. Швалев В. Н., Рогоза А. Н., Реутов В. П., Ковалев В. П., Зюзина Н. Е. и Конишев И. М. Особенности нейрогенной регуляции сердечно-сосудистой системы и ее нарушение в онтогенезе. *Морфология*, № 5, 133–134 (2013).
247. Швалев В. Н., Реутов В. П. и Рогоза А. Н. Анализ возрастных изменений трофики сердечно-сосудистой системы в норме и в условиях патологии. *Морфологические ведомости*, № 3, 6–11 (2012).
248. Швалев В. Н., Реутов В. П., Рогоза А. Н., Сергиенко В. Б., Сосунов А. А. и Ковалев В. П. Морфофункциональные исследования нейрогенной природы заболеваний сердечно-сосудистой системы. *Морфологические ведомости*, № 1, 6–20 (2014). DOI: 10.17750/KMJ2015-598
249. Швалев В. Н., Рогоза А. Н. и Реутов В. П. Развитие традиций казанской медицинской школы – изучение морфологических основ нервной трофики. *Казанский мед. журн.*, **95** (2), 175–180 (2014).
250. Швалев В. Н., Рогоза А. Н., Тарский Н. А., Сергиенко В. Б., Аншелес А. А., Реутов В. П., и Юдаев А. А. Внезапная сердечная смерть и морфофункциональная диагностика предшествующих возрастных нейродистрофических изменений организма. *Тихоокеанский мед. журн.*, № 1, 42 (2017).
251. Швалев В. Н., Реутов В. П., Сергиенко В. Б., Рогоза А. Н., Масенко В. П. и Аншелес А. А. Механизмы развития кардиологических заболеваний при

- возрастных нарушениях состояния нервной системы. *Казанский мед. журн.*, **97** (4), 598–606 (2016).
252. Реутов В. П., Швалев В. Н., Розина В. Н., Сорокина Е. Г. и Самосудова Н. В. Нитратно-нитритный фон существования человека и сердечно-сосудистые заболевания. *Евразийский кардиологич. журн.*, № 3, 108 (2016).
253. Новосельцев В. Н. и Новосельцева Ж. А. Здоровье, гомеостаз и долголетие. *Успехи геронтологии*, **24** (4), 553–562 (1911).
254. Медникова Ю. С., Воронков Д. Н., Худоерков Р. М., Пасикова Н. В. и Захарова Н. М. Активная и пассивная составляющие нейронального возбуждения и его глиальное сопровождение. *Биофизика*, **66** (4), 756–773 (2021). DOI: 10.31857/s0006302921040165
255. Schekman R. and Singer S. J. Clustering and endocytosis of membrane receptors can be induced in mature erythrocytes of neonatal but not adult humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73** (11), 4075–4079 (1976). DOI: 10.1073/pnas.73.11.4075
256. Novick P. and Schekman R. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** (4), 1858–1862 (1979). DOI: 10.1073/pnas.76.4.1858
257. Novick P., Field C., and Schekman R. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, **21** (1), 205–215 (1980). DOI: 10.1016/0092-8674(80)90128-2
258. Südhof T. C. and Rothman J. E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, **323** (5913), 474–477 (2009). DOI: 10.1126/science.1161748
259. Rothman J. E. and Schekman R. Molecular mechanism of protein folding in the cell. *Cell*, **146** (6), 851–854 (2011). DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.041
260. Südhof T. C. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, **80** (3), 675–690 (2013). DOI: 10.1016/j.neuron.2013.10.022
261. Südhof T. C. The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53** (47), 12696–12717 (2014). DOI: 10.1002/anie.201406359
262. Lehninger A. L. *The mitochondrion; molecular basis of structure and function* (N.-Y., 1964).

Typical Pathological Process in Glutamate Neurotoxicity: the Role of Reactive Nitrogen and Oxygen Species

V.P. Reutov*, N.V. Pasikova*, and E.G. Sorokina**

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia

**National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of the Russian Federation,
Lomonosovsky prosp. 2, Moscow, 119991 Russia

The disruption of major regulatory mechanisms of nerve cells can lead to glutamate neurotoxicity/excitotoxicity. This phenomenon most often occurs in hypoxia/ischemia, during inflammatory processes, activation of immune and autoimmune responses. Pathological changes in the brain in the early stages of diseases are nonspecific. The distinction between pathological change and physiological norm is small. These typical pathological processes are common with a variety of diseases. They may also occur in ischemic and hemorrhagic strokes. The main objective of this work was to analyze some physiological and cytochemical processes that are associated with the neurotransmitter glutamate, as well as with highly reactive and highly toxic compounds such as reactive nitrogen and oxygen species. Reactive nitrogen ($\bullet\text{NO}$) and oxygen ($\bullet\text{O}_2^-$) species can affect almost all major components of cells and subcellular structures. At low concentrations, they perform a regulatory function. Mechanism analysis of toxic effects of glutamate, reactive nitrogen and oxygen species was essential for the development of new methods of protection against the damaging effects of the said substances thereby using these methods in treatment of ischemic and hemorrhagic strokes.

Keywords: glutamate, nitric oxide, nitric oxide cycle, superoxide anion radical, superoxide anion radical cycle, nitrogen dioxide, $\bullet\text{OH}$ radicals, peroxynitrites

УДК 571.3

МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА КАК «РАБОЧЕЙ ФОРМЫ» ОКСИДА АЗОТА

© 2024 г. А.Ф. Ванин*,#

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

#E-mail: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

После доработки 02.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Выдвинут тезис, что только включение эндогенного оксида азота (NO) в живых организмах в динитрозильные комплексы железа или в S-нитрозотиолы может обеспечить его стабилизацию, необходимую для функционирования NO в качестве как ауто-, так и паракринного регулятора метаболических процессов. Без такого включения подавляющая часть эндогенного NO исчезает из-за агрессивного действия на него внутри- и внеклеточной среды организма и тем самым исключается из процессов жизнедеятельности. Введение в организм животных и человека экзогенного NO (возможное только путем ингаляции его газообразной формы) не приводит к образованию в крови и других тканях ни динитрозильных комплексов железа, ни S-нитрозотиолов. Подавляющая часть экзогенного NO в этом случае превращается в крови в катионы нитрозония (NO^+), о появлении которых свидетельствует их превращение в S-нитрозотиолы при одновременном с ингаляцией экзогенного NO введении в кровь животных различных тиолов. В свою очередь, появление S-нитрозотиолов у этих животных обнаруживается по их гипотензивному действию на животных. Превращение NO в катионы нитрозония происходит и в процессе синтеза динитрозильных комплексов железа, обусловленного в живых организмах реакцией диспропорционирования эндогенных молекул NO, попарно связывающихся с ионами двухвалентного железа. Последующее связывание возникающих в ходе этой реакции $\text{Fe}(\text{NO})_2$ -групп с тиолсодержащими лигандами приводит к образованию достаточно стабильных динитрозильных комплексов железа, функционирующих в живых организмах в качестве доноров как нейтральных молекул NO, так и катионов нитрозония (NO^+). Перенос последних на мишени их биологического действия осуществляется в результате непосредственного контакта низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа соответственно с гемовой группой гем-содержащих белков (например, гуанилатциклазы) или с тиоловыми группами низкомолекулярных и белковых тиолсодержащих соединений. Приводятся различные последствия такого переноса NO и NO^+ в живых организмах соответственно как позитивного, регуляторного, так и негативного, токсического характера.

Ключевые слова: оксид азота, катион нитрозония, динитрозильные комплексы железа, S-нитрозотиолы, реакция диспропорционирования.

DOI: 10.31857/S0006302924050131, EDN: MJMJKD

Сокращения: RS-NO – S-нитрозотиолы, М-ДНКЖ – моноядерные динитрозильные комплексы железа, Б-ДНКЖ – биядерные динитрозильные комплексы железа, МНКЖ – монокитрозильные моноядерные комплексы железа, МНКЖ-L – монокитрозильные моноядерные комплексы железа с L-лигандами, М-ДНКЖ-RS – моноядерные динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, МНКЖ-RS – моноядерные монокитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами, СТС – сверхтонкая структура, САД – системное артериальное давление, ЛПС – липополисахарид, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат натрия, МНКЖ-ДЭТК – монокитрозильные моноядерные комплексы железа с диэтилдитиокарбаматом натрия, МГД – N-метил-D,L-глуксаминдитиокарбамат, Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, Б-ДНКЖ-MSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с меркаптосукцинатом.

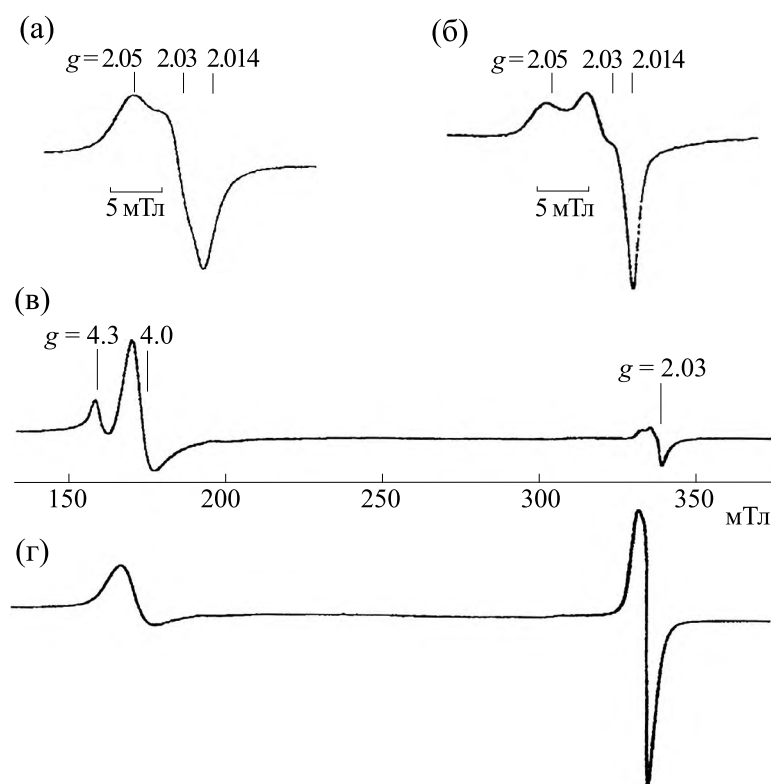
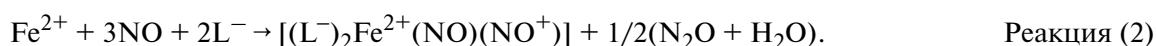
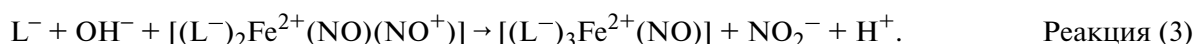


Рис. 1. Сигналы ЭПР низкоспиновых ($S = 1/2$) М-ДНКЖ с цитратом (а) и АТФ (б), зарегистрированные в узком диапазоне магнитного поля, и высокоспиновых ($S = 3/2$) МНКЖ с цитратом (в) и АТФ (г) с основной компонентой при $g = 4.0$. Компонента при $g = 2.0$ маскируется сигналами М-ДНКЖ с цитратом и АТФ. Сигнал при $g = 4.3$ обусловлен высокоспиновым комплексом примесного железа (Fe^{3+}). Сигналы зарегистрированы при 77 К [18].



В ходе этого процесса появляющийся в комплексе анион нитроксила гидролизуется, т.е. протонируется с высвобождением из комплекса предшественника закиси азота (N_2O) — молекулы нитроксила (HNO) — с включением в освободившееся лигандное место третьей молекулы NO . Что касается гидролиза катиона нитрозония — его взаимодействия с анионом гидроксидов, то эта реакция происходит только в М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой приоро-

ды [16]. Появляющийся вместо этого катиона (при нейтральных значениях рН) анион нитрита также выходит из комплекса, в результате М-ДНКЖ- L^- преобразуется в соответствующий мононитрозильный моноядерный комплекс железа (МНКЖ) с L^- -лигандами (МНКЖ- L^-) в концентрации, существенно превосходящей стационарный уровень М-ДНКЖ- L^- (реакция (3)):



В отличие от низкоспинового М-ДНКЖ- L^- с $S = 1/2$, характеризующегося сравнительно узким сигналом ЭПР с $g_1 = 2.05$, $g_2 = 2.03$, $g_3 = 2.014$ ($g_{\text{ср}} = 2.031$), МНКЖ- L^- находится в высокоспиновом состоянии с $S = 3/2$ и характеризуется широким сигналом ЭПР с $g_{1,2} = 4.0$ и $g_3 = 2.0$ (рис. 1) [18]. Сигнал ЭПР М-ДНКЖ- L^- регистрируется как при низкой, так и при комнатной температу-

ре, т.е. и в размороженном растворе, тогда как сигнал МНКЖ- L^- — только в замороженном растворе при низкой температуре [16, 18, 19].

Оба типа нитрозильных комплексов железа неустойчивы — М-ДНКЖ- L^- распадается самопроизвольно из-за гидролиза катионов нитрозония, МНКЖ- L^- — после откачки NO из раствора. Устойчивость М-ДНКЖ- L^- резко повышается

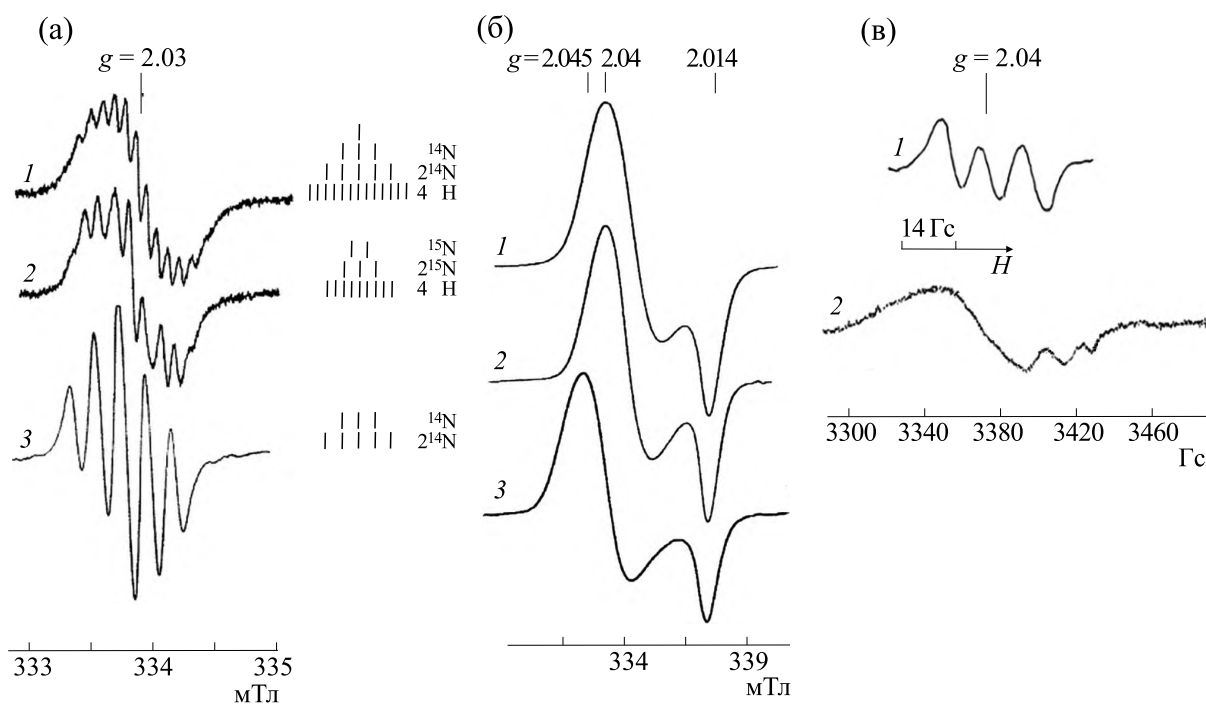


Рис. 2. (а) – Форма сигналов водных растворов ЭПР М-ДНКЖ с цистеином, содержащих ^{14}NO и ^{15}NO (спектры 1 и 2), и М-ДНКЖ с тиосульфатом (спектр 3). Справа приведена расшифровка СТС. (б) – Форма сигналов ЭПР замороженных растворов М-ДНКЖ с цистеином, содержащих ^{14}NO и ^{15}NO (спектры 1 и 2), и М-ДНКЖ с тиосульфатом (спектр 3). Запись при 77 К. (в) – Форма сигналов ЭПР МНКЖ с цистеином. Запись при комнатной температуре (спектр 1) и 77 К (спектр 2) [18, 24].

при замене в них лигандов нетиоловой природы на тиолсодержащие (RS^-) соединения. Тиоловые группы этих соединений характеризуются высокой π -донорной электронной активностью, т.е. способностью передавать электронную плотность на соответствующие электрофилы, в качестве которых в нитрозильных комплексах железа выступают катионы нитрозония. Перенос на них электронной плотности с атомов тиоловой серы приводит к нейтрализации положительного заряда на NO^+ и тем самым к подавлению гидролиза этих катионов и стабилизации М-ДНКЖ [20]. Именно этот механизм стабилизации М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, возникающих, как и М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы, в соответствии со схемой 1, определяет их появление и накопление в живых организмах. Именно это и позволило еще в 60-е годы прошлого века открыть и идентифицировать методом ЭПР М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами сначала в дрожжевых клетках, а затем и в тканях животных [21–23].

Как и М-ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы, М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (М-ДНКЖ- RS^-) находятся в низкоспиновом состоянии с $S = 1/2$ и характеризуются сигналом ЭПР с двумя главными значениями g -фактора –

$g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$, называемым, в соответствии со средним значением g -фактора, сигналом 2.03 (рис. 2б) [18]. Что касается МНКЖ с тиолсодержащими лигандами (МНКЖ- RS^-), они также могут возникать, но не в результате высвобождения из М-ДНКЖ катионов нитрозония, как это происходит с М-ДНКЖ- L^- , а на первых стадиях образования М-ДНКЖ при связывании с Fe^{2+} первой молекулы NO [24–26]. Образующиеся при этом МНКЖ- RS^- , в отличие от МНКЖ- L^- , дают сигнал ЭПР, регистрируемый при комнатной температуре в виде изотропной триплетной сверхтонкой структуры (СТС) от ядра азота ^{14}NO (спин ядра $I = 1$) с центром при $g = 2.04$ [24–26], превращающийся при низкой температуре регистрации в более широкий синглет с центром при том же значении g -фактора (рис. 2в) [24].

При последующей обработке этого раствора газообразным NO , приводящей в соответствии со схемой 1 к образованию М-ДНКЖ- RS^- , вместо триплетного сигнала ЭПР при комнатной температуре регистрируется синглетный сигнал ЭПР при $g = 2.03$ с дополнительной 5- или 13-компонентной СТС, характерной, например, соответственно для М-ДНКЖ с тиосульфатом или с цистеином. Пятикомпонентная СТС возникает в

результате взаимодействия неспаренного электрона с ядрами ^{14}N двух нитрозильных лигандов, тогда как 13-компонентная СТС определяется дополнительным СТ-взаимодействием неспаренного электрона еще с 4 протонами метиленовых групп двух молекул цистеина в лигандном составе М-ДНКЖ (рис. 2). При замене ^{14}NO (спин ядра азота $I = 1$) на ^{15}NO ($I = 1/2$) 13-компонентная СТС становилась 9-компонентной (рис. 2) [18].

Таким образом, если для М-ДНКЖ с лигандами как тиоловой (RS^-), так и нетиоловой (L^-) природы характерно низкоспиновое состояние с $S = 1/2$, для мононитрозильных аналогов этих комплексов низкоспиновое состояние с $S = 1/2$ характерно только для МНКЖ с тиолсодержащими лигандами (МНКЖ- RS^-), тогда как МНКЖ с разнообразными (L^-) лигандами нетиоловой природы, как указывалось выше, находятся в высокоспиновом состоянии с $S = 3/2$. Очевидно, это различие обусловлено более сильным в МНКЖ- RS^- взаимодействием серных (тиоловых) лигандов с центральным атомом, приводящим к полному снятию вырождения верхних d - и p -орбиталей соответственно железа и нитрозильного лиганда и к парамагнитной $d^7(\text{Fe}^+)$ -конфигурации железа в этих комплексах, или, в соответствии с работой [17], к $[(\text{Fe}(\text{NO})_2)]^7$ -представлению ДНКЖ. Слабые, нетиолсодержащие лиганды в МНКЖ- L^- не способны реализовать аналогичную ситуацию, в результате эти комплексы характеризуются высокоспиновым состоянием с локализацией 3 электронов железа на вырожденных молекулярных орбиталях комплекса с основным вкладом в них t_{2g} -орбиталей (d_{xy} , d_{xz} и d_{yz}) железа. Такая конфигурация может реализоваться для тетраэдрической пространственной структуры МНКЖ- L^- [18]. Что касается МНКЖ- RS^- , низкоспиновая электронная конфигурация для них может реализоваться для квадратно-пирамидальной пространственной структуры комплексов, т.е. при расположении четырех RS^- в плоскости, а NO -лиганда – по вертикальной оси (оси z) [18].

Таким образом, изложенный выше материал показывает, что в рамках предполагаемого нами механизма образования М-ДНКЖ с лигандами как тиоловой (RS^-), так и нетиоловой (L^-) природы, обусловленного диспропорционированием молекул NO , для этих комплексов, как и для их биядерной формы, в соответствии со схемой 1 должна реализоваться резонансная структура, в которой нитрозильные лиганды в железо-динитрозильном фрагменте представлены поровну нейтральной молекулой NO и катионом нитрозония. Другими словами, ДНКЖ с различными анионными лигандами, в том числе тиолсодержа-

щими лигандами, способны выступать в качестве доноров как нейтральных молекул NO , так и катионов нитрозония. Что касается мононитрозильных аналогов этих комплексов, они могут выступать в качестве доноров только нейтральных молекул NO .

Вывод о способности М-ДНКЖ, образующихся в соответствии со схемой 1 в результате диспропорционирования молекул NO , выступать в качестве источников катионов нитрозония резко контрастирует с отсутствием такой способности у ДНКЖ с парамагнитной $d^9(\text{Fe}^-)$ -электронной конфигурацией железа в этих комплексах, или, в соответствии с работой [17], $[(\text{Fe}(\text{NO})_2)]^9$ -представлением М-ДНКЖ. Согласно работе [27], такая конфигурация и соответственно характерная для их железо-динитрозильных фрагментов резонансная структура $[\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO})]$ реализуются для этих комплексов в результате одноэлектронного восстановления исходного $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO})_2]$ -комплекса. Очевидно, что такие одноэлектронно восстановленные ДНКЖ могут высвобождать только нейтральные молекулы NO и анионы нитроксила (NO^-), но не NO^+ . Таким образом, проверка способности ДНКЖ высвобождать катионы нитрозония является ключевым моментом в выборе реального механизма образования парамагнитных ЭПР-активных ДНКЖ, обусловленного либо диспропорционированием молекул NO и реализацией d^7 -электронной конфигурации железа или восстановлением одной из NO молекул в железо-динитрозильном фрагменте до NO^- и реализацией d^9 -электронной конфигурации железа в этом фрагменте.

Проведенные нами эксперименты показали, что ДНКЖ как с тиолсодержащими лигандами, так и ДНКЖ с лигандами нетиоловой природы способны высвобождать катионы нитрозония, причем в ряде случаев в том же количестве, что и нейтральных молекул NO [10, 13, 15, 16, 28, 29]. При этом последние обеспечивают позитивное, регуляторное действие ДНКЖ на живые организмы, тогда как катионы нитрозония оказывают на эти организмы негативное, токсическое действие [30, 31]. Соответственно, регуляторная активность молекул NO обеспечивается их воздействием на их биологическую мишень – гуанилатциклазу, тогда как токсическая активность катионов нитрозония определяется их способностью S-нитрозировать критически важные для метаболизма тиолсодержащие белки, подавляя тем самым их биологическую активность.

Как указывалось выше, М- и Б-ДНКЖ представлены в живых организмах в подавляющей своей части М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, как низкомолекулярными, так и входящими в состав белков – белок-связанные М- и

Б-ДНКЖ. Последние выступают в качестве депо, стабилизирующего эти комплексы, тогда как низкомолекулярные ДНКЖ осуществляют перенос входящих в них нейтральных молекул NO и катионов нитрозония на их биологические мишени [32].

Как уже было указано, включение тиолсодержащих лигандов в ДНКЖ обеспечивает стабилизацию этих комплексов в результате переноса электронной плотности с атомов тиоловой серы на катионы нитрозония, что приводит к нейтрализации положительного заряда на этих катионах и тем самым к подавлению их гидролиза и сохра-

нению в составе ДНКЖ, т.е. к стабильности этих комплексов. Существует и второй механизм стабилизации ДНКЖ, обусловленный наличием в их составе тиолсодержащих лигандов. Высвобождающиеся из этих комплексов при их распаде катионы нитрозония могут связываться с этими лигандами с образованием молекул RS-NO, которые, как мы показали в работах [33, 34], сами по себе реагируя с двухвалентным железом и другими тиолами, способны, в соответствии со схемой 2, продуцировать сначала М- и далее Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами:

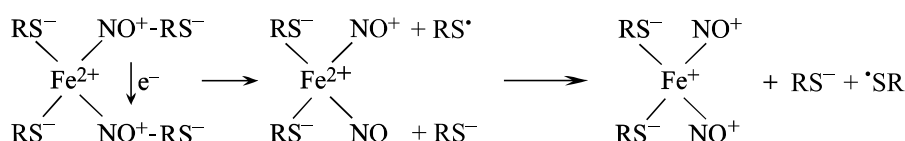


Схема 2. Последовательное образование М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами.

Предполагается, что, попарно связавшись с Fe^{2+} , молекулы RS-NO, как и молекулы NO на схеме 1, вступают в реакцию диспропорционирования с их превращением в неустойчивые аддукты, описываемые резонансными структурами $\text{NO}^+ \text{-RS}^-$ и NO-RS^- . Распад этих аддуктов приводит к образованию М-ДНКЖ с той же резонансной структурой, характерной для М-ДНКЖ, образующихся в реакции газообразного NO с ионами Fe^{2+} и тиолсодержащими соединениями, а именно – $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}^+)]$.

В отличие от молекул NO, высвобождающихся из распадающихся ДНКЖ с последующим улетучиванием из раствора, молекулы RS-NO, образующиеся при связывании катионов нитрозония с тиолами, сохраняются в растворе и могут, в соответствии со схемой 2, генерировать М-, а затем и Б-ДНКЖ, тем самым затормаживая исчезновение этих комплексов в растворе.

Проведенная в работе [35] оценка стационарной концентрации ДНКЖ, RS-NO и различных нитросоединений, образующихся в клеточных культурах при активации в них синтеза эндогенного оксида азота, показала, что содержание ДНКЖ доминирует над остальными производными NO, т.е. есть основание предполагать, что ДНКЖ выступают в качестве наиболее представительной формы эндогенных соединений как стабилизаторов оксида азота.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКЗОГЕННЫХ RS-NO И ДНКЖ, ИМИТИРУЮЩАЯ АНАЛОГИЧНУЮ АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ ЭНДОГЕННОГО NO

Как уже было сказано, включение NO в ДНКЖ или RS-NO обеспечивает защиту этой свободно радикальной молекулы от губительного действия на нее анионов супероксида (а также других агентов), что может существенно повышать время жизни NO в живых организмах. Встает вопрос, не приводит ли такой способ стабилизации NO к тому, что, включившись в указанные NO-содержащие соединения, этот агент «выходит из игры», т.е. образующиеся в живых организмах ДНКЖ и RS-NO оказываются столь стабильными, что оксид азота не высвобождается из них и не оказывает соответствующего действия на живые организмы.

Эксперименты, проведенные на изолированных сосудах *in vitro* и на животных *in vivo* показали, что по крайней мере по своей способности вызывать соответственно вазодилатацию или гипотензию ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и RS-NO характеризуются соответствующей активностью, превосходящей способность свободных молекул NO инициировать вазодилатацию в опытах на изолированных сосудах или гипотензию у животных. В качестве примера можно привести результаты опытов, демонстрирующие способность газообразного NO и ДНКЖ с цистеином инициировать в зависимости от их концентрации в среде инкубации степень расслабления изолированных кольцевых фрагментов аорты крыс (рис. 3) [36].

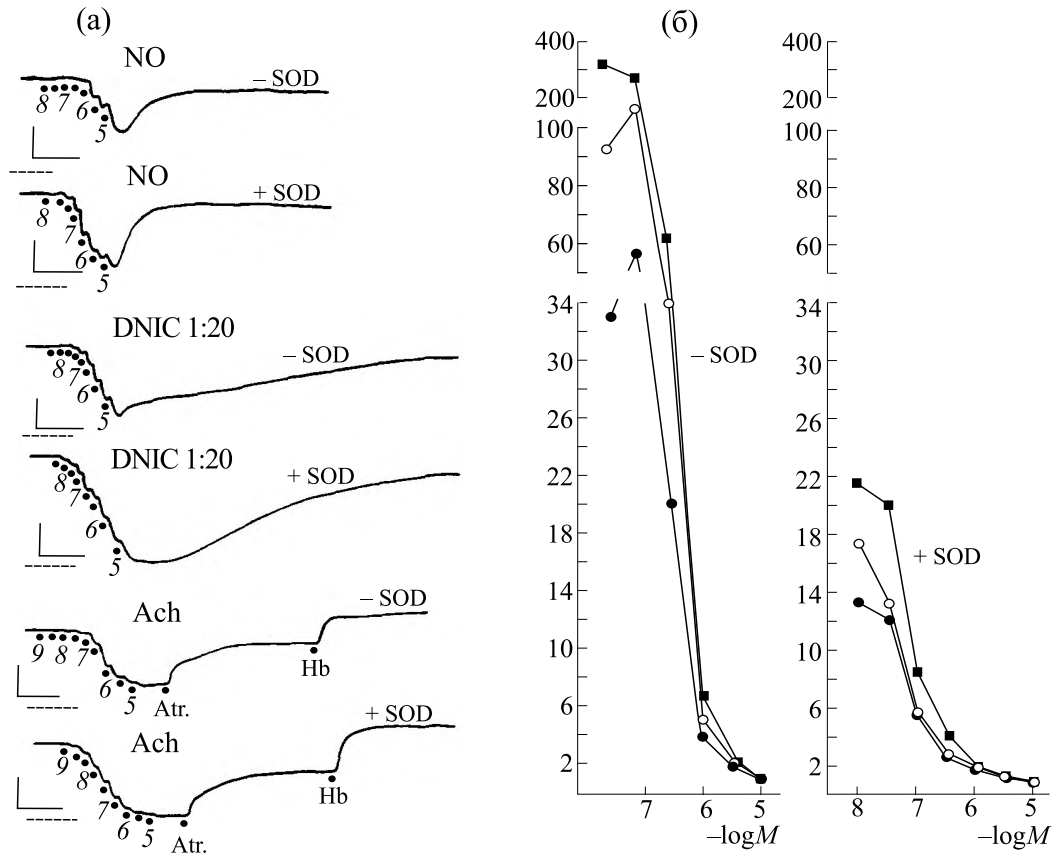


Рис. 3. (а) – Вазодилаторное действие NO, ДНКЖ с цистеином (DNIC 1 : 20) и ацетилхолина (Ach) на кольцевые фрагменты аорты крыс, предварительно сокращенные под влиянием норэпинефрина (10^{-7} М) в отсутствие и в присутствии супероксиддисмутазы (SOD, 30 ед/мл). Точками показано время введения указанных агентов (ДНКЖ, $\log M$), атропина (10^{-5} М) и гемоглобина (Hb, 10^{-5} М). Масштаб по вертикали слева – 1 г, по горизонтали – 3 мин. (б) – Отношение степени релаксации сосудов (в отн. ед.), вызванных Ach (•), DNIC 1 : 2 (○) и DNIC 1 : 20 (■) к релаксации, вызванной NO в отсутствие (слева) и в присутствии (справа) супероксиддисмутазы (SOD). DNIC 1 : 2 и DNIC 1 : 20 синтезированы соответственно при соотношении концентраций Fe^{2+} : цистеин, равном 1 : 2 или 1 : 20 [36].

Как следует из рис. 3, в отсутствие супероксиддисмутазы при малых концентрациях ДНКЖ с цистеином (при соотношении ДНКЖ : цистеин в растворе, равном 1 : 20) эффективность вазодилаторного действия ДНКЖ была на два порядка выше, чем для NO в тех же малых концентрациях. В присутствии супероксиддисмутазы, устраняющей анионы супероксида, это различие ослаблялось, но все равно различалось на порядок. Характерно, что вазодилаторное действие ДНКЖ в дозовом отношении совпадало с действием на сосуды ацетилхолина, инициировавшего генерацию эндогенного NO. Не исключено, что это совпадение могло быть обусловлено включением этого агента в эндогенные ДНКЖ!?

Более резкое различие обнаруживалось для гипотензивного действия газообразного (несвязанного) NO, вводимого животным (крысам) путем ингаляции, и аналогичного эффекта, вызывавшегося у животных внутривенным введением

им растворов RS-NO или ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [37, 38]. Судя по образованию ЭПР-детектируемых нитрозильных комплексов гемоглобина у животных и человека, оксид азота по дыхательному пути через легкие достигал крови в большом круге кровообращения, однако заметный гипотензивный эффект при этом не обнаруживался (рис. 4) [37].

Системное артериальное давление (САД) начинало снижаться, если одновременно с ингаляцией NO животному внутривенно вводили раствор глутатиона или другого тиола. Если же после введения тиола прекращали ингаляцию, САД сразу же начинало восстанавливаться до исходного уровня (рис. 4) [37]. Этот результат можно было объяснить единственным образом, а именно тем, что NO, попадавший в кровь, превращался в катион нитрозония, в свою очередь быстро превращавшийся в результате гидролиза в анион нитрита, неспособный эффективно инициировать рас-

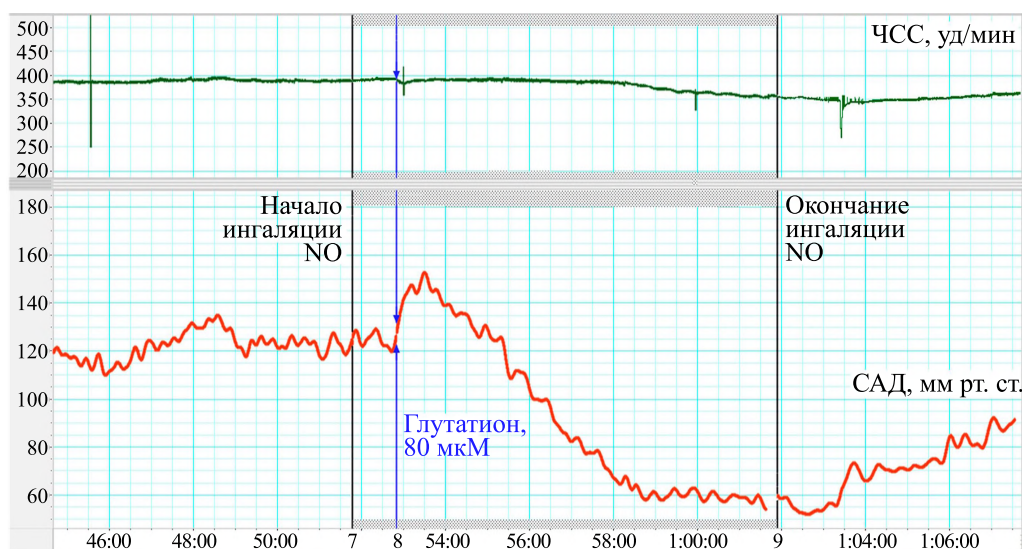


Рис. 4. Сохранение системного артериального давления (САД) в мм рт. ст. у крысы при ингаляции газового потока NO с концентрацией 1000 ppm с последующим снижением САД при одновременном с ингаляцией внутривенным введением крысе 6.4 мкмоль глутатиона на кг массы животного, соответствующем 80 мкМ глутатиона на 1 литр крови. По оси абсцисс – время эксперимента в минутах. Верхний график – число сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), нижний график – САД, мм. рт. ст. [37].

слабление сосудов и тем самым понижать САД. Последнее имело место при введении в кровь тиолов, превращавших катионы нитрозония в S-нитрозотиолы, способные, как и ДНКЖ, вызывать гипотензию [38].

Что касается экзогенных, т.е. синтезированных химическим путем RS-NO и ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, их введение в кровь уже при концентрации в несколько микромолей на кг веса крыс [38] вызывало значительное снижение САД, что не имело места при ингаляции газообразного NO, приводившей к включению в кровь NO в миллимолярной концентрации [39]. При введении животным ДНКЖ с лигандами не-тиоловой природы в организме животных эти лиганды замещались эндогенным тиолами, так что эти ДНКЖ превращались в их аналоги с тиолсодержащими лигандами.

Предполагается, что при поступлении в кровь при ингаляции животным газового потока с высокой концентрацией NO (1000 ppm), наряду с поглощением NO гемоглобином часть его начала окисляться кислородом в диоксид азота (NO₂). В качестве спинового катализатора этого окисления – реакции, запрещенной по спине, – могли выступать имеющиеся в крови комплексы переходных металлов – негемового железа и меди. При высокой концентрации поступавшего в кровь NO и квадратичной зависимости скорости его окисления от концентрации образование NO₂ становилось высокоэффективным, так что оно и

могло обеспечивать превращение значительной части NO в реакции с NO₂ в катионы нитрозония.

Таким образом сопоставление вазодилаторной и гипотензивной активности экзогенного газообразного NO, с одной стороны, и экзогенных RS-NO и ДНКЖ, с другой стороны, показало существенно более высокую в дозовом отношении способность последних вызвать вазодилатацию и, как следствие этого, гипотензию у животных. Столь существенное различие позволяет предположить, что биологическая активность RS-NO и ДНКЖ вряд ли определяется их способностью высвобождать молекулы NO с последующим связыванием этих молекул с главной их биологической мишенью – гуанилатциклазой. Скорее всего, активация этого фермента осуществляется в результате непосредственного контакта его гемовой группы с RS-NO и ДНКЖ в их низкомолекулярной форме с последующим переносом молекулы NO из этих соединений на гемовую группу гуанилатциклазы. Другими словами, оксид азота оказывает соответствующее биологическое действие на живые организмы только в связанной форме – в форме ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами или RS-NO. По-видимому, внутри- и межклеточная среда в живых организмах достаточно агрессивна в отношении NO, что приводит к гибели молекул NO, «не успевших» включиться в соединения, «преодолевающие» эту агрессивность. В связи с этим как ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, так и RS-NO, возникающие в организме животных и человека, можно рассматривать в качестве «рабочей формы» оксида азота.

Провести аналогичное сопоставление биологической активности эндогенного NO и указанных его соединений (RS-NO и ДНКЖ) остается практически невозможным. Тем не менее, есть экспериментальное основание полагать, что NO, продуцируемый в свободной форме в организме животных и человека ферментативным путем в реакции окисления аминокруппы в гуанидиновом остатке L-аргинина, в подавляющей своей части *in vivo* включается в ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Это включение, как уже указано выше, обеспечивает стабилизацию NO и тем самым его перенос на значительные расстояния в тканях животных и человека с его доставкой к соответствующим мишеням биологического дей-

ствия. Аналогичным образом стабилизируется и доставляется к биологическим мишеням другой нитрозильный компонент ДНКЖ – катион нитрозония.

Для обнаружения эндогенных ДНКЖ мы использовали способность производных дитиокарбаматов ($R_2=N-CS_2$)⁻ перехватывать на себя железо-мононитрозильную группу из железо-динитрозильных фрагментов М- и Б-ДНКЖ с образованием, как это показано на схеме 3, ЭПР-детектируемых мононитрозильных комплексов железа с производными дитиокарбамата и высвобождением из ДНКЖ катионов нитрозония, образующих разнообразные RS-NO [40].

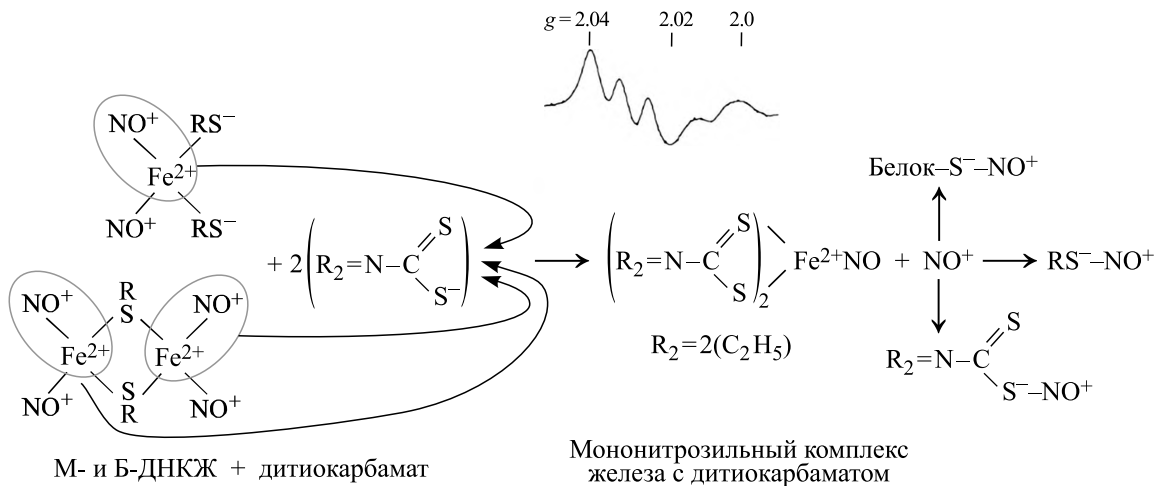


Схема 3. Превращение М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ-ДЭТК, сопровождаемое высвобождением в среду катиона нитрозония. В центре приведен триплетный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК, зарегистрированный при 77 К.

Для образования повышенного количества NO в организме мышей (главным образом в иммунокомпетентных клетках, например в печени) животным на 4 ч вводили бактериальный липополисахарид (ЛПС), индуцирующий синтез индуцибельной NO синтазы (iNOS), а затем этим животным на 30 мин вводили внутримышечно раствор комплекса Fe^{2+} -цитрата и внутривенно — диэтилдитиокарбамат натрия (ДЭТК). Возникающие в результате в организме мышей комплексы Fe^{2+} -ДЭТК улавливали весь эндогенный оксид азота, продуцируемый iNOS, что оценивалось по интенсивности триплетного сигнала ЭПР МНКЖ-ДЭТК (рис. 5, спектр 1). Другой группе мышей после ЛПС на 30 мин вводили комплекс Fe^{2+} -цитрата с последующим забоем животных и обработкой изолированной печени раствором ДЭТК (рис. 5, спектр 2). Третья группа мышей обрабатывалась как предыдущая, но вме-

сто $^{56}Fe^{2+}$ вводили $^{57}Fe^{2+}$. Четвертой группе мышей комплекс Fe^{2+} -цитрат не вводили [41].

Предполагалось, что во второй группе мышей эндогенный NO должен *in vivo* включиться в ДНКЖ с последующим *in vitro* превращением в МНКЖ-ДЭТК, что позволит, сопоставляя интенсивности сигналов 1 и 2, приведенных на рис. 5, оценить долю NO, включившегося *in vivo* в ДНКЖ.

Учитывая, что для образования одного железо-динитрозильного фрагмента, согласно приведенной выше реакции (1), требуется 3 молекулы NO, а для образования одного МНКЖ-ДЭТК — одна молекула NO, сопоставление интенсивностей спектров 1 и 2 на рис. 5 показало, что в ДНКЖ может включаться не менее 75% от общего количества эндогенного NO. Изменение формы спектра 3, обусловленного МНКЖ-ДЭТК, в результате появления СТС от ядра ^{57}Fe свиде-

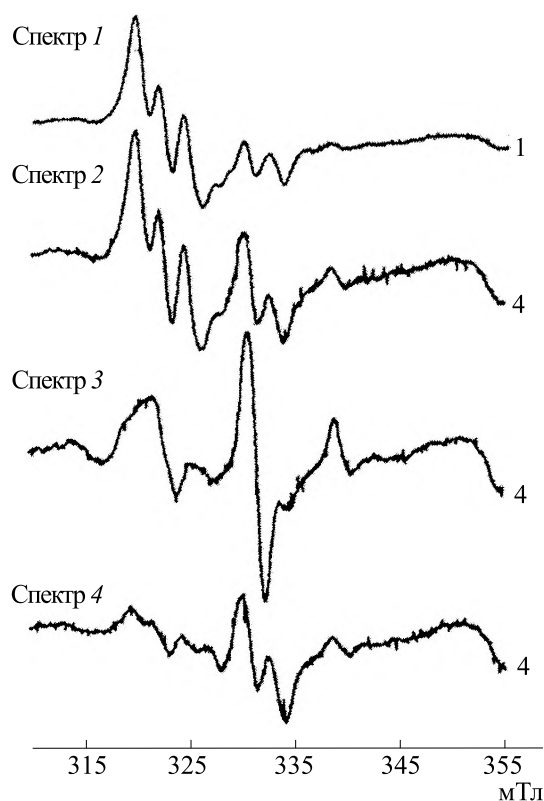


Рис. 5. ЭПР-спектры, зарегистрированные в печени мышей через 4 ч после их обработки бактериальным ЛПС с последующим введением им на 30 мин ДЭТК + Fe^{2+} -цитрата (спектр 1); через 4 ч после обработки мышей ЛПС им ввели на 30 мин Fe^{2+} -цитрат, а затем изолированную печень выдержали в растворе ДЭТК (спектр 2); то же самое, как при (2), но вместо $^{56}\text{Fe}^{2+}$ ввели $^{57}\text{Fe}^{2+}$ (спектр 3); то же самое, как при (2), но без введения Fe^{2+} -цитрата (спектр 4). Спектры зарегистрированы при 77 К. Справа указано усиление радиоспектрометра (в отн. ед.) [41].

тельствует о том, что вводившееся железо участвовало в образовании ДНКЖ при участии эндогенного NO с последующим его превращением в МНКЖ-ДЭТК. Слабая интенсивность спектра 4 на рис. 5 для МНКЖ-ДЭТК, полученных без введения животным железа, подтверждает это заключение.

Поскольку в печени, как и других органах мышей, обработанных ЛПС, не обнаружился сиг-

нал 2.03, характерный для М-ДНКЖ, есть основание полагать, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в организме этих животных были представлены преимущественно ЭПР-недектируемые Б-ДНКЖ. В соответствии с равновесным соотношением между М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами при понижении уровня тиолов в окружающей среде М-ДНКЖ переходят в Б-ДНКЖ (реакция (4)) [32]:



Поэтому преобладание последних в организме мышей, обработанных ЛПС, могло быть обусловлено снижением содержания в клеточной среде тиолов, возможно, в результате повышения окислительного потенциала в этой среде.

Итак, если эндогенно продуцируемые ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами действительно представляют собой эндогенную «рабочую форму» NO, обработка животных экзогенными ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами может дать представление о различных проявлениях ре-

гуляторной активности эндогенного NO как на уровне организма, так и на клеточных культурах и на ферментных системах. Перечень таких проявлений, обнаруженных различными исследователями, приводится в табл. 1.

Получить такое перечисление биологической активности эндогенного NO при изменении эффективности его синтеза в живых организмах или в клеточных культурах, по-видимому, не представляется возможным!

Таблица 1. Примеры регуляторного действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на живые организмы

№	Вид регуляторного действия	Источник
1	Мощное вазодилататорное и гипотензивное действие	[32, 42, 43]
2	Эффективное рано-заживляющее действие	[44]
3	Блокирование агрегации тромбоцитов (тромбоза)	[45]
4	Повышение эластичности эритроцитов	[46]
5	Повышение выживаемости животных при значительных кровопотерях	[47]
6	Мощная пенил-эректильная активность	[48]
7	Анти-апоптозное действие на клеточные культуры	[49]
8	Активация/подавление активности ряда генов	[50–53]
9	Защита миелиновой оболочки нейронов при воспалительных процессах в мозгу	[54]
10	Активация синтеза стрессорных белков	[55]
11	Антиоксидантное действие	[5]
12	Разрушительное действие на электрон-транспортные железосерные белки	[56]
13	Регуляция входа и выхода железа из клеток	[57]
14	Инициирование остео- и ангиогенеза	[58]
15	Уменьшение некротической зоны при экспериментальном инфаркте миокарда	[59]
16	Подавление токсического действия амилоидов на нейроны	[60]
17	Блокирование фиброзного перерождения тканей почек	[61]
18	Ингибирование глутатион-S-трансферазы	[62]
19	Усиление когнитивной способности животных	[63]
20	Стимуляция усвоения железа при заболевании пшеницы ржой	[64]

Как указывалось выше, ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами способны оказывать на биосистемы не только позитивное, регуляторное действие, но и в качестве доноров катионов нитрозония проявлять в отношении этих систем негативную, токсическую активность. Впервые эта активность была продемонстрирована английскими исследователями в их экспериментах на культуре фибробластов [65]. В качестве донора NO^+ они использовали нитропруссид натрия – $\text{Na}_2[(\text{CN})_5\text{Fe}^{2+}\text{NO}^+]$. Оказалось, что в дозовом отношении катионы нитрозония, высвобождающиеся из нитропруссидов натрия, в 40 раз более цитотоксичны, чем молекулы NO , введенные в культуральную среду либо в форме газообразного NO , либо в составе его доноров – GS-NO или $\text{S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина}$. При концентрации нитропруссидов натрия 20 мкМ катионы NO^+ вызывали апоптоз у 50% фибробластов уже через 2 часа после добавления нитропруссидов натрия, тогда как аналогичное действие на клетки молекулы NO при концентрации 800 мкМ оказы-

вали лишь через 24 ч после добавления в культуру газообразного NO или GS-NO и $\text{S-нитрозо-N-ацетил-L-цистеина}$ как доноров NO .

Вместе с тем следует отметить, что в этих экспериментах остался без ответа следующий вопрос: не было ли цитотоксическое действие нитропруссидов натрия обусловлено высвобождением из него анионов цианида? Более убедительные данные о цитотоксическом действии NO^+ были получены в работе [66] в экспериментах по одновременной обработке опухолевых клеток Jurkat человека M-ДНКЖ с тиосульфатом и производным дитиокарбамата – $\text{N-метил-D,L-глуксамин-дитиокарбаматом (МГД)}$. Оказалось, что при действии этой смеси эффективность цитотоксикоза существенно превышала суммарное действие M-ДНКЖ с тиосульфатом и МГД , рассчитанное при условии, что эти агенты не вступают в реакцию друг с другом. Между тем такая реакция, как показано на схеме 3, должна была иметь место и должна была приводить, с одной стороны, к образованию устойчивых MНКЖ-МГД , «выводящих

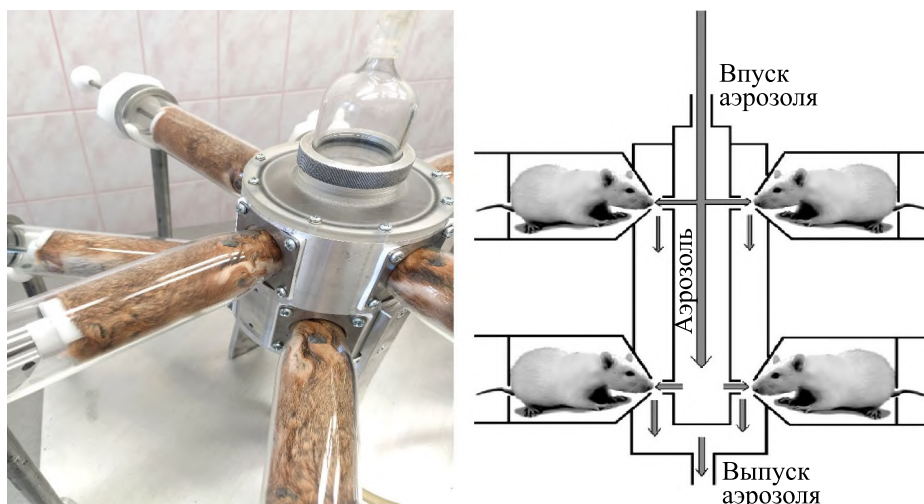


Рис. 6. (а) – Использованная в экспериментах «nose-only» камера для обработки сирийских хомячков распыленными растворами ДНКЖ и ДЭТК, (б) – общая схема этой камеры [69].

из игры» молекулы NO, исходно входившие в состав М-ДНКЖ с тиосульфатом, а с другой стороны – к высвобождению из этих комплексов катионов нитрозония, которые, очевидно, и оказывали, как полагают авторы, эффективное цитотоксическое действие на клетки Jurkat.

При этом следует отметить, что переход NO^+ из связанного в свободное состояние мог приводить перед их связыванием с тиолами к быстрому гидролизу этих катионов с их превращением во внутриклеточной среде в анионы нитрита. Этот процесс мог задерживаться связыванием NO^+ с анионами хлорида с образованием нитрозохлорида с последующим переходом NO^+ из этого соединения на тиолы, характеризующиеся существенно большим средством с катионами нитрозония по сравнению с анионами гидроксила или хлорида.

Подход с использованием производного дитиокарбамата для усиления цитотоксического действия ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами как донорами NO^+ был использован нами при изучении совместного влияния этих агентов на культуру опухолевых клеток MCF-7 человека [5] и бактерий *Escherichia coli* [67]. Обнаруженное в этих работах необычайно резкое, синергическое усиление цитотоксического действия ДНКЖ на эти биосистемы под влиянием производных дитиокарбамата (МГД и ДЭТК) свидетельствует о том, что именно катионы нитрозония – продукт одноэлектронного окисления оксида азота – могут определять цитотоксическое действие, обнаруживаемое в живых организмах, продуцирующих NO.

В этой связи естественным шагом была наша попытка проверить, не способны ли ДНКЖ с

тиолсодержащими лигандами подавить в присутствии производных дитиокарбамата размножение коронавируса SARS-CoV-2 *in vivo* – в организме животных? Проверить такую возможность в экспериментах на сирийских хомячках, инфицированных этим вирусом, согласились сотрудники Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора РФ (Кольцово, Новосибирская обл.).

Были проведены две серии экспериментов с последовательной аэрозольной обработкой (ингаляцией) сирийских хомячков растворами сначала Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH), а затем через 30 мин – ДЭТК в «nose-only» камере или «whole-body» камере [68, 69]. В первом случае распыленный раствор указанных соединений поступал животным только в нос (рис. 6), тогда как во второй камере все тело животного находилось в контакте с этим раствором. В обоих случаях такая ежедневная обработка в течение 4-х суток приводила к существенному ослаблению коронавиральной инфекции. Аналогичный результат был получен и в опытах с использованием только распыленного раствора Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-MSH), существенно менее стабильных, чем Б-ДНКЖ-GSH, без последующей ингаляции животным в «nose-only» камере ДЭТК [69]. Предполагалось, что из-за невысокой стабильности эти комплексы сами по себе (без ДЭТК) будут распадаться в организме хомячков с выделением катионов нитрозония. Степень коронавиральной инфекции оценивали по вирусной (РНК) нагрузке тканей носовой полости и легких, а также по титру вируса в этих тканях.

Результаты экспериментов на хомячках с использованием «nose-only» камеры представлены на рис. 7 и 8. Согласно этим результатам, показатели вирусной инфекции в носовой ткани и в легких

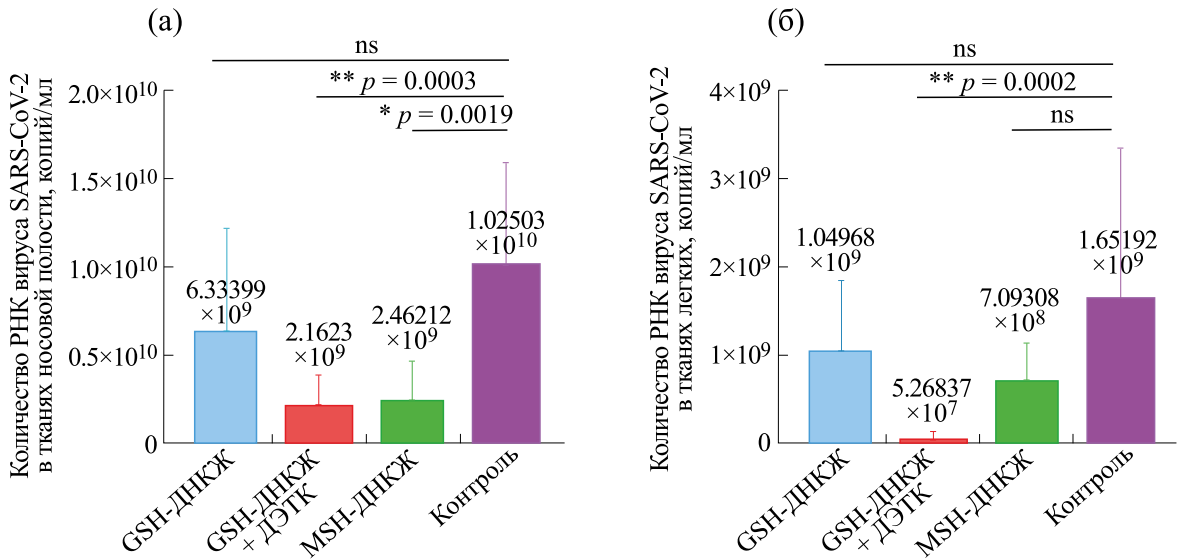


Рис. 7. Вирусная нагрузка в тканях полости носа и легких сирийских хомячков после интраназального заражения SARS-CoV-2. Гистограммы медианных значений пороговых циклов (Ct) в гомогенатах тканей носовой полости (а) и легких (б), в которых вершиной гистограммы представлены медианы, вертикальной линией – 95%-й доверительный интервал. * – Статистически значимое различие при $p < 0.05$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ** – статистически значимо при $p < 0.01$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ns (not significant) – незначимые различия [69].

снижались при обработке животных растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК, тогда как без ДЭТК противовирусный эффект Б-ДНКЖ-GSH был статистически недостоверным.

В отличие от Б-ДНКЖ-GSH, менее стабильный Б-ДНКЖ-MSH сам по себе оказывал проти-

вовирусный эффект только в носовой полости, сопоставимый с действием Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК. В ткани легких этот эффект был менее выраженным. По-видимому, до этой ткани из-за распада Б-ДНКЖ-MSH доходил в меньшем количестве, чем при непосредственном его поступлении в носовую полость.

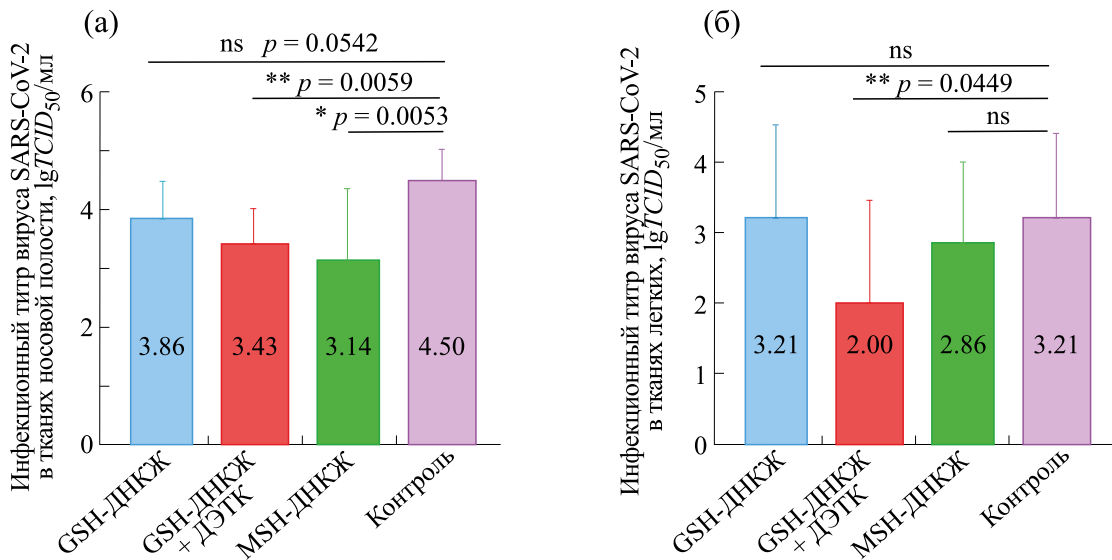


Рис. 8. Инфекционный титр в тканях полости носа и легких сирийских хомячков после интраназального заражения SARS-CoV-2. Гистограммы медианных значений инфекционных титров (lgTCID₅₀/мл) в гомогенатах тканей носовой полости (а) и легких (б), в которых вершиной гистограммы представлены медианы, вертикальной линией – 95%-й доверительный интервал. * – Статистически значимое различие при $p < 0.05$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ** – статистически значимо при $p < 0.01$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ns (not significant) – незначимые различия [69].

Характерно, что, в соответствии с результатами ЭПР-измерений тканей сирийских хомячков, парамагнитные М-ДНКЖ белковой природы обнаруживались при ингаляции животным растворов ДНКЖ только в ткани легких, но не в крови или печени, что свидетельствовало об их локализации только в тканях дыхательных путей. При этом концентрация белковых М-ДНКЖ в легких была на порядок выше при ингаляции хомячкам Б-ДНКЖ-GSH, чем при ингаляции им менее устойчивых Б-ДНКЖ-MSH.

Таким образом данные исследования показали, что, действительно, предложенный нами подход к подавлению коронавирусной инфекции, обусловленный атакой на SARS-CoV-2 катионов нитрозония, может оказаться полезным при создании лекарства против ковида-19. Поскольку главное свойство этих катионов — способность S-нитрозировать тиолы как низкомолекулярной, так и белковой природы, есть основание предполагать, что именно иницируемая этими катионами реакция S-нитрозирования разнообразных тиолсодержащих белков — протеаз, белков оболочки вируса, обратных транскриптаз, факторов транскрипции, а также протеаз хозяина — может обеспечить ослабление вирусной репликации в организме хозяина, защищая тем самым организм животных и человека от вирусной инфекции, вызываемой не только SARS-CoV-2, но и другими респираторными вирусами, например грипповирусом. Ранее, в 90-е годы XX века, мы сделали попытку совместно с сотрудниками Института гриппа (Санкт-Петербург, Россия) проверить действие М-ДНКЖ с цистеином на грипповирус в организме мышей. Использованный штамм такого вируса мог при определенной дозе вызывать 100% гибель животных. Эта гибель полностью снималась при внутривенном введении инфицированным мышам указанного комплекса. К сожалению, данный результат остался непубликованным.

В настоящее время получены данные, позволяющие предполагать, что репликация коронавируса SARS-CoV-2 в организме животных и человека может подавляться также в результате ингаляции потока газообразного NO с концентрацией 1000 ppm и выше [70–72]. Как указывалось выше, при такой ингаляции нейтральные молекулы NO, попадая через легкие в кровь, в значительной своей части трансформируются в ней в катионы нитрозония [37], которые, очевидно, и обеспечивали подавление ковидной инфекции, обнаруженное в работах [70–72]. Следует отметить также недавно

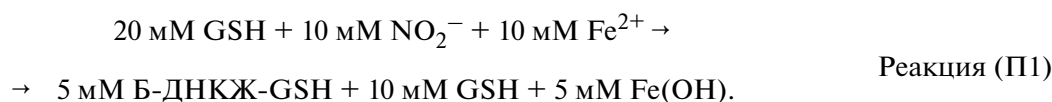
появившуюся публикацию, в которой сообщается о возможном благоприятном влиянии высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота на течение ВИЧ-заболевания у двух ВИЧ-инфицированных пациентов, прошедших сравнительно непродолжительный курс ингаляции NO при его высоком содержании (~1000 ppm) во вдыхаемом воздухе [73], а также благоприятных последствиях такой же терапии больных с пост-ковидным синдромом [74].

Таким образом можно говорить о двух возможных способах генерации катионов нитрозония, способных эффективно подавлять репликацию коронавируса в тканях респираторного тракта. Первый способ — введение в дыхательные пути животных и человека распыленных растворов ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, способными высвободить катионы нитрозония, в особенности при их распаде под действием производных дитиокарбамата. Второй способ — ингаляция животным и человеку газообразного NO, превращающегося в крови в катионы нитрозония.

ПРИЛОЖЕНИЕ

В заключение демонстрируем два примера синтеза Б-ДНКЖ-GSH по механизму, приведенному на схеме 2, с использованием GS-NO в качестве донора NO. Использование для этой цели самого газообразного NO не рекомендуем. Дело в том, что из-за реализации реакции диспропорционирования молекул этого газа в нем всегда имеется примесь диоксида азота, превращающегося при нейтральных значениях pH в анион нитрита. Неконтролируемое включение этого агента в синтезируемый препарат ДНКЖ может привести к артефактным результатам.

Пример 1. В дистиллированную воду последовательно добавляются глутатион (GSH, 20 mM), FeSO₄·7H₂O (10 mM) и затем NaNO₂ (10 mM). Первоначальное введение глутатиона приводит к подкислению раствора до pH 1.5–2.0, обеспечивающего полное растворение двухвалентного железа и постепенное образование (в течение 1.0–1.5 ч) GS-NO, иницируемое последующим добавлением нитрита. Раствор при этом приобретает малиновую окраску. После окончания процесса pH раствора добавлением капель крепкой щелочи (NaOH) повышается до величины 7.5–7.8, в результате чего начинается реакция образования Б-ДНКЖ-GSH по следующей суммарной реакции:



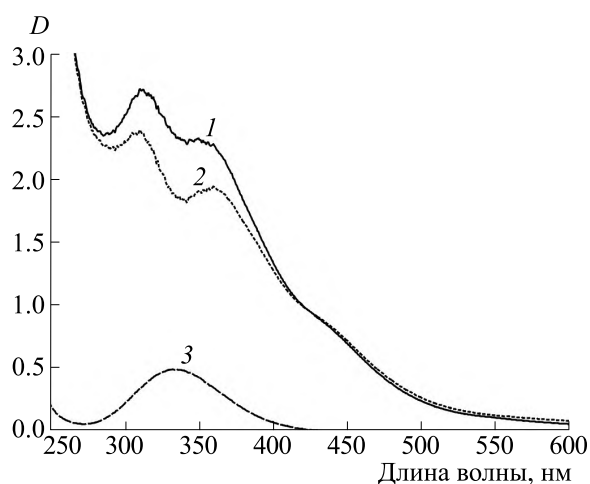


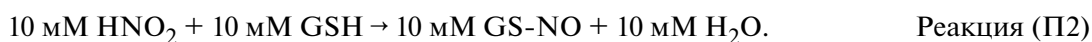
Рис. 9. Спектр 1 – суммарный спектр Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO, синтезированных по примеру 2. Спектр 2 – Спектр поглощения раствора Б-ДНКЖ-GSH, синтезированного по примеру 1. Спектр 3 получен вычитанием из спектра 1 спектра 2. Все растворы перед оптическими измерениями разбавлены в 10 раз.

Для окончания этого процесса требуется не менее 5–6 ч выдерживания раствора на воздухе при комнатной температуре. После этого гидроокисный осадок железа, не вступившего в реакцию, отфильтровывается на бумажном фильтре, а в очищенном от этого осадка растворе Б-ДНКЖ-GSH оптическим методом по интенсивности полосы поглощения на 360 нм ($\epsilon = 3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в оптическом спектре этого комплекса (рис. 9б) оценивается концентрация последнего (в пересчете на одну железо-динитрозильную группу в этом комплексе).

Полученный препарат Б-ДНКЖ-GSH с характерным для него невысоким соотношением кон-

центраций комплекса и свободного GSH (2 : 1) использовался нами в опытах по изучению токсического действия катионов нитрозония, выделявшихся из Б-ДНКЖ-GSH при их разрушении производными дитиокарбамата при двукратном превышении концентрации последних в отношении комплекса.

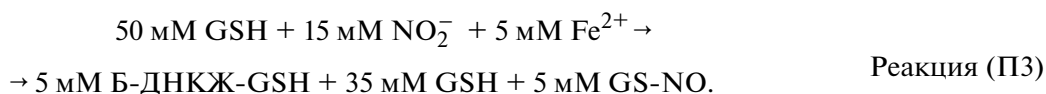
Максимальный уровень образующихся Б-ДНКЖ-GSH (5 мМ) при указанном соотношении реагентов лимитировался концентрацией нитрита. Весь он при взаимодействии с глутатионом по реакции (П2) в протонированной форме включался в образование GS-NO:



В соответствии со схемой 2 взаимодействие 10 мМ GS-NO с 5 мМ Fe^{2+} должно было приводить к образованию 5 мМ Б-ДНКЖ-GSH (в пересчете на одну железо-динитрозильную группу в этом комплексе).

Пример 2. В дистиллированную воду последовательно добавляются глутатион (50 мМ), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 мМ) и затем NaNO_2 (15 мМ). При таком соотношении концентраций реагентов

концентрация соли железа выступает в качестве лимитирующей образование Б-ДНКЖ-GSH. Далее процедура синтеза этого комплекса проводится так же, как описано выше в первом примере, за исключением того, что образование GS-NO в этом случае требует 15–20 мин и никакой гидроокисный осадок не должен возникать. Суммарная реакция образования 5 мМ Б-ДНКЖ-GSH (реакция П3) описывается как:



Из-за недостатка соли Fe^{2+} как лимитирующего образование Б-ДНКЖ-GSH реагента 5 мМ GS-NO сохраняются в растворе и из-за наложе-

ния их полосы поглощения на 334 нм несколько искажают форму спектра поглощения Б-ДНКЖ-GSH (рис. 9а). При вычитании из этого «иска-

женного» спектра «чистого» спектра 5 мМ раствора Б-ДНКЖ-GSH получаем полосу поглощения GS-NO, интенсивность которой при коэффициенте экстинкции $\epsilon = 940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ соответствует 5 мМ GS-NO.

Полученный таким образом препарат Б-ДНКЖ-GSH со сравнительно высоким соотношением концентраций комплекса и свободного GSH (7 : 1) использовался нами в опытах по изучению вазодилаторного и гипотензивного действия этих комплексов на животных и человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с сирийским хомячками и мышами проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18.III.1986). Неукоснительно соблюдались положения Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Washington D.C., 2011) и другие нормы международного права, регулирующие содержание и использование лабораторных животных с точки зрения гуманного обращения с животными и их рационального использования.

Автор подтверждает соблюдение национальных, и международных руководящих принципов по уходу и гуманному использованию животных. Все процедуры экспериментов *in vivo* были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (заявка ГНЦ ВБ «Вектор»/11-10.2023, утверждена протоколом БЭК № 8 от 31.10.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ignarro L., *Nitric oxide biology and pharmacology* (Acad. Press, Zurich, Switzerland, 2000).
- Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы — две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биологических системах. *Биохимия*, **63**, 924–938 (1998).
- Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами. *Физикохимия, биология, медицина* (Ижевский институт компьютерных исследований, Ижевск, 2015).
- Vanin A. F. *Dinitrosyl iron complexes as a "working form" of nitric oxide in living organisms* (Cambridge, Cambridge Scholar Publishing, UK, 2019).
- Shumayev K. B., Gubkin A. A., Serezhnikov V. A., Lobysheva I. I., Kosmachevskaya O. V., Topunov A. F., and Vanin A. F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **18**, 37–46 (2008). DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.085
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., and Palmer L.A. Physiological roles of S-nitrosylation. *Mol. Intervention*, **3**, 253–263 (2003). DOI: 10.1124/mi.3.5.253
- Zhang Y. and Hogg N. S-nitrosohemoglobin: a biochemical perspective. *Free Rad. Biol. Med.*, **38**, 947–958 (2005). DOI: 10.1016/J.Freeradbiomed.2004.12.016
- Seth D., Hess D. T., Hausladen A., Wang L., Wang Y-J., and Stamler J. S. A multiplex enzymatic machinery for cellular protein S-nitrosylation. *Mol. Cell*, **69**, 451–464 (2018). DOI: 10.1016/j.molcel.2017.12.025
- Mingos D. V. P. Historical introduction to nitrosyl complexes. *Structure & Bonding*, **153**, 15–44 (2014). DOI: 10.1007/43_2013_116
- Vanin A. F. Nitrosonium ions as a constituents of dinitrosyl iron complexes with glutathione responsible for their S-nitrosating activity. *Austin J. Anal. Pharm. Chem.*, **5**, 1109–1119 (2018). DOI: 10.26420/austinjnalpharmchem.2018.1109
- Melia T. P. Decomposition of nitric oxide at elevated pressure. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **27**, 95–98 (1965).
- Agnew S. F., Spansou B. I., and Jones L. H. Disproportionation of nitric oxide at high pressure. *J. Phys. Chem.*, **89**, 1678–1682 (1985).
- Vanin A.F. What is the mechanism of nitric oxide transformation into nitrosonium ions ensuring S-nitrosating processes in living organisms. *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 279–292 (2019). DOI: 10.1007/s12013-019-00886-1
- Liu Q., Yu K., and Yi P. Affinity of Fe^{2+} to nitric oxide in aqueous solutions. *Environment. Sci. Pollution Res.*, **28**, 19540–19550 (2019).
- Vanin A. F. How is nitric oxide (NO) converted into nitrosonium cation (NO⁺) in living organisms? (Based on the results of optical and EPR analysis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands). *Appl. Magn. Res.*, **51**, 851–876 (2020). DOI: 10.1007/s00723-020-01270-6
- Vanin A.F. Physico-chemistry of dinitrosyl iron complexes as a determinant of their biological activity. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10536 (2021). DOI: 10.3390/ijms22191035610.1007/s00723-020-01270-6
- Enemark J. H. and Feltham R. D. Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl. *Coord. Chem. Rev.*, **13**, 339–406. (1974). DOI: 10.1016/S0010-845(00)80259-3
- Vanin A. F., Sanina N. A., Serezhnikov V. A., Burbayev D. S., Lozinsky V. I., and Aldoshin S. M. Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands: spatial

- and electronic structures. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 62–73 (2007). DOI: 10.1016/j.niox.2006.07.005
19. Vanin A. F. and Aliev D. I. High spin nitrosyl non-heme iron complexes in animal tissues. *Studia Biofizika*, **93**, 63–68 (1983).
 20. Vanin A. F. and Burbaev D. Sh. Electronic and spatial structures of water-soluble dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands underlying their activity to act as nitric oxide and nitrosonium ion donors. *Biophys. J.*, **14**, 878236 (2011). DOI: 10.1155/2011/878236
 21. Налбандян Р. М., Ванин А. Ф. и Блюменфельд Л. А. В сб. *Тезисы Всесоюз. конф. «Свободнорадикальные процессы в биологических системах»* (М., 1964), с. 18.
 22. Ванин А. Ф. и Налбандян Р. М. Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках. *Биофизика*, **10**, 167–168 (1965).
 23. Ванин А. Ф., Блюменфельд Л. А. и Четвериков А. Г. Исследование методом ЭПР комплексов негеминного железа в клетках и тканях. *Биофизика*, **12**, 829–858 (1967).
 24. Ванин А. Ф. Идентификация комплексов двухвалентного железа с цистеином в биологических системах. *Биохимия*, **60**, 226–232 (1995).
 25. Vanin A. F., Papina A. A., Serezhenkov V. A., and Koppenol W. The mechanism of S-nitrosothiol decomposition catalyzed by iron. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **10**, 60–73 (2004). DOI: 10.1016/j.niox.2004.02.005
 26. Truzzi D. R., Augusto O., and Ford P. C. Thiyl radicals as co-product of dinitrosyl iron complex (DNIC) formation. *Chem. Comm.*, **55**, 9156–9159 (2019). DOI: 10.1039/c9cc04454j
 27. Truzzi D. R., Medeiros N. M., Augusto O., and Ford P. Dinitrosyl iron complexes (DNICs). From spontaneous assembly to biological roles. *Inorg. Chem.*, **60**, 15835–15845 (2021). DOI: 10.1021/acs.inorgchem.1c00823
 28. Vanin A. F. The free-radical nature of nitric oxide molecules as a determinant of their conversion to nitrosonium cations in living systems. *Biophysics*, **65**, 353–367 (2020). DOI: 10.1134/S0006350920030239
 29. Ванин А. Ф. и Ткачев Н. А. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как источники универсальных цитотоксинов – катионов нитрозония *Биофизика*, **68** (3), 421–434 (2023). DOI: 10.1134/S0006302923030018
 30. Ванин А. Ф. Позитивное (регуляторное) и негативное (цитотоксическое) действие динитрозильных комплексов железа в живых организмах. *Биохимия*, **87**, 1737–1760 (2022). DOI: 10.1134/S0006297922110153
 31. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как функционально активная, «рабочая» форма системы оксида азота в живых организмах (обзор). *Молекуляр. биология*, **57** (6), 925–937 (2023). DOI: 10.31857/S0026898423060204, EDN: QLHGFC
 32. Vanin A. F., Poltorakov A. P., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., and Burbaev D. S. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **23**, 136–147 (2010). DOI: 10.1016/j.niox.2010.05.285
 33. Vanin A. F., Malenkova I. V., and Serezhenkov V. A. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic studies. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 1991–2003 (1997). DOI: 10.1006/niox.1997.0122
 34. Borodulin R. R., Kubrina L. N., Mikoyan V. D., Poltorakov A. P., Shvydkiy V. O., Burbaev D. S., Serezhenkov V. A., Yakhontova E. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO⁺ donors. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **29**, 4–16 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2012.11.001
 35. Hickok J. R., Sahni S., Shen H., Arvindt A., Antoniou C., Fung L. W. M., and Thomas D. D. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: biological parameters of assembly and disappearance *Free Rad. Biol. Med.*, **51**, 1558–1566 (2011). DOI: 10/1016/j/reeradbiomed.2011.06.030
 36. Vedernikov Y. P., Mordvintcev P. I., Malenkova I. V., and Vanin A. F. Similarity between the vasorelaxing activity of dinitrosyl iron cysteine complexes and endothelium-derived relaxing factor. *Eur. J. Pharmacol.*, **211**, 313–317 (1992). DOI: 10.1016/0014-2999(92)90386-i
 37. Ванин А. Ф., Абрамов А. А., Вагапов А. Б., Тимошин А. А., Пекшев А. В., Лакомкин В. Л. и Рууге Э. К. Почему вдыхание газообразного оксида азота не влияет на системное артериальное давление у человека и животных? *Биофизика*, **68**, 1259–1264 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923060170
 38. Chazov E. I., Rodnenkov O. V., Zorin A. V., Lakomkin V. L., Gramovich V. V., Vyborov O. N., Dragnev A. G., Timoshin A. A., Buryachkovskaya L. I., Abramov A. A., Massenko V. P., Arzamastsev E. V., Kapelko V. I., and Vanin A. F. Hypotensive effect of “Oxacom” containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **26**, 147–157 (2012). DOI: 10.1016/j.niox.2012.01.008
 39. Ванин А. Ф., Пекшев А. В., Вагапов А. Б., Шарапов Н. А., Лакомкин В. Л., Абрамов А. А., Тимошин А. А. и Капелько В. И. Газообразный оксид азота и динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как предполагаемые лекарственные средства, способные купировать Covid-19. *Биофизика*, **66**, 1283–1294 (2021). DOI: 10.1134/S0006350921010218
 40. Vanin A. F., Tronov V. A., and Borodulin R. R. Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF-7 human breast cancer cell culture). *Cell Biochem. Biophys.*, **79**, 93–102 (2021). DOI: 10.1007/s12013-020-00962-x
 41. Mikoyan V. D., Burgova E. N., Borodulin R. R., and Vanin A. F. The binuclear form of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in animal tissues. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **62**, 1–10 (2017). DOI: 10.1016/j.niox.2016.10.007

42. Галаган М. Е., Орановская Е. В., Мордвинцев П. И., Медведев О. С. и Ванин А. Ф. Гипотензивный эффект динитрозильных комплексов железа в опытах на бодрствующих животных. *Бюл. Всесоюз. кардиол. науч. центра*, **2**, 73–79 (1988).
43. Vanin A. F., Mokh V. P., Serezhenkov V. A., and Chazov E. I. Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **16**, 322–330 (2007). DOI: 10.1016/j.niox.2006.12.003
44. Shekhter A. B., Rudenko T. G., Istranov L. P., Guller A. E., Borodulin R. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating wound healing. *Eur. J. Pharmacol.*, **78**, 8–18 (2015). DOI: 10.1016/j.ejps.2015.06/002
45. Мордвинцев П. И., Руднева В. Г., Ванин А. Ф., Шимкевич Л. Л. и Ходоров Б. И. Ингибирующее действие динитрозильных комплексов железа с низкомолекулярными лигандами на агрегацию тромбоцитов. *Биохимия*, **51**, 1861–1866 (1986).
46. Шамова Е. Б., Бичан О. Д., Дрозд Е. С., Горудко И. В., Чижик С. А., Шумаев К. Б., Черенкевич С. Н. и Ванин А. Ф. Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами оксида азота. *Биофизика*, **56**, 265–271 (2011). DOI: 10.1134/S0006350911020278
47. Remizova M. I., Kochetygov N. I., Kerbut K. A., Burgova E. N., and Vanin A. F. Effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, **662**, 40–46 (2011). DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.04/046
48. Andreev-Andriyevsky A. A., Mikoyan V. D., Serezhenkov V. A., and Vanin A. F. Penil-erectile activity of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **24**, 217–223 (2011). DOI: 10.1016/j.niox.2011.04.008
49. Kim Y. M., Chung H. T., Symmons R. L., and Billiar T. Cellular nonheme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10954–10961 (2000).
50. Ding H. and Demple B. Direct nitric oxide transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5146–5150 (2000).
51. Васильева С. В., Ступакова М. В., Лобышева И. И. и Ванин А. Ф. Активация SoxRS-регулона в *Escherichia coli* оксидом азота и его физиологическими донорами. *Биохимия*, **66**, 1209–1214 (2001).
52. Crack J. C., Smith J., Stapleton M., Peck J., Watmough N. J., Buttner M., Duxton R. S., and Green J. Mechanistic insight into the nitrosylation of the [4Fe-4S] cluster in WhiB-like proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 1112–1121 (2011). DOI: 10.1021/ja109581t
53. Lo F. C., Lee J. F., Liaw W. F., Hsu T. J., Tsai Y. F., Chan S. I., and Yu S. F. The metal core in the recombinant *Escherichia coli* transcriptional factor SoxR. *Chem. Eur. J.* **128**, 2565–2577 (2012). DOI: 10.1002/chem.2011.00838
54. Lepka K., Volbracht K., Bill E., Schneider R., Rios N., Hildebrandt T., Ingwersen J., Prozorovski T., Lillig C. H., van Horssen J., Steinman L., Hartung H.-P., Radi R., Holmgren A. S., and Aknas O. Iron-sulfur glutaredoxin 2 protects oligodendrocytes against damage induced by nitric oxide release from activated microglia. *Glia*, **65**, 1521–1534 (2017). DOI: 10.1002/glia.23178
55. Wiegant F. A. C., Malyshev I. Y., Kleschyov A. L., Van Faassen E., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as inductor of heat shock protein synthesis in H35 hepatoma cells. *FEBS Lett.*, **455**, 179–182 (1999).
56. Voevodskaya N. V., Serezhenkov V. A., Cooper C. E., and Vanin A. F. Exogenous ferrous ion is required for the nitric oxide-catalyzed destruction of the iron-sulfur center in adrenodoxin. *Biochem. J.*, **368**, 633–639 (2002). DOI: 10.1042/BJ20020788
57. Richardson D. R. and Lock H. C. The nitric oxide-iron interplay in mammalian cells: transport and storage of dinitrosyl iron complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 638–651 (2008). DOI: 10.1016/bbagen.2007.12.009
58. Chang S.-H., Hsiao Y.-J., Chen Y.-H., Cheng M.-H., Liu J.-W., Huang H.-J., Chou Y.-T., Amer Y. A. M., Vijayarghavan P., Palanisamy S., Wang Y.-M., and Lu T.-T. Conjugation of bone grafts with NO-delivery dinitrosyl iron complexes promotes synergistic osteogenesis and angiogenesis in rat calvaria bone defects. *J. Mater. Chem.*, **11**, 807–819 (2023). DOI: 10.1039/d3tb00587a
59. Писаренко О., Серебрякова Л. И. и Цкитишвили Ш. В. Кардиозащитное действие динитрозильных комплексов железа с цистеином у крыс. *Изв. РАН. Сер. биол.*, **1**, 110–114 (2008).
60. Chuang W.-H., Chou Y.-T., Chen Y.-T., Kuo T.-H., Liaw W.-F., Lu T.-T., Kao C.-F., and Wang Y.-M. Neuroprotective effect of NO-delivery dinitrosyl iron complexes (DNICs) on pathology in the Alzheimer's disease cell model. *ACS Chem. Neurosci.*, **14**, 2922–2937 (2023). DOI: 10.1021/acscchemneuro.3c00348
61. Lee T. Y., Lu H. H., Cheng H. T., Huang H. C., Tsai Y. J., Chang I. H., Tu C. P., Chung C. W., Lu T. T., and Chen Y. Delivery of nitric oxide with pH-responsive nanocarrier for the treatment of renal fibrosis. *J. Controlled Release*, **354**, 417–429 (2023). DOI: 10.1016/j.jconrel.2922.12.059
62. Keese M. A., Bose M., Muelsch A., Schrimmer R. H., and Becker K. Dinitrosyl-dithiol-iron complexes, nitric oxide (NO) carriers *in vivo*, as potent inhibitors of human glutathione reductase and glutathione-S-transferase. *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 1307–1313 (1997). DOI: 10.1016/S0006-2952(97)00348-1
63. Wu C. R., Huang Y. D., Hong Y. H., Liu Y.-H., Narwane M., Chang Y. H., Dinh T. K., Hsieh H. T., Hseuh Y. J., Wu P. C., Pao C. W., Chan T. S., Hsu I. J., Cheng Y., Chen H. C., Chin T. Y., and Lu T. T. Endogenous conjugation of biomimetic dinitrosyl iron complex with protein vehicles for oral delivery of nitric oxide to brain and activation of hippocampal neurogenesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1** (7), 998–1013 (2021). DOI: 10.1021/jacsau.1c00160

64. Graziano M. and Lamattina L. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. *Trends Plant Sci.*, **10**, 4–8 (2005). DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03283x
65. Khan S., Kayahara M., Joashi U., Mazarakis N. D., Saraff S., and Huges M. Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and nitrosonium cation. *J. Cell Sci.*, **110**, 2315–2322 (1997). DOI: 10.1242/jcs.110.18.2315
66. Kleschyov A. L., Strand S., Schmitt S., Gottfried D., Skatchkov M., Daiber A., Umansky V., and Munzel T. Dinitrosyl-iron triggers apoptosis in Jurkat cells despite overexpression of Bcl-2. *Free Rad. Biol. Med.*, **40**, 1340–1348 (2006). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.001
67. Ванин А. Ф., Телегина Д. И., Микоян В. Д., Ткачев Н. А. и Васильева С. В. Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов. *Биофизика*, **67**, 938–946 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922050207
68. Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Пьянков О. В., Багрянская Е. Г. и Попкова В. Я. Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка. *Биофизика*, **67**, 969–981 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050167
69. Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Ткачев Н. А. и др. Противовирусное действие в отношении SARS-CoV-2 растворов динитрозильных комплексов железа при их ингаляции сирийским хомячком в «nose-only» камере. *Биофизика*, **68** (6) (2024) (в печати).
70. Чернеховская Н. Е., Хивренко Л. А., Андреев В. Г., Пекшев А. В., Поваляев А. В. и Степанова В. В. Оксид азота в комплексном лечении и профилактике осложнений при COVID-19. *Госпитальная медицина: Наука и практика*, **5**, 41–45 (2022). DOI: 10.34852/GM3CVKG.2022.15.31.008
71. Печёнкин Е. В., Коврижкин А. В., Пекшев А. В., Вагапов А. Б., Шарапов Н. А. и Ванин А. Ф. Высокодозовая ингаляция газообразного оксида азота в лечении COVID-19. *Биофизика*, **67**, 1251–1261 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922060185
72. Каменщиков Н. О., Кузнецов М. С., Дьякова М. Л., Подоксёнов Ю. К., Калашникова Т. П., Тё М. А., Чурилина Е. А. и Козлов Б. Н. Ингаляционная терапия комбридного пациента с COVID-19 высокими дозами оксида азота: клинический случай. *Клинические случаи*, **37**, 180 (2022). DOI: 10.29001/2073-8552-2022-37-4-180-187
73. Пекшев А. В., Вагапов А. Б., Шарапов Н. А. и Ванин А. Ф. Высокодозовая ингаляция газообразного оксида азота при ВИЧ-инфекции. *Биофизика*, **68** (5), 1074–1080 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923050289
74. Ванин А. Ф., Пекшев А. В., Печёнкин Е. В., Вагапов А. Б. и Шарапов Н. А. Терапевтическое действие высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота на постковидный синдром, диабет и ВИЧ инфекцию. *Биофизика*, **68**, 142–149 (2023). DOI: 10.31857/0006302923010167

Mechanisms of the Formation and Function of Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms

A.F. Vanin*

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

It has been proposed that only the introduction of endogenous nitric oxide (NO) into dinitrosyl iron complexes (DNIC) or S-nitrosothiols (RS-NO) can ensure stabilization of NO that is critical for operating in an auto/paracrine manner as a regulator of biological processes in living organisms. Without this introduction, the majority of endogenous NO disappears due to aggressive intra/intercellular environment thereby eliminating it from metabolic processes. Administration of exogenous NO in human and animal organisms (the only possible route of administration is via inhalation when it is in the gaseous state) does not lead to formation of DNIC or RS-NO in blood or other tissues. Hence, the majority of exogenous NO during its inhalation is converted into nitrosonium cations (NO⁺), the emergence of which is evidenced by their conversion into RS-NO when various thiol-containing compounds are administered to animal blood concomitantly. In turn, RS-NO formation in those animals was manifested by hypotensive effect on them. NO molecule transformation into nitrosonium cations may also occur during DNIC formation induced by a disproportionation reaction of endogenous NO molecules binding with Fe²⁺ ions in pairs. Subsequent binding of Fe(NO)₂ groups to thiol-containing ligands that occur during this reaction promotes formation of rather stable DNICs that act as donors of both neutral molecules of NO and nitrosonium cations (NO⁺) in living organisms. The transfer of NO and NO⁺ to targets for nitrosation reactions occurs by the interaction of low molecular DNICs with heme groups of heme-containing proteins (for example, guanylate cyclase) or thiol groups in low molecular or protein thiol-containing compounds. This paper presents different results of NO and NO⁺ transfer in living organisms discussing both positive, regulatory and negative, toxic effects of it.

Keywords: nitric oxide, nitrosonium cation, dinitrosyl iron complex, S-nitrosothiol, disproportionation reaction

ПОВЕДЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ПРОСТЕЙШИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СОТОВЫХ ТЕЛЕФОНОВ

© 2024 г. Л.А. Морозова*.,# , С.В. Савельев*

*Фрязинский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН,
пл. Введенского, 1, Фрязино Московской области, 141190, Россия

#E-mail: mila-morozova.ludmila@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.01.2024 г.

После доработки 08.02.2024 г.

Принята к публикации 14.02.2024 г.

Впервые экспериментально исследован эффект значимого изменения сопротивления водной среды популяции простейших микроорганизмов под действием электромагнитного излучения сотовых телефонов. Результаты эксперимента демонстрируют биологический характер изменений, происходящих в системе «вода—популяция простейших», что говорит о выходе воздействия излучения непосредственно на клетку. Такой вывод подтверждается одинаковым по порядку величины временем обмена информацией между отдельными особями популяции при расчете и в эксперименте. Установлена предельно малая концентрация простейших в эксперименте, равная 1000 шт./литр, при которой наблюдается указанный эффект. Сделан вывод, что представленный метод изменения физических свойств водной среды популяции простейших при действии электромагнитных полей может быть применен при выявлении механизмов взаимодействия биологических систем с электромагнитным излучением.

Ключевые слова: сотовый телефон, электромагнитное поле, популяция простейших микроорганизмов, сопротивление водной среды.

DOI: 10.31857/S0006302924050141, EDN: MJICEO

Воздействие электромагнитного поля (ЭМП), определяемого современными гаджетами, все значительнее влияет на жизнь человека [1]. Понимание этого мотивирует проведение исследований по глубине и значительности этого воздействия [2]. Именно поэтому возникает задача об определении критериев, характеризующих воздействие ЭМП современных мобильных устройств, которые бы позволили в реальном времени вести наблюдение за изменением состояния живого организма при внешнем воздействии электромагнитного излучения.

Сотовый телефон, являясь приемо-передающим устройством мобильного типа, присутствует в жизни каждого современного человека. Излучаемые такими гаджетами электромагнитные поля (ЭМП) создают практически непрерывный общий электромагнитный фон (ЭМФ), в котором живет современный человек. Действие на живые организмы этого ЭМФ, усиленного личными гаджетами, достаточно заметно и отражено в на-

учной литературе (см., например, работы [3–5]). Последствиями могут являться не только нарушения функциональной деятельности, но и генетические изменения в клетках – мутации. Мутации в соматических клетках могут быть причиной онкологических и аутоагрессивных заболеваний, снижения иммунитета, преждевременного старения и т.д. Мутации в половых клетках могут не сказаться на здоровье человека, подвергнувшегося мутагенному воздействию, однако они будут переданы следующему поколению. Следствием этого могут быть различные наследственные болезни, врожденные пороки развития, снижение физического и психического здоровья [3, 4]. Так, в эксперименте с использованием корневых меристем *Allium cepa* было установлено, что модулированное в режиме разговора излучение сотового телефона индуцирует в делящихся клетках хромосомные мутации и микроядерные мутации в неделящихся клетках. Была обнаружена кумуляция мутагенного эффекта. Так, при ежедневной экспозиции в один час (*Allium cepa* выращивали три дня – суммарное облучение 3 ч) частота мутаций повышается в 5 раз по сравнению со

Сокращения: ЭМП – электромагнитное поле; ЭМФ – электромагнитный фон.

спонтанным (естественным) уровнем. При ежедневной трехчасовой (суммарно 9 часов) экспозиции уровень мутаций возрастал в 7 раз [3]. Кроме того, воздействие сотовых телефонов может резко снизить выработку гормона мелатонина, благодаря которому человек погружается в сон [6].

Обзор проведенных исследований показывает, сколь значимым и разносторонним может быть влияние сотовых телефонов на биологические организмы. Однако стоит отметить, что эти исследования являю собой сбор статистических данных о результатах действия ЭМП сотовых телефонов при исследовании изменений жизнедеятельности биологических организмов с их последующим методическим обобщением, что с необходимостью требует задействования больших временных ресурсов и трудовых затрат и при этом не решает задачу об определении механизмов действия внешних ЭМП на состояние организма человека.

В связи с этим возникает вопрос о создании метода исследования влияния ЭМП сотового телефона на биологические объекты, который позволял бы в реальном времени проводить оценку такого влияния в зависимости от расстояния, длительности и частоты воздействия. Важным является наличие значимых физических и биологических характеристик метода, которые можно измерить в эксперименте, что позволит провести сравнение воздействия различных современных гаджетов.

В работах [7, 8] впервые установлен и исследован эффект изменения сопротивления водной среды популяции простейших микроорганизмов под действием ЭМП сантиметрового, миллиметрового и терагерцового диапазонов длин волн нетепловой интенсивности, интегральная мощность которых по порядку величины составляла 1 мВт/см^2 . Экспериментально было показано, что при коротких, порядка 1 мин, временах облучения сопротивление водной среды популяции простейших уменьшалось на величину порядка 0.1% от общего значения сопротивления водной среды. При этом уменьшение сопротивления наблюдалось через время порядка 10 мин после облучения, что указывало на биологический характер наблюдаемых изменений. В работах [7, 8] было установлено, что полный цикл изменений сопротивления водной среды популяции микроорганизмов при полутораминутном действии сантиметрового, миллиметрового или терагерцового ЭМИ включает 4 этапа изменения сопротивления водной среды: 1) этап неизменного сопротивления водной среды, 2) этап уменьшения сопротивления, 3) этап неизменного сопротивления со значением ниже первоначального сопротивления водной среды, 4) этап увеличение со-

противления водной среды до первоначального уровня. Длительность всего цикла отклика популяции простейших микроорганизмов от момента начала облучения до момента восстановления сопротивления популяции водной среды составляла в экспериментах 20–60 мин в зависимости от физических параметров воздействующего ЭМП, что также указывало на биологический характер наблюдаемых явлений. Описанный отклик популяции микроорганизмов в воде наблюдался при концентрации простейших от 1000 до 5000 шт./литр.

Частотный диапазон мобильной связи в зависимости от стандарта телефона составляет 453–1800 МГц. Мощность излучения является величиной переменной, зависящей в значительной степени от состояния канала связи «мобильный радиотелефон – базовая станция», более высокому уровню сигнала базовой станции в месте приема соответствует меньшая мощность излучения сотового телефона. Максимальная мощность сотовых аппаратов находится в границах 0.125–1 Вт. Однако мобильные телефоны, в том числе стандарта GSM, осуществляют передачу информации импульсами, что значительно уменьшает интегральную мощность выходного сигнала телефона. Средняя мощность ЭМП современных сотовых телефонов находится в диапазоне от 1 мкВт до 10 мВт в зависимости от стандарта, дальности до сотовой станции, режима его работы на данный момент времени.

Как указывалось в работах [9, 10], биологические эффекты, возникающие при действии ЭМП нетепловой интенсивности, могут наблюдаться в живых организмах при высоком разбросе интегральной мощности воздействующего излучения, составляющем несколько порядков. Исходя из этой предпосылки, можно ожидать аналогичный описанному выше отклик популяции простейших микроорганизмов при воздействии сотовых телефонов.

В настоящей работе на примере амёб *Entamoeba gingivalis* экспериментально исследуется отклик популяции простейших микроорганизмов в виде изменения сопротивления водной среды в системе «вода – обитающая в воде популяция простейших» при воздействии сотовых телефонов различной мощности при концентрации микроорганизмов 2000 шт./литр.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Схема экспериментальной установки по измерению сопротивления воды в системе «вода – обитающая в воде популяция простейших» при постоянном внешнем напряжении представлена на рис. 1. Кювета с водой / используется в качестве плеча мостовой схемы. Значения постоян-

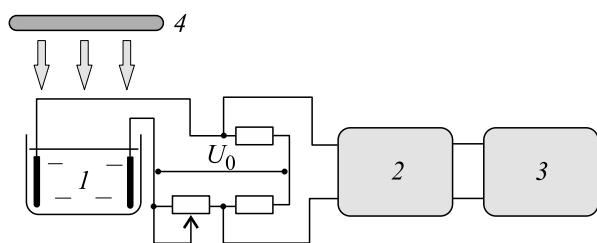


Рис. 1. Схема установки измерения проводимости воды: 1 – кювета с водой и популяцией простейших, 2 – усилитель-преобразователь, 3 – графопостроитель, 4 – сотовый телефон.

ных сопротивлений равнялись 10 кОм, значение переменного сопротивления составляло 15 кОм. Изменение сопротивления воды в кювете приводило к возникновению напряжения разбаланса мостовой схемы, которое преобразовывалось усилителем 2 и регистрировалось в качестве временной диаграммы на графопостроителе 3, осуществлявшего графическую фиксацию изменения напряжения при однократной длительности развертки графопостроителя в течение 70 мин. Значение постоянной времени измерительной цепи составляло 5 с, что при чувствительности установки $5 \cdot 10^{-2} \%$ /см позволяло регистрировать процессы только большой длительности. Напряжение $U_0 = 20$ В.

Разработанная методика эксперимента гипотетически базировалась на возможности фиксации отклика системы «вода – популяция простейших» в виде изменения параметров водной среды при внешнем воздействии ЭМП. Действительно, согласно концепции популяционного гомеостаза [11], внутривидовые отношения простейших обязаны обеспечивать единство популяции за счет действия популяции на воду как среду своего обитания. Тогда воздействие ЭМП на популяцию простейших должно приводить к изменению параметров воды за счет взаимного влияния «вода – обитающая в воде популяция». В эксперименте использовали популяцию амёбы *Entamoeba gingivalis* при концентрации амёб 2000 шт./литр в фазе замедления роста численности популяции. Концентрацию амёб фиксирова-

ли до и после проведения каждого эксперимента путем измерения в камере Горяева с гарантированной точностью 10%. Эта концентрация оставалась неизменной во течение всего контролируемого времени.

Преимущество популяции амёбы *Entamoeba gingivalis* при постановке модельных экспериментов состоит в широком интервале условий ее развития и существования, включая нормальные условия. Популяция характеризуется способностью быстрого роста и обмена веществ, что является несомненной прерогативой по сравнению с другими простейшими. Кроме того, важным показателем является устойчивость популяции к изменениям внешней среды и присутствию других одноклеточных, что повышает достоверность экспериментов. Также важной характеристикой является схожесть обменных процессов в популяции амёбы *Entamoeba gingivalis* с высшими животными.

Температура водной среды популяции амёбы *Entamoeba gingivalis* составляла 22°C во всех экспериментах и определялась температурой воздуха в лаборатории. Атмосферное давление составляло 434 мм рт. ст. Во время проведения всех экспериментов отклонение от указанных значений не превышало 5%.

Для проведения экспериментов были использованы 3 типа сотовых телефонов с различной выходной мощностью, названия моделей и их максимальная выходная мощность представлены в табл. 1.

Эксперименты проводили в 2 этапа. Первый этап соответствовал пассивному режиму сотовых телефонов в режиме ожидания вызова, второй этап проводили при активном состоянии сотовых телефонов в режиме разговора.

Воздействие сотовых телефонов на популяцию простейших. Указанные в табл. 1 сотовые телефоны в соответствии с параметрами базовой станции принимали и передавали сигнал, как в большинстве населенных пунктов Российской Федерации, в стандарте 3G диапазона UMTS 2000. Телефоны работали в стандарте МТС UpLink в диапазоне частот 1950–1965 МГц, DownLink – 2140–2155 МГц, то есть на популяцию простейших воздействие внешнего электромагнитного сигнала телефонов происходило на частотах ЭМП в пределах 1950–1965 МГц.

Расстояние от сотового телефона до поверхности водной среды с популяцией простейших микроорганизмов в эксперименте составляло 35 мм.

На рис. 2 представлена кривая изменения сопротивления водной среды популяции простейших при действии телефона Purism Librem 5 в пассивном и активном режимах. Действие телефона на популяцию происходит в промежуток времени между точками 1 и 2. Результат отклика

Таблица 1. Сотовые телефоны, использованные в эксперименте

Модель сотового телефона	Максимальная выходная мощность, Вт
Purism Librem 5	0.23
Fairphone 3	0.38
Pine64 PinePhone	0.46

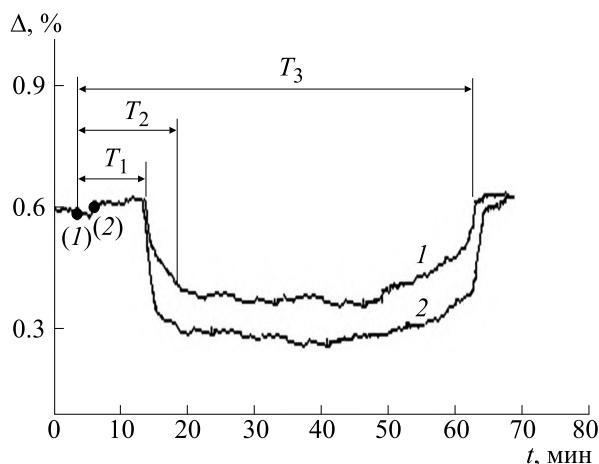


Рис. 2. Зависимость сопротивления водной среды популяции простейших от времени при действии сотового телефона Purism Librem 5 в пассивном (кривая 1) и активном (кривая 2) режимах работы.

популяции простейших микроорганизмов на действие телефона можно разделить на 3 этапа, различающиеся своими временными интервалами. Ход кривых на рис. 2 демонстрирует, что сначала действие излучения телефона характеризовалось переходным процессом с длительностью $T_1 = 13$ мин. от начала облучения с практически неизменным сопротивлением воды. Далее сопротивление начинало уменьшаться при достижении минимального значения $\Delta = 0.33\%$ через $T_2 = 17$ мин. Значение сопротивления воды восстанавливалось через $T_3 = 60$ мин. от начала воздействия ЭМП. Ход кривых, отражающих действие излучения телефона, показывает, что влияние телефона на популяцию простейших значительно зависит от режима работы телефона. Так, более сильное облучение при активном режиме характеризуется более значительным, на 20%, уменьшением сопротивления водной среды (кривая 2), хотя сам процесс отклика популяции простейших определяется аналогичными пассивному воздействию временными интервалами.

На рис. 3 представлен отклик популяции простейших на телефон Fairphone 3 при работе в пассивном и активном режимах.

Как и в предыдущем эксперименте, воздействие излучения сотового телефона на популяцию производилось во временном интервале между точками 1 и 2. Динамика изменения водной среды и в этом случае демонстрировала такой же ход кривых изменения сопротивления, как на рис. 2. Рисунок 3 показывает, что характерные времена T_1 , T_2 и T_3 в случае воздействия излучения от телефона Fairphone 3 такие же, как при воздействии от телефона Purism Librem 5. Однако максимумы изменений сопротивлений при воз-

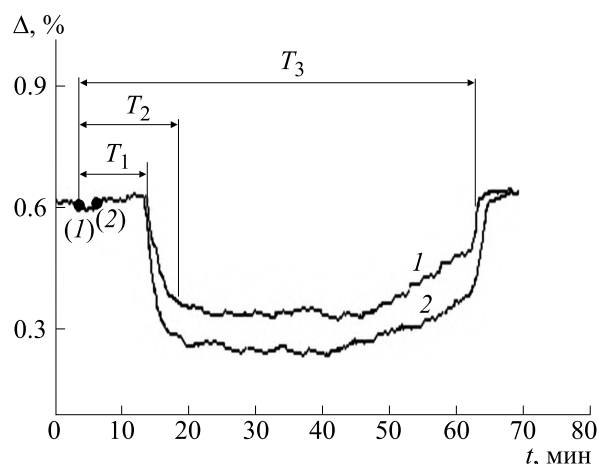


Рис. 3. Зависимость сопротивления водной среды популяции простейших от времени при действии сотового телефона Fairphone 3 в пассивном (кривая 1) и активном (кривая 2) режимах работы.

действию излучения от телефона Fairphone 3 значительно превышают максимальные значения изменений сопротивления водной среды для Purism Librem 5. Такое отличие в экспериментах можно объяснить более мощным сигналом телефона Fairphone 3.

На рис. 4 представлен отклик популяции простейших на телефон Pine64 PinePhone при работе в пассивном и активном режимах.

Рис. 4 демонстрирует динамику изменений сопротивлений водной среды в активном и пассивном режимах, качественно схожую с экспериментами, данные которых представлены на рис. 2 и 3. Характерные времена T_1 , T_2 и T_3 не изменились. Увеличились максимальные изменения сопро-

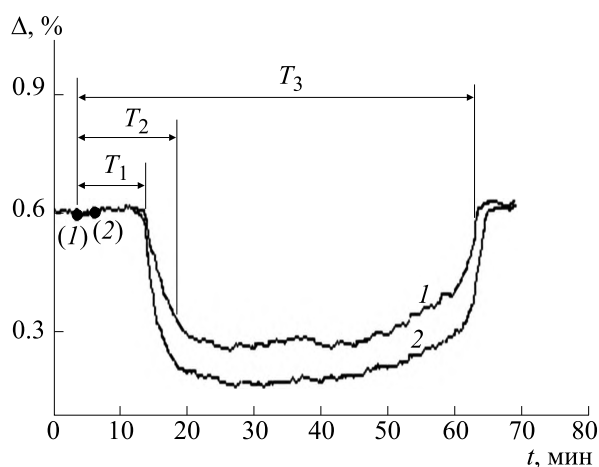


Рис. 4. Зависимость сопротивления водной среды популяции простейших от времени при действии сотового телефона Pine64 PinePhone в пассивном (кривая 1) и активном (кривая 2) режимах работы.

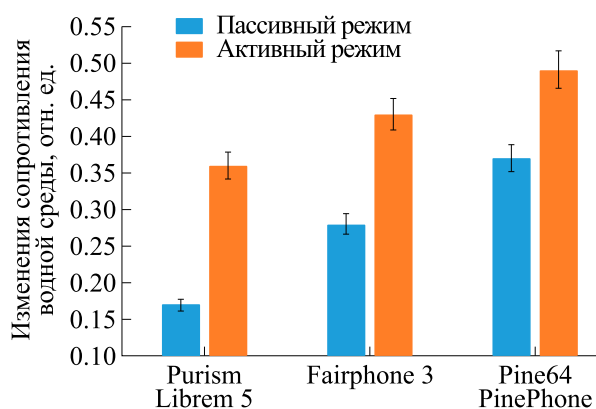


Рис. 5. Максимальные значения изменений сопротивления водной среды популяции простейших при воздействии излучений сотовых телефонов в пассивном и активном режимах.

тивления водной среды, что можно отнести к более мощному сигналу от Pine64 PinePhone.

На рис. 5 представлена гистограмма максимальных изменений сопротивлений водной среды в зависимости от воздействия рассмотренных сотовых телефонов при пассивных и активных режимах работы. Гистограмма показывает, что электромагнитному сигналу с большей мощностью отвечает более значительное изменение значения сопротивления водной среды популяции простейших микроорганизмов. Зависимость динамики изменения значений сопротивлений водной среды от мощности сигнала облучения имеет место как для пассивного, так и активного режима телефонов и имеет четкое отличие по величине для различных мощностей облучения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Приведенные на рис. 2–4 временные зависимости значений сопротивления воды показывают действительную значимость воздействия на систему «вода – популяция простейших» ЭМП современных сотовых телефонов. Важным является то, что зафиксированные результаты воздействия доказывают биологический характер наблюдаемых явлений. Действительно, только биологические объекты могут организовать адекватный отклик на внешнее воздействие через время, на несколько порядков превышающее характеристический период внешнего сигнала. В данном случае характерные времена наблюдаемых процессов изменения сопротивления водной среды превышают период сигнала воздействующего ЭМП на 9–10 порядков.

Концепция популяционного гомеостаза популяции простейших основана на целостности и устойчивости популяции во внешней среде [11]. Результаты настоящей работы подтверждают, что

целостность популяции является результатом непрерывного взаимодействия составляющих ее частей и особей. Один из каналов информационного взаимодействия внутри популяции простейших осуществляется на уровне метаболитов [11, 12]. Изменение сопротивления водной среды исследуемой системы доказывает возможность изменения популяцией структуры воды. Это указывает на то, что воздействие ЭМП может выходить непосредственно на биологический объект. При этом биохимические процессы меняют свою скорость, что приводит к изменению активного мембранного транспорта [9]. Особи популяции после обмена информацией изменяют среду обитания, реструктурируя воду. Изменение структуры воды и связанное с ней уменьшение сопротивления происходит не сразу, а после последовательной передачи информации об облучении от особи к особи внутри популяции. Время передачи информации можно оценить, представив ансамбль особей популяции в виде молекул идеального газа. Тогда, в соответствии с формулами термодинамики, можно рассчитать частоту столкновений молекулы

$$v = \sqrt{2n\sigma V} \quad (1)$$

и длину свободного пробега

$$\lambda = V/v, \quad (2)$$

где n – концентрация молекул (у нас – особей простейших), v – их усредненная скорость и σ – эффективный диаметр особи. Если принять $n = 10^7 \text{ м}^{-3}$, $V = 10^{-4} \text{ м/с}$, $\sigma = 10^{-6} \text{ м}^2$, можно оценить порядок их значений: $v = 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и $\lambda = 0.1 \text{ м}$. Это означает, что в рассмотренных выше случаях передача информации о внешнем воздействии, полученная частью популяции простейших в период воздействия, достигает всех особей популяции за время, по порядку величины равное $T = 1/v = 10 \text{ мин}$. Расчетное значение T хорошо согласуется с полученными экспериментальными данными по временному изменению сопротивления воды с обитающей в ней популяцией простейших.

Различие характерных времен зависимостей проводимости воды на рис. 2–4 объясняется различием условий проведения экспериментов, ход которых при прочих равных параметрах определялся мощностью сигнала телефона при облучении популяции простейших.

Реакция популяции простейших на ЭМП, выраженная во временном изменении сопротивления воды на рис. 2–4, указывает на групповой отклик особей популяции на внешнее воздействие. Сравнение значений характерных времен в эксперименте T_1 и расчетного информационно-обменного времени популяции T свидетельствуют о выходе воздействия ЭМП непосредственно на

клетку. Наличие двухстороннего межклеточного информационного канала и адекватного отклика на внешнее воздействие демонстрирует способность популяции проявить себя как единый организм. Это подтверждает тот факт, что интерфейс межклеточного информационного канала базируется не только на биохимических реакциях на уровне метаболитов, но также и на процессе биологической структуризации воды.

Настоящее исследование позволяет сделать вывод, что время переходного процесса зависимости биологического эффекта от мощности является временем обмена информацией между особями популяции. Биологический эффект уменьшения сопротивления водной среды популяции простейших микроорганизмов подчинен популяционному гомеостазу и связан с переходом системы «вода—популяция» в новое состояние за счет изменения организации обменного канала клетка — водная среда, проявляющемся в реструктуризации макромолекулы воды. Сохранение целостности популяции является результатом «выдавливания» энтропии, полученной за счет внешнего воздействия, в среду обитания, что проявляется в эксперименте как изменение сопротивления воды. Являясь неравновесной изотермической системой с изменяющейся свободной энергией вследствие поглощения излучения [12], популяция сохраняет энтропию в большом диапазоне внешних воздействий в результате двуправленных обменных процессов в системе «популяция — водная среда», одновременность которых поддерживается за счет непрерывного межклеточного информационного обмена.

Необходимо отметить, что для биологической системы в устойчивом состоянии энтропия может меняться в небольших пределах по сравнению с неживыми объектами (например, идеальный газ, распределенная система с хаотическим поведением и т. д., где изменение энтропии в эксперименте может составлять несколько порядков). Это означает, что гарантированную повторяемость результатов экспериментальных исследований на живых системах можно ожидать через период времени, определяемый возвратом к первоначальному состоянию со значением энтропии невозмущенной системы «живой организм — среда обитания». Эксперименты показали, что гарантированная повторяемость результатов с одной и той же популяцией простейших наблюдается не менее, чем через 24 ч.

ВЫВОДЫ

Проведенные в рамках работы эксперименты показали значимую зависимость изменения сопротивления водной среды популяции простейших микроорганизмов от мощности излучения

сотовых телефонов. Динамика изменения сопротивления водной среды указывает на биологический характер процессов, наблюдаемых в системе «вода — популяция простейших». Установлено, что значимое изменение значений сопротивления воды происходит через время порядка 10 мин после начала облучения.

Установлена зависимость изменения значения сопротивления водной среды от мощности облучаемого сигнала как для пассивного, так и для активного режимов исследуемых телефонов. Показано, что более мощному сигналу соответствует более значительное изменение сопротивления водной среды.

Результаты работы показывают возможность наблюдения в реальном времени последствий воздействия излучения сотовых телефонов на биологический объект. Разработанный метод исследования изменения состояния живых систем под действием внешних ЭМП нетепловой интенсивности позволит проводить оригинальные исследования по выяснению механизмов воздействия ЭМП на живые объекты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН № 075-01110-23-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Девятков Н. Д. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона волн на биологические объекты. *Успехи физ. наук*, **110** (3), 453–454 (1973). DOI: 10.3367/UFN.0110.1973071.0453
2. Шаев И. А., Новиков В. В., Яблокова Е. В. и Фесенко Е. Е. Краткий обзор современного состояния исследований биологического действия слабых электромагнитных полей. *Биофизика*, **67** (2), 319–326 (2022).
3. Песня Д. С., Романовский А. В. и Прохорова И. М. Разработка методики для оценки влияния УВЧ-излучения сотовых телефонов и других приборов с ЭМИ РЧ на организмы *in vivo*. *Ярославский педагогический вестник*, **3** (3), 80 (2010).

4. Песня Д. С., Романовский А. В., Прохорова И. М. и др. Исследование мутагенного эффекта модулированного УВЧ излучения сотовых телефонов на растительных и животных организмах *in vivo*. В кн. *Сб. докладов IV Всероссийской конф-ии «Радиолокация и радиосвязь»* (2010), сс. 924–929.
5. Шамигулова А. М., Билялова З. М., Юскевич О. И. и Васильев В. А. К вопросу о безопасности пользования сотовыми телефонами. *Вестн. НЦБЖД*, **2** (32), 110–116 (2017).
6. Аполлонский С. М. и Коровченко П. В. Воздействие электромагнитной среды на абонента сотовой связи и его нормирование. *Безопасность жизнедеятельности*, **1**, 15–24 (2011).
7. Савельев С. В. Взаимное влияние биологических систем и эффективность воздействия на них электромагнитного поля. *Миллиметровые волны в биологии и медицине*, **4**, 20 (2003).
8. Бецкий О. В., Морозова Л. А., Савельев С. В. и Смирнов В. Ф. Механизм информационного воздействия миллиметрового и терагерцового излучения на водосодержащие и живые объекты. *Биомедицинская радиоэлектроника*, **11**, 30–35 (2017).
9. Бецкий О. В., Девятков Н. Д. и Кислов В. В. Миллиметровые волны низкой интенсивности в медицине и биологии. *Биомедицинская радиоэлектроника*, **4**, 13–29 (1998).
10. Синицин Н. И., Петросян В. И., Ёлкин В. А. и др. Особая роль системы «миллиметровая волна – водная среда» в природе. *Биомедицинская радиоэлектроника*, **1**, 3–21 (1999).
11. Шилов А. И. *Эколого-физиологические основы популяционных отношений у животных* (МГУ, М., 1997).
12. Чукова Ю. П. Нетепловые биоэффекты ММ-излучения в свете законов термодинамики и люминесценции. *Миллиметровые волны в биологии и медицине*, **4**, 13–32 (2001).

Influence of Mobile Phone Electromagnetic Radiation Exposure on Behavior of Protozoan Population

L.A. Morozova* and S.V. Savel'ev*

**Fryazino Branch of V.A. Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, pl. Vvedenskogo 1, Fryazino, Moscow Region, 141190 Russia*

For the first time, the effect that mobile phone electromagnetic radiation had on water in the presence of protozoan population and induced a significant change in water properties has been experimentally studied. The results of our experiment demonstrate that changes that occur in the “water–protozoa population” system are the biological effects the cells have in response to the direct effect of radiation. This conclusion is supported by the fact that the calculated order of magnitude of a time interval during which information exchange takes place between some microorganisms of the protozoan population is the same as that over course of the experiment. The minimum concentration of protozoa (1000 pcs/liter) at which this effect was observed was determined. It is concluded that the proposed technique for alteration of physical properties of water in the presence of protozoan population after exposure to electromagnetic fields can be used to uncover the mechanisms of the interaction of biological systems with electromagnetic fields.

Keywords: mobile phone, electromagnetic field, protozoan population, response of protozoan population in water environment

УДК 519.6

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАВЫКОВ У КРЫС В ТРЕХЛУЧЕВОМ ЛАБИРИНТЕ

© 2024 г. С.П. Драган^{*,#}, Д.Б. Комаров^{*}, И.А. Веселовский^{*}, А.В. Богомолов^{*}

^{*}Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА, ул. Маршала Новикова, 23, Москва, 123098, Россия

[#]E-mail: s.p.dragan@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.05.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Экспериментально исследовано формирование поведенческих навыков, заключающихся в обучаемости условной реакции активного избегания, у разных видов крыс в трехлучевом лабиринте. Для определения наиболее обучаемого вида выбраны белые беспородные крысы (100 особей) и крысы линий Long Evans и Dumbo (по 30 особей). Условным стимулом была комбинация включения звука и отключения света в случайно выбираемом целевом коридоре лабиринта. Через 5 с после включения звука свет выключался, в нецелевые коридоры подавался безусловный стимул (электрический ток) и включался свет. Задача крысы состояла в совершении перехода в целевой (безопасный) рукав лабиринта в ответ на звуковой стимул. По достижении цели напряжение с пола нецелевых коридоров снималось, свет выключался. Пауза между сочетаниями «условный/безусловный стимул» составляла 30 с, время обучения для каждого вида крыс составляло 1 месяц, по 20 предъявлений сочетаний стимулов в день. Крыса считалась обученной при вероятности достижения цели в 70% и более случаев за время, не превышающее 6 с. Установлено, что для быстрого обучения больших групп крыс реагированию на раздражающий стимул наилучшим образом подходят крысы линии Dumbo.

Ключевые слова: обучение крыс, трехлучевой лабиринт, экстраполяция результатов медико-биологических исследований, закономерности поведения животных.

DOI: 10.31857/S0006302924050154, EDN: MJDNUE

Решение ряда прикладных задач требует наличия информации о медико-биологических эффектах комбинированного воздействия на человека физических факторов экстремальной и суб-экстремальной интенсивности [1–3]. Получение этой информации предполагает проведение экспериментальных исследований на подопытных животных с последующей экстраполяцией полученных результатов на человека [4, 5]. В соответствии с теорией подобия экстраполяция должна осуществляться между однотипными показателями [6].

В качестве подопытных животных при проведении таких исследований часто используются крысы [7–9]. При проведении экспериментальных исследований с использованием крыс и последующей экстраполяцией результатов на специалистов операторского профиля определяют характеристики поведенческих реакций – время достижения цели и вероятность ошибочного действия [10–12].

Для выявления закономерностей поведения животных в зависимости от характеристик воз-

действующих факторов используют одну или несколько опытных групп обученных животных и группу контроля [13]. Основную сложность при проведении таких исследований представляет необходимость обучения большого количества животных навыкам достижения цели [14]. Поэтому проведены исследования обучаемости разных видов крыс условной реакции активного избегания в трехлучевом лабиринте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования поведенческих реакций крыс применяют различные методы, направленные на выработку и проверку условно-рефлекторной деятельности. Эти методы позволяют установить время достижения цели и зафиксировать возникающие ошибочные действия животного.

Для сокращения времени обучения нами разработан автоматизированный аппаратно-программный комплекс «Трехлучевой лабиринт» с электрополом, системой освещения и подачи

звукового стимула и системой датчиков для определения местоположения животного (три пары датчиков в начале, середине и в конце каждого коридора), при помощи которого у крыс осуществляли выработку условного рефлекса активного избегания [15, 16].

Комплекс «Трехлучевой лабиринт» (рис. 1) состоит из этажа с системой управления и пяти этажей, предназначенных для обучения, в виде одинаковых, функционально независимых, трехлучевых (Y-образных) лабиринтов. На каждом уровне комплекса животные могут свободно перемещаться по лабиринту.

Блок управления, расположенный сверху комплекса, обеспечивает подачу светового (0–100%) и звукового (30–70 дБ) условных сигналов при различном времени действия (0–30 с), установку длительности паузы между воздействиями (0–300 с), а также задание значений напряжения (5–90 В), длительности (8–500 мс) и скважности импульсов (0–500 мс), подаваемых на секции электропола. При этом сила тока составляет 5 мА. Этажи комплекса могут быть настроены как на индивидуальную, так и синхронную работу, могут работать как независимо друг от друга, так и совместно.

Управление комплексом осуществляется в соответствии с алгоритмом, задаваемым оператором с помощью программного интерфейса, реализуемого с помощью внешнего персонального компьютера. Значения настроенных параметров для каждого лабиринта в течение эксперимента поддерживаются автоматически при помощи многоканальной системы обратной связи.

Для определения наиболее обучаемого вида крыс были выбраны три вида: белые беспородные – 100 особей, Long Evans и Dumbo – по 30 особей. Масса крыс составляла 140–160 г.

Для выработки условного рефлекса активного избегания все крысы были разделены на группы по 5 особей в каждой. На каждый этаж комплекса помещали по одному животному, при этом свет на этажах был выключен. После краткого периода адаптации (10 мин в первые 3 суток) происходило предъявление серии из 20 сочетаний «условный/безусловный стимул».

В качестве условного стимула выступала комбинация включения звука и отключения света в целевом коридоре, выбираемом случайно. Через 5 с после включения звука свет выключался, в нецелевые коридоры подавался безусловный стимул – ток (отставленный условный рефлекс) и включался свет. Задача крысы состояла в ответ на звуковой стимул совершить переход в целевой (безопасный) темный рукав лабиринта. По достижении цели напряжение с пола нецелевых коридоров снималось, а свет выключался.

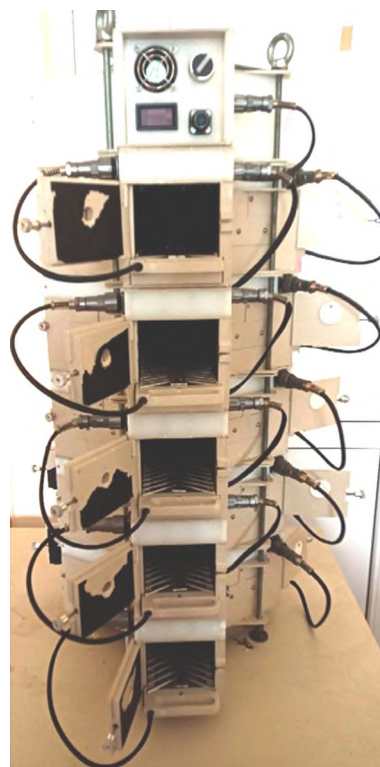


Рис. 1. Общий вид комплекса «Трехлучевой лабиринт».

Пауза между сочетаниями «условный/безусловный стимул» составляла 30 с, отсчет начинался по завершении работы всех лабиринтов. Время обучения для каждого вида крыс составляло 1 месяц, по 20 предъявлений сочетаний стимулов в сутки. Характеристики безусловного стимула подбирали так, чтобы не препятствовать выполнению задачи крысой, но при этом они были достаточными для создания необходимой мотивации.

Крыса считалась обученной при вероятности достижения цели за время, не превышающее 6 с, в 70% и более случаев. Временной критерий 6 с был определен из расчета пятисекундного периода звучания звукового сигнала и секундной задержки датчиков определения местоположения крысы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты обучения представлены на рис. 2–4.

В первые 10 суток обучения количество обученных беспородных крыс составило около 10%, крыс линии Long Evans – 20–35%, а крыс линии Dumbo – 15–60%. Время достижения цели за первые 10 суток обучения у беспородных крыс с 24 с вышло на уровень 15 с, у крыс линий Long Evans и Dumbo – с 20 до 12 с. Количество ошибочных

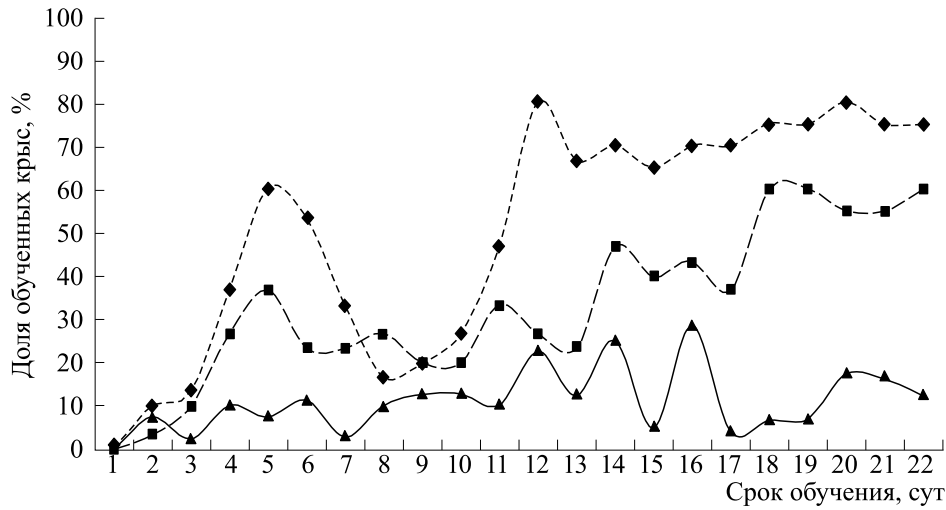


Рис. 2. Обучаемость крыс линий Dumbo (ромбы), Long Evans (квадраты) и беспородных (треугольники): по оси абсцисс – срок обучения, по оси ординат – доля обученных крыс.

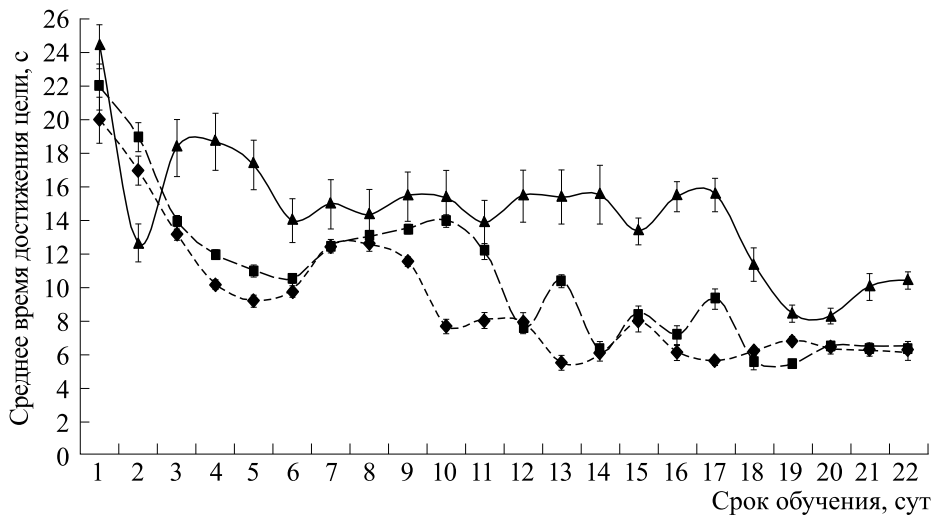


Рис. 3. Среднее время достижения цели крысами линий Dumbo (ромбы), Long Evans (квадраты) и беспородных (треугольники): по оси абсцисс – срок обучения, по оси ординат – среднее время достижения цели, размах соответствует стандартной ошибке.

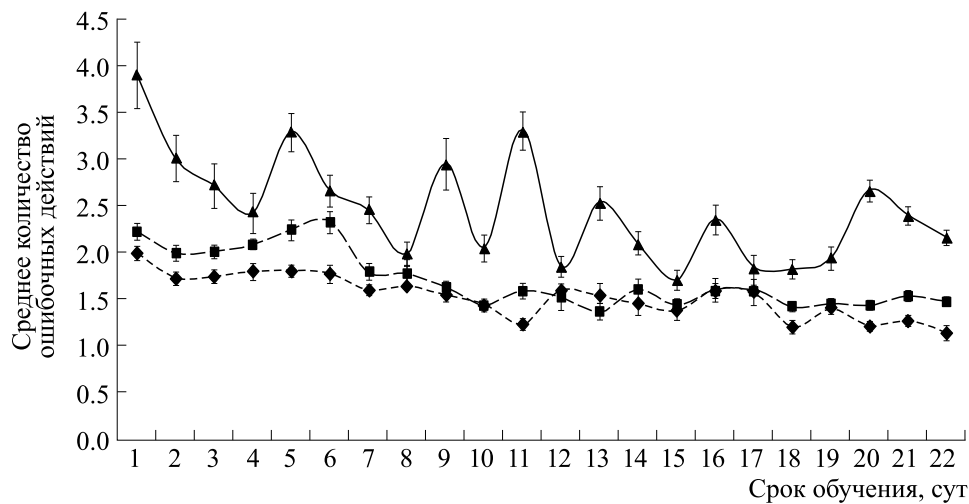


Рис. 4. Среднее количество ошибок крысами линий Dumbo (ромбы), Long Evans (квадраты) и беспородных (треугольники): по оси абсцисс – срок обучения, по оси ординат – среднее количество ошибочных действий, размах соответствует стандартной ошибке.

действий у беспородных крыс за десятидневный период обучения уменьшилось с 4 до 2, а у крыс линий Long Evans и Dumbo – снизилось с 2.2 до 1.5.

По итогам обучения количество обученных беспородных крыс за последние 5 суток (к концу четвертой недели) обучения в среднем составило 12%, крыс линии Long Evans – 58%, крыс линии Dumbo – 76%. Время достижения цели у беспородных крыс составило около 10 с, у крыс линий Long Evans и Dumbo – около 6 с. Среднее количество ошибочных действий у беспородных крыс составило 2.0–2.5, у крыс линии Long Evans – 1.5, а у крыс линии Dumbo – 1.2. Таким образом, крысы линии Dumbo показали лучшие показатели по скорости и качеству обучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что для быстрого обучения больших групп крыс реагированию на раздражающий стимул наилучшим образом подходят крысы линии Dumbo. Использование крыс этой линии позволит более эффективно провести исследования, сопряженные с экстраполяцией медико-биологических эффектов физических факторов с крыс на специалистов операторского профиля.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело финансовой поддержки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание и обращение с животными осуществлялось в соответствии с директивой 2010/63/EU Хельсинской конвенции, исследование проведено в соответствии с принципами положения Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Максимов И. Б., Столяр В. П. и Богомолов А. В. *Прикладная теория информационного обеспечения медико-биологических исследований* (Бином, М., 2013).
- Kislova Yu. V., Bogomolov A. V., and Soloshenko N. V. Mathematical modeling of cardiovascular system in patients with hemorrhage and hypothermia. *Biomed. Engineer.*, **40** (4), 167–170 (2006). PMID: 16989217
- Драган С. П., Кезик В. И. и Богомолов А. В. Физиологические аспекты импедансометрии легких. *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 2, 181–190 (2022). DOI: 10.31857/S1026347022010061, EDN: ECAAYRX
- Фёдоров М. В., Богомолов А. В., Цыганок Г. В. и Айвазян С. А. Технология проектирования многофакторных экспериментальных исследований и построения эмпирических моделей комбинированных воздействий на операторов эрготических систем. *Информационно-измерительные и управляющие системы*, **8** (5), 53–61 (2010). EDN: OPBRHH
- Ушаков И. Б. и Богомолов А. В. Диагностика функциональных состояний человека в приоритетных исследованиях отечественных физиологических школ. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*, № 3, 91–100 (2021). DOI: 10.25016/2541-7487-2021-0-3-91-100
- Седов Л. И. *Методы подобия и размерности в механике* (Наука, М., 1987).
- Даренская Н. Г., Ушаков И. Б., Иванов И. В., Иванченко А. В. и Насонова Т. А. *От эксперимента на животных – к человеку: поиски и решения* (Научная книга, Воронеж, 2010).
- Нотова С. В., Казакова Г. В. и Маршинская О. В. Современные методы и оборудование для оценки поведения лабораторных животных (обзор). *Животноводство и кормопроизводство*, **101** (1), 106 (2018). EDN: OYSMIX
- Notova S. V., Kazakova G. V., and Marshinskaya O. V. Modern methods and equipment for assessing the behavior of laboratory animals (review). *Livestock and feed production*, **101** (1), 106–115 (2018).
- Хоцкий Н. В., Куликов В. А., Завьялов Е. Л., Фурсенко Д. В. и Куликов А. В. Проведение и автоматизация теста «водный лабиринт Морриса» в условиях SPF-вивария. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **19** (4), 388–393 (2015). DOI: 10.18699/VJ15.049
- Муртазина Е. П., Буянова И. С. и Гинзбург-Шик Ю. А. Экспериментальные модели диадического оперантного поведения крыс в различных социальных контекстах. *Зоологич. журн.*, **100** (5), 540 (2021). DOI: 10.31857/S0044513421050093, EDN: PRWPQG
- Cravedi K. D., May M. D., Abettan J. A., Huckleberry K. A., Trettel S. G., Vuong C. V., Altman D. E., Gauchan S., Shansky R. M., Matson L. M., Sousa J. C., Lowery-Gionta E. G., and Moore N.L.T. Response and recovery of endocrine, behavioral, and neuronal morphology outcomes after different traumatic stressor exposures in male rats. *Psychoneuroendocrinology*, **133**, 105394 (2021). DOI: 10.1016/j.psyneuen.2021.105394
- Григорьев Н. Р., Ли Т. и Ли Ш. Ю. Когнитивные способности крыс в оперантном поведении активного избегания в различные этапы онтогенеза.

- Журн. выш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*, **64** (3), 314–323 (2014).
DOI: 10.7868/S0044467714030058, EDN: SFAJ CZ
14. Драган С. П., Богомолов А. В. и Кезик В. И. Анализ импедансных характеристик дыхательной системы животных и человека. *Рос. журн. биомеханики*, **24** (2), 187–195 (2020).
15. Драган С. П., Комаров Д. Б., Веселовский И. А. и Богомолов А. В. Аппаратно-программный комплекс для экспериментального исследования поведенческих реакций лабораторных животных. *Приборы и техника эксперимента*, № 6, 131–132 (2021). DOI: 10.31857/S0032816221060082, EDN: GONGKL
16. Драган С. П., Веселовский И. А., Комаров Д. Б. и Богомолов А. В. Методика формирования поведенческих реакций у лабораторных животных. *Sib. J. Life Sci. Agriculture*, **15** (5), 217–234 (2023). DOI: 10.12731/2658-6649-2023-15-4-11-28, EDN: GKNAYA

Study of Peculiarities of the Formation of Behavioral Skills in Rats in the Three-Arm Maze

S.P. Dragan*, D.B. Komarov*, I.A. Veselovsky*, and A.V. Bogomolov*

*State Research Center – A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency of Russia, ul. Marshala Novikova 23, Moscow, 123098 Russia

The aim of our experimental research was to explore the formation of behavioral skills such as active avoidance learning in different species of rats in the three-arm maze. To determine which species is the most trainable, our study used 100 white outbred, 30 Long Evans and 30 Dumbo rats. The conditioned stimulus was a combination of playing the sound and turning off the light in a randomly selected target arm of the maze. 5 sec after the buzzer started to sound the light was turned off, then an unconditioned stimulus, the electric power, was applied to non-target arm, and the light was turned on. The task of the rat was to change the arm and enter the target (safety) arm of the maze after the sound stimulus. When the task was done, the floor of non-target arm was not charged further and the light was turned off. The interval between conditioned/unconditioned stimulus combinations was 30 s, it took 1 month to train each rat species and 20 sessions with different combinations of stimuli were used every day. The rat was considered trained when the probability of achieving the goal within a time limit not exceeding 6 s is 70% or higher of cases. It has been found that Dumbo rats are the best animals to train quickly in large groups to respond to an irritating stimulus.

Keywords: training of rats, three-arm maze, extrapolation of the results of biomedical research, patterns of animal behavior

УДК 577.32, 577.114.083

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *Helianthus tuberosus* L. НА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО N-ГЛИКОЗИДА ИНДОЛО[2,3-а]КАРБАЗОЛА ЛХС-1269

© 2024 г. М.П. Киселева^{*,#}, И.С. Голубева^{*}, В.П. Дерягина^{*}, А.В. Ланцова^{*}, Л.В. Эктова^{*},
Е.А. Корнюшенков^{*}, Л.М. Борисова^{*}, Е.А. Генералов^{**}

^{*}Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России,
Каширское шоссе, 24, Москва, 115522, Россия

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

[#]E-mail: marina-kiselyova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.05.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 05.06.2024 г.

Исследована противоопухолевая активность производного N-гликозида индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1269 с полисахаридом из *Helianthus tuberosus* L. в качестве адъювантного средства на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис мышей гибридов F1(C₅₇Bl/6 × DBA/2). Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухолей леченых животных в сравнении с контрольными. В результате установлено, что терапевтический эффект комбинации оказался выше и продолжительнее, чем при монотерапии, с уменьшением опухолевого роста карциномы легкого Льюис на 53–64% до 28-х суток наблюдения. Применение полисахарида приводило к росту числа клеток крови – лейкоцитов, лимфоцитов и фагоцитов, ответственных за противоопухолевый иммунитет. Химиотерапевтическое воздействие комбинации ЛХС-1269 и полисахарида показало выраженный устойчивый противоопухолевый ответ в отношении карциномы легкого Льюис в системе периферической крови мышей на фоне временного увеличения числа нейтрофилов и моноцитов на 12-е сутки развития опухоли. Очевидно, тестируемые соединения стимулировали пролиферацию нейтрофилов и моноцитов определенных фенотипов с противоопухолевой активностью на более раннем этапе развития карциномы легкого Льюис.

Ключевые слова: полисахарид из *Helianthus tuberosus* L., производное индолокарбазола ЛХС-1269, эпидермоидная карцинома легкого Льюис, противоопухолевая активность.

DOI: 10.31857/S0006302924050164, EDN: MIXNCU

Опухолевые заболевания продолжают оставаться одной из основных проблем в системе здравоохранения стран мира. Несмотря на новые подходы к повышению эффективности лечения онкологических больных: хирургический [1], иммуно- [2], химио- [3], радио- [4], таргетной [5] терапии и другие, сохраняется рост заболеваемости и количество летальных исходов по всему миру [6].

Повышение эффективности химиотерапии злокачественных новообразований реализуется по разным направлениям, одним из которых является изучение и тестирование новых соедине-

ний природного происхождения, их синтетических аналогов и производных в комплексной терапии.

Полисахариды, полученные из природных источников, представляют обширную гетерогенную группу биологических молекул с разнообразными свойствами: иммуномодулирующими, радиопротекторными, адаптогенными, противоопухолевыми и другими [7]. Большая часть этих свойств определяется взаимодействием с различными группами мембранных рецепторов нормальных клеток и трансформированных опухолевых клеток, некоторые полисахариды могут вызывать остановку клеточного цикла, ингибировать синтез ДНК, стимулировать апоптоз, ферроптоз или дифференциацию клеток [8–10].

Сокращения: ЛХС-1269 – 6-пиколинамидо-12-(β-D-ксилопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион, НТЛР – полисахарид из *Helianthus tuberosus* L., LLC – карцинома легкого Льюис.

Исследованиями также установлено, что полисахариды изменяют микроокружение опухоли и оказывают влияние на ее адгезивные способности, блокируя транскрипционный фактор NF- κ B и ингибируя экспрессию адгезивных молекул Е-селектинов, используемых опухолью для прикрепления, распространения и метастазирования [11, 12]. Кроме того, обнаружено, что некоторые полисахариды подавляют факторы опухолевого ангиогенеза за счет снижения уровня экспрессии белков VEGF, CD31, CD34 и эндопептидазы MMP 9 [13, 14].

Полисахариды обладают антиканцерогенными свойствами. Участвуя в механизмах иммунорегуляции, они активируют ответственные за противоопухолевый иммунитет иммунокомпетентные клетки, такие как натуральные киллеры, регуляторные, цитотоксические, хелперные и фолликулярные Т-клетки, опухоль-ассоциированные нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки и В-клетки [15, 16]. Противоопухолевые свойства некоторых полисахаридов проявляются посредством активации лимфоцитов, секреции цитокинов TNF- α , интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-6 и IL-12 [17, 18].

Таким образом, цитотоксическое и иммуноопосредованное действие полисахаридов на неопластические процессы открывает перспективы для их применения в лечении и профилактике онкозаболеваний [19]. Кроме того, природные полисахариды признаны в качестве адъювантных лекарств [20] в период химио- и лучевой терапии [21]. Известно их применение в комбинированной терапии [22, 23]. В данной работе проводилось исследование полисахарида из *Helianthus tuberosus* L. в комбинации с производным N-гликозид индоло[2,3-а]карбазолом ЛХС-1269.

В научной литературе класс индолокарбазолов представлен многочисленными соединениями, выделенными как из природных источников, так и полученными синтетическим путем [24]. Известно, что препараты на основе производных N-гликозидов индолокарбазолов способны взаимодействовать с несколькими внутриклеточными мишенями и инициировать различные пути гибели опухолевых клеток [25, 26].

Новое противоопухолевое соединение 6-пиколинамидо-12-(β -D-ксилопиранозил) индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион (ЛХС-1269) синтезировано в лаборатории химического синтеза [27], инъекционная лекарственная форма на основе ЛХС-1269 создана в лаборатории разработки лекарственных форм НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России [28]. Исследованиями *in vitro* установлено, что соединение ЛХС-1269 эффективно влияет на васкулогенную мимикрию, подавляет механизм ангиогенеза,

связанный с фактором роста эндотелия сосудов VEGF, приводит к снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли [29, 30].

Высокоочищенный полисахарид НТЛР получен из клубней *Helianthus tuberosus* L. Разветвленная молекула НТЛР имеет молекулярную массу 1–2 МДа с моносахаридным составом из глюкозы, галактозы и уроновых кислот, а также рамнозы, арабинозы, маннозы и ксилозы в следовых количествах, соединенных гликозидными связями β -(1 \rightarrow 3) и β -(1 \rightarrow 4). Полисахарид НТЛР является нетоксичной и не аллергенной молекулой с интерферониндуцирующими свойствами [31]. НТЛР способен стимулировать выработку провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6, а также регулировать уровень IL-1, что приводит к стимуляции натуральных киллеров и увеличению цитотоксического индекса [32], демонстрирует противоопухолевую, антиметастатическую и иммуномодулирующую активность за счет взаимодействия с трансмембранными рецепторами TLR-2/6 и Dectin-1 [33].

Противоопухолевые свойства ЛХС-1269 связаны с изменением экспрессии генов, вовлеченных в апоптоз, клеточное старение, регуляцию метаболизма в условиях гипоксии, ответом на повреждение ДНК и активацией репарации [34]. Значимая цитотоксическая и противоопухолевая активность ЛХС-1269 показана на линиях раковых клеток человека НСТ-116, НТ-29, МСF-7, А549, U251 [34] и на моделях перевиваемых опухолей мышей – карциноме легкого Льюис (LLC), раке шейки матки РШМ-5, аденокарциноме молочной железы Са-755, аденокарциноме толстого кишечника АКАТОЛ [35].

В ходе экспериментальных исследований на культуре клеток HeLa выявлены эпигенетические эффекты ЛХС-1269. Так, при изучении молекулярных механизмов противоопухолевой активности ЛХС-1269 обнаружено его влияние на метилирование ДНК, локализацию гистона H1, ремоделирование хроматина и реактивацию эпигенетически молчащих генов [36].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполняли на перевиваемой модели опухолевого роста мышей карциноме легкого Льюис. Мышей получали из разведения экспериментально-биологической лаборатории НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Лабораторных животных содержали в клетках из полипропилена с подстилом из опилок, стерилизованных в сухожаровом шкафу, в условиях естественного освещения с контролируемой температурой 18–22°C и влажностью воздуха 65%, на брикетированном корме и с постоянным доступом к воде. Животных содержали в

индивидуально вентилируемых клетках в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [37].

LLC перевивали подкожно по 0.5 мл опухолевой суспензии в виде взвеси в среде 199 в разведении 1 : 10 (5×10^6 клеток) в правую подмышечную впадину мышам-самкам гибридов $F_1(C_{57}Bl/6 \times DBA/2)$ с массой тела 18–22 г. Штамм поддерживали на мышках-самках линии $C_{57}Bl/6$ стандартными серийными перевивками внутримышечно каждые 12–14 суток [38, 39].

Перед лечением мышей распределяли в четыре опытные группы по 16 особей в каждой ($n = 16$), что соответствовало численности животных, достаточной для проведения статистической оценки и расчета показателей достоверности. Число животных в контрольной группе без лечения составляло 20 особей ($n = 20$).

Лечение начинали через 48 ч после перевивки LLC – время, соответствующее интенсивному размножению опухолевых клеток в солидной опухоли и их нахождению в наиболее чувствительном к химиотерапии состоянии.

Показатели периферической крови мышей с LLC (концентрация гемоглобина, гематокрит, количество эритроцитов, тромбоцитов, общее число лейкоцитов) определяли на гематологическом анализаторе Mindray (Китай). Подсчет лейкоцитарной формулы проводили стандартным гематологическим методом [40].

Исследуемые соединения. Лекарственная форма ЛХС-1269 представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и инфузий, с содержанием действующего вещества во флаконе 10 мг. Содержимое каждого флакона разводят водой для инъекций до концентрации 5 мг/мл [28].

НТЛР – порошок беловато-сероватого цвета, без запаха, хорошо растворим в воде и нерастворим в органических растворителях. Ампулы объемом 1 мл содержат стерильный раствор НТЛР в концентрации 0.5 мг/мл, растворитель – 0.9% NaCl.

Возможность повышения эффективности противоопухолевого действия ЛХС-1269 оценивали в комбинации с НТЛР при однократном и пятикратном режиме применения НТЛР в дозе 5 мг/кг внутривенно (в/в) в объеме 0.5 мл на мышшь. НТЛР в монотерапии вводили пятикратно в/б в той же дозе и объеме.

Инъекционную лекарственную форму ЛХС-1269 в монотерапии или в комбинации применяли однократно внутривенно (в/в) в дозе 90 мг/кг (терапевтическая доза 120 мг/кг). Дозы и объем

введений рассчитывали на вес каждого животного.

Оценку результатов лечения проводили по показателям торможения роста опухолей (ТРО%) на разные сроки после окончания лечения и вычисляли по формуле:

$$ТРО\% = \frac{V_k - V_0}{V_k} \times 100\%,$$

где V_0 и V_k – средний объем опухолей (mm^3) соответственно в опытной и контрольной группах, который для каждой солидной опухоли определяли как произведение размеров трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла [39].

Показатели эффективности изучаемых препаратов определяли в сравнении с контрольной группой. Минимальным критерием противоопухолевой активности исследуемых соединений считали $ТРО\% \geq 50\%$, принятый для противоопухолевых препаратов [39–42].

Статистическая оценка результатов. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0. Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Данные показателей периферической крови обрабатывали с использованием доверительных интервалов средних сравниваемых величин. После проверки данных на нормальность с помощью критерия Шапиро-Уилка для малых выборок ($n < 50$), критерия Лиллиефорса с учетом параметров выборочного распределения и K -критерия Д’Агостино использовали t -критерий Стьюдента, статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из табл. 1 следует, что продолжительный противоопухолевый эффект ЛХС-1269 наблюдали в комбинации однократного и пятикратного применения НТЛР ($ТРО\% = 64–59\%$ и $ТРО\% = 59–53\%$ соответственно, $p < 0.05$ к контролю). ЛХС-1269 в монотерапии оказывал противоопухолевое действие до 8-х суток наблюдения на уровне $ТРО\% = 60–52\%$, $p < 0.05$ к контролю, НТЛР в монотерапии проявлял активность в отношении LLC на уровне $ТРО\% = 32–38\%$, что менее 50%. Включение полисахарида НТЛР в схему комбинированного лечения приводило к уменьшению опухолевого роста LLC в группе с ЛХС-1269 (рис. 1). Наблюдение за животными продолжали до 28 суток после окончания лечения.

На следующем этапе исследования провели сравнительную оценку влияния НТЛР, ЛХС-1269 и их комбинаций на систему периферической крови мышей с LLC в условиях химиотерапевти-

Таблица 1. Противоопухолевая эффективность ЛХС-1269, НТЛР в монотерапии и в комбинациях на LLC мышей

№№ п/п	Группа	Путь введения	Доза (мг/кг)/интервал (час) × число введений	ТРО%, %							
				Время после окончания лечения, сут							
				1	4	8	12	16	20	24	28
1	ЛХС-1269	в/в	90 × 1	60 ^{1,2}	48 ^{1,2}	52 ^{1,2}	35	48	40	46	42
2	НТЛР	в/б	5/24 × 5	32	24	34	22	30	30	38	29
3	ЛХС-1269 + НТЛР	в/в + в/б	90 × 1 + 5/24 × 5	59 ^{1,2}	53 ^{1,2}	59 ^{1,2}	49 ¹	58 ^{1,2}	54 ^{1,2}	53 ^{1,2}	49 ^{1,2}
4	ЛХС-1269 + НТЛР	в/в + в/б	90 × 1 + 5 × 1	64 ^{1,2}	42	50 ^{1,2}	34	50 ¹	48 ^{1,2}	50 ^{1,2}	59 ¹

Примечание. ¹ – $p < 0.05$ по отношению к контролю, ² – $p > 0.05$ между группами 1, 3 и 4.

ческого воздействия на 12-е и 20-е сутки после прививки (табл. 2 и 3 соответственно).

Хотя данные показателей общего анализа крови мышей носят предварительный характер и требуют уточняющих экспериментов, некоторые тенденции можно отследить. Прежде всего, стоит отметить, что на 12-е и 20-е сутки показатели общего анализа крови не идентичны, что связано с развитием опухолевого процесса и действием ЛХС-1269 и НТЛР. К 12-м суткам развития опухолевого процесса наблюдается статистически значимое снижения абсолютного числа лейкоцитов в группе ЛХС-1269, при этом в группе с НТЛР и комбинированного применения с ЛХС-1269 их количество выше показателей контрольной группы. Так, например, применение ЛХС-1269 в комбинации с пятикратным введением НТЛР привело к росту числа лейкоцитов в 1.5 раза, в комбинации с однократным введением НТЛР – в 1.3 раза, а в монотерапии НТЛР – в 1.2 раза. К 20-м суткам общее число лейкоцитов во всех группах по сравнению с 12-ми сутками увеличи-

валось до 2.3 раза. При этом стимулирующий эффект НТЛР сохранялся на уровне 1.2 раза, а в группах с ЛХС-1269 количество лейкоцитов снижалось до 1.8 раза в сравнении с контролем.

На 12-е сутки наблюдается увеличение относительного числа лимфоцитов в крови подопытных животных группы НТЛР в монотерапии сравнительно с контролем. Так, например, при сравнении с группой ЛХС-1269 в монотерапии процент лимфоцитов увеличивался до 3.4 раза, а с группой комбинированного применения – до 12 раз. Такое изменение свидетельствует, скорее всего, о стимуляции числа иммунокомпетентных клеток и их миграцией из периферического кровотока к очагу воспаления за счет действия НТЛР. ЛХС-1269 в данном случае вызывает повреждение опухолевой ткани, увеличивая локальное воспаление, а НТЛР стимулирует миграцию лимфоцитов в опухолевый узел. Эту же гипотезу подтверждают данные моноцитов (абсолютные и процентные показатели) – в группе НТЛР в периферическом кровотоке их количество меньше в сравнении с контролем

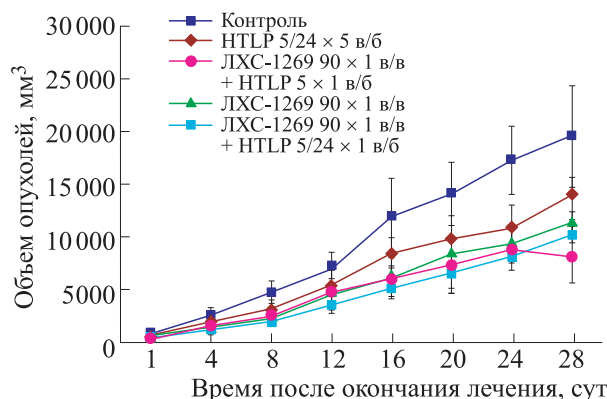


Рис. 1. Динамика роста LLC под действием ЛХС-1269 и НТЛР в монотерапии и при комбинированном воздействии.

Таблица 2. Общий анализ крови мышей на 12-е сутки после перевивки LLC и лечения

Клетки крови	Группа животных				
	ЛХС-1269 × 1 (в/в) + + НТЛР × 1 (в/б)	ЛХС-1269 × 1(в/в) + + НТЛР × 5 (в/б)	НТЛР × 5 (в/б)	ЛХС-1269 × 1 (в/в)	Контроль
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	2.46 ± 0.69*	2.83 ± 0.71**	2.25 ± 0.5*	1.27 ± 0.38*	1.87 ± 0.53
Нейтрофилы, %	64.5 ± 18.6*	75.1 ± 20.7**	36.7 ± 11.4	59.2 ± 14.2**	34.9 ± 7.2
Количество, 10 ⁹ /л	1.59*	2.12**	0.83	0.75	0.65
Лимфоциты, %	9.6 ± 2.9**	4.9 ± 1.6**	59.3 ± 10.6*	17.7 ± 3.4**	45.1 ± 15.3
Моноциты, %	25.4 ± 9.4	19.4 ± 7.8	3.4 ± 2.4**	20.8 ± 7.5	18.2 ± 8.2
Количество, 10 ⁹ /л	0.62	0.55	0.08	0.26	0.34
Эозинофилы, %	0.4 ± 0.4	0.4 ± 0.5	0.5 ± 0.3	1.5 ± 1.2	1.6 ± 0.9
Базофилы, %	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.8 ± 0.5	0.2 ± 0.3
Эритроциты, 10 ¹² /л	2.05 ± 0.7	1.51 ± 0.52	1.38 ± 0.37	1.19 ± 0.26	1.63 ± 0.46
Гемоглобин, г/л	31.5 ± 10.5	24.5 ± 8.1	21.5 ± 5.5	19.5 ± 4.4	25.0 ± 7.1
Гематокрит, %	8.75 ± 2.67	6.85 ± 1.85	5.95 ± 1.49	5.2 ± 1.4	6.90 ± 2.14
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	135.0 ± 35.1	137.0 ± 31.5	82.0 ± 23.8*	78.5 ± 26.7*	141.0 ± 38.1
Тромбокрит, %	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.02

Примечание. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ при сравнении с показателями контроля по критерию Стьюдента. Приведены среднеарифметические значения ± стандартное отклонение (SD).

Таблица 3. Общий анализ крови мышей на 20-е сутки после перевивки LLC и лечения

Клетки крови	Группа животных				
	ЛХС1269 × 1 (в/в) + + НТЛР × 1 (в/б)	ЛХС-1269 × 1(в/в) + + НТЛР × 5 (в/б)	НТЛР × 5 (в/б)	ЛХС-1269 × 1 (в/в)	Контроль
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	2.5 ± 0.78*	2.34 ± 0.75*	4.90 ± 1.23	2.83 ± 0.79**	4.20 ± 1.26
Нейтрофилы, %	53.2 ± 14.4	57.4 ± 21.0	43.4 ± 10.2	55.1 ± 14.9	48.8 ± 12.7
Количество, 10 ⁹ /л	1.33	1.34	2.13	1.56	2.05
Лимфоциты, %	38.1 ± 10.3	28.7 ± 7.2**	45.8 ± 11.0	34.3 ± 6.9*	43.1 ± 13.0
Моноциты, %	7.0 ± 4.9	11.1 ± 4.0**	9.4 ± 3.3**	8.7 ± 3.7	6.5 ± 2.9
Количество, 10 ⁹ /л	0.17	0.26	0.46**	0.25	0.27
Эозинофилы, %	0.5 ± 0.6	1.2 ± 0.8	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.7	0.8 ± 0.5
Базофилы, %	1.2 ± 0.7	1.6 ± 0.5	0.7 ± 0.3	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.7
Эритроциты, 10 ¹² /л	1.99 ± 0.65	1.97 ± 0.55	2.07 ± 0.60	2.10 ± 0.57	2.13 ± 0.66
Гемоглобин, г/л	31.50 ± 9.77	32.0 ± 9.0	29.0 ± 7.8	34.0 ± 9.0	29.0 ± 8.7
Гематокрит, %	8.90 ± 2.58	9.00 ± 2.43	8.0 ± 2.24	9.40 ± 2.54	8.30 ± 2.41
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	101.0 ± 28.1	54.0 ± 12.7*	94.0 ± 23.5	107.0 ± 28.8	91.0 ± 27.7
Тромбокрит, %	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.02

Примечание. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ при сравнении с показателями контроля по критерию Стьюдента. Приведены среднеарифметические значения ± стандартное отклонение (SD).

в 4.3 раза, а в сравнении с группой ЛХС-1269 — в 3.3 раза. При этом на 20-е сутки количество моноцитов в группе НТЛР было выше контрольного значения в 1.7 раза, а в группе с ЛХС-1269 — в 1.8 раза на раннем этапе опухолевого процесса, что также свидетельствует о стимуляции синтеза моноцитов.

В случае нейтрофилов обращает на себя внимание несоответствие тенденции процентного содержания клеток и абсолютного, что связано с автоматическим пересчетом числа клеток на общее количество. К 12-м суткам комбинированное применение ЛХС-1269 и НТЛР дозозависимо увеличивало количество нейтрофилов у животных до 3.3 раза, к 20-м суткам этот эффект снижался для группы НТЛР до значения, неотличимого от контроля, а в группах с ЛХС оказался в 1.5 и 1.3 раза ниже значений контрольной группы. Стоит отметить, что на начальных этапах опухолевого процесса применение комбинации препаратов стимулирует нейтрофильный ответ, на поздних стадиях этот эффект не наблюдается. Предположительно, такое явление связано со специфическим воздействием ЛХС-1269 на данный тип клеток. С другой стороны, можно предположить, что пятикратного введения НТЛР недостаточно для длительного (3 недели) поддержания выработки нейтрофилов.

Таким образом, экспериментально установлено повышение антипролиферативной активности ЛХС-1269 в комбинации с НТЛР. Комбинированное лечение вызывало синергический противоопухолевый эффект, то есть терапевтический эффект комбинированного применения оказался выше и продолжительнее, чем в тех же дозах при монотерапии.

В настоящем исследовании у мышей с опухолью LLC, которым вводили комбинации ЛХС-1269 и НТЛР, регистрировали выраженный устойчивый противоопухолевый ответ. Одним из предполагаемых механизмов антипролиферативной активности комбинации НТЛР и ЛХС-1269 является прямое действие ЛХС-1269 в качестве химиотерапевтического агента и опосредованное действие НТЛР в качестве адъювантного и иммуномодулирующего средства. Учитывая иммунобиологические и колониестимулирующие свойства полисахарида НТЛР [31], а также эпигенетическую и антиангиогенную активность индолокарбазола ЛХС-1269 [36], есть основания полагать, что в комбинации тестируемые соединения активируют пролиферацию нейтрофилов и моноцитов определенных фенотипов с противоопухолевой активностью на более раннем этапе развития опухолей. Стимулирующее действие НТЛР на антипролиферативную активность ЛХС-1269 сопоставимо с показателями ТРО% в сторону уменьшения опухолевого роста LLC в тот

же период наблюдения. Согласно данным, полученным другими авторами в экспериментах на мышах с LLC, показано, что добавление полисахаридов к полихимиотерапии цисплатином/паклитакселом предотвращало развитие нейтропении, вызванной противоопухолевой терапией, повышая ее эффективность за счет восстановления гранулоцитарного роста кроветворения [22, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение полисахарида НТЛР в качестве адъюванта в схему лечения мышей с опухолью LLC повышало антипролиферативную активность ЛХС-1269. Применение НТЛР приводило к росту числа клеток крови мышей — лейкоцитов, лимфоцитов и фагоцитов, ответственных за противоопухолевый иммунитет.

Химиотерапевтическое воздействие комбинации ЛХС-1269 и НТЛР показало выраженный устойчивый противоопухолевый ответ в отношении LLC в системе периферической крови мышей на фоне временного увеличения числа нейтрофилов и моноцитов на 12-е сутки развития опухоли. Очевидно, тестируемые соединения стимулировали пролиферацию нейтрофилов и моноцитов определенных фенотипов с противоопухолевой активностью на более раннем этапе развития LLC. Преимущество комбинированного применения ЛХС-1269 и НТЛР подтверждается данными по критерию торможения опухолевого роста LLC и длительности противоопухолевого эффекта в те же сроки наблюдения за животными.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено в рамках государственного задания по теме «Фармацевтическая разработка и доклинические исследования оригинальных инновационных лекарственных средств с улучшенным профилем безопасности для лечения злокачественных новообразований» (№ АААА-А20-120031190013-9, 2020–2022 гг.) и проекта междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» (№ 23-Ш06-08).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, при-

нятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (заключение № 03П-21/5-24).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Heidkamp J., Scholte M., Rosman C., Manohar S., Fütterer J. J., and Rovers M. M. Novel imaging techniques for intraoperative margin assessment in surgical oncology: A systematic review. *Int. J. Cancer*, **149** (3), 635–645 (2021). DOI: 10.1002/ijc.33570
- Cha J. H., Chan L. C., Song M. S., and Hung M. C. New approaches on cancer immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **10** (8), a036863 (2020). DOI: 10.1101/cshperspect.a036863
- Анисимов М. Н. и Гудимчук Н. Б. «Зоопарк» ингибиторов динамики микротрубочек. *Прупода*, № 8, 3–12 (2020). DOI: 10.7868/S0032874X20080013
- Dona Lemus O. M., Cao M., Cai B., Cummings M., and Zheng D. Adaptive radiotherapy: next-generation radiotherapy. *Cancers*, **16** (6), 1206 (2024). DOI: 10.3390/cancers16061206
- Karati D. and Kumar D. A Comprehensive review on targeted cancer therapy: new face of treatment approach. *Curr. Pharm. Des.*, **29** (41), 3282–3294 (2023). DOI: 10.2174/0113816128272203231121034814
- Siegel R. L., Giaquinto A. N., and Jemal A. Cancer statistics, 2024 [erratum in *CA Cancer J. Clin.*, **74** (2), 203 (2024)]. *CA Cancer J. Clin.*, **74** (1), 12–49 (2024). DOI: 10.3322/caac.21820
- Yu Y., Shen M., Song Q., and Xie J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review. *Carbohydr. Polym.*, **183**, 91–101 (2018). DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.009
- Generalov E. A. Antimetastatic and tumor growth inhibition activity of polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. *ARC J. Cancer Sci.*, **1** (1), 5–10 (2015). DOI: 10.20431/2455-6009.0101002
- Du H., Jin X., Jin S., Zhang D., Chen Q., Jin X., Wang C., Qian G., and Ding H. Anti-leukemia activity of polysaccharide from *sargassum fusiforme* via the pi3k/akt/bad pathway *in vivo* and *in vitro*. *Mar. Drugs*, **21** (5), 289 (2023). DOI: 10.3390/md21050289.
- Li M., Liu Y., Zhang H., Liu Y., Wang W., You S., Hu X., Song M., Wu R., and Wu J. Anti-cancer potential of polysaccharide extracted from *Polygonatum sibiricum* on HepG2 cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Front. Nutr.*, **9**, 1054565 (2022). DOI: 10.3389/fnut.2022.938290
- Yue L., Cui H., Li C., Lin Y., Sun Y., Niu Y., Wen X., and Liu J. A polysaccharide from *Agaricus blazei* attenuates tumor cell adhesion via inhibiting E-selectin expression. *Carb. Pol.*, **88** (4), 1326–1333 (2012). DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.02.015
- Cao R., Jin W., Shan Y., Wang J., Liu G., Kuang S., and Sun C. Marine bacterial polysaccharide EPS11 inhibits cancer cell growth via blocking cell adhesion and stimulating anoikis. *Mar. Drugs*, **16** (3), 85 (2018). DOI: 10.3390/md16030085.
- Ping Z., Xu H., Liu T., Huang J., Meng Y., Xu X., Li W., and Zhang L. Anti-hepatoma activity of the stiff branched β -d-glucan and effects of molecular weight. *J. Mater. Chem. B*, **4** (26), 4565–4573 (2016). DOI: 10.1039/c6tb01299j.
- Jiang Z., Chi J., Li H., Wang Y., Liu W., and Han B. Effect of chitosan oligosaccharide-conjugated selenium on improving immune function and blocking gastric cancer growth. *Eur. J. Pharmacol.*, **891**, 173673 (2020). DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173673.
- Guo R., Chen M., Ding Y., Yang P., Wang M., Zhang H., He Y., and Ma H. Polysaccharides as potential anti-tumor biomacromolecules – a review. *Front. Nutr.*, **9**, 838179 (2022). DOI: 10.3389/fnut.2022.838179
- Li W., Song K., Wang S., Zhang C., Zhuang M., Wang Y., and Liu T. Anti-tumor potential of astragalus polysaccharides on breast cancer cell line mediated by macrophage activation. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **98**, 685–695 (2019). DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.025.
- Bao X., Yuan H., Wang C., Liu J., and Lan M. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*. *Carbohydr. Polym.*, **98**, 1236–1243 (2013). DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.07.018
- Liu Y., Zhang L., Zhu X., Wang Y., Liu W., and Gong W. Polysaccharide *Agaricus blazei* Murill stimulates myeloid derived suppressor cell differentiation from M2 to M1 type, which mediates inhibition of tumour immune-evasion via the toll-like receptor 2 pathway. *Immunology*, **146** (3), 379–391 (2015). DOI: 10.1111/imm.12508.
- Khan T., Date A., Chawda H., and Patel K. Polysaccharides as potential anticancer agents – a review of their progress. *Carbohydr. Polym.*, **210**, 412–428 (2019). DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.064
- Generalov E. A. Study of the structure and immunoenhancing activity of glucan ADVA. *Moscow Univ. Phys.*, **68**, 470–477 (2013). DOI: 10.3103/S0027134913060040
- Pang G., Wang F., and Zhang L. W. Dose matters: direct killing or immunoregulatory effects of natural polysaccharides in cancer treatment. *Carbohydr. Polym.*, **195**, 243–256 (2018). DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.100.
- Gao X. and Homayoonfal M. Exploring the anti-cancer potential of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLPs) and their versatile role in enhancing drug delivery systems: a multifaceted approach to combat cancer. *Cancer Cell Int.*, **23** (1), 324 (2023). DOI: 10.1186/s12935-023-03146-8.
- Safonova E. A., Lopatina K. A., Razina T. G., Zueva E. P., Fedorova E. P., Gur'ev A. M., and Belo-

- usov M. V. Modification of the myelotoxic and antitumor effects of polychemotherapy by polysaccharides from *Tussilago farfara* L. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **166** (2), 197–200 (2016). DOI: 10.1007/s10517-018-4313-5
24. Zenkov R. G., Ektova L. V., Vlasova O. A., Belitskiy G. A., Yakubovskaya M. G., and Kirsanov K. I. Indolo[2,3-*a*]carbazoles: diversity, biological properties, application in antitumor therapy. *Chem. Heterocyc. Comp.*, **56** (6), 644–658 (2020). DOI: 10.1007/s10593-020-02714-4
 25. Kozin D. A., Shprakh Z. S., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V., Avertseva I. N., and Rodionova G. M. Indolo[2,3-*a*]carbazole derivatives with antitumor activity and instrumental methods for their investigation. *Drug Dev. Registr.*, **9** (4), 15–20 (2020). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135
 26. Kolpaksidi A. P., Dmitrieva M. V., Yarosh I. V., and Krasnyuk I. I. Antitumor drugs based on indolocarbazol derivatives. *Pharmacy & Pharmacol.*, **9** (4), 252–265 (2021). DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265
 27. Éktova, L. V., Goryunova, O. V., Eremina, V. A., Tikhonova N. I., and Medvedeva L. A. An improved method for the synthesis of the of indole[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole-5,6-dione N-glycosides and their cytotoxic activity. *Pharm. Chem. J.*, **53**, 604–609 (2019). DOI: 10.1007/s11094-019-02046-4
 28. Николаева Л. Л., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Орлова О. Л., Оборотов А. В., Игнатъева Е. В., Шпрах З. С., Кульбачевская Н. Ю. и Коняева О. И. Разработка состава и технологии получения модели инъекционной формы производного индолокарбазола. *Хим.-фармацевт. журн.*, **57** (6), 42–46 (2023). DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-6-42-46
 29. Vartanian A., Golubeva I., and Shprakh Z. Is vasculogenic mimicry a hallmark of an aggressive tumor? In: *Horiz. Cancer Res.* (Nova Science Publishers, Inc., 2017), v. 65, pp. 13–33.
 30. Vartanian A., Misyurin V. A., Baryshnikova M. A., and Shprakh Z. Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents. *Melanoma Res.*, **27** (1), 8–16 (2017). DOI: 10.1097/CMR.0000000000000308
 31. Generalov E. A. Water-soluble polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L.: radioprotective, colony-stimulation and immunomodulation activities. *Biophysics*, **60** (1), 73–79 (2015).
 32. Generalov E. and Yakovenko L. Receptor basis of biological activity of polysaccharides. *Biophys. Rev.*, **15**, 1209–1222 (2023). DOI: 10.1007/s12551-023-01102-4
 33. Generalov E. A. and Afremova A. I. The Molecular mechanism of the action of *Helianthus tuberosus* L. polysaccharide. *Biophysics*, **61**, 558–564 (2016). DOI: 10.1134/S0006350916040096
 34. Kalitin N. N., Ektova L. V., Kostritsa N. S., Sivirina A. S., Kostarev A. V., Smirnova G. B., Borisova Y. A., Golubeva I. S., Ermolaeva E. V., Vergun M. A., Babaeva M. A., Lushnikova A. A., and Karamysheva A. F. A novel glycosylated indolocarbazole derivative LCS1269 effectively inhibits growth of human cancer cells in vitro and in vivo through driving of both apoptosis and senescence by inducing of DNA damage and modulating of AKT/mTOR/S6K and ERK pathways. *Chem. Biol. Interact.*, **364**, 110056 (2022). DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110056
 35. Голубева И. С., Яворская Н. П., Эктова Л. В., Дмитриева М. В., Борисова Л. М., Еремина В. А., Тихонова Н. И. и Пугачева Р. Б. Противоопухолевая активность некоторых производных N-гликозидов индоло[2,3-*a*]карбазолов с углеводным остатком ксилозой. *Рос. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 86–93 (2020). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-86-93
 36. Zenkov R. G., Vlasova O. A., Maksimova V. P., Fetisov T. I., Karpechenko N. Y., Ektova L. V., Eremina V. A., Popova V. G., Usalka O. G., Lesovaya E. A., Belitskiy G. A., Yakubovskaya M. G., and Kirsanov K. I. Molecular mechanisms of anticancer activity of N-glycosides of indolocarbazoles LCS-1208 and LCS-1269. *Molecules*, **26** (23), 7329 (2021). DOI: 10.3390/molecules26237329
 37. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. | FAOLEX n.d. URL: <https://www.fao.org/faolex/results/details/ru/c/LEX-FAOC098296/> (accessed: 30.08.2023).
 38. Трещалина Е. М., Смирнова Г. Б. и Андропова Н. В. *Коллекция опухолевых штаммов животных для экспериментальной химиотерапии злокачественных опухолей* (Практическая медицина, М., 2022).
 39. Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К., Андропова Н. В. и Гарин А. М. Методические рекомендации 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. 640–657.
 40. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М. и Шахов В. П. *Методы культуры ткани в гематологии* (Изд-во Томского университета, Томск, 1992).
 41. *Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США*. Под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина, А. Голдина и А. Кляйна (Медицина, М., 1980).
 42. Крицкая К. А., Петренко В. С., Ларюшкин Д. П., Намов А. А. и Поцелуева М. М. Действие различных концентраций хелатора железа (дефероксамина), на клетки асцитной карциномы ЭРЛИХА *in vitro*. В сб. *Матер. 22-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»* (Синхробук, Пушино, 2018), с. 352. EDN: URYPPS

Influence of Polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. on Antiproliferative Activity of N-Glycoside Indolo[2,3-a]carbazole Derivative LCS-1269

M.P. Kiseleva*, I.S. Golubeva*, V.P. Deryagina*, A.V. Lantsova*, L.V. Ektova*,
E.A. Kornushenkov*, L.M. Borisova*, and E.A. Generalov**

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,
Kashirskoye Shosse 24, Moscow, 115522 Russia

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

The Lewis model of epidermoid carcinoma that developed in the lungs of F1(C₅₇Bl/6 × DBA/2) hybrid mice has been used while investigating antitumor activity of the N-glycoside derivative indolo[2,3-a]carbazole (LCS-1269) with a polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. as an adjuvant agent. The antitumor effect of LCS-1269 together with the polysaccharide was evaluated by the inhibition of tumor growth in treated animals in comparison to the control group. As a result, it was found that combination of LCS-1269 with the polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. provided more pronounced therapeutic and longer-lasting effect than monotherapy showing a 53–64% decrease in growth of Lewis lung carcinoma for up to a 28-day observation period. Polysaccharide supplementation led to an increase in the number of blood cells - leukocytes, lymphocytes and phagocytes responsible for antitumor immunity. The chemotherapy in combination with LCS-1269 and polysaccharide had a pronounced sustained antitumor effect on Lewis lung carcinoma in the peripheral blood system of mice in presence of a temporarily increased level of neutrophils and monocytes by the 12th day of tumor development. Apparently, the tested compounds stimulated proliferation of neutrophils and monocytes of certain phenotypes with antitumor activity at an earlier stage of Lewis lung carcinoma development.

Keywords: polysaccharide from Helianthus tuberosus L., indolocarbazole derivative LCS-1269, Lewis epidermoid lung carcinoma, antitumor activity

СВОЙСТВА РЕЗОРБИРУЕМЫХ КОНДУИТОВ НА ОСНОВЕ НАНОВОЛОКОН ИЗ ПОЛИ(L-ЛАКТИДА) И ВОЛОКОН ИЗ ХИТОЗАНА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ

© 2024 г. Н.А. Тагандурдыева*, #, М.А. Трубе**, И.О. Шемякин***, Д.Н. Соломицкий***, Г.В. Медведев***, Е.М. Иванькова*, И.П. Добровольская*, ****, В.Е. Юдин*, ****

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

**Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198, Россия

***Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова, ул. Льва Толстого, 6–8, Санкт-Петербург, 197022, Россия

****Институт высокомолекулярных соединений РАН, Большой просп., 31, Санкт-Петербург, 199004, Россия
#E-mail: jemala1996@gmail.com

Поступила в редакцию 12.04.2023 г.

После доработки 12.04.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Разработаны трубчатые кондуиты для регенерации периферических нервов и восстановления дефектов с диастазом более 3 см. Оптимальная конструкция кондуита включает трубку на основе нановолокон из поли(L-лактида) и наполнитель в виде композиционных волокон из хитозана, содержащих нановолокна хитина. Проведено исследование *in vivo* двигательных нарушений с помощью оценки функционального индекса седалищного нерва. Показано, что наличие в конструкции кондуита моноволокон хитозана и композиционных волокон из хитозана, содержащих нановолокна хитина, повышает скорость регенерации седалищного нерва, величина его функционального индекса составляет 76–83. Степень восстановления проводимости нерва, определенная методом измерения амплитуды М-ответа, составляет 46%. Разработанная конструкция кондуита имитирует ориентированную архитектуру нерва, способствует электрической коммуникации между концами поврежденного нерва, создает условия для повышения скорости регенерации нервных волокон и направленности их роста.

Ключевые слова: хитозановые волокна, нановолокна хитина, поли(L-лактид), кондуит, периферические нервные волокна, регенерация.

DOI: 10.31857/S0006302924050173, **EDN:** MIWKZC

В последние десятилетия произошел скачок в понимании патофизиологии повреждений периферической нервной системы и процесса ее регенерации. На основе новой информации наблюдается активное развитие микрохирургических методов лечения, направленных на восстановление нервных волокон с последующим восстановлением сенсорной и/или моторной функции организма. Однако, эта проблема остается нерешен-

ной, так как функциональное восстановление, как правило, не достигает предтравматического уровня [1].

Поврежденные периферические нервы восстанавливаются с помощью хирургического вмешательства, а именно наложением анастомоза конец в конец, конец в бок и бок в бок. Однако это эффективно лишь при размере поврежденного участка нерва, диастазе, менее 3 см.

При реконструкции повреждений размером более 3 см наложение швов отрицательно влияет на регенерацию нерва ввиду возникающих механических напряжений в нервной ткани. Поэтому в таких случаях применяют трансплантаты различного происхождения, а также имплантаты в виде трубчатых каналов – кондуитов [2, 3].

Сокращения: PLA – полилактид (polylactic acid), PGA – полигликолид (polyglycolic acid), PChs – полифиламентные хитозановые волокна (multifilament chitosan yarn), MChs – монофиламентные хитозановые волокна (monofilament chitosan yarn), Chs-ChNF – монофиламентные хитозановые волокна, наполненные нановолокнами хитина (monofilament chitosan yarn with chitin nanofibrils), SFI – функциональный индекс седалищного нерва (sciatic functional index).

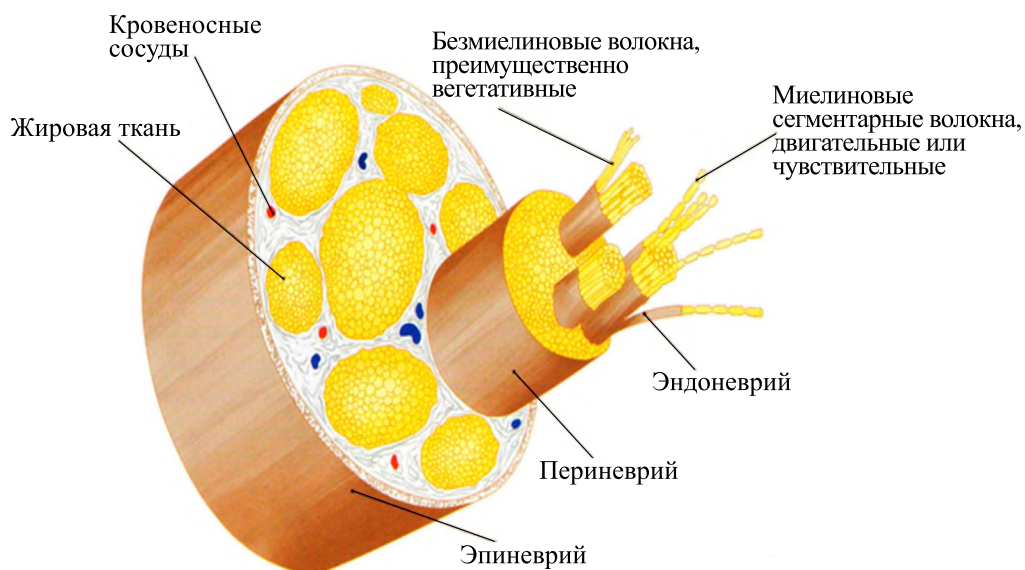


Рис. 1. Строение периферического нерва [26].

Чаще всего восстановление периферического нерва проводят методом аутотрансплантации, который считается «золотым стандартом» [4–7]. Аутотрансплантат является каркасом, который обеспечивает направление регенерации нервных волокон, жизнеспособность шванновских клеток (леммоцитов) и диффузию к месту дефекта нейротрофических факторов [8–10]. Однако этот метод обладает множеством ограничений, связанных с необходимостью многократных операций, с отличием размеров трансплантата и нервной ткани, дефицита донорского материала. Трудности в восстановлении нервной ткани связаны с инвазией рубцовой ткани, что обусловлено миграцией фибробластов в зону диастаза [4, 11].

Перечисленные проблемы частично решаются применением алло- и ксенотрансплантатов, но их клиническое применение ограничено в связи с частными случаями иммунного отторжения, вторичной инфекции и других системных побочных эффектов [12].

Многих перечисленных недостатков лишены кондуиты на основе природных и синтетических полимеров. Однако лишь часть из них превосходит по своим характеристикам аутотрансплантаты, а большинство не позволяет восстанавливать дефекты с диастазом более 3 см. Помимо этого существует сложность их хирургического применения, а продукты разложения могут оказывать негативное воздействие на живой организм. Если имплантат получен из нерезорбируемого материала, требуется повторная операция с целью его удаления [4, 5, 13]. Поэтому исследования по получению конструкций для регенерации нервов продолжаются с учетом результатов современных достижений в области нейрофизиологии, цито-

логии, медицины и материаловедения. Важно отметить, что эти исследования направлены преимущественно на разработку биорезорбируемых кондуитов, конструкция которых стимулирует рост аксонов, приводящий к замещению дефектов с большим диастазом.

Такие конструкции состоят из полимерной трубки, внутренний канал которой содержит стволовые или соматические клетки, компоненты межклеточного матрикса, гелеобразный и/или волокнистый наполнитель [14–21]. Наполнители создают благоприятную среду для направленного движения шванновских клеток, снижению их дезориентации [22, 23]. Клетки выполняют важнейшие функции в процессе регенерации нерва, они стимулируют формирование миелиновой оболочки нейронов, выполняют опорную функцию, способствуют ионному обмену тела нейрона с внешней средой, что приводит к возможности передачи возбуждения по нервным волокнам.

Процесс естественной регенерации нерва при малом диастазе включает формирование фибринового канала между нервными концами (рис. 1). Это обеспечивает инфильтрацию шванновских клеток и образование лент Бюнгнера, состоящих из ориентированных столбцов ламинина и выровненных шванновских клеток. В процессе регенерации аксоны следуют за лентами Бюнгнера до дистального конца, что приводит к реиннервации [24, 25].

Однако при больших дефектах образование фибриновых каналов и лент Бюнгнера затруднительно, поэтому регенерирующим нервным волокнам трудно пересечь большой промежуток без внешней поддержки. Для этого используют

наполнители кондуитов, которые можно разделить на биохимические и физические. Биохимические включают в себя шванновские клетки, нервные стволовые клетки, мезенхимные или эмбриональные стволовые клетки, факторы роста, нейротрофические факторы, нуклеиновые кислоты и молекулы внеклеточного матрикса, такие как коллаген, ламинин и фибронектин и др. [27]. Таким образом, биохимические наполнители позволяют создать в кондуите микросреду, способствующую регенерации аксонов.

В качестве физических наполнителей используют гели, губки, микрофиламенты, микроволокна, нити, многоканальные структуры и их комбинации, которые вводятся непосредственно в просвет канала [5, 27–32]. Подобные наполнители усиливают направленную регенерацию путем имитации ориентированной архитектуры фасцикулярного нерва. Разделение внутреннего просвета кондуита на более мелкие направляющие трубки уменьшает дисперсию аксонов, которая обычно возникает в полых каналах. Наполнители также влияют на адгезию, пролиферацию и миграцию шванновских клеток, на транспорт питательных веществ, инфильтрацию кровеносных сосудов, ограничивают инфильтрацию клеток, препятствующую росту аксонов [33, 34].

Введение в просвет кондуита волокнистых материалов приводит к формированию анизотропной структуры пор, продольный размер которых значительно выше поперечного, увеличению площади поверхности внутреннего канала. Это создает оптимальную топологию среды для адгезии и роста клеток [27], усиливает образование миелинизированных аксонов, что способствует восстановлению сенсорной функции органов [14, 19–21, 35].

В литературе можно найти исследования применения различных наполнителей природного происхождения, таких как хитозан [14, 36], фиброины шелка [11, 37–39], коллаген [17], а также такие белки, как ламинин и фибронектин [40–42] и др. при восстановлении целостности нервных волокон. В сравнении с другими природными полимерами хитозан обладает преимуществами. Он способен уменьшать образования рубцовой ткани и поддерживать регенерацию аксонов, продукты резорбции хитозана оказывают нейрозащитное действие, а его физические и химические свойства позволяют моделировать физиологическую структуру периферических нервов [43–47]. Продукты распада хитозана, в частности, хитозановые олигосахариды, способствуют пролиферации клеток и предотвращению апоптоза. Это связано со способностью хитозановых олигосахаридов ускорять клеточный цикл, повышать пролиферативную активность шванновских клеток [48–50].

Однако, несмотря на все достоинства хитозана, получение кондуитов на его основе ограничено из-за сложностей, которые возникают при создании структуры кондуита. Такая структура должна обеспечивать обменные процессы, сопрождающие регенерацию нервной ткани. С другой стороны, препятствовать инфильтрации фибробластов и других клеток в область диастаза до полного восстановления нервной ткани, а также защищать нервную ткань от компрессии.

В качестве полимеров для кондуитов интересны поли- α -гидроксизефиры [51], наиболее известными из которых являются полилактид (PLA), полигликолид (PGA), поликапролактон и их сополимеры [52].

В связи с тем что требуется сохранение механических свойств кондуитов на более длительный срок, целесообразно применение в качестве кондуитов PLA. В ряде работ приведены результаты исследований применения PLA в качестве кондуитов самостоятельно или совместно с другими модифицирующими агентами [36, 53–56]. При этом кондуиты на основе этого полимера показали себя как нетоксичные, биосовместимые материалы с контролируемой скоростью резорбции и способностью замещать дефекты более 3 см, также они способствуют образованию значительного количества миелинизированных волокон и кровеносных сосудов, организованных пучков с множеством регенерирующих кластеров, состоящих из нервных волокон, окруженных слоями уплотненных периневриум подобных клеток [54, 55].

В связи с вышесказанным, целью работы являлась разработка конструкции резорбируемого кондуита на основе нановолокон из поли(L-лактида) и композиционных волокон из хитозана, содержащих в качестве наполнителя нанофибриллы хитина, исследование *in vivo* их влияния на регенерацию седалищного нерва крысы и восстановление ее двигательной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Для получения трубчатых матриц использовали биорезорбируемый полимер – PLA фирмы Corbion PURAC (Нидерланды) с молекулярной массой 20 кДа. В качестве растворителя использовали хлороформ производства фирмы «Экос-1» (Россия). Полимер растворяли при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 60–90 мин, концентрация полимера в растворе составляла 16 масс. %.

Трубку из нановолокон получали методом электроформования на вращающийся цилиндрический приемный электрод. Диаметр приемного электрода составлял 1.5 мм, скорость его вращения 1500 об/мин, скорость подачи раствора 0.5–0.7 мл/ч,

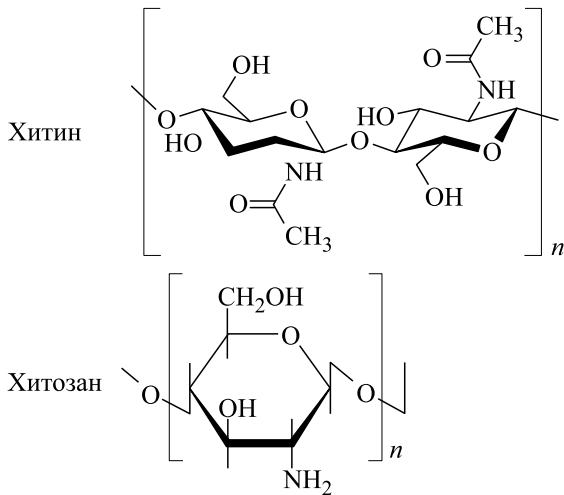


Рис. 2. Структурные формулы макромолекул хитина и хитозана.

напряжение между подающим и приемным электродом 27–29 кВ, расстояние между ними 150 мм. Полученную после электроформования нановолоконную трубку из PLA обрабатывали в фиксированном на электроде состоянии при $T = 90^{\circ}\text{C}$ в течение часа. Толщина стенки трубки составляла 300–350 мкм.

В качестве наполнителя кондуита использовали волокна на основе хитозана. Хитозан является самым распространенным производным природного полисахарида – хитина (рис. 2). Хитин и хитозан обладают такими ценными характеристиками, как биосовместимость и биорезорбируемость. Хитозан – катионный полисахарид основного характера, включает звенья остатков 2-амино-2-деокси- β -D-глюкопиранозы, соединенных β -(1–4)-гликозидной связью, обладает полиэлектролитными свойствами. Продукты резорбции хитозана оказывают нейрозащитное действие, а его физические и химические свойства позволяют моделировать физиологическую структуру периферических нервов [43–47].

В качестве основы кондуита в настоящей работе выбран материал на основе нановолокон из поли(L-лактида). В качестве наполнителя, обеспечивающего направленный рост аксонов, а также электрический контакт между концами поврежденного нерва, использовали волокна из хитозана, а также композиционные волокна на его основе, содержащие в качестве наполнителя нановолокна хитина.

Для получения хитозановых моно- и полифиламентных волокон, а также композиционных волокон использовали хитозан фирмы Biolog Herpe (Германия) с молекулярной массой 164.2 кДа и степенью деацетилирования 92.4%. Наполнителем композиционных волокон являлись нановолокна хитина фирмы SRL Mavi Sud (Италия),

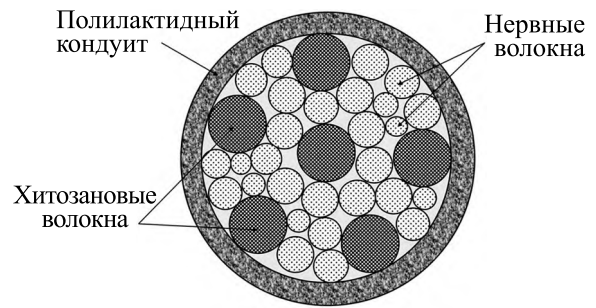


Рис. 3. Схема кондуита, наполненного хитозановыми моноволоконками.

структура которых описана в работе [57]. Способ получения волокон из хитозана описан в работах [58, 59].

Исследования *in vivo*. Эксперименты *in vivo* проводили на самцах белых крыс Wistar. Масса подопытных животных составляла 180–200 г, возраст – 3 месяца. Животных оперировали под общей анестезией (растворы Zoletil 100 – 0.1 мл и Rometarum 20 мг/мл – 0.0125 мл на 0.1 кг массы животного, интраперитонеально).

В экспериментах *in vivo* по регенерации седалищного нерва крысы использовали в качестве кондуитов трубки из нановолокон PLA, трубки, содержащие моноволокна хитозана, и композиционные моноволокна, содержащие 5–50 масс. % нановолокна хитина, а также полифиламентные нити, состоящие из моноволокон. Диаметр моноволокон составлял 45–50 мкм, в полифиламентных нитях диаметр одного волокна составлял 20–25 мкм. Количество волокон в пучке – 75–100 штук.

Количество волокон в кондуит вводили в количестве, обеспечивающем 50% свободного объема во внутреннем канале кондуита. Свободный объем необходим для направленного роста шванновских клеток, транспорта белков, необходимых для регенерации аксонов. Исходя из геометрических размеров кондуита и наполнителя, в трубку с внутренним диаметром 1.2–1.5 мм и толщиной стенок 300–350 мкм вводили моноволокна диаметром 45–50 мкм или 20–25 мкм для полифиламентных нитей. На рис. 3 представлена модель, а на рис. 4 – фотография кондуита, наполненного хитозановыми моноволоконками.

Животных случайным образом разделяли на семь групп. В экспериментах по имплантации в каждой группе использовали аутоневральные вставки, PLA-кондуиты без волокон, PLA-кондуиты с наполнителями в виде полифиламентных хитозановых волокон (PChs), монофиламентных хитозановых волокон (MChs) и монофиламентных хитозановых волокон, наполненных нановолокнами хитина (Chs-ChNF) в количестве

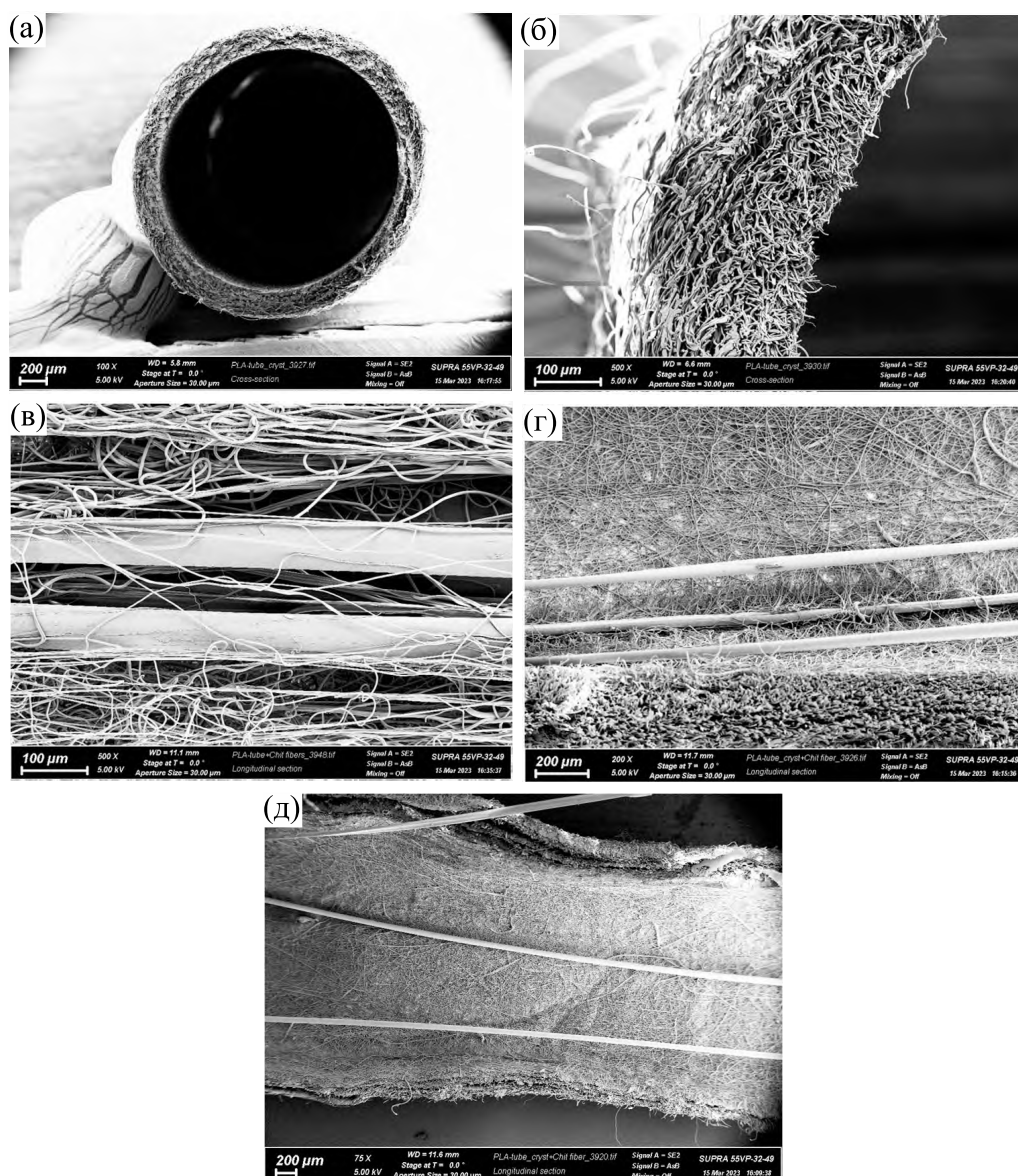


Рис. 4. Микрофотографии трубчатого кондуита на основе нановолокон поли(L-лактида) и моноволокон из хитозана: (а) и (б) – торец кондуита на основе поли(L-лактида); (в) – внутренняя структура кондуита с хитозановыми волокнами до кристаллизации; (г) и (д) – внутренняя структура кондуита с хитозановыми волокнами после кристаллизации.

0.5 масс. % (Chs-ChNF 0.5%), 30 масс.% (Chs-ChNF 30%) и 50 масс.% (Chs-ChNF 50%). В каждой группе было по 10 животных.

Схема имплантации кондуита в седалищный нерв крысы представлена на рис. 5. Животным под общей анестезией повреждали седалищный нерв и на уровне середины бедренной кости создавали диастаз размером 10 мм. В контрольной группе (с аутоновральными вставками) резецированный дистальный сегмент нерва подшивали к проксимальному концу нерва и наоборот. В остальных группах диастаз замещали кондуитами. На рис. 5 приведены фотографии операции

по имплантации аутоневральной вставки и кондуита на основе нановолокон из PLA, содержащего волокна из хитозана. После имплантации раны послойно ушивали атрауматическими иглами с нитью Prolen 4-0.

После проведения оперативного вмешательства животных содержали в специальных условиях в течение четырех месяцев со свободным доступом к воде и пище и возможностью свободно передвигаться. Все животные были активны, негативное влияние от имплантации материалов не выявлено, о чем свидетельствовали общее

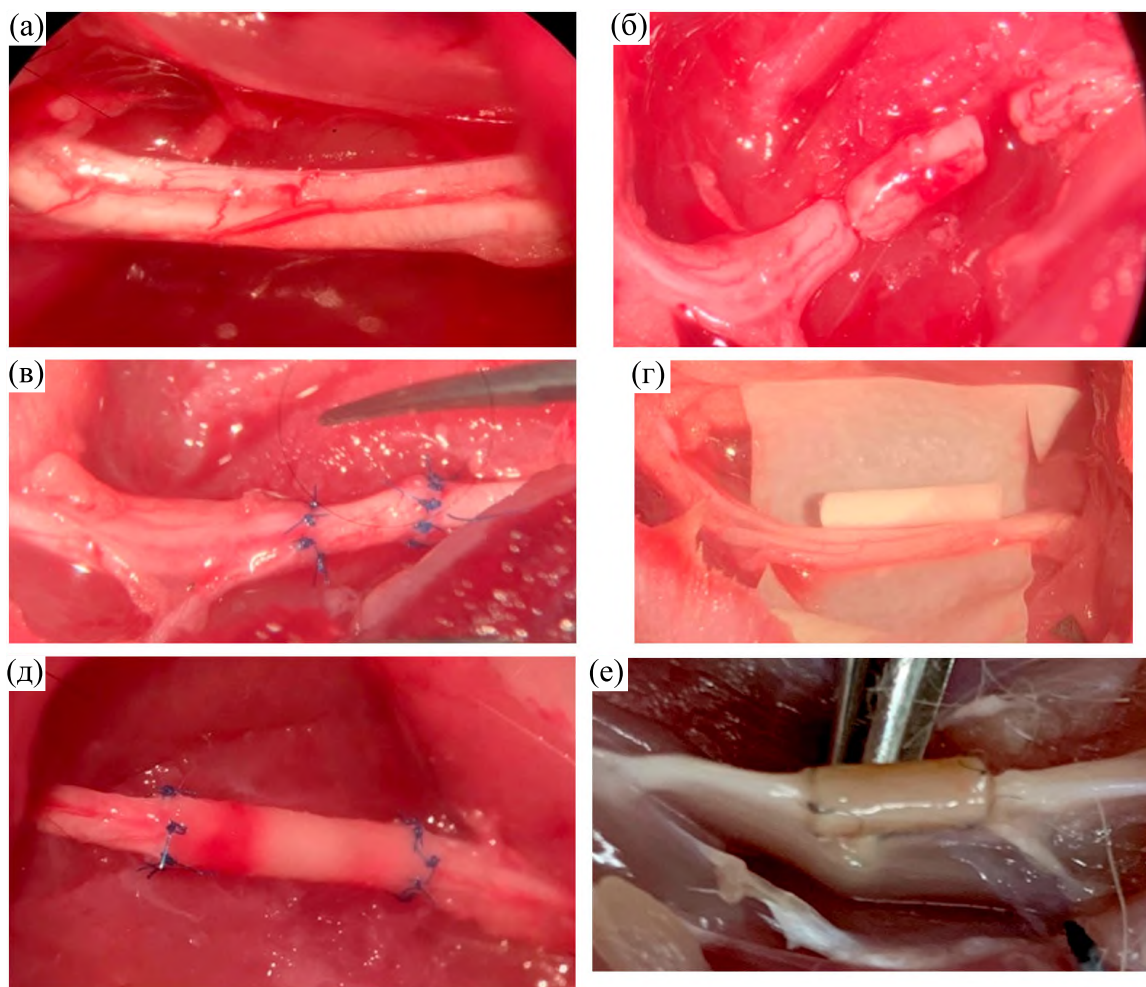


Рис. 5. (а) – Нативный седалищный нерв; (б) – седалищный нерв с диастазом 10 мм; (в) – дефект нерва, замещенный аутоневральной вставкой; (г) – трубчатый кондуит на основе нановолокон из PLA; (д) – кондуит, имплантированный в седалищный нерв; (е) – кондуит через 4 месяца после имплантации.

поведение и отсутствие воспалительных процессов в зоне имплантации.

Оценка степени восстановления проводимости нервов. Наиболее объективным методом оценки функционального состояния периферических нервов является электронейромиография [60].

Электронейромиография – метод диагностики, основанный на регистрации и анализе биоэлектрических потенциалов мышц и периферических нервов. Процедура электронейромиографии заключается в воздействии низкоинтенсивных электрических импульсов и фиксации реакции мышцы, иннервируемой этим нервом. Поскольку исследуются сразу несколько двигательных единиц, входящих в состав одной мышцы, то оценивается суммарный потенциал действия всех двигательных единиц – М-ответ. Амплитуда М-ответа указывает на количество

двигательных единиц в данной мышце, ее снижение может говорить о снижении количества двигательных единиц.

Для проведения электронейромиографии животных иммобилизовали на манипуляционном столике, далее референтный и стимулирующий электроды вводили в *m. biceps femoris* (двуглавая мышца бедра), заземляющий электрод фиксировали на стопе.

Оценка восстановления двигательной функции после регенерации поврежденных седалищных нервов проведена путем определения функционального индекса (SFI). Для этого отпечатки задних лап фиксировали на предварительно подготовленных бумажных полосках, после чего животных отпускали с целью их передвижения по заданной траектории.

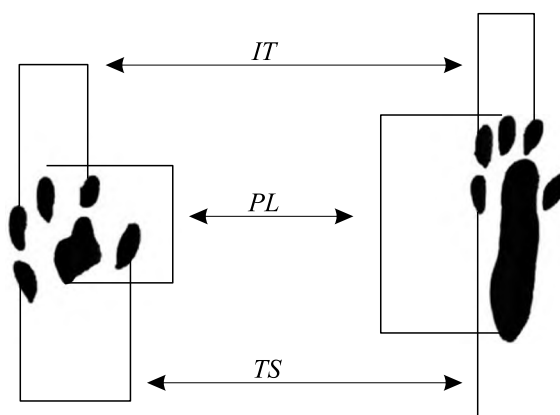


Рис. 6. Схема параметров измерения SFI.

Измеряемыми параметрами (как у нормальных (N), так и у экспериментальных (E) лап) являются длина отпечатка (PL), длина от кончика

самого длинного пальца до пятки (TS) и промежуточным разводом пальцев (IT) (рис. 6). Индекс SFI вычисляли по следующей формуле:

$$SFI = -38.3 \frac{PL_E - PL_N}{PL_N} + 109.5 \frac{TS_E - TS_N}{TS_N} + 13.3 \frac{IT_E - IT_N}{IT_N} - 8.8. \quad (1)$$

Согласно формуле, значение SFI равно нулю у интактной конечности, тогда как у животных с нефункционирующим нервом эта величина равна 100.

следования животных, у которых проводили реконструкцию седалищного нерва с использованием кондуитов на основе нановолокон из PLA, представлены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка восстановления проводимости нервов. Результаты электронейромиографического ис-

Из данных табл. 1 следует, что через четыре недели наблюдения у всех животных наблюдалось значительное снижение амплитуды М-ответа, что свидетельствует о существенном снижении

Таблица 1. Значения амплитуды М-ответа

Трубчатый кондуит/наполнитель	Значения амплитуды М-ответа, мВ		
	Интактный нерв	Через 4 недели	Через 16 недель
Аутоневральная вставка	26.6–31.2	4.8–8.1	12.7–16.7
	28.9 ± 3.3	6.8 ± 2.4	15.1 ± 5.2
PLA	24.5–30.1	4.0–6.1	7.1–10.3
	27.3 ± 3.8	5.1 ± 1.8	8.8 ± 3.9
PLA/MChs	24.3–29.7	4.1–6.9	12.5–15.1
	27.2 ± 3.6	5.5 ± 2.2	13.8 ± 3.2
PLA/PChs	27.4–29.3	3.0–4.5	5.1–8.7
	27.8 ± 2.1	3.9 ± 1.5	6.9 ± 4.7
PLA/Chs-ChNF 0.5%	28.1–32.5	2.9–5.1	10.1–14.8
	30.1 ± 3.1	4.3 ± 1.7	12.5 ± 5.8
PLA/Chs-ChNF 30%	25.8–30.9	3.7–6.0	11.2–14.2
	28.8 ± 3.7	4.9 ± 1.4	12.7 ± 3.7
PLA/Chs-ChNF 50%	25.6–28.9	4.9–5.8	12.2–15.9
	28.2 ± 2.5	5.3 ± 0.9	14.1 ± 4.6

нервно-мышечной проводимости задних конечностей по сравнению с интактными конечностями. Через 16 недель значения амплитуд М-ответа увеличиваются во всех случаях, кроме кондуитов, содержащих наполнитель в виде PChs. Более высокие значения амплитуды М-ответа наблюдали при заполнении внутреннего канала кондуита MChs, а также композиционными моноволокнами, содержащими 50 масс.% наночастиц хитина. Отметим, что значения М-ответа для таких конструкций кондуита существенно выше, чем аналогичные значения для кондуита из полый трубки и с наполнителем из полифиламентных нитей и близки к аналогичным значениям у животных, для регенерации нерва у которых использовали метод «золотого стандарта» — ауто-невральную вставку.

Это говорит о том, что наличие моноволокон из хитозана оказывает положительное влияние на скорость направленного роста аксонов, скорость регенерации и миелинизацию нервов. Это связано с двумя факторами: первый — за счет структурирования свободного объема трубки, образования межволоконного пространства в виде продольных каналов. Моноволокна хитозана обладают высоким модулем упругости, до 7.8 ГПа. Это придает жесткость образовавшейся внутри трубки структуры. Хорошая упорядоченность структуры наполнителя в продольном направлении, оптимальный размер пор и их ориентация вдоль оси трубки способствуют направленному росту шванновских клеток, формированию структуры нерва, близкой к нативной. Второй важной особенностью хитозана и волокон на его основе являются их электролитные свойства [61]. Наличие NH_3^+ -ионов в жидкой среде обеспечивает ионную проводимость и тем самым способствует коммуникации между концами нерва. Итак, наличие в кондуите волокон на основе хитозана способствует регенерации седалищного нерва крысы с диастазом 10 мм.

Оценка восстановления двигательной активности. Оценка восстановления двигательной функции после регенерации поврежденного седалищного нерва проведена методом определения SFI через 16 недель после имплантации (рис. 7).

Значение SFI равно нулю у интактного нерва, тогда как у нефункционирующего нерва величина SFI близка к 100.

Из данных, приведенных на рис. 7, следует, что через 16 недель после имплантации кондуитов с различными волоконными наполнителями или без них величина SFI меньше 100. Это свидетельствует о протекании процесса восстановле-

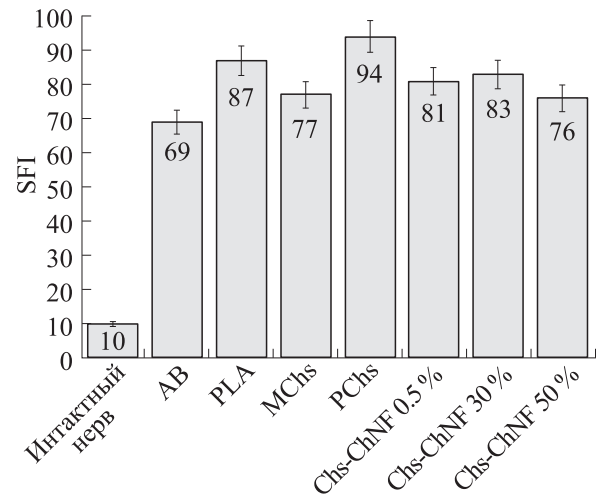


Рис. 7. Значения SFI через 16 недель после имплантации.

ния седалищного нерва. Наиболее интенсивно этот процесс наблюдается при наполнителе в виде моноволокна из хитозана и композиционного волокна, содержащего 50 масс.% наночастиц хитина. В случае отсутствия в трубке волоконного наполнителя процесс восстановления нерва происходит медленней. Это свидетельствует о положительном влиянии структуры внутреннего объема кондуита, каналов, которые формируются в межволоконном пространстве, что способствует направленному росту регенерирующих аксонов, влияет как на скорость, так и на их количество.

Следует отметить, что во всех случаях использования кондуитов из нановолокон величина SFI несколько выше, чем при использовании ауто-невральной вставки. Однако окончательный вывод о достоинствах кондуитов для восстановления седалищного нерва можно будет сделать после длительного наблюдения за животными, при использовании стимулирующих электрических и механических воздействий.

ВЫВОДЫ

Получены резорбируемые кондуиты для регенерации периферических нервов в виде трубок из нановолокон поли(L-лактида), в которых элементами для направленного роста аксонов являются волокна из хитозана, а также композиционные волокна, содержащие 0.5–50.0 масс.% наночастиц хитина.

Показано, что композиционные моноволокна на основе хитозана и наночастиц хитина с модулем упругости $E = 7.8$ ГПа способствуют направленному росту нейронов.

Высказано предположение, что ионная проводимость хитозана способствует коммуникации концов нейронов периферического нерва.

Исследования восстановления проводимости нерва, проведенные методом определения амплитуды М-ответа, показали, что наличие моноволокон хитозана в конструкции кондуита увеличивает значение амплитуды М-ответа.

Результаты исследования двигательной активности показали ускорение восстановления поврежденных нервов при наличии в кондуите наполнителей в виде моноволокон хитозана. Оценка SFI подтверждает наличие функционального восстановления седалищного нерва при наполнении кондуитов моноволоконными (SFI = 76–83).

В целом можно сделать вывод, что наличие в трубчатой конструкции кондуита на основе нановолокон из поли(L-лактида) моноволокон из хитозана положительно влияет на скорость и степень регенерации поврежденных периферических нервов. Содержание нанофибрилл хитина в композиционном волокне из хитозана повышает восстановление функций задних конечностей животного.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с крысами проводили в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (принципы Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г., и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными 1996 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Houshyar Sh., Bhattacharyya A., and Shanks R. Peripheral nerve conduit: materials and structures. *ACS Chem. Neurosci.*, **10** (8), 3349–3365 (2019). DOI: 10.1021/acscchemneuro.9b00203
- Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J. Hand Surg.*, **25A**, 391–414 (2000). DOI: 10.1053/jhsu.2000.4165
- Meek M. F. and Coert J. H. US Food and Drug Administration/Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Ann. Plast. Surg.*, **60** (1), 110–116 (2008). DOI: 10.1097/SAP.0b013e31804d441c
- Babu P., Behl A., Chakravarty B., Bhandari P., Bhatti T., and Maurya S. Entubulation techniques in peripheral nerve repair. *Ind. J. Neurotrauma*, **5**, 15–20 (2008). DOI: 10.1016/S0973-0508(08)80023-8
- de Ruiter G. C. W., Malesy M. J. A., Yaszemski M. J., Windebank A. J., and Spinner R. J. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg. Focus.*, **26**, E5 (2009). DOI: 10.3171/FOC.2009.26.2.E5
- Millesi H. Bridging defects: autologous nerve grafts. *Acta Neurochir. Suppl.*, **100**, 37–38 (2007). DOI: 10.1007/978-3-211-72958-8_8
- Hodgkin A. L. and Huxley A. F. Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature*, **144**, 710–711 (1939). DOI: 10.1038/144710a0
- Dahlin L. B. and Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, **12**, 341–352 (2001). DOI: 10.1016/S1042-3680(18)30059-7
- Hudson A. R., Morris J., Weddell G., and Drury A. Peripheral nerve autografts. *J. Surg. Res.*, **12**, 267–274 (1972). DOI: 10.1016/0022-4804(72)90021-2
- Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J. Neurocytol.*, **23**, 1–28 (1994). DOI: 10.1007/BF01189813
- Huang W., Begum R., Barber T., Ibba V., Tee N. C. H., Hussain M., Arastoo M., Yang Q., Robson L. G., Lesage S., Gheysens T., Skaer N. J. V., Knight D. P., and Priestley J. V. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. *Biomaterials*, **33**, 59–71 (2012). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.030
- Seddon H. J. Three types of nerve injury. *Brain*, **66**, 237–288 (1943). DOI: 10.1093/brain/66.4.237
- Kehoe S., Zhang X. F., and Boyd D. FDA Approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury*, **43**, 553–572 (2012). DOI: 10.1016/j.injury.2010.12.030
- Wang X., Hu W., Cao Y., Yao J., Wu J., and Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/pga artificial nerve graft. *Brain*, **128**, 1897–1910 (2005). DOI: 10.1093/brain/awh517
- Quigley A. F., Razal J. M., Thompson B. C., Moulton S. E., Kita M., Kennedy E. L., Clark G. M., Wallace G. G., and Kapsa R. M. I. A conducting-polymer platform with biodegradable fibers for stimulation and guidance of axonal growth. *Adv. Mater.*, **21**, 4393–4397 (2009). DOI: 10.1002/adma.200901165
- Jing W., Ao Q., Wang L., Huang Z., Cai Q., Chen G., Yang X., and Zhong W. Constructing conductive conduit with conductive fibrous infilling for peripheral nerve regeneration. *Chem. Eng. J.*, **345**, 566–577 (2018). DOI: 10.1016/j.cej.2018.04.044
- Yoo J., Park J. H., Kwon Y. W., Chung J. J., Choi I. C., Nam J. J., Lee H. S., Jeon E. Y., Lee K., Kim S. H.,

- Jung Y., and Park J. W. Augmented peripheral nerve regeneration through elastic nerve guidance conduits prepared using a porous PLCL membrane with a 3D printed collagen hydrogel. *BioMater. Sci.*, **8**, 6261–6271 (2020). DOI: 10.1039/D0BM00847H
18. Quigley A. F., Razal J. M., Thompson B. C., Moulton S. E., Kita M., Kennedy E. L., Clark G. M., Wallace G. G., and Kapsa R. M. I. A Conducting-polymer platform with biodegradable fibers for stimulation and guidance of axonal growth. *Adv. Mater.*, **21**, 4393–4397 (2009). DOI: 10.1002/adma.200901165
 19. Chew S. Y., Mi R., Hoke A., and Leong K. W. Aligned protein-polymer composite fibers enhance nerve regeneration: a potential tissue-engineering platform. *Adv. Funct. Mater.*, **17**, 1288–1296 (2007). DOI: 10.1002/adfm.200600441
 20. Newman K. D., McLaughlin C. R., Carlsson D., Li F., Liu Y., and Griffith M. Bioactive hydrogel-filament scaffolds for nerve repair and regeneration. *Int. J. Artif. Organs*, **29**, 1082–1091 (2006). DOI: 10.1177/039139880602901109
 21. Cai J., Peng X., Nelson K. D., Eberhart R., and Smith G. M. Permeable guidance channels containing microfilament scaffolds enhance axon growth and maturation. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **75**, 374–386 (2005). DOI: 10.1002/jbm.a.30432
 22. Erturk A., Hellal F., Enes J., and Bradke F. Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *J. Neurosci.*, **27**, 9169–9180 (2007). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0612-07.2007
 23. Menorca R. M. G., Fussell T. S., and Elfar J. C. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.*, **29**, 317–330 (2013). DOI: 10.1016/j.hcl.2013.04.002
 24. Evans G. R. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat. Rec.*, **263**, 396–404 (2001). DOI: 10.1002/ar.1120
 25. Johnson E. O., Zoubos A. B., and Soucacos P. N. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*, **36** (Suppl. S4), S24–S29 (2005). DOI: 10.1016/j.injury.2005.10.012
 26. Siemionow M. and Brzezicki G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int. Rev. Neurobiol.*, **87**, 141–172 (2009). DOI: 10.1016/S0074-7742(09)87008-6
 27. Jiang X., Lim S. H., Mao H.-Q., and Chew S. Y. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Exp. Neurol.*, **223**, 86–101 (2010). DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.09.009
 28. Ngo T.-T. B., Waggoner P. J., Romero A. A., Nelson K. D., Eberhart R. C., and Smith G. M. Poly(L-lactide) microfilaments enhance peripheral nerve regeneration across extended nerve lesions. *J. Neurosci. Res.*, **72**, 227–238 (2003). DOI: 10.1002/jnr.10570
 29. Saeki M., Tanaka K., Imatani J., Okamoto H., Watanabe K., Nakamura T., Gotani H., Ohi H., Nakamura R., and Hirata H. Efficacy and safety of novel collagen conduits filled with collagen filaments to treat patients with peripheral nerve injury: a multicenter, controlled, open-label clinical trial. *Injury*, **49**, 766–774 (2018). DOI: 10.1016/j.injury.2018.03.011
 30. Ceballos D., Navarro X., Dubey N., Wendelschafer-Crabb G., Kennedy W. R., and Tranquillo R. T. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.*, **158**, 290–300 (1999). DOI: 10.1006/exnr.1999.7111
 31. Navissano M., Malan F., Carnino R., and Battiston B. Neurotube for facial nerve repair. *Microsurgery*, **25**, 268–271 (2005). DOI: 10.1002/micr.20128
 32. Sundback C., Hadlock T., Cheney M., and Vacanti J. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials*, **24**, 819–830 (2003). DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00409-X
 33. Stang F., Fansa H., Wolf G., Reppin M., and Keilhoff G. Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, **26**, 3083–3091 (2005). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.060
 34. Allodi I., Udina E., and Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog. Neurobiol.*, **98**, 16–37 (2012). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.005
 35. Gámez E., Goto Y., Nagata K., Iwaki T., Sasaki T., and Matsuda T. Photofabricated gelatin-based nerve conduits: nerve tissue regeneration potentials. *Cell Transpl.*, **13**, 549–564 (2004). DOI: 10.3727/000000004783983639
 36. Xie F., Li Q. F., Gu B., Liu K., and Shen G. X. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a biodegradable chitosan–PLA composite peripheral nerve guide conduit material. *Microsurgery*, **28**, 471–479 (2008). DOI: 10.1002/micr.20514
 37. Radtke C., Allmeling C., Waldmann K.-H., Reimers K., Thies K., Schenk H. C., Hillmer A., Guggenheim M., Brandes G., and Vogt P. M. Spider silk constructs enhance axonal regeneration and remyelination in long nerve defects in sheep. *PLoS One*, **6** (2), e16990 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0016990
 38. Yang Y., Ding F., Wu J., Hu W., Liu W., Liu J., and Gu X. Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, **28** (36), 5526–5535 (2007). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.001
 39. Wang C., Jia Y., Yang W., Zhang C., Zhang K., and Chai Y. Silk fibroin enhances peripheral nerve regeneration by improving vascularization within nerve conduits. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **106**, 2070–2077 (2018). DOI: 10.1002/jbm.a.36390
 40. Ito T., Nakamura T., Suzuki K., Takagi T., Toba T., Hagiwara A., Kihara K., Miki T., Yamagishi H., and Shimizu Y. Regeneration of hypogastric nerve using a polyglycolic acid (PGA)-collagen nerve conduit filled with collagen sponge proved electrophysiologically in a canine model. *Int. J. Artif. Organs*, **26** (3), 245–251 (2003). DOI: 10.1177/039139880302600311

41. Matsumoto K., Ohnishi K., Kiyotani T., Sekine T., Ueda H., Nakamura T., Endo K., and Shimizu Y. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.*, **868** (2), 315–328 (2000). DOI: 10.1016/s0006-8993(00)02207-1
42. Kiyotani T., Teramachi M., Takimoto Y., Nakamura T., Shimizu Y., and Endo K. Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.*, **740** (1–2), 66–74 (1996). DOI: 10.1016/s0006-8993(96)00848-7
43. Yuan Y., Zhang P., Yang Y., Wang X., and Gu X. The interaction of schwann. cells with chitosan membranes and fibers *in vitro*. *Biomaterials*, **25**, 4273–4278 (2004). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.029
44. Simões M. J., Gärtner A., Shirotsaki Y., Gil da Costa R. M., Cortez P. P., Gartner F., Santos J. D., Lopes M. A., Geuna S., Varejão A. S. P., and Maurício A. C. *In vitro* and *in vivo* chitosan membranes testing for peripheral nerve reconstruction. *Acta Med. Port.*, **24** (1), 43–52 (2011). DOI: 10.20344/amp.344
45. Meyer C., Stenberg L., Gonzalez-Perez F., Wrobel S., Ronchi G., Udina E., Sukanuma S., Geuna S., Navarro X., Dahlin L. B., Grothe C., and Haastert-Talini K. Chitosan-film enhanced chitosan nerve guides for long-distance regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials*, **76**, 33–51 (2016). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.040
46. Stenberg L., Kodama A., Lindwall-Blom C., and Dahlin L. B. Nerve regeneration in chitosan conduits and in autologous nerve grafts in healthy and in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Eur. J. Neurosci.*, **43**, 463–473 (2016). DOI: 10.1111/ejn.13068
47. Neubrech F., Sauerbier M., Moll W., Seegmüller J., Heider S., Harhaus L., Bickert B., Kneser U., and Kremer T. Enhancing the outcome of traumatic sensory nerve lesions of the hand by additional use of a chitosan nerve tube in primary nerve repair. *Plast. Reconstr. Surg.*, **142**, 415–424 (2018). DOI: 10.1097/PRS.0000000000004574
48. Boecker A., Daeschler S. C., Kneser U., and Harhaus L. Relevance and recent developments of chitosan in peripheral nerve surgery. *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 104 (2019). DOI: 10.3389/fncel.2019.00104
49. Huang H.-C., Hong L., Chang P., Zhang J., Lu S.-Y., Zheng B.-W., and Jiang Z.-F. Chitoooligosaccharides attenuate Cu²⁺-induced cellular oxidative damage and cell apoptosis involving Nrf2 activation. *Neurotox. Res.*, **27**, 411–420 (2015). DOI: 10.1007/s12640-014-9512-x
50. Wang Y., Zhao Y., Sun C., Hu W., Zhao J., Li G., Zhang L., Liu M., Liu Y., Ding F., Yang Y., and Gu X. Chitosan degradation products promote nerve regeneration by stimulating schwann. cell proliferation via MiR-27a/FOXO1 Axis. *Mol. Neurobiol.*, **53**, 28–39 (2016). DOI: 10.1007/s12035-014-8968-2
51. Duffy P., McMahon S., Wang X., Keaveney S., O’Cearbhaill E. D., Quintana I., Rodríguez F. J., and Wang W. Synthetic bioresorbable poly- α -hydroxyesters as peripheral nerve guidance conduits; a review of material properties, design strategies and their efficacy to date. *Biomater. Sci.*, **7**, 4912–4943 (2019). DOI: 10.1039/C9BM00246D
52. Chrzęszcz P., Derbisz K., Suszyński K., Miodoński J., Trybalski R., Lewin-Kowalik J., and Marcol W. Application of peripheral nerve conduits in clinical practice: A literature review. *Neurol. Neurochir. Pol.*, **52**, 427–435 (2018). DOI: 10.1016/j.pjnns.2018.06.003
53. Lu M. C., Huang Y. T., Lin J. H., Yao C. H., Lou C. W., Tsai C. C., and Chen Y. S. Evaluation of a multi-layer microbraided polylactic acid fiber-reinforced conduit for peripheral nerve regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **20** (5), 1175–1180 (2009). DOI: 10.1007/s10856-008-3646-4
54. Goulart C. O., Lopes F. R. P., Monte Z. O., Dantas S. V., Souto A., Oliveira J. T., Almeida F. M., Tonda-Turo C., Pereira C. C., and Borges C. P. Evaluation of biodegradable polymer conduits—poly (l-lactic acid)—for guiding sciatic nerve regeneration in mice. *Methods*, **99**, 28–36 (2016). DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.09.008
55. Matsumine H., Sasaki R., Yamato M., Okano T., and Sakurai H. A polylactic acid non-woven nerve conduit for facial nerve regeneration in rats. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **8** (6), 454–462 (2014). DOI: 10.1002/term.1540
56. Binan L., Tendey C., De Crescenzo G., El Ayoubi R., Aji A., and Jolicœur M. Differentiation of neuronal stem cells into motor neurons using electrospun poly-L-lactic acid/gelatin scaffold. *Biomaterials*, **35** (2), 664–674 (2014). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.097
57. Dobrovol’skaya I. P., Kasatkin I. A., Yudin V. E., Ivan’kova E. M., and Elokhovskii V. Y. Supramolecular structure of chitin nanofibrils. *Polym. Sci. Ser. A*, **57**, 52–57 (2015). DOI: 10.1134/S0965545X15010022
58. Yudin V. E., Dobrovolskaya I. P., Neelov I. M., Dresvyanina E. N., Popryadukhin P. V., Ivan’kova E. M., Elokhovskii V. Y., Kasatkin I. A., Okrugin B. M., and Morganti P. Wet spinning of fibers made of chitosan and chitin nanofibrils. *Carbohydr. Polym.*, **108**, 176–182 (2014). DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.02.090
59. Dresvyanina E., Yudenko A., Yevlampieva N., Maevskaia E., Yudin V., Gubarev A., Slyusarenko M., and Heppe K. The molecular mass effect on mechanical properties of chitosan fibers. *FibRes. Text.*, **25**, 27–31 (2018).
60. Pavot A., Ignacio D., and Tchou S. Thermography in peripheral nerve injury and its relationship to electroneuromyography. *Adv. Tech. Clin. Appl. Biomed. Thermol.*, **255**, 255–280 (1994).
61. Zhang M., Zhang F., Li C., An H., Wan T., and Zhang P. Application of chitosan and its derivative polymers in clinical medicine and agriculture. *Polymers*, **14**, 958 (2022). DOI: 10.3390/polym14050958

Properties of Resorbable Conduits Based on Poly(L-lactide) Nanofibers and Chitosan Fibers for Peripheral Nerve Regeneration

N.A. Tagandurdyeva*, M.A. Trube**, I.O. Shemyakin***, D.N. Solomitskiy***, G.V. Medvedev***, E.M. Ivan'kova*, I.P. Dobrovolskaya*, ****, and V.Ye. Yudin*, ****

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

**Peoples' Friendship University of Russia, ul. Mikluho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

***Pavlov First State Medical University of St. Petersburg, ul. Lva Tolstogo 6-8, Saint Petersburg, 197022 Russia

****Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Bolshoi prosp. 31, Saint Petersburg, 199004 Russia

Tubular conduits have been developed to regenerate peripheral nerves and repair defects with a diastase more than 3 cm. An optimal design of a conduit consists of a tube based on poly(L-lactide) nanofibers and chitosan composite fibers with chitin nanofibrils. In the study performed with *in vivo* model for motor dysfunction, nerve functional status has been assessed by means of the sciatic functional index. It has been shown that chitosan monofibers and chitosan composite fibers with chitin nanofibrils in the design of conduits can increase the regeneration rate of the sciatic nerve, the sciatic functional index is 76–83. The degree of nerve conduction recovery, determined by measuring the amplitude of the M response, is 46%. The developed conduit design imitates the oriented architecture of the nerve, facilitates electrical communication between the ends of the damaged nerve, and promotes increased rate of nerve regeneration and the direction of nerve growth.

Keywords: chitosan fibers, chitin nanofibrils, poly(L-lactide), conduit, peripheral nerve fibers, regeneration

УДК 577.3

ПРОСВЕЩЕНИЕ И КОММЕРЦИЯ

© 2024 г. Г.Р. Иваницкий*,#

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

#E-mail: ivanitsky@iteb.ru

Поступила в редакцию 04.12.2023 г.

После доработки 15.07.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

В начале XXI века усилилось распространение негативных тенденций, подрывающих развитие научных знаний. Они представляли угрозу не только для интеллектуального развития молодого поколения, но и тормозили развитие науки в целом. Их появление было продуктом сформировавшегося общества потребления, которое основано на развитии технологий коммерции. Возник вопрос: как противостоять этим негативным тенденциям?

Ключевые слова: понижение требования к научным знаниям, общество потребления, засорение Интернета ложной ненаучной информацией.

DOI: 10.31857/S0006302924040182, EDN: MIPPEA

В начале XX века в странах Запада возникло и стремительно стало развиваться общество потребления (англ. *consumer society*). Россию эта волна захлестнула в 90-е годы XX века. Общественные отношения стали определяться не историческими культурными традициями, основанными на просвещении, а оборотом денег на рынке товаров и услуг. Направленно происходило выведение нового вида людей — вместо *Homo sapiens* (Человека разумного) создавался *Homo edax* (Человек потребляющий). Интересы людей быстро менялись.

С одной стороны, происходила коммерческая стандартизация внешнего вида, так называемой элиты общества. Расширяется «индустрия красоты и моды». Например, происходит широкое распространение омолаживающих процедур и пластических операций. Ускорился темп изменений моды. Вещи стали мгновенно обесцениваться, т.е. намного быстрее, чем физически изнашиваться. В обществе потребления человек, «отставший от моды», чувствовал себя символически бедным. Мода, диктуемая рынком, стала приводить к оболваниванию людей. При этом совершенствовались с помощью рекламы методы манипулирования сознанием.

С другой стороны, образование, особенно высшее, становилось платной рыночной услугой, что ограничивает его приобретение в массовых масштабах на конкурсной основе. Физкультура и спорт также проходили процесс коммерциализа-

ции. Доступ к занятиям физкультурой становился платной услугой. Профессиональный спорт превращал спортсменов в товар. Они перепродавались и покупались клубами.

Итак, «хотели как лучше, а получилось как всегда» — на первый план вышло индивидуальное потребление материальных благ и формирование новой системы ценностей. Прошлые ценности, такие как необходимость всестороннего умственного, нравственного и духовного развития человека, отошли на второй план. Крылатая фраза: *встречают по одежке, а провожают по уму*, потеряла свою лучшую половину фразы.

Невежественных людей легче обмануть, продавая им любой товар. Социальная система вместо борьбы с невежеством, часто не отдавая себе отчета, стала насаждать его. В контексте этой статьи необходимо отметить, что для развития науки самым угрожающим явлением оказалась ее коммерциализация. Она не обошла и такую науку, как биофизика. «Утечка умов» отразилась на ее развитии.

Мои оценки в 2000 г. были еще оптимистичными — в статье «Новый старт или последний финиш» [1] я писал: «... в академических научных центрах обычно считали фундаментальную науку составной частью культуры и мало думали о прагматизме, столь характерном, например, для американских ученых. В нашей стране занятие наукой для старшего поколения было и оставалось

процессом, в котором удовлетворяется желание познать законы Природы. Результаты науки для нас не товар или способ обогащения, а, скорее, средство самоутверждения в постижении истины. У нас есть еще ученые — носители «ноу-хау» таких школ, которые сформировали и продолжают формировать оазисы и очаги новых мировых научных ценностей, оставаясь при этом на прежних позициях в отношении к науке. Ценность российской фундаментальной науки для западной цивилизации, как мы в этом убеждаемся на протяжении последних 10 лет, состоит не в том, чтобы мы с нашей низкой технической оснащенностью и финансированием лабораторий включились бы в гонку в научных областях, имеющих технологическую направленность, а в своеобразии идей существующих научных школ. Начавшийся процесс нашей тесной кооперации с мировой наукой будет долгим (хотя, возможно, и взаимовыгодным) и для многих мучительным. Он продлится не одно поколение, так как доктрины развития науки и менталитеты научных сотрудников в прошлом были разными».

Я ошибался, введение западной Болонской системы образования на российскую почву быстро принесло вредные плоды. Обратная сторона развития Интернета усилила пагубное влияние западной системы образования на школьное образование России.

УРОКИ ПРОШЛОГО ПРИ ПЕРЕХОДЕ К НАСТОЯЩЕМУ ВРЕМЕНИ

В 60-х годах XX века в России с распространением лженаучных теорий велась активная борьба, в которой участвовали многие выдающиеся ученые того периода. Например, профессор, д. ф.- м. н. А.И. Китайгородский (который в тот период возглавлял отдел в Институте биологической физики АН СССР) написал прекрасную книгу «Реникса» [2]. Эта книга была посвящена новым научным методам, получившим распространение в тот период (в частности электронно-парамагнитный резонанс, ядерно-магнитный резонанс). В науках, изучающих духовную жизнь людей, эти методы только начинали внедряться и, естественно, сталкивались с трудностями. Автор книги доходчиво и с юмором показал, каков характер этих трудностей, как научное знание борется с легковерием, пустословием, лжеучениями и как забвение научного подхода к исследованиям тех или иных явлений открывает дорогу всевозможным «чудесам», к которым он относил телепатию.

В Москве в 1970–1990-х годах в издательстве «Педагогика» была организована серия научно-популярных книг «Ученые — школьнику» («Библиотека Детской энциклопедии»). Книги пред-

назначались для читателей среднего и старшего школьного возраста. Авторами книг были видные деятели науки (обычно академики и члены-корреспонденты Академии наук) или крупные общественные деятели. В качестве рецензентов также выступали члены Академии наук. За этот период было опубликовано 83 книги по самым актуальным темам того периода. Некоторые примеры книг из этой серии, имеющих отношение к биофизике, показаны на рис. 1.

Кроме того, общество «Знание» выпускало массовыми тиражами серию брошюр по всем направлениям науки. Печать брошюр была самой простой и дешевой, и стоили они копейки. В основе пропаганды научных знаний лежала не коммерция, а забота о подрастающем поколении.

Написать популярную и интересную брошюру или книгу для молодежи — это большой труд, но для автора он окупался тем, что он сам лучше начинал понимать цель своей работы и совершенствовал собственную логику поиска ответов на главные вопросы, отделяя их от второстепенных вопросов.

Я убедился в этом на собственном опыте, написав по просьбе редакций популярных научных журналов и общества «Знание» два десятка статей и брошюр. Написание популярных статей — это тренировка мозга, подобная стихосложению, поскольку это работа с образами. Приобретение навыка кратко и образно излагать свои мысли важно при занятии научными исследованиями. Математика тоже работает с образами, т.е. с символами. Для примера ограничусь лишь пятью примерами из своих научно-популярных публикаций [3–7].

Книга «Мир глазами биофизика» [8], написанная для подростков, имела тираж 150000 экземпляров и стоила всего 40 копеек. По современным ценам — это меньше 50 рублей. Когда несколько лет спустя я стал читать лекции по биофизике студентам, то один из них мне сказал, что после прочтения этой книги, когда он был школьником 7-го класса, занятия биофизикой стали целью его научных интересов. Я считаю, что это самая высокая похвала за проделанную работу.

Школьная образовательная деятельность в наукограде Пушкино началась еще в 60-х годах, когда был заметен контраст между уровнем знаний, которыми обладали приглашенные специалисты институтов, и уровнем преподавания основ науки в средней школе. Речь шла не столько о содержании школьных курсов, сколько о качестве реализации принятых учебных программ. Тогда-то у меня с профессором МГУ С.Э. Шнолем возникла идея: в воскресные дни привлечь без отрыва от их



Рис. 1. Примеры книг для детей, написанные крупными учеными страны: (а) – академик В.М. Глушков, выдающийся ученый страны в области кибернетики; (б) – академик А.Н. Несмеянов, выдающийся ученый в области элементоорганической химии, президент АН СССР; (в) – академик Е.И. Чазов, выдающийся ученый в области кардиологии; (г) – академик А.Б. Мигдал, выдающийся физик-теоретик; (д) – академик Ю.А. Овчинников, вице-президент АН СССР; (е) – член-корреспондент АН СССР Б.Ф. Ломов, специалист в области инженерной и педагогической психологии; (ж) – член-корреспондент АН СССР и член-корреспондент РАН Г.Р. Иваницкий, биофизик; (з) – академик К.В. Судаков, специалист в области изучения мотиваций и эмоциональных стрессов у человека и животных; (и) – академик А.А. Самарский, выдающийся специалист в области вычислительной математики, математической физики, теории математического моделирования.

основной деятельности к работе со школьниками научные кадры институтов и местной интеллигенции Пушкино. Тем более что среди школьников значительную часть составляли дети самих сотрудников институтов города. В Доме ученых по воскресеньям сотрудники Института биологической физики АН СССР читали лекции для детей по различным направлениям современной науки. Слухи об этом лектории быстро распространились по всему району. По воскресеньям родители из соседних поселков начали привозить своих детей, чтобы они получали знания из первых рук [9]. Результат оказался весьма полезным и дал впоследствии свои плоды. Многие из слушателей с успехом поступили в ведущие вузы страны [10].

В период развала СССР правительству было не до борьбы с распространением лженаучных теорий. Псевдонаучные теории начали получать широчайшее распространение в России в конце 80-х и начале 90-ых годов. Российская медицина во времена перестройки переживала серьезный упадок. Больной человек мог надеяться только на чудо. Телевидение интенсивно пропагандировало распространение мистики, паранормальных явлений, магов и колдунов, что не только приводило к оглуплению населения, но подрывало здоровье людей.

На экранах телевизоров появился так называемый экстрасенс-гипнотизер (Анатолий Кашпировский), который якобы мог удаленно лечить телезрителей, смотрящих его передачу. Другим «чудом» был экстрасенс с интеллигентной внешностью (Аллан Чумак), пассами обрабатывающий с экрана воду, стакан с которой телезритель должен был разместить перед экраном телевизора. По утверждению выступающего, эта вода становилась лечебным зельем, помогавшим от всех болезней. Мы пытались разоблачить это шарлатанство, но нам не верили. Только в 2014 г., проведя множество экспериментов, удалось показать, что вода не может сохранять эффекты от любых внешних физических воздействий на нее, т.е. не обладает долговременной памятью [11].

Но этими примерами мракобесие не ограничилось. В 90-х годах началось строительство так называемых энергетических пирамид (Александр Голод), которые, якобы, были преобразователями или накопителями некоей неизвестной науке «космической биоэнергии». Автор утверждал, что продукты, помещенные внутрь пирамиды, начинали восстанавливать здоровье людей, которые использовали их. Нам удалось разоблачить этот миф [12].

Можно привести десятки других подобных примеров с предсказателями, астрологами и колдунами. Академия наук пыталась вести контр-

пропаганду, но она была неэффективна, поскольку игнорировалась. Это не удивительно. Эти лже-теории пользовались популярностью даже в высших эшелонах власти: в книге «„Ученые“ с большой дороги»¹ академик РАН и председатель Комиссии по борьбе с лженаукой и фальсификацией научных исследований академик Э. П. Кругляков описывал случай, когда охранник президента России Александр Коржаков оказал протекцию автору «теории» получения энергии из камней. Глава государства Борис Ельцин одобрил ее, выделив «изобретателю-шарлатану» на эксперименты из бюджета страны 120 млн рублей, несмотря на протест научного сообщества. Из биографических материалов известно, что Ельцин верил и экстрасенсам. Публикации об оживших мертвецах, торсионных полях и других псевдонаучных теориях выходили в тот период в крупных СМИ и даже в правительственной «Российской газете».

Казалось бы, что смутные времена прошли, и не стоит вспоминать о них. Однако это не так.

ИНТЕРНЕТ КАК СИСТЕМА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ДЕЗИНФОРМАЦИИ

Во-первых, создание собственных страниц в Интернете привело к тому, что количество блогеров в РФ по разным данным в 2023 г. насчитывало от 750 тысяч до миллиона человек. Владелец страницы в сети Интернет обычно размещает общедоступную для людей информацию. Ограничивающее условие — в течение суток ею должны заинтересоваться более трех тысяч пользователей сети. Однако некоторые из блогеров с целью заработка денег вели в прямом эфире передачи, совершая над собой или гостями опасные для здоровья, порою садистские унижительные действия (англ. *Trash stream*). Были случаи, когда они кончались летальным исходом. Более трех лет в Государственной думе велись дискуссии о запрете подобных передач. Последняя информация от 6 ноября 2023 года: правительство России подготовило положительные отзывы на пакет проектов Думы, вводящих наказание за треш-стрим. Треш-стрим — это пример крайне негативного влияния Интернета на молодежь.

¹ Это была серия книг и сборников, публиковавшаяся Академией наук по инициативе академика РАН Э.П. Круглякова, в которых рассказывалось о том, как в России и во многих развитых странах мира возникла и сформировалась новая форма организованной преступности, пропагандирующая лженауку. В книгах рассказывалось, как мошенники, рядящиеся в тогу ученых, при поддержке СМИ рекламировали бессмысленные приборы-пустышки, бесстыдно обманывая старых больных людей, как в общественное сознание проникают термины из арсенала махровой лженауки и как некоторым лжеученым удается грабить даже государство. Ряд статей из этих книг был переведен и опубликован во многих странах мира.

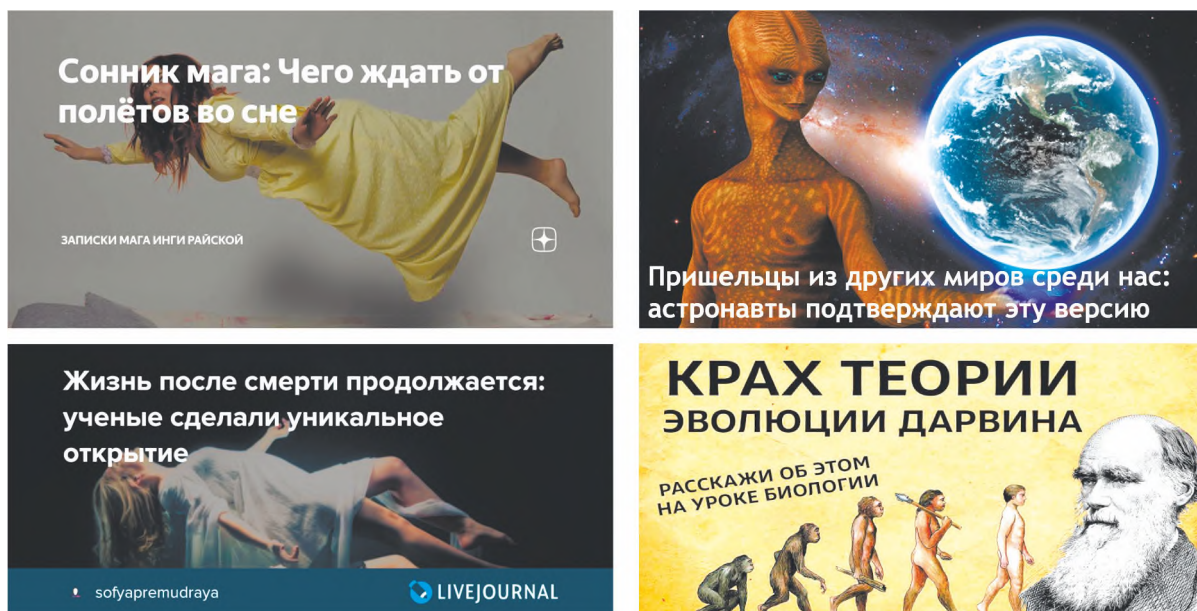


Рис. 2. Некоторые примеры рекламных афиш статей блогеров о различных мистических учениях и об эзотерических теориях.

Однако есть менее ужасный, но тем не менее опасный другой вариант. В поисковой системе «Яндекс» в 2016 г. появился экспериментальный проект, который анализировал поведение пользователей и предлагал им персонализированную ленту рекомендаций. Это была так называемая блог-платформа «Дзен», которая позволяла пользователям создавать и публиковать свои статьи, видео и подкасты².

«Яндекс.Дзен» значительно расширил свои возможности и аудиторию, став одной из крупнейших платформ для маркетинга в России и СНГ. Им пользовались владельцы интернет-магазинов, блогеры, преподаватели и др. В 2020 г. «Яндекс.Дзен» добавил функцию видеосторий (англ. *stories*), которая дала авторам возможность создавать короткие видеоролики с текстом и музыкой, снабженные стикерами — яркими индивидуальными, иногда подвижными «наклейками»-заголовками. 28 апреля 2022 г. «Яндекс.Дзен» был выкуплен российской инвестиционной технологической корпорацией «ВК». После этого название платформы упростилось: из двух слов названия одно исчезло, и эта цифровая платформа стала называться просто «Дзен».

Казалось бы, что в таком варианте обмена информацией с целью рекламы той или иной продукции ничего плохо нет. Однако не случайно говорят, что *дорога в Ад выстлана благими намерени-*

² Подкаст — это программа, доступная для скачивания через Интернет, например аудиофайлов, которые пользователь загружает на свое персональное устройство для прослушивания в удобное для себя время.

ями. Сам термин «Дзен» таил в себе многие опасности³ и оказал существенное негативное влияние, поскольку сформировал ленту квазинаучных публикаций, автоматически подстраиваясь под интересы молодежной аудитории.

Некоторые предприимчивые блогеры, не обладающие знаниями, занялись популяризацией эзотерических теорий, так называемых тайных учений, а попросту мистикой и другими лженаучными построениями, выдавая их за достижения современной науки, доступные лишь избранным. При этом свое изложение они снабжали яркими рекламными афишами (рис. 2).

Многих блогеров не волновала научная достоверность даваемой ими информации. Главное для них — это лайки аудитории. Они ориентированы на повышение частоты посещения их страниц и роста числа подписчиков. Чем больше пользователей, тем выше доход блогеров. Продвинутые блогеры, умеющие удерживать аудиторию, получают в месяц 150–300 тыс. руб. [13]

За первый квартал 2023 г. дневная аудитория портала «Дзен» составила 32.5 млн человек, а месячная, согласно данным «Коммерсанта», — 70 млн. К июлю 2023 г. на «Дзене» было зарегистрировано 80.7 млн человек. Таким образом, для

³ Термин *дзен* в широком смысле — это школа мистического созерцания или учение о просветлении, появившееся на основе смешения буддийского мистицизма и молодежного нигилизма. Другими словами, формирование у человека желания ставить под сомнение общепринятые ценности, идеалы, нормы нравственности, культуру и отрицать такие фундаментальные понятия, как объективная истина, знание, мораль и даже смысл жизни.

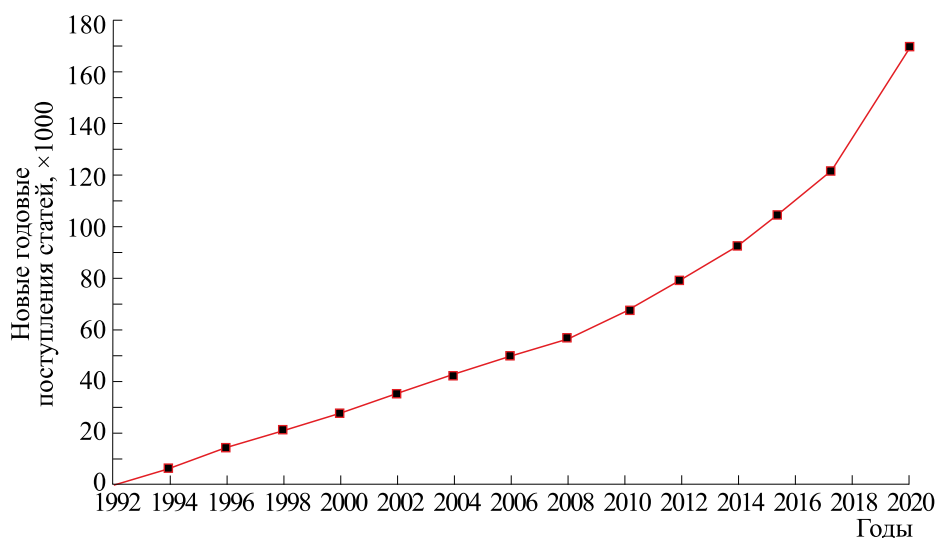


Рис. 3. Статистика годового суммарного прироста статей по всем направлениям науки в arXiv.org с 1991 по 2020 годы. Годовой шаг прироста увеличился от 5000 в 1991 г. до 50000 в 2020 г. Далее скачок роста стал еще больше.

каждого блогера найдется своя аудитория, даже если он излагает абсолютную чепуху.

Помимо подростковой, молодежной аудитории и у представителей научного сообщества возникли новые проблемы, созданные коммерциализацией науки.

ОТ ПОЯВЛЕНИЯ ПРЕПРИНТОВ К КОММЕРЦИАЛИЗАЦИИ НАУЧНЫХ ЖУРНАЛОВ

Во второй половине XX века в научном сообществе с благими намерениями была запущена волна нового варианта обмена научной информацией. Появилась неформальная практика обмена препринтами на электронных носителях, т.е. *черновыми версиями будущих статей*, которые не проходили предварительного рецензирования. Объясняли это тем, что рецензирование существенно увеличивает сроки публикации статей в научных журналах. Подобная ускоренная система передачи информации оправдывалась тем, что позволяла быстро закреплять авторство новых открытий. Наибольшую роль в распространении препринтов сначала сыграли ученые, работающие в области физики, прежде всего в физике высоких энергий. В 1967 г. в Стэнфордском университете началась разработка электронного компьютерного архива препринтов, который мог обрабатывать практически неограниченное количество библиографических записей. В России, например, Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН издает препринты с 1968 г., в Пущинском научном центре биологических исследований препринты начали издаваться с 1970 г.

Казалось бы, такая система рассылки препринтов позволяла авторам предотвращать ненужное дублирование исследований и ускорять продвижение их по карьерной лестнице. Тем не менее, тогда основное содержание препринтов впоследствии публиковалось в рецензируемых журналах на бумажных носителях.

Период 1980–1990-х годов характеризовался массовым распространением компьютеров. На замену рассылки бумажных версий препринтов по обычной почте пришла новая система – рассылка аннотаций работ, посылаемых по электронной почте, после чего заинтересовавшийся той или иной статьей искал ее в базе данных или запрашивал копию у автора. У такого распространения информации был свой недостаток. Если публикация высылалась по обычной почте, то могло пройти много времени до момента получения запрашиваемого препринта.

Борьба за скорость обмена информацией уже в конце XX века и в XXI веке привела к широкому распространению электронных архивов (arXiv.org), которые обладали открытым доступом к научным статьям и препринтам по всем разделам науки, включая биофизику. Однако информация, размещенная в них, перед публикацией статьи не рецензировалась, а проходила лишь первичную проверку модератором. Создание arXiv оказало существенное влияние на развитие движения за открытый доступ к информации как основного способа обмена научными данными во всех областях науки.

Произошел бурный рост архивов. Например, согласно исследованию 2015 г., около 75% работ физиков и биофизиков по теме конденсированного состояния депонировались в arXiv'e. Напри-

мер, опрос профессорского состава Оклахомского университета показал, что 92% преподавателей математики и 67% физиков использовали препринты arXiv для поддержки и распространения своих исследований. Начиная с 2012 г. в arXiv'e начали публиковать работы в сфере всей биологии.

С каждым годом объемы архивов росли. В последние годы в arXiv.org особенно увеличивалось количество статей по экономике, финансам и биологии (рис. 3).

В 2016 г. в базах данных публикаций Scopus и Web of Science было проиндексировано около 1.92 млн статей. В 2022 г. это число подскочило до 2.82 млн. Но этот скачок не был связан с ростом научных знаний, потому что количество присуждаемых научных степеней не только не увеличилось, а даже снизилось. Скорее всего, рост публикаций определялся внедрением в научных Институтах метрических показателей оценки эффективности исследователей. Появилось требование: «*Публикуй как можно больше статей — не выступишь норму по статьям, будешь понижен в должности*». Причина, по-видимому, была в том, что научные учреждения стали оцениваться вышестоящими организациями, руководящими развитием науки, по величине прироста количества публикаций.

Серьезные обзорные научные публикации, требующие много времени на написание обзора и отвечающие на вопросы, куда идет то или иное научное направление или какие проблемы становятся актуальными и практически важными, — становятся редкостью. Это была не только российская проблема. На Западе ситуация аналогичная, а возможно, и более катастрофичная.

Американский статистик Марк Хансен (*Marc Hansen*) — профессор Высшей школы журналистики Колумбийского университета и директор Института медиа инноваций им. супругов Браун приводит следующие статистические данные. На долю нескольких издателей — MDPI, Elsevier, Frontiers, Springer-Nature и Wiley — приходится более 70% прироста статей в год. Фактически только в MDPI⁴ прирост составил 27%.

Количество опубликованных работ в MDPI значительно выросло: в 2017, 2018 и в 2019 годах ежегодный рост составил более 50%. В 2019 г. было опубликовано 110000 работ. В 2021 г. было опубликовано 235638 работ, т.е. прирост более чем в 2 раза. В 2020 году MDPI был крупнейшим издателем статей открытого доступа в мире и пя-

тым издателем по объему выпуска журнальных статей [14].

При этом возникли проблемы. В феврале 2014 г. MDPI был включен в список Джеффри Билла⁵, т.е. в его список ненадежных издательских компаний открытого доступа, которые на первое место ставили не качество публикаций, а заработок денег [15]. Дж. Билла беспокоило, что «*журналы MDPI содержат сотни слабо рецензируемых статей, которые в основном написаны и опубликованы для продвижения по службе, а не для распространения научных сведений...*». Билл также утверждал, что MDPI использовал электронную почту для вымогательства рукописей у авторов [16], а также включало в редакции своих журналов в рекламных целях Нобелевских лауреатов без их ведома.

MDPI отрицал обвинения Дж. Билла [17]. Некоторые из авторов статей, изданных MDPI, встали на защиту издательства. Тяжба продолжалась несколько месяцев, наконец, MDPI было удален из Beall's list. Однако даже после его удаления Билл продолжал критиковать MDPI; в декабре 2015 г. он написал: «*ясно, что MDPI рассматривает рецензирование как всего лишь формальный шаг, который издателем приходится терпеть, прежде чем публиковать статьи и принять деньги от авторов...*» и «*ясно, что рецензированием MDPI руководит невежественный канцелярский персонал, особенно в Китае...*» [18]. Короче говоря, просвещение и научные знания с коммерцией несовместимы.

Почему так увеличилось количество статей? У М. Хансена и его коллег не было прямого доступа к данным о доходах издателей, деятельность которых они исследовали, но имелись подозрения, что это связано с получением большой прибыли. Недавний анализ, проведенный в Quantitative Science Studies, показал, что плата за статьи действительно привела к огромному увеличению доходов коммерческих издателей. В журнале Science организацией AAAS⁶ была опубликована статья, авторы которой подсчитали, что в период с 2015 по 2018 годы ученые заплатили пяти крупнейшим издателям (Elsevier, Sage, Springer-Nature,

⁵ Джеффри Билл (*Jeffrey Beall*) — американский библиотеквед, адъюнкт-профессор библиотеки при Университете штата Колорадо в Денвере, составитель основанного на продолжительном мониторинге «списка Джеффри Билла», в котором он на своем веб-сайте Scholarly Open Access фиксировал недобросовестных издателей, выпускающих книги и статьи в журналы открытого доступа.

⁶ AAAS (*The American Association for the Advancement of Science*), т.е. Американская ассоциация содействия развитию науки — международная некоммерческая организация, заявленная цель которой заключается в содействии сотрудничеству между учеными, защите свободы исследований, поощрении научной ответственности, а также в поддержке образования и науки на благо человечества.

⁴ MDPI — это многопрофильный институт цифрового издательства научных журналов с открытым доступом, который имеет редакции в 11 странах, одно из крупных издательств в мире. Эта организация коммерческая, т.е. взимает плату с автора за публикацию статьи в открытом доступе.

Taylor & Francisco и Wiley) более 1 млрд долларов за статьи, публикуемые в открытом доступе. Все отмечали, что эти компании имеют «непристойно высокую норму прибыли».

Неудивительно, что MDPI и другие издатели не согласны с анализом М. Хансена и соавторов. Представитель MDPI сообщил газете *El Pais* (испанская газета «Страна»), что данные «сомнительны и неточны», а расходы издательства существенно не возросли. Представитель издательства Frontiers утверждал, что его журналы «обеспечивают тщательную проверку научных работ перед публикацией».

Независимо от расходов издательств и их проблем с увеличением производства бумаги, резкий рост числа публикаций очевиден. Следовательно, необходима реформа, которая требует фундаментальных изменений в академической культуре научных публикаций. В развитии науки важно не потерять научную строгость и экспериментальную достоверность. Если это будет потеряно, то будет потеряно все.

ОЦЕНКА ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УЧЕНЫХ

Рассмотрим сложности оценки ученых на примере Испании, поскольку многие их проблемы характерны и для России. В Испании Национальное агентство по оценке и аккредитации (ANECA – National Evaluation and Accreditation Agency) считает, что принятая у них система оценки ученых, в которой главным критерием карьерного роста является публикация статей, должна быть пересмотрена.

Во многих областях исследований, включая биофизику, наблюдается растущий интерес к новым проектам, призванным повысить точность и достоверность исследований (например, рандомизированные контролируемые исследования). Аналогичным образом вырос интерес к усилиям по повышению прозрачности, таким как предварительная регистрация гипотез и методов. Это необходимо, чтобы снять опасения, что улучшение качества исследований и достоверный обмен научной информацией восстановятся сами собой, т.е. плохие статьи станут заметными и легко будут отвергаться. Предлагалось создать стандартный шаблон статей, в который авторы лишь вписывают свои результаты. Это (как надеялись многие издатели) облегчит рецензирование статей и повысит ответственность авторов.

Кроме того, относительно мало внимания уделяется другой практике – популяризации научных знаний, которая могла бы помочь в достижении этой цели путем соотнесения результатов исследований с мнениями научного сообщества, политиков и широкой общественности. В настоящее время ANECA оценивает «исследователь-

скую деятельность» ученых каждые 6 лет. Чтобы получить скромное повышение зарплаты и иметь право на повышение, исследователи должны доказать, что они опубликовали как минимум пять статей за этот период в престижных журналах, индексируемых в Journal Citation Reports (JCR). Достижение этой цели также позволяет ученым руководить докторантами и быть в списке главных исследователей в своих университетах, что дает им доступ к большему бюджету. Правительство Испании ввело эту систему в 1994 г., стремясь повысить продуктивность исследователей страны. И это удалось: по данным Министерства науки и инноваций Испании, к 2021 г. страна заняла 11-е место в мире по объему научной продукции, выпуская более 100 000 публикаций ежегодно.

Однако сами ученые говорят, что требование роста публикаций оказало негативное влияние на качество их работы и расходование средств, получаемых от грантов. Это запустило «ненасытную печатную машину», – говорит Анхель Дельгадо Васкес, глава Службы поддержки обучения и исследований в Университете Пабло де Олавиде. Одни исследователи начали лихорадочно работать над достижением цели, готовя статью чуть не каждые два дня. Другие пошли на уступки, публикуя статьи низкого качества или обманным путем добиваясь соавторства. Есть и такие, которые признались, что давали взятки из своих грантов исследователям из Саудовской Аравии или Индии за соавторство в их статьях. Критики говорят, что также растет процент платы из грантов за обработку статей, взимаемых журналами.

В рамках новой системы эксперты ANECA больше не будут ограничиваться в своих оценках лишь импакт-фактором журналов, в которых публикуются ученые, а будут также учитывать такие детали, как, например, достигало ли исследование неакадемической аудитории через новостные сообщения или правительственные документы. Статьи также получают более высокие оценки, если они будут написаны совместно с местными сообществами или другими авторами, не являющимися научными работниками. В попытке снизить уровень государственных средств, расходуемых на публикацию, оценщики будут принимать во внимание статьи, опубликованные на некоммерческих издательских платформах с открытым доступом, которые не взимают плату с авторов, например таких, как Open Research Europe.

Что делать? Дискуссии на эту тему продолжаются. Одни специалисты говорят, что необходимо еще более радикальные реформы. Другие – что нужно отменить вообще подобные оценки деятельности ученых по количеству публикаций, поскольку они «только обогащают крупных научных издателей и усиливают разочарование моло-

дых исследователей». Например, в Испании в настоящее время ANECA рассматривает около 600 предложений, полученных по предлагаемым изменениям оценок. Чиновники ANECA надеются завершить работу над новой системой оценки к концу 2023 г., чтобы новый регламент оценок вступил в силу с 1 января 2024 г.

ВЫВОДЫ

1. В России ситуация аналогична ситуации, имеющей место в западных странах. По имеющимся сведениям, эта проблема осознана руководством нашей страны. На популяризацию науки в бюджете на 2024 г. заложены средства в размере 0.5 млрд рублей. Конечно, этих средств недостаточно, чтобы решить далеко не полный перечень проблем, изложенных выше. Главное состоит в том, что трудно предложить комплексную программу полного выхода из кризиса, в который попала страна в начале 90-х годов не только в области просвещения и развития науки. Если думать не о продолжительности жизни нашего поколения, а о следующем поколении, то становится очевидным, что вложение капитала в образование людей это стратегически наиболее доходное его вложение.

2. Необходимо разработать комплексный долгосрочный план решения всего набора проблем, связанных с развитием науки. При этом может оказаться весьма полезным накопленный опыт в период существования СССР: физико-математические школы, Дома творчества, районные, городские, областные, всероссийские и международные научные конкурсы и олимпиады, периодические встречи школьников с выдающимися учеными, награждение выпускников-лидеров золотыми и серебряными медалями после школы и многое другое. Иными словами, нужна новая долгосрочная программа, разработанная с участием Академии наук и с учетом развития современных цифровых технологий искусственного интеллекта.

3. При всем желании без развития фундаментальной и прикладной науки правительство РФ не сможет привести страну к устойчивому, ускоренному темпу развития экономики, если опережающими темпами не будет развиваться образовательная база населения.

4. Для развития современной науки необходимо создать материальную базу носителей достоверной информации, которая должна сопровождать человека всю его жизнь. Сегодня старый лозунг «Учиться, учиться и учиться!» становится вновь весьма актуальным.

5. Следует отдавать себе отчет, что заимствовать чужой опыт решения этой проблемы, отвер-

гая собственный, очень опасно. При переносе его на российскую почву необходимо учитывать наши национальные особенности, основанные на большом разнообразии регионов страны и отличиях менталитета их населения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания № 075-00224-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иваницкий Г. Р. Новый старт или последний финиш? *Вестн. РАН*, **70** (3), 201–213 (2000).
2. Китайгородский А. И. *Реникса* (Молодая гвардия, М., 1967).
3. Иваницкий Г. Р. *Ритмы развивающихся сложных систем* (Серия «Кибернетика, математика», вып. 9) (Знание, М., 1988).
4. Иваницкий Г. Р. Автоволны вокруг и внутри нас. В сб. «*Наука и человечество*» (Знание, М., 1989), сс. 211–226.
5. Иваницкий Г. Р. *Найдутся ли ответы?* (Серия «Знак вопроса», вып. 6) (Знание, М., 1991).
6. Иваницкий Г. Р. Волны поколений в городе. *Наука и жизнь*, № 12, 33–35 (1986).
7. Иваницкий Г. Р., Медвинский А. Б. и Цыганов М. А. Как малые причины порождают большие следствия. *Химия и жизнь*, № 4–6, 34–39 (1996).
8. Иваницкий Г. Р. *Мир глазами биофизика* (Педагогика, М., 1985).
9. Иваницкий Г. Р., Кашин М. П. и Емельянов А. И. Научные учреждения – средней школе. *Вестн. АН СССР*, № 11, 54–56 (1979).
10. Иваницкий Г., Жиронкина О., Федотчев А., Шноль С. Пушинский эксперимент: использование педагогического потенциала общества. *Народное образование*, № 12, 74–76 (1983).
11. Ivanitskii G. R., Deev A. A., and Khizhnyak E. P. Long-term dynamic structural memory in water: can it exist? *Phys. Usp.*, **57**, 37–65 (2014). DOI: 10.3367/UFNe.0184.201401b.0043
12. Иваницкий Г. Р. и Нариманов А. А. Объяснение «эффекта пирамид». *Биофизика*, **47** (5), 943–952 (2002).

13. <https://skillbox.ru/media/marketing/mozhno-li-zarabatyvat-na-yandeksdzene-200-tysyach-v-mesyats-i-chto-dlya-etogo-nuzhno-delat>
14. *Guest Post – MDPI's Remarkable Growth. The Scholarly Kitchen* (10 August 2020). Accessed: 16.03.2021.
15. Beall J. *Chinese Publisher MDPI Added to List of Questionable Publishers*. Scholarly Open Access. Archived from the original on 6 March 2014.
16. Beall J. *Guest Editing a Special Issue with MDPI: Evidences of Questionable Actions by the Publisher*. Scholarly Open Access (11 June 2015). Archived from the original on 16 June 2015.
17. *Update: Response to Mr. Jeffrey Beall's Repeated Attacks on MDPI*. URL: www.mdpi.com. Accessed: 16.03.2023.
18. Beall J. *Instead of a Peer Review, Reviewer Sends Warning to Authors. Scholarly Open Access (17 December 2015)*. Archived from the original on 13 March 2016.

Education and Commerce

G.R. Ivanitskii*

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

At the beginning of the XXI century, the spread of negative trends that undermine the development of scientific knowledge has intensified. They posed a threat not only to the intellectual development of the younger generation, but also hampered the development of science as a whole. Their appearance was a product of an established consumer society, which is based on the development of commercial technologies. The question arose: how to counter these negative trends?

Keywords: lowering the requirement for scientific knowledge, consumer society, clogging the Internet with false and non-scientific information

УДК 612.71.28 + 577.334.61

ПАМЯТИ УЧЕНОГО-БИОФИЗИКА, ПЕДАГОГА, ОРГАНИЗАТОРА НАУКИ, ПРОФЕССОРА Э.К. РУУГЕ

DOI: 10.31857/S0006302924050197, EDN: MIOQZD

*«Когда ты родился, ты один плакал, а все вокруг радовались.
Проживи свою жизнь так, чтобы когда ты будешь умирать,
все вокруг плакали, а ты один улыбался».*

Индийская мудрость



Энно Куставич Рууге
(18.09.1935–10.09.2024)

10 сентября 2024 года ушел из жизни большой ученый, мудрый педагог и замечательный человек Энно Куставич Рууге. Он родился 18 сентября 1935 г. в Эстонии (Нарва), в 1960 г. окончил физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. В 1966 г. Э.К. Рууге защитил кандидатскую диссертацию на соискание степени кандидата физико-математических наук по теме «Исследование свободнорадикальных состояний клетки, субклеточных фракций и модельной системы аскорбиновая кислота–белок». В то время это была одна из самых актуальных проблем биологической физики. Ведь совсем недавно, в 1956 г., появилась свободнорадикальная теория старения, постулированная американским геронтологом Денхамом Харманом (1916–2014), утверждавшая, что старение и смерть наступают в результате накопления повре-

ждений в клетках, нанесенных свободными радикалами в течение жизни.

Э.К. Рууге был учеником профессора Льва Александровича Блюменфельда (1921–2002), который стоял у истоков применения метода ЭПР-спектроскопии в биологии и медицине. Он был одним из первых ученых, кто в СССР стал заниматься свободными радикалами, образующимися в клетках, субклеточных структурах и в модельных системах, связанных с системой «аскорбиновая кислота–белок».

В 1980 г. Э.К. Рууге защитил диссертацию на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по теме «Свободнорадикальные парамагнитные центры в тканях животных и листьях высших растений». С 1981 г. и по настоящее время он работал в Национальном медицин-

ском исследовательском центре кардиологии имени академика Е.И. Чазова Министерства здравоохранения Российской Федерации (бывший Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР). В 1984 г. он стал профессором кафедры биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. В разные годы Э.К. Рууге читал спецкурсы «Физическая химия», «Магнитные свойства молекул. Методы магнитной радиоспектроскопии в биофизических и медико-биологических исследованиях» и «Медицинская биофизика». Он также вел семинары по физической химии. На протяжении ряда лет был членом Научного совета по проблемам биологической физики РАН и Научного совета по химической физике РАН (секция биохимической физики), был членом Российского биохимического общества, Международного общества по ЭПР (International EPR(ESR) Society) и Международного общества по изучению сердца (International Society for Heart Research). Области его научных интересов: биоэнергетика, биофизика мембран, энергетический метаболизм сердечной мышцы, физические аспекты патогенеза заболеваний сердечно-сосудистой системы. Основные направления научной деятельности были связаны с исследованием свободнорадикальных процессов в организме, выяснением молекулярных механизмов образования и метаболических реакций активных форм кислорода и азота в клетках миокарда, изучением физико-химических свойств липопротеидов/липопротеинов в клетках крови при атерогенезе. Липопротеины (липопротеиды) – класс сложных белков, простетическая группа которых представлена каким-либо липидом. Так, в составе липопротеинов могут быть свободные жирные кислоты, нейтральные жиры, фосфолипиды, холестериды. Липопротеины представляют собой комплексы, состоящие из белков (аполипопротеинов) и липидов, связь между которыми осуществляется посредством гидрофобных и электростатических взаимодействий. Эти исследования являются чрезвычайно важными для понимания механизма образования атеросклеротических бляшек, которые являются одной из основных причин развития инфаркта миокарда и ишемического инсульта, который может предшествовать развитию геморрагического инсульта. Часто случается так, что ученые предчувствуют, какое заболевание приведет их к уходу из жизни. Активно занимаются изучением этой проблемы.

Э.К. Рууге установил, что при переносе электронов в дыхательной цепи митохондрий возникают свободно радикальные промежуточные продукты (интермедиаты) различных типов, а свободные радикалы коэнзима Q_{10} ответственны за образование в митохондриях активных форм кислорода ($\cdot O_2^-$ и $\cdot OH$ -радикалы, H_2O_2). Выяв-

лены закономерности функционирования электрон-транспортной цепи хлоропластов высших растений в зависимости от внешних физико-химических факторов. Методом спектроскопии ЭПР спиновых ловушек впервые доказано существование конформационных перестроек в молекуле миозина. Обнаружено, что физико-химические свойства липопротеидов/липопротеинов плазмы крови определяются характером нарушений липидного обмена, а свойства мембран эритроцитов – обострением нестабильной стенокардии. Показано, что восстановление сократительной функции сердечной мышцы и характеристик митохондриальной дыхательной цепи определяется длительностью предшествующей ишемии, а необратимые повреждения клеток миокарда связаны с усиленной генерацией активных форм кислорода.

Э.К. Рууге подготовил 32 кандидата наук, 12 его учеников стали докторами наук. В eLibrary у Э.К. Рууге представлено 360 публикаций, на которые имеется около 4500 цитирований. В системе PubMed зафиксированы 175 его статей. Индекс Хирша в eLibrary – 31, в Scopus – 24.

Энно Куставич Рууге был замечательным человеком: никогда ни на кого не повышал голос, был неизменно доброжелательным, всегда помогал ученикам и коллегам. Он был надежным другом, верным мужем, воспитал двоих сыновей, которые стали учеными и продолжили научную традицию российских физиков. Родившись в Эстонии, крещен был в традициях лютеранской/протестантской веры, которая как идеология и международная историческая сила оформилась в XVI веке, когда Мартин Лютер (1483–1546) и Жан Кальвин (1509–1564) возглавили массовое движение против духовной монополии католицизма. Однако история протестантизма прослеживается в более ранние века, идеалом движения было возвращение к раннему христианству. Э.К. Рууге был верующим человеком. Он сохранил верность той христианской традиции, в которой крестили его родители. Также он сохранил верность своему учителю – Л.А. Блюменфельду, одному основному направлению исследований в биологии и медицине – ЭПР-спектроскопии клеток, субклеточных структур и различных физико-химических моделей.

Э.К. Рууге был однолюбом: любил свою жену и не смог пережить ее смерть. О таких людях говорят, что они дружно жили и умерли почти в один день. Память о таких ученых, педагогах и людях хранят долгие годы их коллеги, ученики, друзья и знакомые. Нечасто случается так, что в последний путь кого-то провожают, кроме родных, неродные, но ставшие по духу родными, взрослые мужчины и женщины со слезами на глазах. Энно Куставич Рууге смог прожить свою жизнь так, как

об этом гласит индийская мудрость, представленная в качестве эпиграфа.

В библиотеке Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова его отпевал священник протестантской/лютеранской церкви. Так состоялся переход ученого, педагога, человека и гражданина Энно Куставича Рууге в мир иной. Покойся с миром, дорогой Энно, пусть земля тебе будет пухом.

Учитель и научный руководитель Э.К. Рууге, Лев Александрович Блюменфельд, в конце жизни написал стихи, которые явились отражением его жизненного кредо:

Я прожил жизнь, не мне судить
Как прожил — хорошо иль плохо,
Но не смогла совсем убить
Меня во мне моя эпоха.

Я был всегда самим собой,
А не самим собой доволен.
Не спорил мелочно с судьбой,
Не покорялся чуждой воле.

Я важных задниц не лизал,
Я не менял с годами веры,
Я мог сказать себе: «Нельзя»
Перед соблазнами карьеры.

Я прожил жизнь. Она была
Не весела и не печальна.
Я не жалею, что прошла,
Но мог бы все начать сначала.

Внешне Лев Александрович Блюменфельд и Энно Кустович Рууге не были похожи, как говорится, от слова «совсем». Однако внутренне они были аристократами духа, и это их объединяло, делая похожими друг на друга. Такими они останутся в памяти своих современников. Вспоминая этих неординарных ученых, их ученики, коллеги и друзья будут равняться на них, подтягиваться к их уровню. Благодаря этому мир, в котором мы живем, будет становиться лучше, чище и светлее.

В.П. Реутов
Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН