

ISSN 0006-3029

Том 68, Номер 3

Май - Июнь 2023



БИОФИЗИКА

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 3, 2023

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами
как источники универсальных цитотоксинов — катионов нитрозония

А.Ф. Ванин, Н.А. Ткачев 421

Обработка нитроцеллюлозных мембран в тлеющем разряде повышает
чувствительность иммуноанализа

П.А. Петрова, С.В. Замалутдинова, А.А. Внукова, Д.А. Алексеева, Д.В. Багров 435

Кинетика и механизм ингибирования активности пероксидазы
хрена *N*-фосфонометил-глицином

Л.В. Авдеева, Я.В. Вахтерова, Е.А. Саратовских 442

Органический осмолит бетаин эффективно нейтрализует вредное воздействие
диклофенака на структуру и стабильность белка

М. Башируддин, Н. Ахмед, Х. Алам Хан, Ш. Джамал 451

Особенности олигомеризации гладкомышечного титина и скелетного
миозин-связывающего белка С

Л.Г. Бобылёва, М.А. Тимченко, Э.И. Якупова, И.М. Вихлянцева, А.Г. Бобылёв 461

К вопросу о взаимодействии ресвератрола с нуклеосомами

*Н.В. Малюченко, Т.В. Андреева, О.В. Гераськина, Н.С. Герасимова,
А.В. Любителиев, А.В. Феофанов, В.М. Студитский* 466

Влияние излучения хирургического лазера на свойства бычьего
сывороточного альбумина *in vitro*

Д.А. Серов, Е.И. Нагаев, А.И. Кулешова, В.Е. Реут, М.Е. Асташев 474

Изменение активности эндоцеллюлярных оксидоредуктаз микромицетов
в условиях воздействия низкочастотного импульсного магнитного поля
и низкоинтенсивного лазерного излучения

*И.О. Макаров, Д.А. Клюев, В.Ф. Смирнов, О.Н. Смирнова, Н.А. Аникина,
Н.В. Дикарева, А.Ю. Шишкин* 482

Идентификация патогенных бактерий по спектру нативных молекул ДНК

Б.Л. Ихлов 489

Анализ покрытия Alu-повторов выровненными геномными прочтениями

Г.С. Тамазян, А.А. Канапин, А.А. Самсонова 496

Генетические детерминанты целостности генома льна

А.А. Канапин, А.А. Самсонова 501

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Физиологическая роль медленных натриевых каналов в процессе первичного
сенсорного кодирования ноцицептивной информации

Е.А. Скребенков, Б.В. Крылов, О.Л. Власова 506

Эктацитометрическая характеристика эритроцитов крыс, подвергнутых переохлаждению на фоне употребления природных цеолитов

А.П. Вохминцев

513

Влияние белков острой фазы воспаления на активность нейтрофилов периферической крови

*Н.Д. Федорова, Д.А. Сумбатьян, А.В. Соколов, М.В. Филатов,
А.П. Трашков, Е.Ю. Варфоломеева*

522

Влияние ДНК-связывающих лигандов из группы димерных бисбензимидазолов DBA(*n*) и DBPA(*n*) в комбинации с γ -излучением на эпителиально-мезенхимальный переход и размер пула стволовых клеток рака молочной железы линии MCF-7

*К.А. Чурюкина, О.Н. Матчук, А.Д. Каприн, С.А. Иванов, В.С. Коваль, А.Ф. Арутюнян,
А.Л. Жузе, И.А. Замулаева*

529

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Окислительный гомеостаз прорастающих семян гороха (*Pisum sativum* L.) в зависимости от продолжительности ультразвукового воздействия

С.С. Тарасов, Е.К. Крутова

544

Влияние ионизирующего излучения на радиочувствительность клеточных ядер проростков семян пшеницы

Л.А. Минасбекян, И.А. Авагян

554

Динамика биофизических характеристик пелагиали северной части Черного моря в первых декадах XXI века

*С.А. Пионтковский, И.М. Серикова, И.А. Минский, Ю.А. Загородняя,
В.В. Суслин, И.В. Ковалева*

564

Метод декартова генетического программирования для анализа изображений развивающегося глаза мушки дрозофилы

Н.А. Данилов, К.Н. Козлов, С.Ю. Суркова, М.Г. Самсонова

576

Экспериментально-теоретическое определение скорости звука в паренхиме легких у кроликов

В.И. Кезик, С.П. Драган, А.Э. Сулейманов

583

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Нанотехнологии в лекарственной терапии злокачественных опухолей

Д.Б. Корман, Л.А. Островская, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина

593

Патогенетическая роль посттрансляционных изоформ уромодулина

*А.В. Яковлева, Н.А. Верлов, М.Г. Залеский, С.Б. Ланда,
В.В. Шаповалов, В.Л. Эмануэль*

609

Люминесцентная диагностика и количественная оценка малярийной инфекции методом латерального проточного иммуноанализа с применением квантовых точек из теллурида кадмия

Х. Чаухан, А. Джаривала, В. Кхерадж

616

Contents

Vol. 68, No. 3, 2023

Molecular Biophysics

Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as Sources of Universal Cytotoxins – Nitrosonium Cations

A.F. Vanin and N.A. Tkachev 421

Glow Discharge Treatment of Nitrocellulose Membranes Increases the Immunoassay Sensitivity

P.A. Petrova, S.V. Zamalutdinova, A.A. Vnukova, D.A. Alekseeva, and D.V. Bagrov 435

Kinetics and Mechanism of Inhibition of Horseradish Peroxidase Activity by *N*-Phosphonomethyl-Glycine

L.V. Avdeeva, Ya.V. Vakhterova, and E.A. Saratovskikh 442

The Organic Osmolyte Betaine Effectively Counteracts the Deleterious Effect of Diclofenac on Protein Structure and Stability

M. Basheeruddin, N. Ahmed, Kh.A. Khan, and Sh. Jamal 451

Peculiarities of Oligomerization of Smooth Muscle Titin and Skeletal Myosin-Binding Protein C

L.G. Bobyleva, M.A. Timchenko, E.I. Yakupova, I.M. Vikhlyantsev, and A.G. Bobylev 461

On the Interaction of Resveratrol with Nucleosomes

N.V. Maluchenko, T.V. Andreeva, O.V. Geraskina, N. S. Gerasimova, A.V. Lubitelev, A.V. Feofanov, and V.M. Studitsky 466

Influence of Laser Radiation of a Surgical Laser on the Structure of Bovine Serum Albumin Molecules *in vitro*

D.A. Serov, E.I. Nagaev, A.I. Kuleshova, V.E. Reut, and M.E. Astashev 474

Changes in the Activity of Micromycete Endocellular Oxidoreductases under the Influence of Low-Frequency Pulsed Magnetic Field and Low-Intensity Laser Radiation

I.O. Makarov, D.A. Klyuev, V.F. Smirnov, O.N. Smirnova, N.A. Anikina, N.V. Dikareva, and A. Yu. Shishkin 482

Identification of Pathogenic Bacteria Using the Spectra of Native DNA Molecules

B.L. Ikhlov 489

Analysis of Coverage of Alu Repeats by Aligned Genomic Reads

G.S. Tamazian, A.A. Kanapin, and A.A. Samsonova 496

Genetic Determinants of Flax Genome Integrity

A. A. Kanapin and A.A. Samsonova 501

Cell Biophysics

Physiological Role of Slow Sodium Channels in Primary Sensory Coding

E.A. Skrebenkov, B.V. Krylov, and O.L. Vlasova 506

Ektacytometry: Characterization of the Erythrocytes of Rats Subjected to Hypothermia and Receiving Natural Zeolites

A.P. Vokhmintsev 513

The Effect of Acute Phase Proteins on the Activity of Peripheral Blood Neutrophils <i>N.D. Fedorova, D.A. Sumbatian, A.V. Sokolov, M.V. Filatov, A.P. Trashkov, and E.Yu. Varfolomeeva</i>	522
Effects of DNA-Binding Ligands from Dimeric Bisbenzimidazoles Series DBA(<i>n</i>) and DBPA(<i>n</i>) in Combination with γ -Radiation on Epithelial-Mesenchymal Transition and Pool Size of MCF-7 Breast Cancer Stem Cells <i>K.A. Churiukina, O.N. Matchuk, A.D. Kaprin S.A. Ivanov, V.S. Koval, A.F. Arutyunyan, A.L. Zhuze, and I.A. Zamulaeva</i>	529

Complex Systems Biophysics

Oxidative Homeostasis in Germinating Pea Seeds (<i>Pisum sativum</i> L.) Depending on Ultrasonic Exposure Duration <i>S.S. Tarasov and E.K. Krutova</i>	544
Effects of Ionizing Radiation on Radio Sensitivity of Cell Nuclei of Wheat Seedlings <i>L.A. Minasbekyan and I.A. Avagyan</i>	554
The Dynamics of Biophysical Characteristics of the Northern Black Sea Pelagic Ecosystem in the First Decades of the XXI Century <i>S.A. Piontkovski, I.M. Serikova, I.M. Minsky, Yu.A. Zagorodnyaya, V.V. Suslin, and I.V. Kovaleva</i>	564
Cartesian Genetic Programming for Image Analysis of the Developing <i>Drosophila</i> Eye <i>N.A. Danilov, K.N. Kozlov, S.Y. Surkova, and M.G. Samsonova</i>	576
Experimental and Theoretical Determination of the Speed of Sound in Lung Parenchyma of Rabbits <i>V.I. Kezik, S.P. Dragan, and A.E. Suleymanov</i>	583

Medical Biophysics

Nanotechnologies for Drug Therapy of Malignant Tumors <i>D.B. Korman, L.A. Ostrovskaya, N.V. Bluhterova, V.A. Rikova, and M.M. Fomina</i>	593
A Pathogenetic Role of Posttranslational Isoforms of Uromodulin <i>A.V. Iakovleva, N.A. Verlov, M.G. Zaleskiy, S.B. Landa, V.V. Shapovalov, and V.L. Emanuel</i>	609
Luminescent Diagnostics and Quantitative Assessment of Malaria Based on a Lateral Flow Immunoassay with CdTe Quantum Dots <i>H. Chauhan, A. Jariwala, and V. Kheraj</i>	616

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ КАК ИСТОЧНИКИ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ЦИТОТОКСИНОВ – КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ

© 2023 г. А.Ф. Ванин*,#, Н.А. Ткачев*

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

#E-mail: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 15.03.2023 г.

После доработки 15.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Показано, что высвобождение половины нитрозильных лигандов из железо-динитрозильных фрагментов в биядерных динитрозильных комплексах железа с тиолсодержащими лигандами в форме катионов нитрозония (NO^+) при распаде этих комплексов в кислотных растворах повышается при понижении стабильности этих комплексов и полностью прекращается при повышении концентрации свободных тиолов (не включившихся в биядерные динитрозильные комплексы железа) до уровня, превышающего концентрацию железо-динитрозильных фрагментов в два и более раз. Первый фактор проявляется в том, что менее устойчивые комплексы с меркаптосукцинатом распадаются в кислотной среде при комнатной температуре, тогда как распад более устойчивых комплексов с глутатионом происходит только при прогреве их растворов при 80°C . Прекращение высвобождения катионов NO^+ из комплексов при повышении уровня свободных тиолов в растворе определяется способностью последних инициировать восстановление катионов NO^+ до NO .

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, S-нитрозотиолы, катион нитрозония, нитрит, оксид азота.

DOI: 10.31857/S0006302923030018, EDN: FPGKAY

В последние годы усилился интерес к динитрозильным комплексам железа (ДНКЖ) как экзогенным производным одного из универсальных регуляторов метаболических процессов – оксида азота (NO) [1–3]. Большинство исследователей полагает, что включение NO в эти комплексы обеспечивает его стабилизация в живых организмах и тем самым перенос к удаленным мишеням биологического действия этого агента. Наши многолетние исследования позволяют предполагать большее, а именно, что ДНКЖ, в особенности, включающие в себя, наряду с нитро-

розильными лигандами тиолсодержащие соединения, следует рассматривать в качестве «рабочей формы» оксида азота, функционирующей в живых организмах [4, 5]. Включение NO в эти комплексы обеспечивает не только его стабилизацию, но и превращение половины молекул NO в катионы нитрозония (NO^+), а также стабилизацию последних в составе ДНКЖ и перенос их на соответствующие мишени, например, на тиоловые группы, превращающиеся при связывании с NO^+ в соответствующие S-нитрозотиолы (RS-NO) [6–8].

В соответствии с нашими представлениями превращение молекул NO в катионы нитрозония происходит в ходе образования моноядерной формы ДНКЖ (М-ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами по механизму, приведенному на схеме 1:

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, RS-NO – S-нитрозотиолы, М-ДНКЖ – моноядерная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ – биядерная форма динитрозильных комплексов железа, ЖДНФ – железо-динитрозильные фрагменты, GSH – восстановленный глутатион, NAC – N-ацетил-L-цистеин, MS – меркаптосукцинат, Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом.

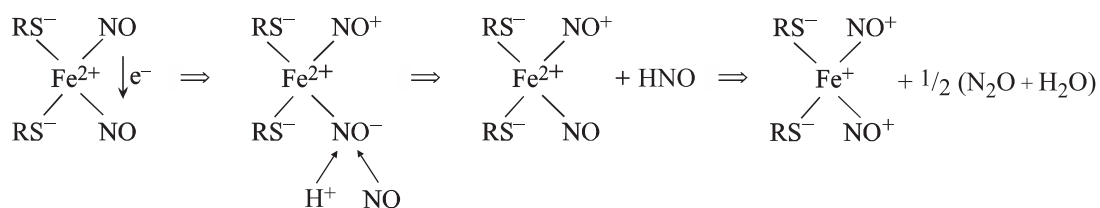


Схема 1. Механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции Fe^{2+} с молекулами NO и тиолсодержащими соединениями [6–10].

Согласно этому механизму, появление катиона нитрозония в ДНКЖ обеспечивается попарным связыванием молекул NO с ионами Fe^{2+} с последующей реакцией диспропорционирования этих молекул, превращающихся соответственно в анион нитроксила (NO^-) и катион нитрозония. После протонирования первого образующаяся молекула нитроксила (HNO) выходит из комплекса и ее место занимает другая (третья) молекула NO. В результате вместо исходного ЭПР-неактивного комплекса $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO})_2]$ с четным (равным 8) числом электронов на верхних молекулярных орбиталях комплекса (шесть d-электронов от Fe^{2+} и двух — от свободно-радикальных молекул ?NO) возникает ЭПР-регистрируемый комплекс с нечетным (равным 7) числом электронов, характеризующийся резонансной структурой $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO})(\text{NO}^+)]$ с равным соотношением NO и NO^+ в железо-динитрозильном фрагменте ДНКЖ.

Сохранение катиона нитрозония в составе ДНКЖ определяется наличием в нем тиолсодержащих лигандов, атомы серы в которых характеризуются высокой электрон-донорной активностью. Перенос электронной плотности с этих атомов на катион нитрозония приводит к снижению положительного заряда на этом катионе. В результате предотвращается его взаимодействие с анионами гидроксидов и тем самым гидролиз катиона нитрозония, который приводил бы к превращению этого катиона в анион нитрита (при сохранении нейтральных значений pH) и тем самым к распаду ДНКЖ. Этот эффект лежит в основе высокой стабильности ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, определяющей их существование в живых организмах, что и позволило выявить их наличие в этих организмах по характерному для М-ДНКЖ сигналу ЭПР с $g_{\text{cp}} = 2.03$ [10].

В живых организмах ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут быть представлены также и в биядерной форме (Б-ДНКЖ), характеризующейся в соответствии с М-ДНКЖ резонансной

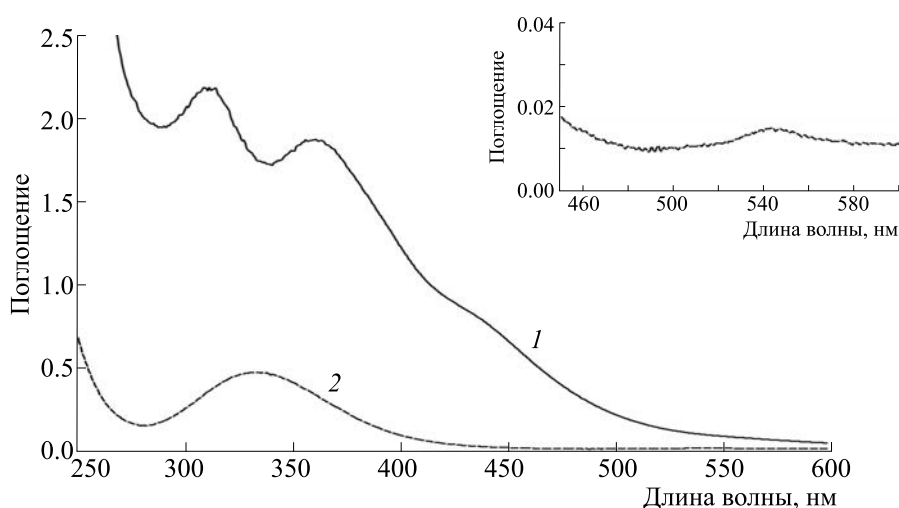


Рис. 1. Стандартные спектры поглощения Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (спектр 1) и S-нитрозотиолов (спектр 2). На врезке демонстрируется слабое оптическое поглощение S-нитрозотиолов в области 540 нм [11].

структурой $[(RS^-)_2Fe^{2+}_2(NO)_2(NO^+)_2]$. Она ЭПР-неактивна и характеризуется спектром поглощения с полосами на 310 и 360 нм, представленным на рис. 1 (кривая 1) [11, 12].

Ранее мы привели экспериментальные данные, свидетельствующие о наличии в составе Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (а следовательно и в составе М-ДНКЖ) катионов нитрозония [5–8]. Высвобождение последних при распаде Б-ДНКЖ с глутатионом или N-ацетил-L-цистеином, вызванном подкислением их раствора до pH 1.0 с последующим его прогревом при 80°C в аэробных и анаэробных условиях, прослеживалось по образованию соответствующих S-нитрозотиолов, определявшихся по характерной для них полосе спектра оптического поглощения на 334 нм, приведенного на рис. 1 (кривая 2).

При этом оказалось, что концентрация S-нитрозотиолов (а следовательно, катионов нитрозония), появившихся в этих опытах, по крайней мере в аэробных условиях, в соответствии с вышеприведенной резонансной структурой железодинитрозильных фрагментов (ЖДНФ) динитрозильных комплексов железа, была точно равна половине нитрозильных лигандов, входивших в состав этих фрагментов. В анаэробных условиях S-нитрозотиолы появлялись в этих опытах только в растворах Б-ДНКЖ, в которых молярное соотношение количества свободных (не включенных в Б-ДНКЖ) тиолов и самих Б-ДНКЖ не превышало 1 : 1 [7, 8]. При этом, как правило, уровень высвобождавшихся из Б-ДНКЖ катионов нитрозония, был ниже половины нитрозильных лигандов, входивших исходно в состав железодинитрозильных фрагментов в этих комплексах. При соотношении свободных тиолов и Б-ДНКЖ, равном 2 : 1 и выше, все нитрозильные лиганды в опытах, проводившихся с их растворами в анаэробных условиях, высвобождались из Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами только в форме нейтральных молекул NO, определявшихся измерениями уровня газообразного NO оптическим методом [5, 7, 13].

Естественно, что при распаде Б-ДНКЖ, вызванном в анаэробных условиях окислением их тиолсодержащих лигандов феррицианидом или блокированием в них тиоловых групп пара-хлормеркурийбензоатом, высвобождающиеся из этих комплексов катионы нитрозония, как это было показано нами в работах [7, 13], из-за отсутствия тиолов начинали гидролизываться, превращаясь в анионы нитрита. Концентрацию последних можно было оценить оптическим методом по концен-

трации S-нитрозотиолов, образующихся в реакции нитрита с тиолами в кислой среде.

При проведении всех этих исследований остались безответными следующие вопросы. Во-первых, не могли ли S-нитрозотиолы в наших опытах с обработкой Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами кислотой и нагреванием возникать в аэробных условиях в результате окисления NO, выделявшегося из Б-ДНКЖ, до диоксида азота с последующим образованием триоксида азота, способного S-нитрозировать тиолы? Во-вторых, осталось непонятным, почему при соотношении свободных тиолов и Б-ДНКЖ, равном или выше 2 : 1, катионы нитрозония не обнаруживались при кислотном распаде этих комплексов в анаэробных условиях? В-третьих, можно ли было, снижая это соотношение, включить в S-нитрозотиолы все катионы нитрозония, входившие в Б-ДНКЖ в состав ЖДНФ?

В настоящей публикации мы попытались ответить на эти вопросы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали ферросульфат ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион (GSH), N-ацетил-L-цистеин (NAC) и меркаптосукцинат (MS) — все от Sigma (США).

Синтез Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Синтез всех ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (GSH, NAC и MS) проводили по методике, описанной в работе [14] по реакции между соответствующими S-нитрозотиолами, Fe^{2+} и тиолами, приведенной на схеме 2, демонстрирующей образование в этой реакции мооядерной формы таких комплексов (М-ДНКЖ). Для этого в 10 мл дистиллированной воды вводили тиол (20, 30 или 40 мМ), далее после добавления в раствор 0.05 мл серной кислоты в него вводили 20 мМ ферросульфата железа и, наконец, 20 мМ нитрита натрия. Введение последнего инициировало образование в кислой среде соответствующих S-нитрозотиолов ($RS-NO$) — GS-NO, NAC-NO и MS-NO в концентрации, равной концентрации нитрита — 20 мМ, заканчивавшееся за полтора часа для GS-NO и за несколько минут для NAC-NO и MS-NO. После этого в растворы вводили каплями концентрированный раствор щелочи (NaOH), повышая pH раствора до нейтральных значений. В результате розовая окраска раствора, обусловленная RS-NO, сменялась на оранжево-коричневую, характерную для образующихся в результате обратимой конденсации двух М-ДНКЖ, образующихся по схеме 2, в биядерные ДНКЖ (Б-ДНКЖ). Этот процесс для Б-ДНКЖ с NAC или MS занимал при комнатной температуре по-

рядка одного часа, тогда как образование Б-ДНКЖ с GSH заканчивалось лишь через четыре-пять часов, после чего нерастворимые в воде гидроокисные комплексы железа, не включившегося в Б-ДНКЖ, удаляли фильтрацией раствора через фильтровальную бумагу.

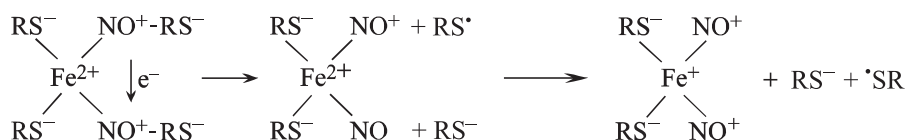


Схема 2. Механизм образования М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в реакции S-нитрозотиолов, ионов Fe^{2+} и тиолов [15].

Эта стадия сразу же приводит к образованию парамагнитных (ЭПР-активных) М-ДНКЖ с высвобождением одной молекулы тиола и одного тиольного радикала с последующей, о чем уже было сказано, конденсацией М-ДНКЖ в биядерную форму этих комплексов. Поскольку на синтез одного ЖДНФ в этих комплексах уходило по две молекулы RS-NO, 20 мМ концентрация последних должна была обеспечивать образование 10 мМ ЖДНФ. Их связывание по два через посредство двух тиолсодержащих мостиков и должно было приводить, в соответствии с вышеприведенной формулой этих комплексов — $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}_2(\text{NO})_2(\text{NO}^+)_2]$, к возникновению в растворе Б-ДНКЖ, что и имело место в ходе использованного нами метода синтеза этих комплексов.

При использовании при синтезе Б-ДНКЖ тиолсодержащих соединений, превышающих количество нитрита — 30 или 40 мМ (вместо 20 мМ), в растворе появлялись «свободные» (не включенные в Б-ДНКЖ) тиолы, в молярном соотношении свободный тиол : Б-ДНКЖ, равным соответственно 1 : 1 или 2 : 1. При исходной концентрации в 20 мМ тиолов в свободной форме (не включенной в Б-ДНКЖ) в растворе эти комплексы не обнаруживались. В этом случае синтез Б-ДНКЖ обеспечивался тиолами, высвобождавшимися из RS-NO в ходе синтеза М-ДНКЖ, приведенного на схеме 2.

Как следует из вышесказанного, концентрация синтезированных Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (Б-ДНКЖ-GSH) теоретически должна была в пересчете на один ЖДНФ составлять в среднем 10 мМ. Последнее можно было проверить по полосе поглощения на 360 нм в оптическом спектре синтезированного Б-ДНКЖ с коэффициентом экстинкции, равным $3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [11].

В соответствии со схемой 2 основной стадией в образовании М-ДНКЖ является реакция диспропорционирования (взаимного одноэлектронного окисления-восстановления) молекул RS-NO, попарно связывающихся с ионом Fe^{2+} :

Оптические измерения. Оптические измерения растворов проводили при комнатной температуре на спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu, Europra GmbH, Германия), используя плоскую кювету с длиной оптического пути 10 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Описание полученных препаратов Б-ДНКЖ. Регистрация спектров поглощения полученных препаратов Б-ДНКЖ показала (рис. 2б), что при снижении молярного соотношения свободных тиолов (глутатиона, НАС или цистеина) и Б-ДНКЖ ниже 1 : 1, т.е. при понижении содержания свободных тиолов в растворе Б-ДНКЖ обнаруживалось отклонение формы этих спектров от «стандартного» (приведенного на рис. 1) спектра поглощения Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами.

Это отклонение проявлялось в уплощении спектра поглощения синтезированных Б-ДНКЖ между полосами на 310 и 360 нм, т.е. уплощении минимума между этими полосами (рис. 2б, спектр 1). Оно могло быть обусловлено наложением на этот спектр полосы оптического поглощения на 334 нм соответствующих S-нитрозотиолов, «не успевших» включиться в образование сначала соответствующих М-, а затем и Б-ДНКЖ из-за быстрого осаждения железа в форме гидроокисных комплексов (и, как следствие этого, выключения части железа из реакции по схеме 2). Это предположение полностью подтвердилось при сложении спектров поглощения Б-ДНКЖ с глутатионом, полученных по схеме 2, при разных количествах GS-NO, «не успевших» включиться в Б-ДНКЖ-GSH. Например, если в эти комплексы не включилось бы 10 из 20 мМ GS-NO, то включение в них остальных 10 мМ (50%) GS-NO должно было привести к образованию 5 мМ Б-ДНКЖ-GSH. Соответственно при распаде этих комплексов выделилось бы 5 мМ катионов нитрозония,

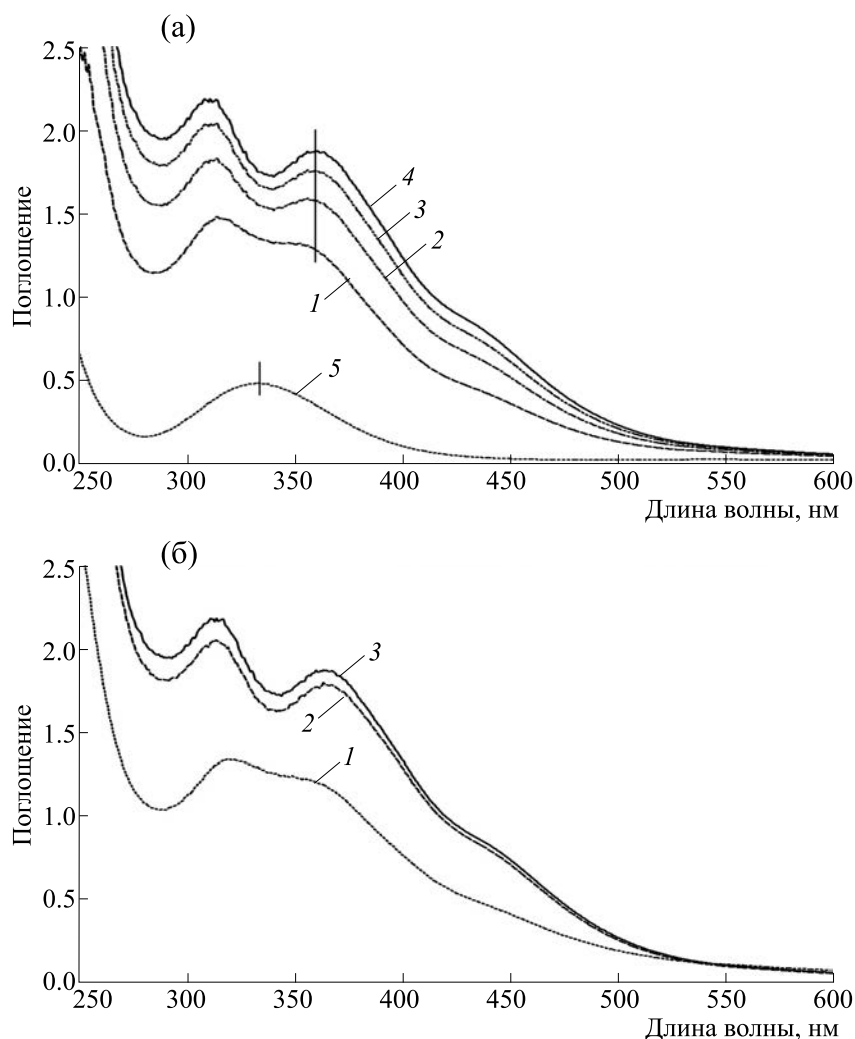


Рис. 2. (а) — Форма спектров поглощения растворов Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO, полученных путем сложения спектров поглощения Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO, при включении в комплексы Б-ДНКЖ-GSH 10, 5 и 2 мМ GS-NO (соответственно спектры 1–3). Спектры 4 и 5 — стандартные спектры, характерные соответственно для Б-ДНКЖ-GSH и GS-NO и использованные для расчета кривых 1–3. (б) — Экспериментально зарегистрированные спектры поглощения комплексов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношении GSH : Fe^{2+} : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ, 30 : 20 : 20 мМ или 40 : 20 : 20 мМ (соответственно кривые 1–3). Экспериментальные и рассчитанные спектры приведены для растворов, соответствующих их 20-кратному разбавлению.

образующих такое же количество GS-NO. В результате в растворе должно было бы аккумулироваться 15 мМ этого соединения, а форма спектра поглощения раствора, полученного наложением полосы поглощения GS-NO (10 мМ), не включившегося в Б-ДНКЖ, на спектр поглощения возникшего в этом растворе Б-ДНКЖ-GSH (5 мМ) должен иметь форму, приведенную на рис. 2а (спектр 1). На том же рис. 2 приведены полученные таким же путем спектры растворов, содержащих 5 мМ (25%) или 2 мМ (10%) GS-NO из его общего количества в 20 мМ, не включившегося в Б-ДНКЖ-GSH. Соответственно концентрация этих комплексов должна была составлять 7.5 и 9 мМ (рис. 2а, соответственно спектры 2 и 3).

Очевидно, что такого рода спектры оптического поглощения при тех же количествах NAC-NO должны наблюдаться для растворов Б-ДНКЖ-NAC.

Сопоставление этих спектров с экспериментально полученными для растворов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношении GSH : Fe^{2+} : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ, 30 : 20 : 20 мМ или 40 : 20 : 20 мМ (рис. 2б, соответственно спектры 1–3) показывает, что наложение спектра поглощения GS-NO на спектр поглощения Б-ДНКЖ-GSH наиболее четко проявляется для комплексов, синтезированных при соотношении GSH : Fe^{2+} : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ.

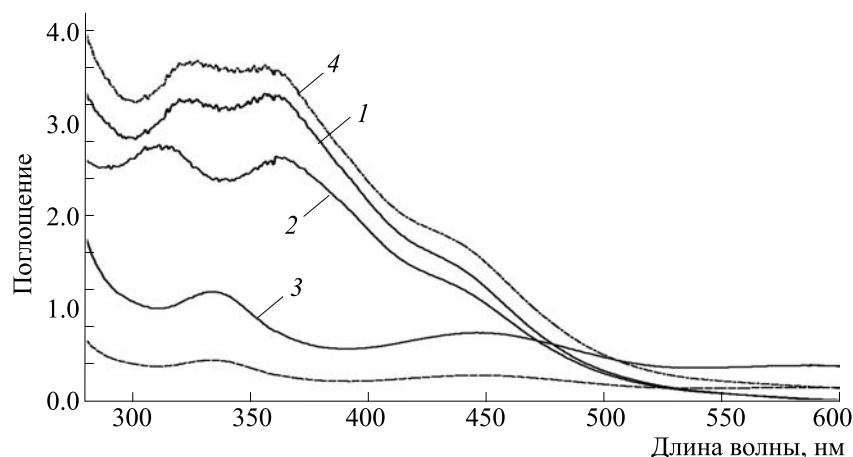


Рис. 3. Форма спектра поглощения раствора комплексов Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при соотношении $MS : Fe^{2+} : \text{нитрит}$, равном 40 : 20 : 20 мМ (спектр 1), с последующим подкислением до pH 1.0 (спектр 2). Спектр 3 — ЭПР-спектр МНКЖ с ЭДТА [16]. Его наложение на спектр 2 дает новый спектр, обозначенный как спектр 4. Спектры комплексов Б-ДНКЖ-MS зарегистрированы при 20-кратном разбавлении растворов.

Что касается Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-MS), то такие построения спектров провести не удалось. Дело в том, что в спектре поглощения этого комплекса не удалось наблюдать «обычный» (стандартный) спектр Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами. Для Б-ДНКЖ-MS наблюдался сдвиг полосы на 310 нм к полосе на 360 нм (рис. 3, спектр 1). И лишь при подкислении раствора этого комплекса до pH 1–2 спектр поглощения Б-ДНКЖ-MS становился идентичным «обычному», стандартному спектру Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (рис. 3, спектр 2).

Не исключено, что указанный сдвиг мог определяться наложением на спектр Б-ДНКЖ-MS оптического поглощения высокоспинового ($S = 3/2$), моонитрозильного комплекса железа (МНКЖ), включающего в себя лиганды нетиоловой природы, например карбоксильные группы в молекуле MS. О такой возможности свидетельствуют результаты сложения стандартного спектра поглощения Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами и спектра поглощения МНКЖ с этилендиаминовыми (ЭДТА) лигандами, взятого из работы [16], с интенсивной полосой на 340 нм и менее интенсивными полосами на 435 и 630 нм. При некоторой интенсивности полосы на 334 нм (при трехкратном снижении ее амплитуды) ее наложение на спектр поглощения Б-ДНКЖ приводило к заметному сдвигу полосы на 310 нм к полосе на 360 нм (рис. 3, спектр 4). Тем не менее мы считаем, что приводимое объяснение является все еще гипотетическим и требует дальнейшей проверки.

Изучение действия кислотной обработки синтезированных Б-ДНКЖ при комнатной температуре или при 80°C в присутствии и в отсутствие

кислорода в растворах этих комплексов проводилось после 20-кратного разбавления этих растворов, так что исходная концентрация Б-ДНКЖ в них в среднем составляла 0.5–0.6 мМ.

Соединения, появившиеся при кислотном разрушении Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в аэробных и анаэробных условиях. Судя по сохранению спектра поглощения Б-ДНКЖ с GSH или NAC, синтезированных при различных соотношениях тиола, Fe^{2+} и нитрита, при подкислении растворов этих комплексов до pH 1.0 они сохранялись при комнатной температуре без изменения по крайней мере в течение 1 часа. Такая стабильность не наблюдалась для Б-ДНКЖ-MS — при комнатной температуре в кислой среде они распадались за 2–15 мин, а при 80°C — за 20–50 с. Во всех этих экспериментах распад Б-ДНКЖ-MS сопровождался появлением полосы поглощения на 334 нм и слабой полосы на 543 нм, характерных для RS-NO (рис. 4, спектры 3).

Концентрация RS-NO, соответствующая интенсивности полосы на 334 нм, была практически равна концентрации ЖДНФ в Б-ДНКЖ-MS, содержавших по одному катиону NO^+ и одной молекуле NO. Отсюда можно было сделать вывод о том, что распад Б-ДНКЖ-MS на воздухе приводит к высвобождению из каждого ЖДНФ по одному катиону нитрозония, связывающемуся с тиоловой группой MS с образованием одной молекулы MS-NO. Однако результат последующей обработки этого раствора избытком глутатиона поставил под сомнение этот вывод. Оказалось, что интенсивность полосы на 334 нм заметно, в среднем в полтора раза, усиливалась, что свидетельствовало о наличии в растворе еще одного агента, ответственного за образование дополни-

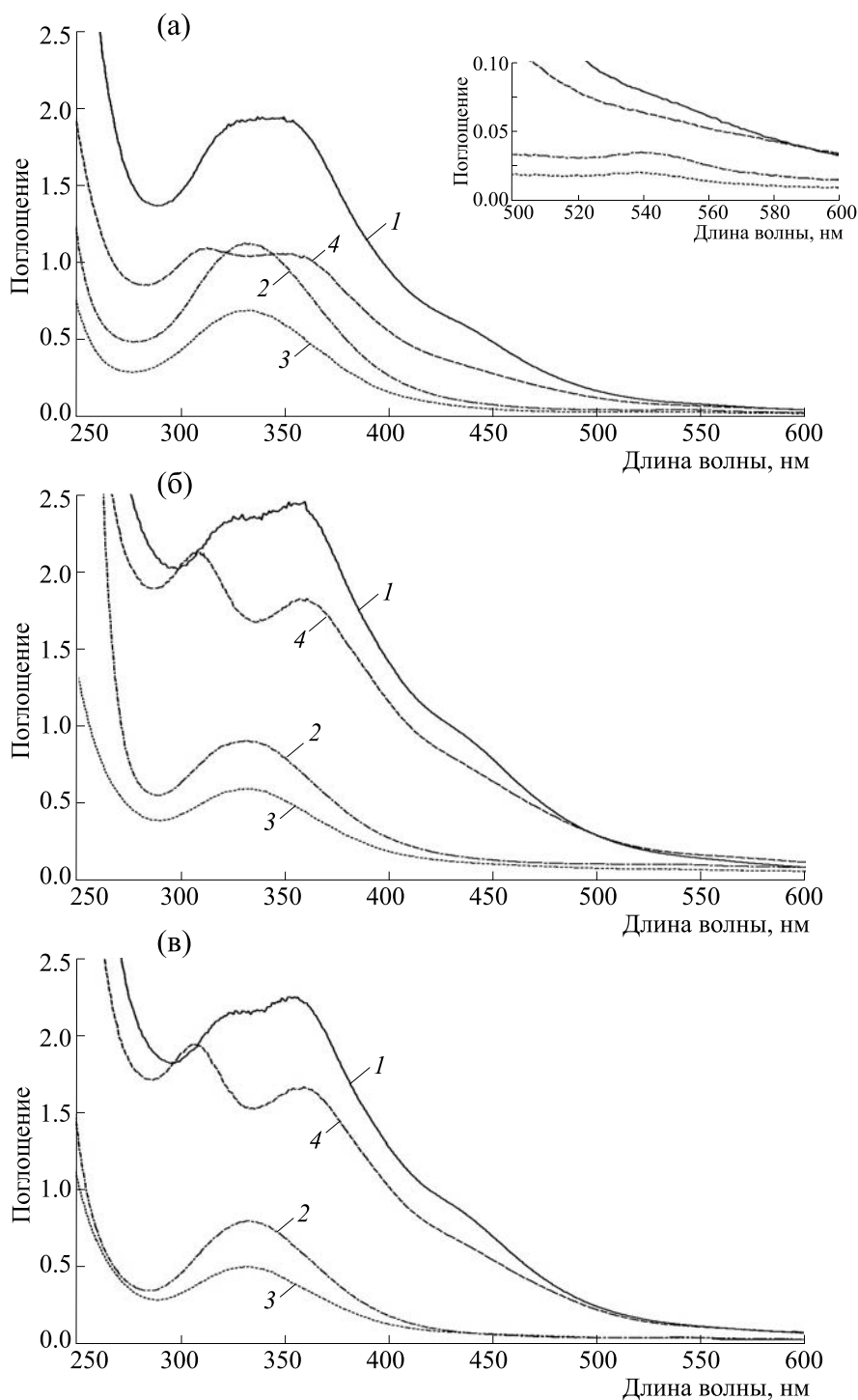


Рис. 4. Эволюция спектров поглощения комплексов Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при соотношении MS : Fe^{2+} : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ (а), 30 : 20 : 20 мМ (б) или 40 : 20 : 20 мМ (в), с последующей их инкубацией в аэробных условиях при комнатной температуре после подкисления растворов до pH 1.0. Спектры 1 – исходные, спектры 4 зарегистрированы через 1 мин после подкисления, спектры 3 – зарегистрированы соответственно через 2, 5 и 15 мин. Спектры 2 – к предыдущим растворам добавлен избыток глутатиона. На врезке (рис. (а)) показано слабое оптическое поглощение на 540 нм, характерное для RS-NO. Аналогичное поглощение обнаруживалось и для растворов, спектры которых показаны на рис. (б) и (в). Спектры зарегистрированы для растворов Б-ДНКЖ-MS, разбавленных в 20 раз.

тельного количества RS-NO (рис. 4, спектры 4). Им могла быть азотистая кислота (HNO_2), возникавшая в кислой среде в результате гидролиза триоксида азота (N_2O_3) — аддукта NO, выделявшегося из Б-ДНКЖ, и диоксида азота (NO_2), образующегося при окислении NO кислородом воздуха. Но если это так, то нельзя было исключить и того, что полоса поглощения на 334 нм в целом могла быть обусловлена только появлением в растворе триоксида азота, так что никакого высвобождения катионов нитрозония из ЖДНФ (да и самих этих катионов в данных фрагментах) не было! Что касается совпадения концентрации MS-NO, образующихся перед добавлением глутатиона, и концентрации ЖДНФ в Б-ДНКЖ-MS (10 мМ), оно могло быть обусловлено равенством концентрации этих фрагментов и молекул MS, входящих в состав Б-ДНКЖ и образующих затем MS-NO с катионом нитрозония, высвобождающимся из триоксида азота. (Последний можно представить как аддукт катиона нитрозония и аниона нитрита — $\text{NO}^+ \cdot \text{NO}_2^-$.)

Очевидно, что для того, чтобы разобраться в этом диссонансе экспериментальных результатов, необходимо было изучить распад Б-ДНКЖ-MS в растворе в отсутствие воздуха, т.е. провести эксперименты с предварительной откачкой воздуха из этого раствора — в анаэробных условиях. Такого рода эксперименты показали, что и в отсутствие воздуха распад Б-ДНКЖ-MS в кислой среде приводил к появлению в растворе MS-NO в концентрации, равной концентрации ЖДНФ в этих комплексах. Таким образом, эти фрагменты действительно могли выступать в качестве доноров катионов нитрозония, причем в соотношении один катион на один ЖДНФ или на один атом железа в Б-ДНКЖ-MS.

Такого рода распад наиболее четко и воспроизводимо наблюдался для растворов Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при соотношении $\text{MS} : \text{Fe}^{2+} : \text{нитрит}$, равном 20 : 20 : 20 мМ или 30 : 20 : 20 мМ. Эксперименты проводили следующим образом. Из 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-MS откачивали воздух, затем к нему в анаэробных условиях добавляли 0.01 мл крепкой серной кислоты, после чего раствор прогревали при 80°C с последующей откачкой вышедшего из распадающихся комплексов газообразного NO, и только после этого раствор открывали на воздух для оптических измерений. Последние проводили сразу после обесцвечивания раствора.

Существенно, что последующее добавление избытка глутатиона практически не сказывалось на интенсивности полосы на 334 нм, характерной для RS-NO (рис. 5а,б, кривые 2 и 1). Это означает, что из-за откачки воздуха высвобождающийся из Б-ДНКЖ-MS газообразный NO не мог произ-

водить триоксид азота, как это имело место при кислотном распаде Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на воздухе (рис. 4). Следовательно, единственными S-нитрозирующими агентами могли выступать катионы нитрозония, высвобождающиеся из распадающегося Б-ДНКЖ-MS.

Что касается Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при высоких концентрациях MS, например, при соотношении $\text{MS} : \text{Fe}^{2+} : \text{нитрит}$, равном 40 : 20 : 20 мМ, то в этом случае распад комплексов в анаэробных условиях, даже при 80°C, не сопровождался появлением в растворе MS-NO (рис. 5в, кривые 2 и 1).

Аналогичные результаты были получены в опытах с кислотным разрушением при 80°C в анаэробных условиях Б-ДНКЖ с GSH (рис. 6а) или NAC (данные не приводятся). При комнатной температуре инкубации комплексы в кислой среде сохранялись без изменения по крайней мере в течение часа.

Как и в опытах с Б-ДНКЖ-MS, распад Б-ДНКЖ с GSH или NAC в кислой среде в анаэробных условиях при 80°C не сопровождался образованием соответствующих RS-NO, если в экспериментах использовали Б-ДНКЖ, синтезированные при высоких концентрациях тиолов, например, при соотношении $\text{тиол} : \text{Fe}^{2+} : \text{нитрит}$, равном 40 : 20 : 20 мМ (рис. 6б). В этом случае в соответствии со схемой 2 синтез Б-ДНКЖ должен был сопровождаться сохранением в растворе тиолов, не включившихся в Б-ДНКЖ, — назовем их свободными тиолами. Соотношение этих тиолов и Б-ДНКЖ в растворе при 40 мМ исходной концентрации тиолов должно в соответствии со схемой 2 составлять 2 : 1, тогда как при соотношении в ходе синтеза Б-ДНКЖ тиола, Fe^{2+} и нитрита, равном 20 : 20 : 20 мМ, свободные тиолы в растворе синтезированных таким образом Б-ДНКЖ должны были отсутствовать, т.е. концентрации свободных тиолов и Б-ДНКЖ должны были соотноситься как 0 : 1. Поскольку только при таком соотношении в анаэробных условиях инкубации Б-ДНКЖ-GSH распад этих комплексов достоверно сопровождался высвобождением из них катионов нитрозония, а в присутствии свободных тиолов этот процесс блокировался, есть основание предполагать, что именно свободные тиолы, как восстановители катионов нитрозония, могли подавлять этот процесс. Каким образом — эту сложную проблему мы рассмотрим при обсуждении полученных результатов.

Характерно, что блокирующее действие свободных тиолов на высвобождение катионов нитрозония из Б-ДНКЖ-GSH полностью устранялось при проведении тех же экспериментов в аэробных условиях (рис. 6в). Вероятнее всего, это

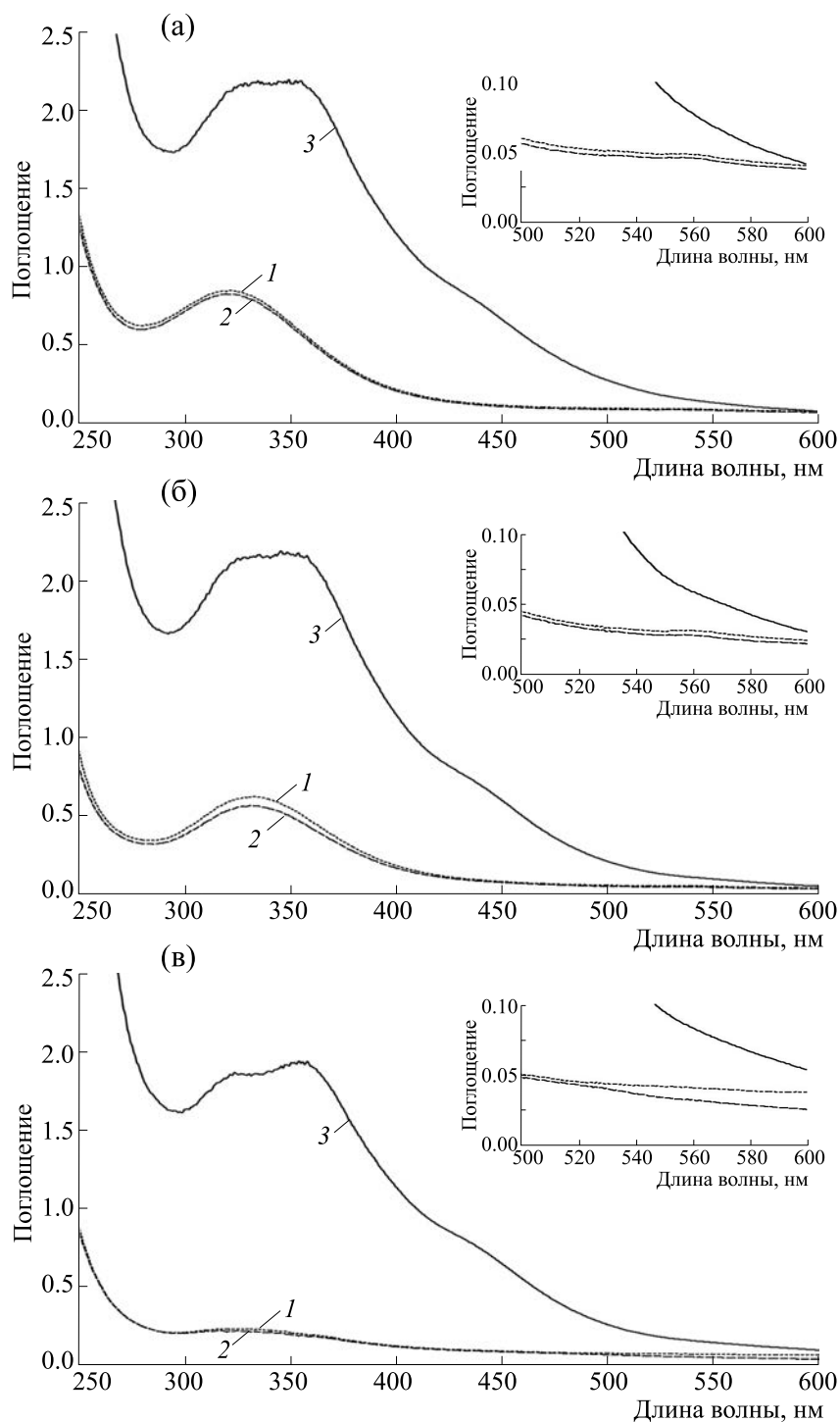


Рис. 5. Эволюция спектров поглощения комплексов Б-ДНКЖ-MS, синтезированных при соотношении MS : Fe^{2+} : нитрит, равном 20 : 20 : 20 мМ (а), 30 : 20 : 20 мМ (б) или 40 : 20 : 20 мМ (в), с последующей инкубацией растворов этих комплексов в анаэробных условиях после их подкисления до pH 1.0 при 80°C. Спектры 3 – исходные растворы комплексов Б-ДНКЖ-MS, спектры 2 – для тех же растворов через 1, 7 и 15 мин при 80°C, спектры 1 – после добавления к предыдущим растворам избытка глутатиона. На врезках на рис. (а) и (б) указано слабое поглощение на 500 нм, характерное для RS-NO; на врезке на рис. (в) оно отсутствует. Спектры зарегистрированы для растворов комплексов Б-ДНКЖ-MS, разбавленных в 20 раз.

эффект был обусловлен окислением тиолов до дисульфидов, не способных восстанавливать катионы нитрозония до молекулярного NO. Об эффективности окислительных процессов в этих условиях свидетельствует смещение максимума полосы на 334 нм, характерной для GS-NO, до 330 нм, обусловленное, как это было показано в наших предыдущих работах, появлением полосы оптического поглощения ионов Fe^{3+} на 302 нм, накладывающейся на полосу поглощения RS-NO [17]. Причиной появления этих ионов было, очевидно, окисление кислородом воздуха ионов Fe^{2+} , выходящих из Б-ДНКЖ.

В заключение этого раздела обратим внимание на один факт, характерный для распада Б-ДНКЖ с GSH и MS, синтезированных при низкой (20 мМ) концентрации GSH и MS. При этой концентрации скорость реакции образования обоих Б-ДНКЖ могла быть недостаточно высокой, так что из-за быстрого осаждения железа в форме гидроокисных комплексов (и, как следствие этого, выключения части железа из реакции, приведенной на схеме 2) в Б-ДНКЖ могла «не успеть» включиться часть соответствующих RS-NO, участвующих в соответствии со схемой 2 в образовании этих комплексов. В результате спектр поглощения растворов Б-ДНКЖ мог представлять собой, как это показано на рис. 2а, сумму спектра поглощения Б-ДНКЖ с пониженной концентрацией и полосы поглощения RS-NO на 334 нм. Совпадение формы такого суммарного спектра, приведенного на рис. 2а (спектр 1), и спектра, приведенного на рис. 6а (спектр 1), позволяет говорить о сохранении в растворе Б-ДНКЖ-GSH значительного количества GS-NO, не включившегося в комплекс. В результате появляющаяся после распада Б-ДНКЖ-GSH полоса поглощения на 334 нм (рис. 6а, спектр 3) могла определяться не только GS-NO, обусловленным высвобождением из Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония, но и исходным GS-NO, сохранившимся в растворе. К счастью, в нашем случае вклад последнего в полосу поглощения оказался, судя по материалу, иллюстрируемому на рис. 2, примерно равным вкладу GS-NO, возникшему при участии катионов нитрозония, так что и в этом случае можно утверждать, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами сами по себе способны выступать в качестве источников катионов нитрозония.

ОБСУЖДЕНИЕ

Главный результат проведенных исследований состоит в том, что он полностью согласуется с нашим, ранее сделанным утверждением о том, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут выступать в качестве источников (доноров) катио-

нов нитрозония (NO^+) (5–8, 13). Наиболее убедительно об этом говорят результаты наших опытов, в которых было продемонстрировано высвобождение NO^+ из Б-ДНКЖ в кислотной среде в анаэробных условиях, сопровождавшееся образованием соответствующих RS-NO. Поскольку концентрация последних практически была равна концентрации ЖДНФ, есть основание полагать, что в этих фрагментах половина из двух нитрозильных лигандов может находиться в форме катиона нитрозония, а вторая – в форме нейтральной молекулы NO.

Главным препятствием, затруднявшим обнаружение катионов NO^+ , высвобождавшихся в анаэробных условиях из ДНКЖ, была способность этих катионов восстанавливаться по одноэлектронному механизму, очевидно, под действием имевшихся в растворе тиолов до нейтральных, «летучих» молекул NO. Этот процесс начинал ослабляться при снижении соотношения свободные тиолы : Б-ДНКЖ до 1 : 1 и полностью подавлялся при отсутствии свободных тиолов в растворе, что и позволило обнаружить катионы нитрозония, высвобождающиеся из этих комплексов по полосе оптического поглощения RS-NO, возникающих при связывании катионов нитрозония с тиолами, также высвобождающимися из Б-ДНКЖ.

Следует отметить, что одноэлектронное восстановление NO^+ тиолами самими по себе без участия в этом процессе других агентов невозможно из-за нарушения закона сохранения спина в этой реакции [18]. Если бы такая реакция имела место, то исходно диамагнитная пара реагентов (RS^- и NO^+) с суммарным спином $S = 0$ давала бы продукты – тиильный радикал и молекулу NO со спином для обоих $S = 1/2$, так что их суммарный спин был бы равен 1, т.е. не равен суммарному спину исходных реагентов. Преодолеть это неравенство можно при включении в эту реакцию спиновых катализаторов, способных изменить спин одного или обоих реагентов. В качестве такого катализатора, обеспечивавшего одноэлектронное восстановление NO^+ тиолсодержащим лигандом в ходе распада Б-ДНКЖ, могли бы выступать атомы железа, все еще сохранявшие химическую связь с тиолами и катионом нитрозония. Спиновая плотность на атоме железа могла инициировать спиновую поляризацию неподеленной пары электронов в атоме тиоловой серы, инициируя переход этого атома в триплетной состояние (с $S = 1$) [18]. В результате одноэлектронное восстановление NO^+ до NO тиоловой группой полностью бы соответствовало закону сохранения спина в химической реакции и это превращение должно было реализоваться. Поскольку согласно закону действующих масс эф-

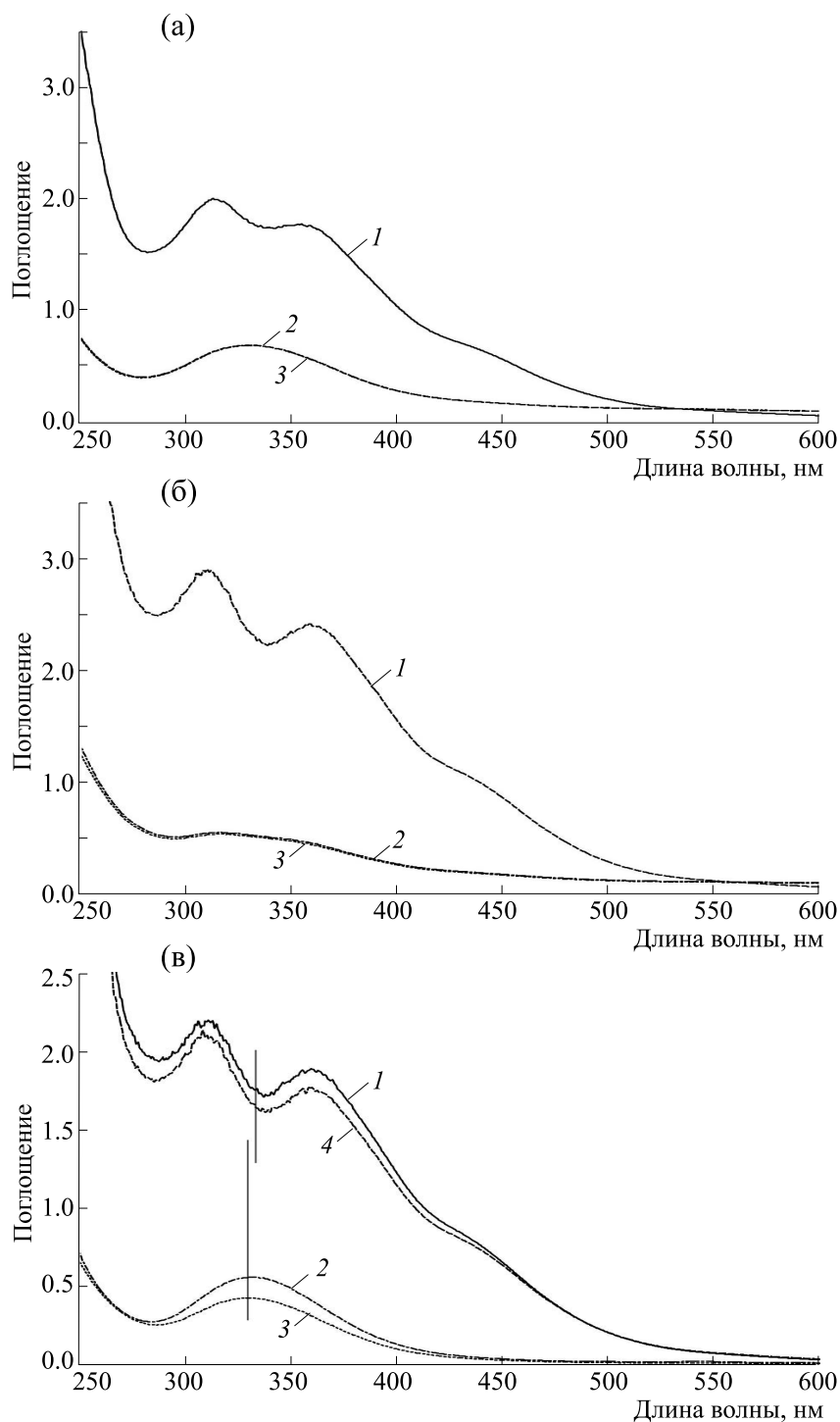


Рис. 6. Эволюция спектров поглощения комплексов Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношении $MS : Fe^{2+} : \text{нитрит}$, равном 20 : 20 : 20 мМ (а) или 40 : 20 : 20 мМ ((б) и (в)) с последующей инкубацией растворов этих комплексов после их подкисления до pH 1.0 при 80°C в анаэробных (рис. (а) и (б)) или в аэробных условиях (рис. (в)). На рис. (а) и (б) спектры 1 – исходные растворы комплексов Б-ДНКЖ-GSH, спектры 3 и 2 – соответственно через 5 и 15 мин после прогрева растворов при pH 1.0 с последующим добавлением к растворам избытка глутатиона; на рис. (в) спектры 4, 3 и 2 – соответственно через 1 мин после подкисления раствора, последующего прогрева в течение 1 мин при 80°C и добавления избытка глутатиона. Спектры зарегистрированы для растворов Б-ДНКЖ-GSH, разбавленных в 20 раз. На рис. (в) вертикальные линии проведены на 330 и 334 нм.

фективность этой реакции должна возрастать при повышении концентрации тиолов в растворе, восстановление NO^+ до NO должно было в этом случае усиливаться, что мы и наблюдали в растворах Б-ДНКЖ при повышении в них соотношения свободный тиол : Б-ДНКЖ до 2 : 1 и более. Проведенные нами ранее измерения оптического поглощения NO в газовой фазе показали, что, действительно, при таком соотношении оба нитрозильных лиганда в ЖДНФ высвобождаются из них в форме молекул NO [7, 8, 13]. Результаты же настоящей работы показывают, что при снижении соотношения свободный тиол : Б-ДНКЖ до нуля только половина нитрозильных лигандов высвобождается в этой форме, тогда как другая половина — в форме катионов нитрозония.

Этот результат позволяет разобраться в обнаруженном нами диссонансе результатов опытов по распаду использованных Б-ДНКЖ в кислой среде в аэробных условиях. Из этих опытов можно было сделать два взаимоисключающих вывода: либо катионы нитрозония действительно могут высвобождаться из Б-ДНКЖ, образуя значительную часть соответствующих RS-NO , либо их в Б-ДНКЖ вообще нет, а RS-NO образуются при распаде Б-ДНКЖ в реакции тиолов с азотистой кислотой, появившейся в кислой среде в результате гидролиза аддукта NO и диоксида азота ($?\text{NO}_2$) — продукта окисления кислородом воздуха NO , высвободившегося из Б-ДНКЖ. Поскольку опыты с распадом Б-ДНКЖ в анаэробных условиях показали, что катионы нитрозония в этих комплексах, действительно, существуют и высвобождаются из этих комплексов при низкой концентрации свободных тиолов, есть основание утверждать, что и в аэробных условиях, приводящих к окислению свободных тиолов до дисульфидной формы, этот процесс идет и обеспечивает появление в растворе RS-NO в концентрации, равной уровню ЖДНФ. Что же касается дополнительной части RS-NO , появляющейся при добавлении в раствор избытка глутатиона, эта часть RS-NO образуется в реакции добавленного глутатиона с азотистой кислотой, возникающей при гидролизе триоксида азота — аддукта NO , высвобождающегося из ДНКЖ, и NO_2 , образующегося при окислении части молекул NO .

Ранее мы показали, что наиболее эффективное высвобождение катионов нитрозония достигается обработкой М- и Б-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами производными дитиокарбамата ($\text{R}_2\text{N-CS}_2^-$). Последние способны эффективно акцептировать из ЖДНФ железо-мононитрозильную ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$) группу с образованием устойчивых мононитрозильных комплексов железа

(МНКЖ) с производными дитиокарбамата и высвобождением из ДНКЖ катионов нитрозония [14, 19, 20].

Такого рода обработка сирийских хомячков, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, распыленными в небулайзере растворами сначала Б-ДНКЖ-GSH, а затем диэтилдитиокарбамата приводила к резкому подавлению размножения вируса в носовой и легочной ткани этих животных [21], тогда как обработка животных только Б-ДНКЖ приводила к существенно более слабому лечебному эффекту. Сам диэтилдитиокарбамат не влиял на этот процесс [21]. Столь слабое лечебное действие Б-ДНКЖ-GSH было, по-видимому, обусловлено высокой стабильностью этих комплексов, затруднявшей их распад в организме животных. В связи с этим есть основание предполагать, что Б-ДНКЖ-MS из-за их слабой устойчивости и без диэтилдитиокарбамата могут оказать, как доноры NO^+ , заметное лечебное действие на животных, а возможно, и человека, инфицированных SARS-CoV-2.

Не исключено, что такая же биологическая активность может появиться и у Б-ДНКЖ-GSH при снижении соотношения свободный GSH : Б-ДНКЖ-GSH до 1 и ниже (ранее мы использовали в наших опытах на сирийских хомячках растворы Б-ДНКЖ-GSH при двукратном превышении свободного глутатиона над уровнем комплексов). Это снижение, во-первых, в соответствии с законом действующих масс снизит устойчивость этих комплексов, а во-вторых, ослабит процесс восстановления катионов нитрозония до NO и тем самым повысит эффективность токсического действия Б-ДНКЖ-GSH на патогенный вирус.

В настоящее время нет данных, которые позволили бы достоверно говорить о механизме этого действия. Наиболее вероятным представляется предположение от том, что мишенью действия катионов нитрозония являются тиоловые группы жизненно важных для размножения вируса протеаз — протеазы хозяина и протеазы, продуцируемой в организме хозяина вирусом. S-нитрозирование этих групп катионами нитрозония приводит к ингибированию этих белков и тем самым к ослаблению размножения вируса [21].

Впервые экспериментальные данные о более эффективном цитотоксическом действии катионов нитрозония по сравнению с аналогичным действием молекулярного NO , а точнее — продукта его конденсации с анионом супероксида — пероксинитрита, — были получены в работе [22]. В экспериментах на культуре фибробластов было показано, что в дозовом отношении катионы нитрозония, высвобождающиеся из анионов

нитропрусида $[(\text{CN}^-)_5\text{Fe}^{3+}\text{NO}^+]^{2-}$, в 40 раз более цитотоксичны, чем молекулы NO. Более того, катионы NO^+ при концентрации 20 мкМ вызывали апоптоз у 50% фибробластов уже через 2 ч после добавления нитропрусида, тогда как аналогичное действие на клетки молекулы NO при концентрации 800 мкМ оказывали лишь через 24 ч после добавления в клеточную культуру газообразного NO или его доноров — GS-NO или NAC-NO. Однако в этих экспериментах остался без ответа вопрос — не было ли цитотоксическое действие нитропрусида обусловлено высвобождением из него анионов цианида. Более убедительные данные о цитотоксическом действии катионов нитрозония были получены в работе [20] в экспериментах по одновременной обработке опухолевых клеток Jurkat человека М-ДНКЖ с тиосульфатом и производным дитиокарбамата — N-метил-D,L-глукаминдитиокарбаматом. Оказалось, что при действии этой смеси эффективность цитотоксикоза существенно превышала суммарное действие М-ДНКЖ и N-метил-D,L-глукаминдитиокарбамата, рассчитанное при условии, что эти агенты не вступают в реакцию друг с другом. Между тем такая реакция, как было сказано выше, должна была иметь место и должна была приводить с одной стороны к образованию устойчивых МНКЖ с N-метил-D,L-глукаминдитиокарбаматом, «выводящих 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 [20].

Подход с использованием производного дитиокарбамата для синэнергетического усиления цитотоксического действия этого агента и ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами на биосистемы был использован нами при изучении влияния этих агентов на организм животных, о чем было сказано выше, а также на культуру опухолевых клеток MCF-7 человека [19] и бактерии *Escherichia coli* [23]. Обнаруженное в этих работах необычайно резкое (синэнергетическое) усиление цитотоксического действия ДНКЖ на эти биосистемы под влиянием производных дитиокарбамата — N-метил-D,L-глукаминдитиокарбамата и диэтилдитиокарбамата свидетельствует о том, что именно катионы нитрозония как одно из производных одного из универсальных регуляторов метаболических процессов — оксида азота — ответственны за цитотоксическое действие системы оксида азота, функционирующей во всех представителях живого мира.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T.-T. Lu, Y.-M. Wang, C.-H. Hung, et al., *Inorg. Chem.*, **57**, 12425 (2018).
2. S.-L. Cho, C.-J. Liao, and T.-T. Lu, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **24**, 495 (2019).
3. N. Lehnert, E. Kim, H.T. Dong, et al., *Chem. Rev.*, **121**, 14682 (2021).
4. A. F. Vanin, *Dinitrosyl iron complexes as a “working form” of nitric oxide in living organisms* (Cambridge Scholar Publishing, Cambridge, UK, 2019).
5. A. F. Vanin, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10356 (2021).
6. A. F. Vanin, *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 279 (2019).
7. А. Ф. Ванин, *Биофизика*, **65**, 421 (2020).
8. A. F. Vanin, *Appl. Magn. Res.*, **51**, 851 (2020).
9. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 191 (1997).
10. A. F. Vanin and D. Sh. Burbaev, *Biophys. J.*, 878236 (2011).
11. A. F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **23**, 136 (2010).
12. В. Д. Микоян, Е. Н. Бургова, Р. Р. Бородулин и др., *Биофизика*, **65**, 1142 (2020).
13. A. F. Vanin, *Austin J. Analyt. Pharmac. Chem.*, **5**, 1109 (2018).
14. R. R. Borodulin, L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, et al., *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **66**, 1 (2013).
15. A. F. Vanin, I. V. Malenkova, and V. A. Serezhenkov, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **1**, 191 (1997).
16. J. A. Farrar, R. Grinter, D. L. Pountney, et al., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2703 (1993).
17. А. Ф. Ванин, В. Д. Микоян и Н. А. Ткачев, *Биофизика*, **67**, 1047 (2022).
18. A. L. Buchachenko and V. L. Berdinsky, *J. Phys. Chem.*, **100**, 1988 (1996).
19. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, *Cell Biochem. Biophys.*, **79**, 93 (2021).
20. A. L. Kleschyov, S. Strand, S. Schmitt, et al., *Free Rad. Biol. Chem.*, **40**, 1349 (2006).
21. А. В. Шиповалов, А. Ф. Ванин, О. В. Пьянков и др., *Биофизика*, **67**, 969 (2022).
22. S. Khan, M. Kayahara, U. Joashi, et al., *J. Cell Sci.*, **110**, 2315 (1997).
23. А. Ф. Ванин, Д. И. Телегина, В. Д. Микоян и др., *Биофизика*, **67**, 938 (2022).

Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as Sources of Universal Cytotoxins – Nitrosonium Cations

A.F. Vanin* and N.A. Tkachev*

**N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

It was shown that the release of a half of nitrosyl ligands from dinitrosyl iron units in the form of nitrosonium cation (NO^+) from binuclear dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (B-DNIC) during DNIC decomposition in acid solutions is increased with the decrease of the stability of these complexes and completely blocked with the increase of the concentrations of free thiols (non-included into B-DNIC) up to the level that was two times and more than that of dinitrosyl iron units. It was demonstrated that the less stable B-DNIC with mercaptosuccinate degrade in an acidic environment at ambient temperature, while the decomposition of more stable B-DNIC with glutathione was only marked when the solution was heated at 80°C. The inhibition of NO^+ release from B-DNIC in the presence of elevated free thiol level in the solution was due to the ability of free thiols to induce the reduction of NO^+ to NO.

Keywords: iron dinitrosyl complexes, S-nitrosothiols, nitrosonium cation, nitrite, nitric oxide

УДК 57.088.1

ОБРАБОТКА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАН В ТЛЕЮЩЕМ РАЗРЯДЕ ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ИММУНОАНАЛИЗА

© 2023 г. П.А. Петрова*, С.В. Замалутдинова*, А.А. Внукова*, Д.А. Алексеева*, Д.В. Багров*.*

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

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

Поступила в редакцию 31.03.2023 г.

После доработки 31.03.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Обработка поверхности плазмой может использоваться для ее гидрофилизации и улучшения ее сорбционных свойств. В данной работе показано, что обработка нитроцеллюлозных мембран в тлеющем разряде улучшает адсорбцию антител в 15–17 раз, а также приблизительно на порядок повышает чувствительность иммуноанализа (дот-блоттинга), выполняемого на таких мембранах. Это продемонстрировано на примере иммуноанализа на интерлейкин-1 бета с хемилюминесцентной детекцией. Обработка нитроцеллюлозных мембран в тлеющем разряде не сопровождалась изменениями их структуры или химического состава, о чем свидетельствуют данные сканирующей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии соответственно. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации существующих лабораторных процедур, прежде всего дот-блоттинга.

Ключевые слова: нитроцеллюлоза, иммуноанализ, мембрана, чувствительность, антитела, интерлейкин.

DOI: 10.31857/S000630292303002X, EDN: FPIRBX

Дот-блоттинг — это метод молекулярной биологии, используемый для обнаружения биомолекул, который предполагает проведение реакции на поверхности полимерной мембраны. Обычно используют мембраны, изготовленные из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида, потому что большинство белков эффективно связываются с их поверхностью. Впервые метод дот-блоттинга был описан, вероятно, в 1982 г. — его использовали для анализа связывания различных пар «антиген–антитело» и для обнаружения антител против возбудителей инфекционных заболеваний (цитомегаловируса, аденовируса, микоплазмы и других) в сыворотке крови пациентов [1].

В основе дот-блоттинга лежит последовательность иммунохимических реакций: на подложку (мембрану) наносят рецепторный слой (антитела или антиген), затем отмывают, блокируют и наносят исследуемый образец. При инкубации образца на мембране происходит аффинное связывание анализата с молекулами рецепторного слоя.

Сокращения: ИФА — иммуноферментный анализ, ИЛ16 — интерлейкин-1 бета, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия.

Затем, после повторной отмывки и блокировки, на мембрану наносят антитела против анализата либо их конъюгаты. Часто используют пероксидазу хрена — фермент, работа которого приводит к возникновению колориметрического или хемилюминесцентного сигнала в зависимости от использованного субстрата. В результате окраска мембраны (или хемилюминесценция) наблюдается только в тех местах, где произошло связывание анализата из исследуемого образца.

Отличие дот-блоттинга от традиционного иммуноферментного анализа (ИФА), выполняемого в ячейках планшета, состоит в том, что реакция идет на мембране, а область, в которой происходят все реакции, определяется объемом капель и их растеканием по мембране. Используемый объем раствора может быть снижен до 0.1 мкл [1], хотя на практике обычно используют ~ 5–10 мкл [2, 3]. В современном варианте для нанесения растворов на мембрану часто используют вакуумную систему, которая заставляет раствор двигаться через мембрану под действием перепада давления. Преимущества дот-блоттинга перед обычным ИФА состоят в скорости (мембрану проще отмывать и блокировать, чем планшет), возможности экономии реагентов, а в некоторых случаях — в

возможности проводить регистрацию на качественном уровне без использования ридеров.

Для большинства видов ИФА актуальна задача повышения чувствительности [4, 5]. Она может быть решена за счет использования антител с низкими константами диссоциации, за счет специфических инженерных особенностей или биохимических процедур амплификации сигнала [6]. В некоторых случаях чувствительность может быть улучшена за счет обработки плазмой поверхности полимера-носителя, на котором происходят реакции связывания [7, 8]. При этом улучшение характеристик биосенсора объясняют улучшением смачиваемости полимера-носителя, а также усилением адсорбции молекул рецепторного слоя на его поверхность.

В данной работе мы показали, что чувствительность дот-блоттинга может быть повышена за счет обработки нитроцеллюлозной мембраны в тлеющем разряде. Это было показано на примере иммуносенсора для определения интерлейкина-1 бета (ИЛ1б) — провоспалительного цитокина, имеющего большое клиническое значение [9]. Описываемый иммуносенсор представлял собой «сэндвич» из улавливающих антител, аналита и биотинилированных проявляющих антител, собранный на нитроцеллюлозной мембране. Хемилюминесцентный сигнал, регистрируемый от мембран, обработанных в тлеющем разряде, оказывался интенсивнее, чем аналогичный сигнал от обычной мембраны. Чувствительность анализа (отношение приращения сигнала к приращению концентрации аналита) на обработанных мембранах была почти на порядок выше, чем на необработанных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Использовали мембраны из нитроцеллюлозы с эффективным размером пор 0.45 мкм (Bio-Rad, США). Все основные реагенты для ИФА (улавливающие антитела, ИЛ1б, биотинилированные проявляющие антитела, конъюгаты стрептавидина с пероксидазой хрена) были взяты из набора KSA563hu01 (Cloud-clone, Китай). Для независимого подтверждения используемых концентраций ИЛ1б использовали набор реагентов для определения ИЛ1б (АО «Вектор-Бест», Россия).

Фосфатно-солевой буфер готовили из таблеток («Панэко», Россия). Для приготовления буфера PBST в фосфатно-солевой буфер добавляли 0.075% Tween-20 (Bio-Rad, США). Для блокировки мембран использовали 4%-й раствор бычьего сывороточного альбумина («ПанЭко», Россия); в растворы ИЛ1б добавляли эмбриональную бычью сыворотку, очищенную углем (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США).

Для оценки адсорбции антител на мембраны использовали антивидовые антитела (антитела козы к иммуноглобулину кролика), конъюгированные с красителем Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США). Для растворения нитроцеллюлозных мембран и приготовления пленок методом полива использовали ацетон («Химмед», Россия).

Обработка мембран в тлеющем разряде. Обработку мембран в тлеющем разряде проводили на приборе Emitech K100X (Quorum Technologies Ltd., Великобритания). Каждую мембрану последовательно обрабатывали с двух сторон, давление составляло 0.1 мбар. Использовали один из двух вариантов обработки: обычный (45 с при силе тока 25 мА) или интенсивный (8 мин при силе тока 50 мА). Обработку мембраны проводили при разной полярности — мембрана была расположена в прианодной или прикатодной области.

Сканирующая электронная микроскопия. Фрагменты мембран размером от 5×5 до 9×9 мм² покрывали слоем золота толщиной 20 нм с помощью распылителя IB3 (Eiko Engineering, Япония). Структуру исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) TM3000 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Изображения обрабатывали с использованием программного обеспечения Fiji [10].

Инфракрасная спектроскопия. Регистрацию ИК-спектров проводили на ATR-FTIR-спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, США) с приставкой MIRacle (PIKE Technologies, США). Для регистрации каждого спектра использовали 30 накоплений, образец прижимали к призме из селенида цинка. Перед измерением каждого образца регистрировали фоновый сигнал.

Иммуноанализ. Иммуноанализ проводили в 24-луночных планшетах, использовали нитроцеллюлозные мембраны размером от 5×5 до 9×9 мм². На мембраны наносили улавливающие антитела в концентрации 10 мкг/мл (использовали объем 10–15 мкл) и выдерживали приблизительно 30 мин с открытой крышкой до высыхания раствора. Затем мембраны блокировали 4%-м раствором бычьего сывороточного альбумина в течение 40–60 мин при покачивании. После блокировки мембраны отмывали буфером PBST трижды по 5 мин. На подготовленные таким способом мембраны наносили растворы ИЛ1б с известной концентрацией. В качестве разбавителя использовали буфер, состоящий из 0.1% бычьего сывороточного альбумина и 4% эмбриональной бычьей сыворотки в PBST-буфере. Растворы ИЛ1б с рабочей концентрацией в диапазоне 0–280 пг/мл были приготовлены из стокового раствора. Концентрацию стока измеряли с помощью ИФА-набора Интерлейкин-1 бета-ИФА-БЕСТ согласно рекомендациям производителя. Раствор

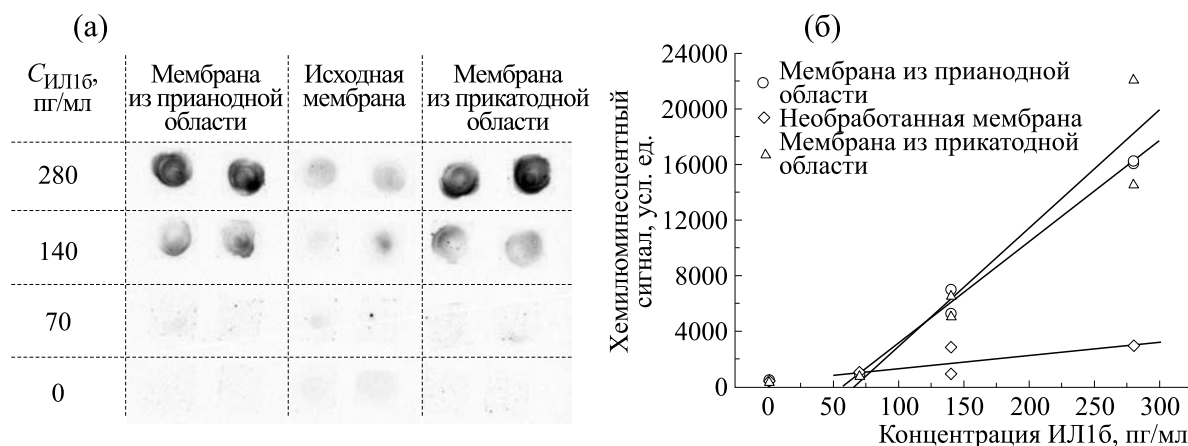


Рис. 1. Результаты измерения концентрации ИЛ16 с помощью дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах: (а) — результаты дот-блоттинга, инвертированное изображение; (б) — зависимости хемилюминесцентного сигнала от концентрации ИЛ16.

ИЛ16 выдерживали на мембранах 60 мин при покачивании, после чего повторяли этап промывки.

Проявляющие биотинилированные антитела разводили до рабочей концентрации 0.5 мкг/мл, наносили на мембраны и инкубировали 60 мин при покачивании, далее повторяли снова этап промывки. На заключительном этапе на мембраны на 30 мин наносили конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, разведенный в 0.1%-м растворе бычьего сывороточного альбумина в буфере PBST. Мембраны отмывали в буфере PBST и фосфатно-солевом буфере и вносили хемилюминесцентный субстрат. Съемку проводили на приборе ChemiDoc (Bio-Rad, США) с выдержкой в диапазоне от 5 до 10 мин. Выдержку подбирали так, чтобы был задействован весь динамический диапазон детектора.

Оценка адсорбции антител на мембраны. Измерения методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии проводили на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония). Мембраны, обработанные растворами флуоресцентно меченых антител, помещали на предметный столик микроскопа, определяли верхнюю и нижнюю поверхности мембраны и фокусировали лазер на равном расстоянии от них для настройки динамического диапазона. Коррекцию настроек по оси z проводили в соответствии с рекомендациями производителя с использованием программного обеспечения NIS-Elements. Изображения получали с помощью объектива CFI Plan Apo VC 20 $\times$ /0.75, параметры съемки (мощность лазера, чувствительность детектора, скорость съемки) были одинаковы для всех образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение чувствительности иммуноферментного анализа. При дот-блоттинге с хемилюминесцентной детекцией на поверхности мембраны наблюдаются светящиеся участки, интенсивность свечения которых монотонно зависит от концентрации аналита в пробе. На рис. 1а представлена фотография мембраны, на которой выполняли дот-блоттинг. Если в эксперименте использовали мембраны, которые были обработаны в тлеющем разряде, то сигнал от них был значительно сильнее, чем сигнал от обычных, необработанных мембран. Этот результат был воспроизведен в трех независимых экспериментах.

Результаты количественной обработки хемилюминесцентных сигналов представлены на рис. 1б. Каждая точка соответствует результатам обработки изображения одного пятна на мембране; все сопоставляемые мембраны были измерены одновременно, поэтому вариации условий съемки полностью исключены. Хотя метод дот-блоттинга обычно используют как полуквантитативный, мы можем построить зависимости сигнала от концентрации (в диапазоне концентраций более 70 пг/мл). Если использовать линейную зависимость, то тангенс угла наклона соответствующего графика будет характеризовать чувствительность анализа — отношение приращения сигнала к приращению концентрации. Для мембран, обработанных в плазме, оно было приблизительно на порядок (в 7.5–9.0 раз) больше, чем для необработанных мембран.

Обнаруженный эффект обладает большой практической значимостью, а также имеет два необычных свойства. Во-первых, он сохранялся в течение как минимум четырех суток после обработки мембран. Другими словами, мембраны, обработанные в тлеющем разряде, после хранения в

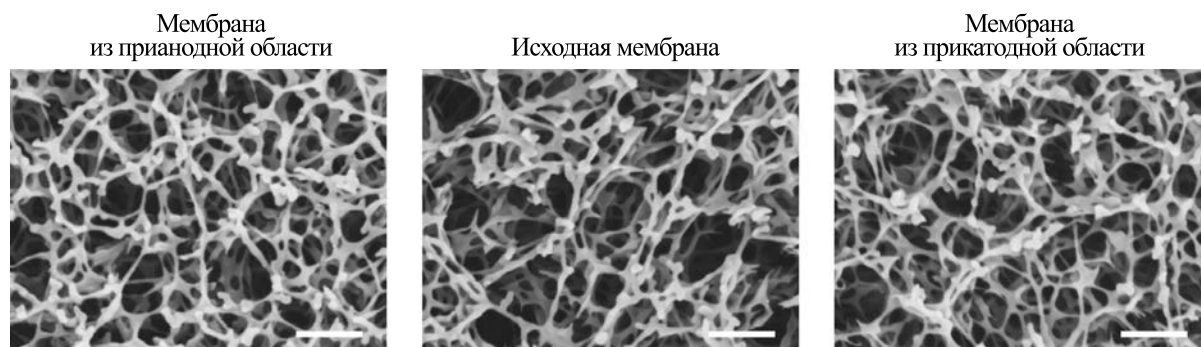


Рис. 2. Изображения нитроцеллюлозных мембран, полученные методом СЭМ. Длина масштабного отрезка — 2 мкм.

течение четырех суток обеспечивали высокий сигнал в эксперименте по дот-блоттингу. Вероятно, время хранения может быть и больше, особенно если хранить мембраны в инертной атмосфере.

Во-вторых, эффект наблюдался независимо от полярности напряжения, использованного при обработке мембраны. На рис. 1 видно, что результаты дот-блоттинга на мембранах, обработанных при разной полярности (мембрана расположена на катоде или на аноде), слабо отличаются друг от друга, но резко отличаются от результатов, полученных на необработанных мембранах. Эта закономерность будет подтверждена ниже в экспериментах по адсорбции флуоресцентно меченых антител на мембраны.

Контроль структуры поверхности мембраны. Изменяется ли поверхность нитроцеллюлозной мембраны при ее обработке в тлеющем разряде? Для ответа на этот вопрос структуру поверхности мембран исследовали методом СЭМ (рис. 2). На изображениях видны поры с характерным диаметром менее 1 мкм, разделенные стенками с толщиной 0.3 ± 0.1 мкм (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Полученные изображения отлично соответствуют литературным данным [11]. Структура мембраны оставалась неизменной при обработке в тлеющем разряде, и совпадала со структурой исходной мембраны. Аналогично, поверхность нитроцеллюлозных мембран не изменялась при автоклавировании [11].

Определение размера пор в мембранах требует дополнительных комментариев. По данным производителя средний размер пор составляет 0.45 мкм и, скорее всего, был определен по результатам теста на начало пузырения (на точку пузырька), который долгое время был стандартом для измерения пористости мембран [12]. В этом тесте через смоченную мембрану пропускают воздух, и измеряют давление P , при котором мембрана начинает пропускать пузыри, а затем по известному давлению вычисляют диаметр пор D по формуле

$$D = K \frac{4\gamma \cos\theta}{P}, \quad (1)$$

где γ — коэффициент поверхностного натяжения жидкости, θ — краевой угол смачивания, K — коэффициент, который зависит от формы пор [13]. Для пор со сложной трехмерной структурой волюмометрические методы измерения обычно более эффективны, чем микроскопия. Поэтому полученные СЭМ-изображения (рис. 2) не противоречат характеристикам мембраны, измеренным производителем.

Чтобы проконтролировать возможные изменения химической структуры мембран после их обработки в тлеющем разряде, использовали метод ИК-спектроскопии. При подготовке образцов для этого исследования использовали два режима — обычный (сила тока 25 мА, время обработки 45 с) и интенсивный (сила тока 50 мА, время обработки 8 мин). «Обычный» режим был выбран потому, что он рутинно используется при подготовке образцов для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии. При этом обрабатывают углеродную поверхность; сетки с углеродным покрытием располагают в прианодной области. Такая обработка усиливает адсорбцию различных объектов, включая внеклеточные везикулы [14], вирусы [15] и ДНК-белковые комплексы [16]. «Интенсивный» режим обработки был использован, чтобы усилить воздействие тлеющего разряда на мембрану и проверить, будет ли изменяться ее ИК-спектр.

Полученные спектры представлены на рис. 3. Видно, что они отлично совпадают (приводятся спектры мембран, обработанных в «интенсивном» режиме — 8 мин при силе тока 50 мА). Нам не удалось зарегистрировать различия, вызванные обработкой мембран в тлеющем разряде. По-видимому, при небольшой мощности (менее ~50 Вт) и небольшом (до 10 мин) времени обработки изменения химической структуры происходят на такой малой глубине, что не обнаруживаются методом ИК-спектроскопии [17]. Аккуратное измерение глубины, на которую

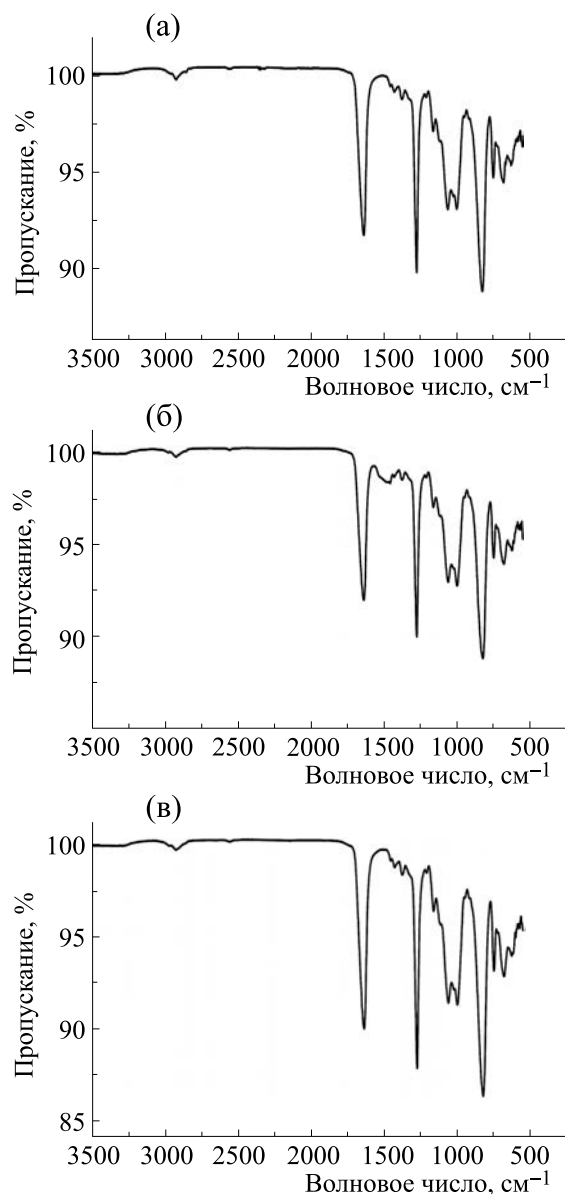


Рис. 3. ИК-спектры нитроцеллюлозы: (а) — необработанная мембрана, (б) — мембрана из катодной области, (в) — мембрана из анодной области.

проникает плазма в пористую мембрану, является нетривиальной задачей и может быть предметом дальнейших исследований.

Расшифровка полос поглощения ИК-спектров представлена в табл. 1. Наиболее заметные полосы соответствуют следующим группам: 1640 см^{-1} — асимметричные валентные колебания групп NO_2 , 1378 см^{-1} — деформационные колебания C—H -связи, 1062 см^{-1} — валентные колебания связи C—O—C в кольце пиранозы, 1000 см^{-1} — валентные колебания C—O , 830 см^{-1} — валентные колебания NO_2 .

Неплотное прилегание образца к призме ИК-спектрометра может быть причиной артефактов. Чтобы исключить влияние пористости на получаемые ИК-спектры, мембраны растворяли в ацетоне и готовили пленки методом полива. Затем поверхность этих пленок обрабатывали в тлеющем разряде и получали ИК-спектры до и после обработки. Положения полос поглощения в спектрах сплошных пленок до и после обработки отлично совпадали, а также совпадали с положениями полос в спектрах пористых мембран (данные не приводятся).

Измерение адсорбции антител на мембраны. Можно предположить, что увеличение сигнала от мембраны, обработанной плазмой, объясняется более интенсивной адсорбцией на нее улавливающих антител. Чтобы проверить эту гипотезу, мы использовали флуоресцентно меченые антитела, наносили их на поверхность мембран, а затем получали изображения мембран с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Изображения всех мембран получали при одних и тех же настройках микроскопа (мощность лазера, чувствительность детектора, скорость съемки и т.п.), чтобы можно было использовать интенсивность флуоресценции как меру интенсивности адсорбции антител на мембрану. Аналогичный подход был использован нами для оценки адсорбции ранее [20], и он применяется многими авторами [7, 8].

На рис. 4 представлены средние значения интенсивностей флуоресценции. От мембран, обработанных в тлеющем разряде, флуоресцентный сигнал был в 15–17 раз интенсивнее, чем от обычных мембран. Это говорит о том, что адсорбция антител на них происходила более интенсивно.

Итак, обработка мембраны в тлеющем разряде сохраняет ее структуру на уровне, доступном исследованию СЭМ, и сохраняет ее химический состав на уровне, доступном ИК-спектроскопии. При этом наблюдается усиленная адсорбция антител на поверхность обработанной мембраны, которая может отчасти объяснять большую чувствительность дот-блоттинга, выполняемого на обработанной мембране. По-видимому, и блокировка мембраны, обработанной в тлеющем разряде, проходит более эффективно, и в общем случае это может положительно отразиться на результатах анализа.

При обработке полимера плазмой происходит множество процессов, включающих формирование свободных радикалов, возникновение новых химических связей, деградацию поверхности и т.д. [21, 22]. При обработке поверхность приобретает электрический заряд, но в описанных выше экспериментах он проявлялся сравнительно слабо. Вероятно, наибольшее влияние на свойства поверхности оказывает ее окисление (обработка

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для проведения ПЦР

Волновое число, см^{-1}	Функциональная группа и тип колебаний
2918	C–H, вал., сим.
1640	NO_2 , вал., асим.
1378	C–H, деф.
1276	NO_2 , вал., сим.
1062	C–O–C, вал.
1000	C–O, вал.
830	NO_2 , вал.
744	NO_2 , деф.
680	NO_2 , деф.

Примечание. Вал. — валентное колебание, деф. — деформационное колебание, сим. — симметричное колебание, асим. — асимметричное колебание. Интерпретация полос поглощения сделана на основании работ [18, 19].

происходит в кислородной плазме), а также формирование свободных радикалов (оно может обеспечивать высокую адсорбцию).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленных данных следует, что обработка нитроцеллюлозных мембран в тлеющем разряде увеличивает чувствительность дот-блоттинга. Этот эффект наблюдался вне зависимости от полярности напряжения, использованного при обработке мембраны, и сохранялся в течение, как минимум, четырех дней. Вероятно, увеличе-

ние чувствительности связано с более интенсивной адсорбцией улавливающих антител на обработанную мембрану. Методами СЭМ и ИК-спектроскопии не выявлено изменений в структуре мембран, вызванных обработкой.

Проведенное исследование открывает несколько направлений для дальнейшей работы. Скорее всего, условия обработки поверхности плазмой могут быть оптимизированы для обеспечения наилучшей адсорбции, а также для возможности длительного хранения обработанной поверхности без изменения ее сорбционных свойств. Вероятно, оптимальных результатов можно будет добиться при хранении мембраны в инертной атмосфере. Кроме того, представляет интерес возможность переноса полученных результатов на другие типы лабораторных анализов, например, ИФА, выполняемый в планшетах, или дот-блоттинг на мембранах из поливинилиденфторида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова до 2020 года.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

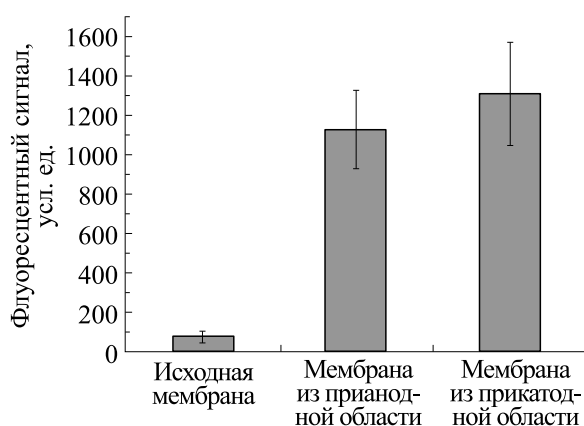


Рис. 4. Результаты измерения флуоресценции мембран с нанесенными на них флуоресцентно мечеными антителами по данным конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Hawkes, E. Niday, and J. Gordon, *Anal. Biochem.*, **119** (1), 142 (1982).
2. D. I. Stott, *J. Immunoassay*, **21** (2–3), 273 (2000).
3. V. Faoro and G. Stanta, In *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*, Ed. by G. Stanta (Springer, Berlin, Heidelberg, 2011), pp. 275–276.
4. S. Zhang, et al., *Analyst*, **139** (2), 439 (2014).
5. N. Tsurusawa, J. Chang, M. Namba, et al., *J. Clin. Med.*, **10** (21), 5197 (2021).
6. S. Watabe, H. Kodama, M. Kaneda, et al., *Biophysics (Japan)*, **10**, 49 (2014).
7. J. Wang, et al., *PLoS One*, **8** (12), e82888 (2013).
8. C. F. O. Hoy, et al., *Sensing and Bio-Sensing Research*, **26**, 100304 (2019).
9. N. Kaneko, et al., *Inflamm. Regener.*, **39** (1), 12 (2019).
10. C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, *Nat. Methods*, **9** (7), 671 (2012).
11. A. Li, et al., *Cytotechnology*, **65** (1), 71 (2013).
12. T. H. Meltzer and M. Jornitz, *Am. Pharmaceut. Rev.*, **6**, 44 (2003).
13. Z. Ashrafi, L. Lucia, and W. Krause, *Soft Matter*, **15** (45), 9359 (2019).
14. I. Nikishin, et al., *Micron*, **145**, 103044 (2021).
15. D. V. Bagrov, et al. *Microscopy Res. & Technique*, **85** (2), 562 (2022).
16. O. I. Volokh, et al., *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 1048117 (2022).
17. J. G. Dillard and I. M. Spinu, *J. Adhesion*, **31** (2–4), 137 (1990).
18. P.-O. Bussiere, J.-L. Gardette, and S. Therias, *Polymer Degradation and Stability*, **107**, 246 (2014).
19. V. I. Kovalenko, et al., *J. Struct. Chem.*, **34** (4), 540 (1994).
20. А. М. Сенковенко и др., *Биофизика*, **67** (3), 555 (2022).
21. О. Йосихито, *Высокомолекуляр. соединения*, **30** (9), 1815 (1988).
22. T. Desmet, et al., *Biomacromolecules*, **10** (9), 2351 (2009).

Glow Discharge Treatment of Nitrocellulose Membranes Increases the Immunoassay Sensitivity

P.A. Petrova*, S.V. Zamalutdinova*, A.A. Vnukova*, D.A. Alekseeva*, and D.V. Bagrov*

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

Plasma treatment can make the surfaces of the materials more hydrophilic and improve the surface and adsorption properties. Our research shows that the glow discharge treatment of nitrocellulose membranes improves the adsorption capacity for antibodies by a factor of 15–17 and increases the sensitivity of immunoassay (dot-blotting) performed on the membranes approximatively by an order of magnitude. This feature has been demonstrated for the interleukin-1 beta immunoassay with chemiluminescent detection. Upon glow discharge treatment, the nitrocellulose membranes did not change their structure or chemical composition as can be seen using scanning electron microscopy and IR spectroscopy, respectively. The obtained results can be used to optimize the existing laboratory procedures, especially dot-blotting.

Keywords: nitrocellulose, immunoassay, membrane, sensitivity, antibodies, interleukin

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА *N*-ФОСФОНОМЕТИЛ-ГЛИЦИНОМ

© 2023 г. Л.В. Авдеева*, Я.В. Вахтерова**, Е.А. Саратовских*,#

*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, просп. Н.Н. Семёнова, 1, Черноголовка Московской области, 142432, Россия

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/51, Москва, 119912, Россия

#E-mail: easar@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 30.12.2022 г.

После доработки 06.03.2023 г.

Принята к публикации 15.03.2023 г.

Исследовано ингибирование активности пероксидазы хрена *N*-фосфонометил-глицином, действующим веществом самого распространенного в сельскохозяйственной практике в мире гербицида раундапа (глифосата). Показано, что *N*-фосфонометил-глицин ингибирует активность пероксидазы из корней хрена по конкурентному типу, $K_i = 0.1004$ мМ. Определена константа Михаэлиса $K_m = 1.776$ мМ и величина концентрации $I_{50} = 0.302$ мМ. Полученные данные показывают, что *N*-фосфонометил-глицин способен блокировать работу антиоксидантной системы и в теплокровных организмах может стать причиной накопления свободных радикалов, что является дополнением к имеющимся литературным данным о биологических мишенях, на которые направлено действие раундапа.

Ключевые слова: раундап (глифосат), пероксидаза хрена, ингибирование активности фермента.

DOI: 10.31857/S0006302923030031, EDN: FPODNK

Экологическая опасность химического загрязнения окружающей среды проявляется в прямом и опосредованном токсическом действии на живые организмы веществ, не предназначенных природой к естественному метаболизму. Техногенные выбросы в окружающей среде приводят к изменению нормального протекания биохимических реакций. В результате этого, экосистемы теряют способность к самоочищению. Накопление токсикантов в природных объектах обуславливает прогрессирующие темпы сокращения ресурсов — запасов питьевой воды, промышленных организмов, плодородия почв.

Раскрытие молекулярных механизмов биологического действия экотоксикантов на структурно-функциональные системы клетки — ферментные системы, биомембраны, генетический аппарат — необходимы для успешной борьбы за чистоту окружающей среды и безопасность существования человека. Без понимания химической причины возникновения токсичности невозможно создавать методы контроля состояния окружающей среды, прогнозировать токсичность и отда-

ленные последствия применения препаратов, предотвращать возникновение вредных продуктов трансформации исходных соединений, разрабатывать эффективные и экологически безопасные способы переработки отходов промышленных и сельскохозяйственных производств, стоков коммунально-бытового хозяйства.

До 80% пестицидов адсорбируется почвенным гумусом, в таком состоянии они практически не подвергаются биоразложению, вследствие чего их время жизни в почвенном покрове значительно возрастает [1]. Накапливаясь в почвах, растениях и животных, они вызывают глубокие и необратимые нарушения нормальных циклов биологического круговорота веществ [2], отрицательно влияют на живые организмы почв [3]. Подавляемые виды насекомых вырабатывают резистентность, заставляя применять более токсичные препараты [2, 4]. Появляются в качестве сорных виды растений, более устойчивые к действию гербицидов [4, 5], увеличивается эрозия почв. В частности, с ростом применения гербицида раундапа происходит образование водородных связей между его фосфорными группами и гуминовыми полимерами, приводящее к дезагрегации молекул гуминовых кислот [6, 7]. Уменьшается содержание микроэлементов и других веществ в расте-

Сокращения: *N*-ФМГ — *N*-фосфонометил-глицин, ВПС-синтаза — 5-энолпирувилкина-3-фосфат-синтаза, ПХ — пероксидаза хрена.

ниях, способность сельскохозяйственной продукции к хранению, вкусовые качества и пищевую ценность растений [8].

Вещество с тривиальным названием глифосат используется более чем в 20 коммерческих препаратах, в частности, в раундапе (далее по тексту мы приводим те названия, которые использовали авторы в конкретной цитируемой статье). Раундап является самым распространенным по объему производства и применения в практике сельского хозяйства в мире [9]. Это неселективный системный гербицид, использующийся для борьбы с сорняками, особенно многолетними. Действующее вещество имеет систематическое название *N*-фосфонометил-глицин (*N*-ФМГ).

Всякое вещество, которое в следовых количествах оказывает биологическое действие, влияет на какую-то ферментативную реакцию. Считается, что действие раундапа, как и других фосфорорганических пестицидов, на растение обусловлено тем, что он ингибирует фермент растений 5-энолпирувилшикимат-3-фосфат-синтазу (ВПСП-синтаза, КФ 2.5.1.19) [10, 11]. ВПСП-синтаза является компонентом ферментной системы шикиматного пути биосинтеза бензоидных ароматических соединений (содержащих бензольные кольца) и осуществляет одну из стадий превращения шикимата в хоризмат — предшественник трех ароматических протеиногенных аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана), *para*-аминобензоата, терпеноидных хинонов (убихинона, пластохинона, филлохинона), ряда других важных метаболитов (фенолов, ароматических кислот, токоферолов, алкалоидов, фитогормонов), лигнинов и др. [12, 13].

На ферменте ВПСП-синтазе, выделенном из *Escherichia coli*, определено обратимое ингибирование его раундапом с псевдопервым порядком, при $K_i = 45 \text{ мМ}$ и $V_{\max} = 1.1 \text{ мМ} \cdot \text{мин}^{-1}$ [14]. В прямой реакции ингибирование конкурентное по фосфоэнолпирувату [15], но неконкурентное по шикимат-3-фосфату. Продукт реакции конкурентно ингибирует и то, и другое. В обратной реакции — неконкурентно ингибируется фермент из *Streptococcus pneumoniae*, но бесконкурентно — неорганический фосфат. Это указывает на образование непродуктивного четырехчленного комплекса между ферментом, раундапом и фосфатом [16]. Октаэдрическая координация осуществляется ионом кобальта: ВПСП-синтаза—Co—раундап [17].

Поэтому при попадании раундапа на растение он проникает в клетки, блокирует синтез ряда необходимых соединений, и в результате растение погибает. Кроме растений, шикиматный путь имеют микроорганизмы, что подвергает опасности их жизненный цикл при наличии раундапа в окружающей среде [18]. Считается, что животные

не имеют ферментной системы шикиматного пути, в том числе они не имеют ВПСП-синтазы.

Однако в литературе имеется очень большое количество работ, доказывающих высокую опасность раундапа для живых организмов. Установлено, что раундап оказывает токсическое действие на живые организмы всех трофических уровней, в частности, у людей вызывает множество патологий — нарушения в работе печени, почек, онкологические заболевания. В марте 2015 г. Международное агентство по изучению рака ВОЗ обнародовало заключение, о том, что глифосат является «возможным канцерогеном для человека» (категория опасности «2А»). В заключении приводятся данные о повышенном уровне развития неходжкинской лимфомы у работающих с глифосатом [19]; о развитии рака у лабораторных крыс и мышей [20, 21]; о способности глифосата повреждать ДНК и вызывать абберрации хромосом в клетках человека и животных, культивируемых *in vitro*; а также приводить к повышению частоты хромосомных повреждений (микроядер) в клетках крови [21]. Показано [22] образование комплексов раундапа с ДНК и РНК, приводящее к потере комплементарности спирали.

Ранее было показано, что раундап ингибирует активность фермента НАДН-оксидоредуктазы, катализирующего многие окислительно-восстановительные реакции в клетках [23]. Естественно, вставал вопрос о способности окислительно-восстановительной системы организма растения или животного окислять и обезвреживать данное химическое токсичное соединение. Способность объектов окружающей среды к самоочищению, т.е. разложению загрязняющих веществ, во многом определяется протеканием ферментативных окислительно-восстановительных процессов в клетках растений и микроорганизмов. Поэтому мы исследовали действие раундапа именно на окислительный фермент.

В качестве объекта исследования взята пероксидаза хрена (ПХ). Выбор фермента обусловлен тем, что пероксидазы (КФ 1.11.1.X) относятся к классу оксидоредуктаз, ферментов основной антиоксидантной системы. ПХ окисляет широкий спектр субстратов, однако функционирует исключительно в присутствии пероксида водорода. Например, при исследовании ингибирования активности пероксидазы хрена хлорсодержащим гербицидом пиклорамом, было показано, что до концентрации $2 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ он не влиял на окисление содержащей протогем ПХ [24].

Цель настоящего исследования состоит в определении кинетических параметров ингибирования пероксидазы хрена гербицидом раундапом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе были использованы: вода дистиллированная; раундап («Август», Россия) в форме действующего вещества *N*-ФМГ ($C_3H_8NO_5P$), очищенного двойной перекристаллизацией из воды [25]; тиосульфат натрия ($Na_2S_2O_3$, Merck, Германия) в виде 0.1 N водного раствора; серная кислота (neoFroxx, Германия), в виде 1 N раствора; йодид натрия (NaI, Biochem, Франция) в виде 1 N раствора; бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$ («ЛенРеактив», Россия) в форме порошка; крахмал растворимый («ЛенРеактив», Россия) в виде 1%-го раствора; молибдат натрия (Na_2MoO_4 , «ЛенРеактив», Россия) в виде 0.1%-го раствора; гидрохинон, ($C_6H_6O_2$, Sigma-Aldrich, США), очищенный экстракцией из диэтилового эфира согласно работе [26]; перекись водорода (H_2O_2 , Merck, Германия) в виде 35%-го раствора; уксусная кислота (CH_3COOH , «ЛенРеактив», Россия) в виде 0.2 M раствора; ацетат натрия (CH_3COONa , «ЛенРеактив», Россия) в виде 0.2 M раствора; натрий-ацетатный буфер (pH 5.4) в концентрации 0.05 M. Пероксидаза хрена была выделена из корней хрена экстракцией водой с последующей фильтрацией с помощью ионообменной хроматографии и диализа согласно работе [27].

Приборы. Текущую концентрацию водных растворов регистрировали на UV-VIS-спектрофотометре BUOLAMBDA-45 (Perkin Elmer, США) при температуре 23°C. Использовали кварцевые кюветы объемом 3.0 мл и длиной оптического пути 1 см.

Определение концентрации перекиси водорода. Определение концентрации H_2O_2 в растворе выполняли йодометрическим методом [28].

Определение концентрации гидрохинона. Концентрацию гидрохинона в растворах определяли спектрофотометрически по калибровочной прямой, построенной по поглощению при $\lambda = 289$ нм и определенному в ходе исследования коэффициенту экстинкции $\epsilon = 2691 \pm 43 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Проведение предварительных реакций между компонентами системы. Возможность протекания реакции между гидрохиноном и *N*-ФМГ проверяли при молярных соотношениях гидрохинон : *N*-ФМГ = 1 : 1; 1 : 3 и 3 : 1; исходные концентрации: гидрохинон — 0.15 мМ и *N*-ФМГ — 0.167 мМ. Возможность протекания реакции между гидрохиноном и H_2O_2 проверяли при молярных соотношениях гидрохинон : H_2O_2 = 1 : 1; 1 : 2 и 2 : 1; исходные концентрации: гидрохинон — 0.336 мМ и H_2O_2 — 0.318 мМ. Реакцию в тройной системе гидрохинон : *N*-ФМГ : H_2O_2 проводили при мольном соотношении реагентов 1 : 1 : 1. Исходные

концентрации растворов: гидрохинон — 0.336 мМ, *N*-ФМГ — 0.331 мМ и H_2O_2 — 0.318 мМ. Для каждой реакции регистрировали изменение электронных спектров гидрохинона во времени.

Определение активности фермента и величины константы ингибирования. Концентрацию пероксидазы определяли спектрофотометрически по поглощению при 403 нм ($\epsilon = 102 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [29]. За единицу активности ПХ принимали его количество, окисляющее 1 мкМ гидрохинона за 1 мин. Удельная активность составляла 110 ед/мг (мкМ окисленного субстрата в 1 мин на 1 мг белка). Значение *RZ* определяли как отношение поглощения при $\lambda = 403$ нм к поглощению при $\lambda = 275$ нм. Спектральный показатель чистоты *RZ* = 2. Каталитическую активность фермента ПХ определяли на основании контроля концентрации гидрохинона. Реакцию окисления гидрохинона на ферменте в присутствии H_2O_2 проводили при 23°C в 0.05 M натрий-ацетатном буфере, pH 5.4. Концентрации используемых веществ: гидрохинон — 0.05÷0.4 мМ; H_2O_2 — 0.64 мМ; ПХ — 15 нМ. Ингибирование пероксидазного окисления гидрохинона изучали путем добавления ингибитора *N*-ФМГ (в концентрации 0÷0.5 мМ) в кювету вместе со всеми компонентами системы.

В работе использовали методику Михаэлиса—Ментен. На первом этапе получали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации гидрохинона и определяли I_{50} — концентрацию ингибитора, при которой скорость ферментативной реакции составляет 50% от скорости в отсутствие ингибитора. На втором этапе проводили эксперименты при постоянной концентрации H_2O_2 и изменяющейся концентрации гидрохинона.

Значения константы ингибирования активности фермента K_i рассчитывали по формуле [30]:

$$K_i = \frac{I_{50} \cdot K_m}{\frac{S}{v} - K_m},$$

где K_i — константа ингибирования, I_{50} — концентрация пестицида ингибитора, K_m — полученные значения константы Михаэлиса для гидрохинона, v — скорость в конкретный момент времени, S — концентрация гидрохинона, V — максимальная скорость, взята из графика Лайнуивера—Бэрка.

Все эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистический разброс данных не превышал 3%.

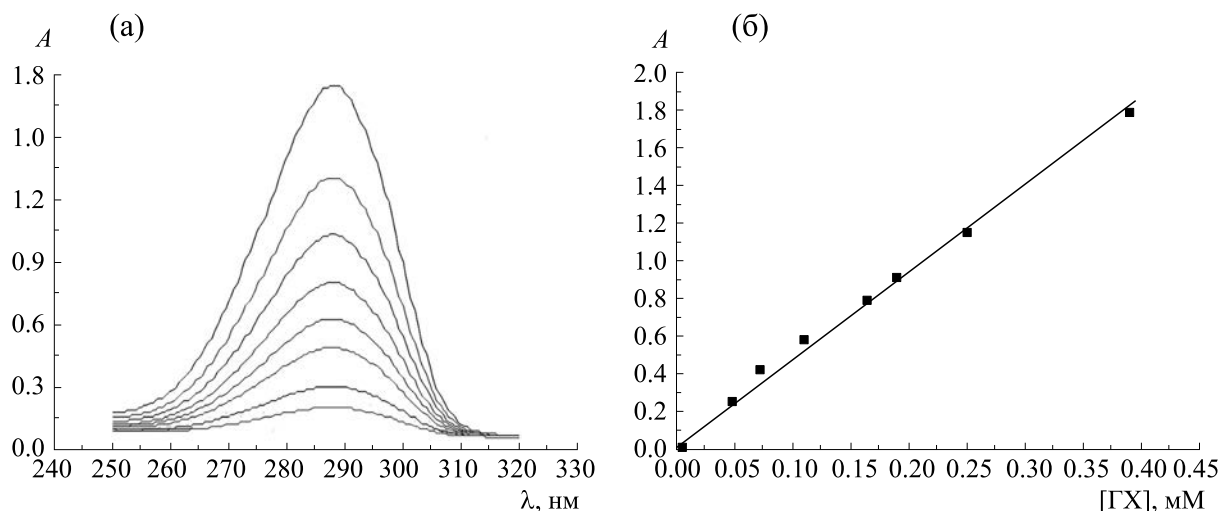


Рис. 1. (а) — Электронные спектры водных растворов гидрохинона в различных концентрациях (0.39 ± 0.048 мМ), (б) — график зависимости оптической плотности растворов гидрохинона от концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено исследование кинетики и механизма ингибирования активности ПХ действующим веществом раундапа — *N*-ФМГ. За ходом реакции окисления гидрохинона пероксидом водорода наблюдали по уменьшению оптической плотности гидрохинона (рис. 1а).

По линейной зависимости оптической плотности раствора гидрохинона от концентрации свежеприготовленного раствора (рис. 1б) определен коэффициент экстинкции $\epsilon = 2691 \pm 43 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Это значение использовано в дальнейшем для расчета кинетических параметров реакции окисления гидрохинона.

Изучали кинетику реакций «гидрохинон + раундап», «гидрохинон + перекись водорода», «гидрохинон + раундап + перекись водорода». Исследуемая система является многокомпонентной, содержащей ПХ, *N*-ФМГ, H_2O_2 и гидрохинон. В ней гидрохинон — активнейший восстановитель, а H_2O_2 — сильнейший окислитель. Поэтому необходимо установить, являются ли компоненты системы инертными друг к другу, в частности, не происходит ли фонового окисления гидрохинона без участия ПХ. Полученные результаты представлены на рис. 2 (кривые 1–3).

Как видно из рис. 2 (кривая 3), концентрация гидрохинона в смесях остается неизменной от 40 мин до полутора часов для всех проверенных соотношений гидрохинон : *N*-ФМГ. Концентрация гидрохинона в смесях гидрохинон : H_2O_2 (рис. 2, кривая 1) остается неизменной от 25 мин наблюдения, также при трех исследованных соотношении компонентов. Это означает, что реакционные взаимодействия между гидрохиноном и

N-ФМГ, а также между гидрохиноном и H_2O_2 в диапазоне исследованных нами концентраций отсутствуют, т.е. не наблюдается параллельная реакция окисления гидрохинона, обусловленная наличием в системе H_2O_2 и/или растворенного кислорода. Это позволяет не учитывать спонтанное окисление гидрохинона в дальнейших экспериментах.

В тройной системе гидрохинон : *N*-ФМГ : H_2O_2 концентрация гидрохинона остается неизменной в течение 25 мин (рис. 2, кривая 2). Таким образом, компоненты исследуемой реакционной системы (гидрохинон, *N*-ФМГ и H_2O_2) являются инертными по отношению друг к другу.

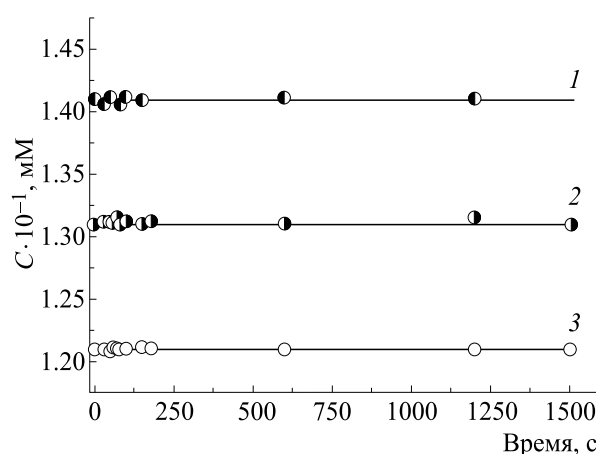


Рис. 2. Динамика изменения концентрации гидрохинона в присутствии компонентов реакционной системы: 1 — H_2O_2 (гидрохинон : $\text{H}_2\text{O}_2 = 1 : 1$); 2 — H_2O_2 и *N*-ФМГ (гидрохинон : H_2O_2 : *N*-ФМГ = 1 : 1 : 1); 3 — *N*-ФМГ (гидрохинон : *N*-ФМГ = 1 : 3).

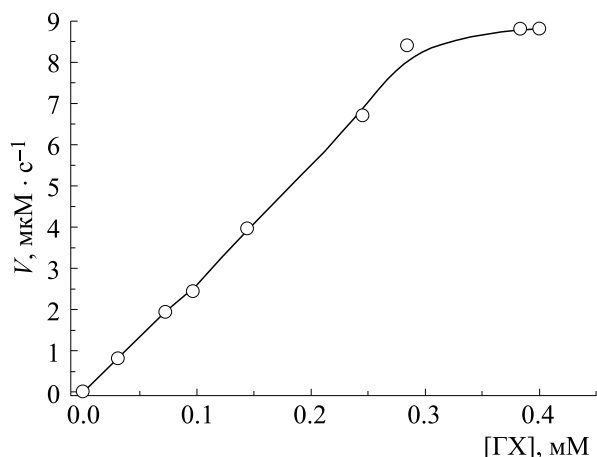


Рис. 3. Скорость окисления гидрохинона ($0.05 \div 0.4$ mM) на ферменте ПХ (15 нМ) в присутствии 0.64 mM H_2O_2 . Среда — 0.05 M Na-ацетатный буфер, pH 5.4.

Кинетика окисления гидрохинона на пероксидазе хрена. Известно, что гидрохинон относится к группе быстро окисляемых субстратов ПХ [31]. Кинетика пероксидазного окисления гидрохинона подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментен. На рис. 3 приведена экспериментальная кинетическая кривая скорости реакции фермента ПХ от концентрации субстрата — гидрохинона — при постоянной концентрации H_2O_2 . Из нее следует, что константа Михаэлиса $K_m = 0.1776$ mM.

Влияние N -ФМГ на активность ПХ иллюстрирует рис. 4. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления гидрохинона в присутствии различных концентраций N -ФМГ строятся в координатах Лайнуивера—Берка. Полученные результаты показывают прямую зависимость снижения скорости ферментативной реакции от концентрации N -ФМГ. Величина концентрации N -ФМГ, приводящая к падению скорости ферментативной реакции в два раза (I_{50}), составляет 0.302 mM.

Как видно из рис. 5, зависимость изменения скорости реакции от концентрации гидрохинона в двойных обратных координатах (координаты Лайнуивера—Берка) носит линейный характер и демонстрирует конкурентный тип ингибирования по донору электронов — гидрохинону. Значения кажущихся констант Михаэлиса составляют $K'_m = 0.883$ mM и $K'_m = 0.552$ mM при концентрациях субстрата 0.398 mM и 0.31 mM соответственно. Максимальная скорость ферментативной реакции составила $V = 0.5$ $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$.

Следовательно, N -ФМГ блокирует фермент, связываясь с некими активными группами молекул или аминокислотными остатками, вероятно:

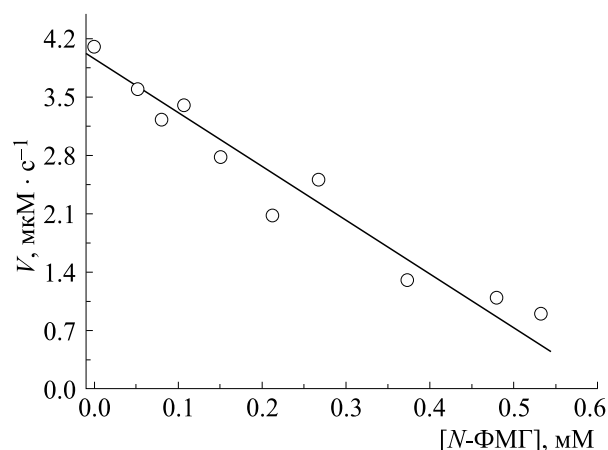


Рис. 4. Зависимость скорости окисления гидрохинона ($0.05 \div 0.4$ mM) на ферменте ПХ (15 нМ) в присутствии 0.64 mM H_2O_2 от концентрации ингибитора N -ФМГ ($0.05 \div 0.53$ mM). Среда — 0.05 M Na-ацетатный буфер, pH 5.4.

SH , NO^- , COO^- , находящимися внутри активного центра фермента.

Экспериментальные кинетические параметры ферментативного процесса приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что с увеличением концентрации гидрохинона происходит возрастание величины K'_m . Значения K_i рассчитывали по уравнению [30]. Полученное значение константы ингибирования $K_i = 0.1004$ mM.

Механизм ингибирования активности пероксидазы хрена N -фосфонометил-глицином. Известно,

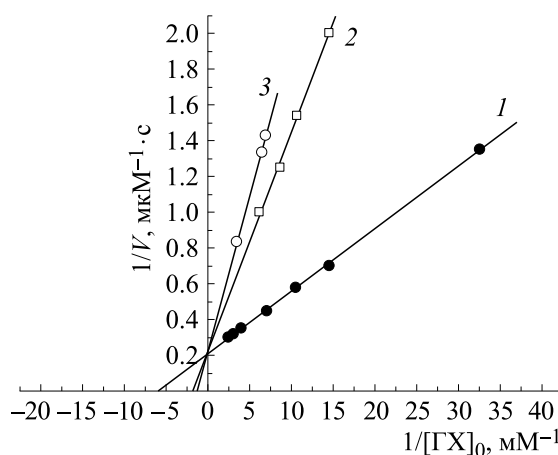


Рис. 5. Зависимость обратной скорости ферментативной реакции от обратной концентрации ингибитора N -ФМГ (координаты Лайнуивера—Берка): 1 — без ингибитора, 2 — в присутствии 0.31 mM N -ФМГ, 3 — в присутствии 0.398 mM N -ФМГ. Концентрации реагентов: ПХ — 20 нМ, H_2O_2 — 0.62 mM, гидрохинон — $0.07 \div 0.285$ mM, среда — 0.05 M Na-ацетатный буфер, pH 5.4.

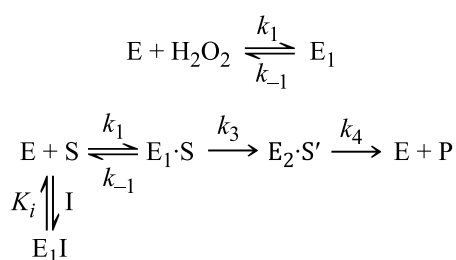
Таблица 1. Кинетические параметры пероксидазной реакции

Система	Кинетический параметр			
	I50, mM	K_m , mM	K_m' , mM	V , мкМ · с ⁻¹
Гидрохинон + H ₂ O ₂ + ПХ	—	0.1776		5.00
Гидрохинон + H ₂ O ₂ + ПХ + + <i>N</i> -ФМГ (<i>S</i> = 0.398 мМ)	0.302		0.883	5.00
Гидрохинон + H ₂ O ₂ + ПХ + + <i>N</i> -ФМГ (<i>S</i> = 0.31 мМ)	0.302		0.552	5.00

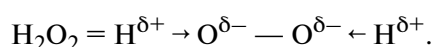
что *N*-ФМГ представляет собой аналог аминокислоты глицина. В растениях *N*-ФМГ блокирует работу ВПС-синтазы, тем самым угнетается синтез ароматических аминокислот, белка, хлорофилла, в результате чего растения погибают [32].

Кроме того, было показано [23], что *N*-ФМГ ингибирует активность НАДН-оксидоредуктазы. Это приводит к угнетению окислительно-восстановительных процессов как в растениях, так и в живых организмах. При этом *N*-ФМГ достаточно легко образует комплексы с металлами вида $M(N\text{-ФМГ})_2$ [33]. В результате повышается токсичность гербицида и меняется место связывания в активном центре. Ингибитор связывается в непосредственной близости к $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ -кластеру активного центра НАДН-оксидоредуктазы [23]. Можно предположить, что и в ПХ ингибитор ориентируется на ион железа в составе гема активного центра.

Полученные результаты показали, что *N*-ФМГ инактивирует ПХ. Механизм ингибирования ПХ является весьма сложным и может включать несколько стадий. Конкурентное ингибирование *N*-ФМГ пероксидазного окисления гидрохинона, по-видимому, протекает по классической схеме 1.

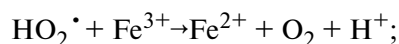
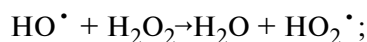
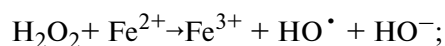


Работа ПХ происходит исключительно в присутствии H₂O₂, приводящей фермент в активированное состояние (E₁). В молекуле пероксида водорода электронная плотность смещена в сторону атомов кислорода [34]:



Реакция разложения пероксида водорода в присутствии катализаторов часто протекает по

радикально-цепному механизму, при этом роль катализатора заключается в иницировании свободных радикалов [34, 35]. Если кроме водного раствора H₂O₂ присутствует Fe²⁺, тогда в системе идет реакция переноса электрона с иона Fe²⁺ на молекулу H₂O₂ с образованием иона Fe³⁺ и очень неустойчивого анион-радикала $[\text{H}_2\text{O}_2]^\bullet$, который сразу же распадается на анион HO⁻ и свободный гидроксильный радикал HO[•]. Радикал HO[•] очень активен, реализуя разнообразные реакции с органическими соединениями, в том числе окисления ароматических соединений. В отсутствие же подходящих реагентов HO[•] реагирует с H₂O₂ с образованием менее активного радикала HO₂[•], который способен восстанавливать ионы Fe³⁺, что замыкает каталитический цикл:



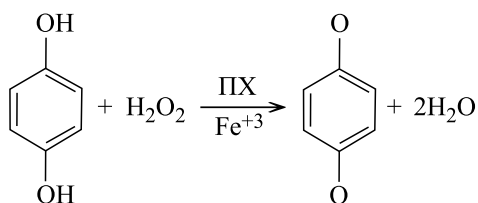
ПХ относится к двухкомпонентным ферментам, в ее состав входят гемин, представленный протопорфирином IX в комплексе с Fe³⁺, и полипептидная цепь [35, 36]. Пропионовокислые остатки протопорфирина направлены к поверхности, а винильные группы — во внутреннюю часть белка [37, 38]. Планарная структура гемина фиксируется внутри белка за счет π-электронных взаимодействий пропионовокислых остатков пиррольных колец протопорфирина с аминокислотными остатками: тирозина (Tyr), фенилаланина (Phe), триптофана (Trp), гистидина (His) и метионина (Met) [39]. Известно, что Phe-41 локализован между остатками дистальных His-40 и His-42. Последний координирует атом железа гемина в активном центре ПХ. При этом остаток Phe-143 расположен в проксимальной области гемина вблизи входа в полость, связывающую гем и совместно с Phe-142, формирует протяженный гид-

рофобный участок активного центра ПХ, связывающий субстрат [40].

Активный центр ПХ представлен Arg-38, Phe-41 и His-42; а Phe-142 и Phe-143 формируют канал доступа ароматических субстратов к активному центру [41,42]. Активную роль в каталитическом процессе пероксидазного окисления субстратов принимает ион Fe^{3+} , находящийся в координации с четырьмя атомами азотов пирролов протопорфирина, проксимальным лигандом которого является остаток имидазола гистидина белка His-170. В процессе восстановления перекиси водорода участвуют His-42 и Arg-38, расположенные в спирали В [41, 43, 44].

Причины широкой субстратной специфичности пероксидазы объясняются тем, что на поверхности белка реализуются несколько различных каналов электронного транспорта с субстратов, контактирующих с поверхностью белковой глобулы, на железо гема [45]. Ингибиторы пероксидаз — ионы, образующие прочные комплексы с катионом железа [35]. В восстановлении фермента участвуют соединения, являющиеся донорами водорода и донорами электронов.

В исследуемой реакции в активном центре в отсутствие ингибитора Fe^{3+} гем смещает в свою сторону электронную плотность донора электронов — перекиси водорода, возможно, через посредство аминокислотных остатков His-42 и(или) Arg-38. H_2O_2 претерпевает ряд превращений с образованием ионов и радикалов. Фермент переходит в окисленную форму (E_1). Гидрохинон, как сильнейший восстановитель, также входит в координацию с Fe^{+3} , который оттягивает на себя электронную плотность кислорода, что приводит к дегидрированию гидрохинона. При этом гидрохинон отдает два H^+ , а H_2O_2 принимает их на себя. Возникают две параллельные цепи: переноса e^- и переноса H^+ . Отдав e^- и H^+ реагенты, системы «расходятся» с образованием продуктов реакции: 1,4-бензохинона и воды:



Однако этого не происходит в присутствии ингибитора. В данном исследовании показано, что ингибитор *N*-ФМГ не взаимодействует ни с гидрохиноном, ни с H_2O_2 . Кроме того, он конкурирует с гидрохиноном за место связывания в активном центре. Очевидно, что *N*-ФМГ обладает значительной электронной плотностью за счет неподеленной электронной пары на двойной свя-

зи — $\text{P}=\text{O}$ и смещенной в сторону кислорода электронной плотности двух гидроксильных групп. Он атакует железо гема. Это кажется весьма вероятным, так как высокая комплексообразующая способность пестицидов с металлами, в частности с железом, была показана ранее [33]. В этом случае две группы HO^- в сочетании с двойной связью на кислороде при фосфорном конце молекулы *N*-ФМГ, имеют столь же значительную избыточную электронную плотность, что и H_2O_2 . Фосфорный остаток *N*-ФМГ способен к донированию двух H^+ . Аминокислотные группы, которые входят в активный центр ПХ (His-42, Phe-41, Arg-38), своими карбоксильными остатками могут достаточно легко вступить в реакцию с карбоксильным остатком *N*-ФМГ. Такое взаимодействие приведет к образованию прочной ковалентной связи между ферментом и ингибитором. Гипотетическая схема такого варианта ингибирования активности фермента представлена на рис. 6.

Прерываются цепь переноса электронов и цепь переноса протона. Фермент полностью дезактивирован: *N*-ФМГ препятствует вхождению гидрохинона в активный центр, связыванию, превращению и образованию продуктов реакции.

Снижение активности ПХ под действием *N*-ФМГ свидетельствует о снижении регулирования окислительно-восстановительных процессов и может приводить к накоплению перекиси водорода и усилению свободнорадикальных процессов в клетках. Полученные нами в настоящей работе данные расширяют круг знаний о тех ферментах, деятельность которых в растении или живом организме ингибирует гербицид раундап.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что гидрохинон в условиях проведения исследования (23°C ; 1.5 ч наблюдения; при соотношениях реагентов гидрохинон : *N*-ФМГ = 1 : 1; 1 : 3; 3 : 1; гидрохинон : H_2O_2 = 1 : 1; 1 : 2; 2 : 1; гидрохинон : *N*-ФМГ : H_2O_2 = 1 : 1 : 1) не вступает во взаимодействие ни с H_2O_2 , ни с *N*-фосфометил-глицином (глифосатом) — действующим веществом гербицида раундап.

2. Впервые показано, что *N*-фосфометил-глицин ингибирует пероксидазу из корней хрена. Данный результат является серьезным дополнением к имеющимся литературным данным о мишенях, на которые направлено действие гербицида раундап.

3. Определена константа Михаэлиса (K_m = 0.1776 мМ) и величина концентрации *N*-ФМГ, приводящая к падению скорости ферментативной реакции в два раза (I_{50} = 0.302 мМ). Установлено, что *N*-ФМГ ингибирует пероксидазу по

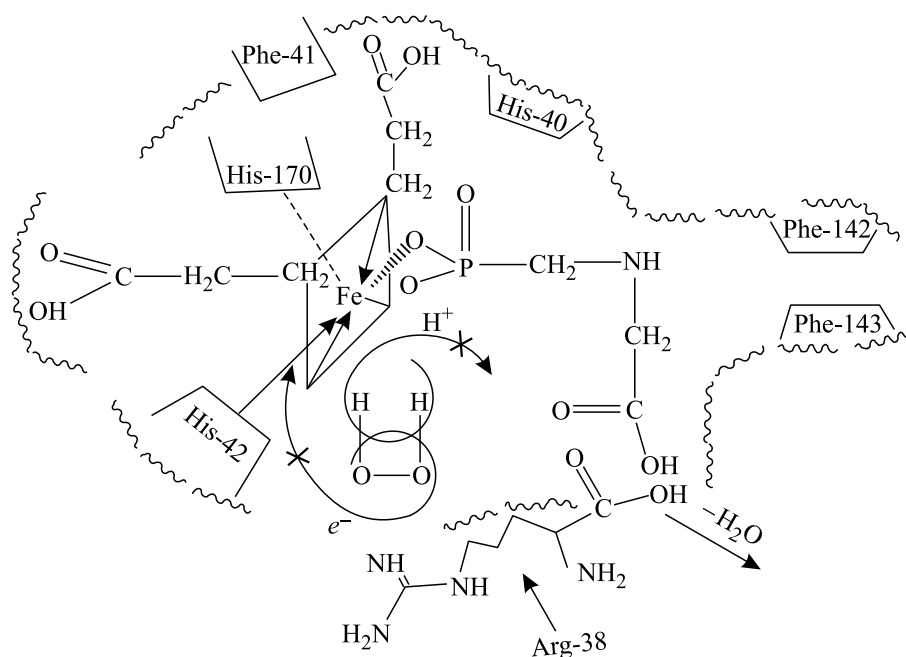


Рис. 6. Гипотетическая схема ингибирования активности P450-NADH.

конкурентному типу. Значение K_i составляет 0.1004 мМ.

4. Полученные результаты доказывают, что гербицид раундап блокирует работу антиоксидантной системы, что в теплокровных организмах может стать причиной накопления свободных радикалов и онкологических перерождений тканей и органов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в соответствии с темами Государственного задания № 0089-2019-0014 (№ государственной регистрации АААА-А19-119071890015-6) и № 0089-2019-0004 (№ государственной регистрации АААА-А19-119071190045-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. А. Головлёва и З. И. Филькенштейн, *Агрохимия*, № 3, 105 (1984).
2. С. А. Остроумов, *Введение в биохимическую экологию* (Изд-во МГУ, М., 1986).
3. Г. В. Меренюк, А. С. Усатая, Е. Е. Емнова и др., *Гигиена и санитария*, № 5, 20 (1987).
4. В. В. Курдюков, *Последствие пестицидов на растительные и животные организмы* (Колос, М., 1982).
5. А. В. Яблоков, *Ядовитая приправа. Проблемы применения ядохимикатов и пути экологизации сельского хозяйства* (Мысль, М., 1990).
6. И. В. Перминова, в сб. *Биотехнология: состояние и перспективы развития*, под ред. П. Д. Саркисова и М. П. Кирпичникова (ПИК Максима, М., 2003), с. 11.
7. В. Н. Давидчик, О. В. Королёва, Е. В. Степанова и др., в сб. *Биотехнология: состояние и перспективы развития*, под ред. П. Д. Саркисова и М. П. Кирпичникова (Максима, М., 2003), с. 59.
8. Л. А. Юданова, *Пестициды в окружающей среде* (ГПНТБ СО АН СССР, Новосибирск, 1989).
9. Ch. M. Benbrook, *Environ. Sci. Eur.*, **28** (1), 3 (2016).
10. Е. М. Кузнецова и В. Д. Чмиль, *Современные проблемы токсикологии*, № 1, 87 (2010).
11. Д. Грин и Р. Гольдбергер, *Молекулярные аспекты жизни* (Мир, М., 1968).
12. V. Tzin, G. Galili, and A. Aharoni, In *eLS* (John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2012). DOI: 10.1002/9780470015902.a0001315.pub2
13. *Saccharomyces Genome Database — S. cerevisiae Pathway: chorismate biosynthesis*: <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=ALL-CHORISMATE-PWY-1>. Дата обращения: 30.12.2022.

14. Q. K. Huynh, G. M. Kishore, and G. S. Bild, *J. Biol. Chem.*, **263** (2), 735 (1988).
15. E. Schönbrunn, S. Eschenburg, W. A. Shuttleworth, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1376 (2001).
16. W. Du, N. G. Wallis, and D. J. Payne, *J. Enzyme Inhib.*, **15** (6), 571 (2000).
17. R. J. Ganson, R. A. Jensen., *Arch. Biochem. Biophys.*, **260** (1), 85 (1988).
18. N. E. De Long and A. C. Holloway, *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **10**, 101 (2017).
19. K. Z. Guyton, D. Loomis, Ya. Grosse, et al., *Lancet*, **16** (5), 490 (2015). DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8
20. D. Cressey, *Nature* (2015). DOI: 10.1038/nature.2015.17181
21. *IARC Monographs, V. 112: Evaluation of Five Organophosphate Insecticides and Herbicides* (International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 20 March 2015).
22. Е. А. Саратовских, М. В. Личина, Б. Л. Психа и др., *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 9, 1984 (1989).
23. Е. А. Саратовских, Л. А. Коршунова, Р. И. Гвоздев и др., *Изв. АН. Сер. хим.*, № 5, 1284 (2005).
24. J. K. Chang and C. L. Foy, *Biochem. Physiol.*, **18** (2), 141 (1982).
25. Н. Н. Мельников, *Пестициды. Химия, технология и применение* (Химия, М., 1987).
26. Т. П. Позднякова, *Методы выделения и очистки органических соединений* (НТИ МГУДТ, Новосибирск, 2008).
27. K. G. Paul, *The Enzymes* (Acad. Press, N-Y., 1963).
28. Т. А. Большова, Г. Д. Брыкина, А. В. Гармаш и др., *Основы аналитической химии* (Акад., М., 2012).
29. S. Ogawa, Y. Shira, and I. Morishima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90** (2), 674 (1979).
30. М. Диксон и Э. Уэбб, *Ферменты* (Мир, М., 1982).
31. Г. С. Захарова, И. В. Упоров и В. И. Тишков, *Усп. биол. химии*, **51**, 37 (2011)
32. О. С. Медведев, *Комбикорма*, **4**, 61 (2017).
33. Е. А. Саратовских, *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 10, 2327 (1989).
34. Л. И. Мухортова, Ю. Т. Ефимов, И. В. Глушков и др., *Химия и технология пероксида водорода* (Чуваш. ун-т, Чебоксары, 2020).
35. Г. Эйхгорн, *Неорганическая биохимия* (Мир, М., 1978).
36. K. G. Welinder, L. B. Smillie, and G. R. Schonhaum, *Canad. J. Biochem.*, **50** (1), 44 (1972).
37. Н. Н. Угарова, О. В. Лебедева и А. П. Савицкий, *Пероксидазный катализ и его применение* (МГУ, М., 1981).
38. А. П. Савицкий, Н. Н. Угарова и И. В. Березин, *Биоорган. химия*, **3** (9), 1242 (1977).
39. R. K. DiNello and D. H. Dolphin, *J. Biol. Chem.*, **56** (13), 6903 (1981).
40. K. G. Welinder, *Eur. J. Biochem.*, **151**, 497 (1985).
41. Т. Н. Аммосова, И. В. Упоров, М. Ю. Рубцова и др., *Биохимия*, **62** (4), 516 (1997).
42. M. Gajhede, P. Osmark, F. M. Poulsen, et al., *Nature Struct. Biol.*, **3**, 1040 (1996).
43. D. J. Schuller, N. Ban, R. B. van Huystee, et al., *Structure*, **4**, 311 (1996).
44. И. Г. Газарян, И. В. Упоров, Т. А. Чубарь и др., *Биохимия*, **63** (5), 708 (1998).
45. N. N. Ugarova, G. D. Kutuzova, V. V. Rogozhin, et al., *Bioch. Biophys. Acta*, **790** (1), 22 (1984). DOI: 10.1016/0167-4838(84)90327-3

Kinetics and Mechanism of Inhibition of Horseradish Peroxidase Activity by *N*-Phosphonomethyl-Glycine

L.V. Avdeeva*, Ya.V. Vakhterova**, and E.A. Saratovskikh*

*Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. N.N. Semenova 5, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

**Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/51, Moscow, 119912 Russia

The inhibition of horseradish peroxidase activity by *N*-phosphonomethyl-glycine, an active ingredient in the most extensively used glyphosate-based herbicide (Roundup) in agricultural applications worldwide, was investigated. It has been shown that *N*-phosphonomethyl-glycine inhibits the activity of peroxidase from horseradish roots. This inhibition is of a competitive nature, the value of $K_i = 0.1004$ mM. The Michaelis constant ($K_m = 0.1776$ mM) and herbicide concentration (I_{50} of Roundup = 0.302 mM) were determined. The results demonstrate that *N*-phosphonomethyl-glycine can suppress the activity of the antioxidant system, and in warm-blooded organisms it may cause the accumulation of free radicals, thereby contributing to expanding knowledge of biological targets Roundup is applied to.

Keywords: Roundup (glyphosate), horseradish peroxidase, enzyme inhibition

ОРГАНИЧЕСКИЙ ОСМОЛИТ БЕТАИН ЭФФЕКТИВНО НЕЙТРАЛИЗУЕТ ВРЕДНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИКЛОФЕНАКА НА СТРУКТУРУ И СТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА

© 2023 г. М. Башируддин*, Н. Ахмед*, Х. Алам Хан*, Ш. Джамал*, #

*Школа наук о жизни Института науки и техники имени Б.С. Абдур Рахмана (Институт Полумесяца), Вандакур, Ченнаи, Тамил-Наду, 600048, Индия

#E-mail: shazja.sls@crenscent.education

Поступила в редакцию 28.01.2022 г.

После доработки 16.02.2022 г.

Принята к публикации 09.11.2022 г.

Понимание физико-химических основ взаимодействия фармакофоров с белками необходимо для выработки стратегии синтеза лекарств направленного действия. В данном исследовании исследовались эффекты нестероидного противовоспалительного средства диклофенака натрия на стабильность и структуру бычьей панкреатической РНКазы А, взятой в качестве модельного фермента, методами тепловой денатурации, кругового дихроизма, собственной флуоресценции и докинга. Поскольку взаимодействие с белком — это важный фармакокинетический параметр вещества, было важно изучить эффект диклофенака натрия на структуру и стабильность белка. При оценке термодинамических параметров наблюдалась дестабилизация РНКазы А в присутствии диклофенака натрия согласно значениям средней точки тепловой денатурации и изменения свободной энергии Гиббса при 25°C, в то время как добавление осмолитов стабилизировало белок. В присутствии диклофенака натрия и осмолита наблюдалось изменение в третичной, но не во вторичной структуре белка. Исследование флуоресценции показало снижение интенсивности, подтверждающее эффект тушения флуоресценции РНКазы А диклофенаком натрия и осмолитами. Метод молекулярного докинга позволил показать участие водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий в связывании РНКазы А с диклофенаком натрия. Активность фермента РНКазы А снижается в присутствии диклофенака натрия, в то же самое время осмолит позволяет восстановить активность, повышая значение константы катализа и снижая величину константы Михаэлиса. Это исследование позволяет создать платформу для применения комбинированной терапии диклофенаком натрия и осмолитами, чтобы уменьшить вредное побочное воздействие диклофенака натрия.

Ключевые слова: РНКазы А; тепловая денатурация; осмолиты; диклофенак.

DOI: 10.31857/S0006302923030043, EDN: FQGCXE

Взаимодействие «лекарство—белок» — важный фармакокинетический параметр лекарства. Показано, что связывание лекарств с различными белками имеет существенное влияние на фармакокинетику веществ, в частности, на скорость метаболизма и почечный клиренс. Для разных лекарств, в частности, для нестероидных противовоспалительных средств показано обратимое связывание с белками плазмы [1]. Подобно другим нестероидным противовоспалительным

средствам, для диклофенака натрия (ДКФ) показано взаимодействие с альбумином и другими белками сыворотки [2]. РНКазы А — это хорошо охарактеризованный глобулярный мономерный белок (длина 124 аминокислотных остатка, молекулярная масса 14.3 кДа) с шестью остатками тирозина и четырьмя присутствующими в норме дисульфидными связями, обеспечивающими стабильность структуры [3]. Вследствие своей стабильной природы РНКазы А широко используется в различных исследованиях стабильности и сворачивания белков [4]. Осмолиты — это низкомолекулярные органические молекулы, для которых показано накопление *in vivo* в ответ на стрессовые условия окружающей среды [5]. Такие осмолиты, как бетаин, полиолы, сахара и полиамины накапливаются в растительных и жи-

Сокращения: ДКФ — диклофенак натрия, T_m — средняя точка тепловой денатурации, ΔG_D° — изменение свободной энергии Гиббса при 25°C, ΔC_p — изменение теплоемкости при постоянном давлении, КД — круговой дихроизм, УФ — ультрафиолетовый, K_m — константа Михаэлиса, k_{cat} — константа катализа.

вотных тканях во время осмотического стресса [6]. Эти осмолиты увеличивают термодинамическую стабильность макромолекул без негативного действия на их нативную функциональную активность [7]. Для них показана способность стабилизировать белки и обращать вспять процессы агрегации и неправильного сворачивания белков [8]. Также они продемонстрировали увеличение стабильности белков путем различных механизмов [9,10]. Действие по типу химического шаперона, характерное для таких осмолитов, как триметиламин-N-оксид и бетаин, используется для облегчения надлежащего сворачивания рекомбинантных белков, в то время как гуанидин гидрохлорид и мочеви́на облегчают ренатурацию и активацию телец включения [5]. В данном исследовании были проанализированы эффекты ДКФ на структурные и функциональные свойства РНКазы А. В дальнейшем будут предприняты попытки выяснить, ослабляют ли осмолиты денатурирующее действие ДКФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Лиофилизированный препарат РНКазы А был приобретен в Sigma Chemical Co (США). Диклофенак, какодиловая кислота, глицин, саркозин, бетаин и диализные трубки также приобретались в Sigma Chemical Co (США). KCl приобретали в компании SRL. Все реактивы были аналитической чистоты и использованы без дальнейшей очистки.

Приготовление белкового раствора. Раствор РНКазы А диализовали против 0.1 М KCl (pH 7.0) при 4°C. Стоковый раствор РНКазы А фильтровали через фильтр 0.45 мкм, его концентрацию определяли экспериментально, принимая молярный коэффициент экстинкции ϵ при 277.5 нм за $9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [11]. Осмолиты готовили на какодилатном буферном растворе, pH 7.0. Все растворы для оптических измерений готовили в дегазированном буферном растворе какодиловой кислоты (50 mM), содержащем 0.1 М KCl. pH измеряли после эксперимента по денатурации, наблюдали незначительное изменение pH (0.00–0.06).

Эксперименты по денатурации. Исследования тепловой денатурации проводили с помощью спектрофотометра V-730 UV/VIS (Jasco, Япония) с Пельтье-термостатом ETCS-761. Все образцы подвергали тепловой денатурации при температуре от 20 до 85°C со скоростью нагрева 1°C/мин, достаточной для уравнивания системы, и регистрировали поглощение при 287 нм. Данные после тепловой денатурации образцов сохраняли, значения поглощения преобразовывали в разностный коэффициент молярной экстинкции $\Delta\epsilon_\lambda$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Все кривые индуцированного на-

гревом перехода строили в осях « $\Delta\epsilon$ — температура». Анализ кривых перехода проводили путем параболической аппроксимации, причем величины средней точки тепловой денатурации (T_m) и H_m определяли по этим графикам согласно ранее описанному методу [12]. Значение изменения теплоемкости при постоянном давлении (ΔC_p , ккал/моль/К) было принято за 1.20 ± 0.05 ккал/моль для РНКазы А [13]. Используя значения T_m и ΔH_m , рассчитывали значения $\Delta G_D(T)$ (ΔG_D для произвольной температуры) по уравнению Гиббса–Гельмгольца [12]. Спектры кругового дихроизма (КД) РНКазы А в ближней и дальней ультрафиолетовой (УФ) областях измеряли на спектрополяриметре J-810 (Jasco, Япония) с термостатом PTC-424S. Для снятия спектров КД в дальней УФ-области использовали длину оптического пути 1 мм, для ближней УФ-области — 10 мм. При каждой длине волны среднее значение эллиптичности ($\text{град}\cdot\text{см}^2\cdot\text{дмоль}^{-1}$) преобразовывали сигналом КД [14]. Растворы 10 мкМ ДКФ и 20 мкМ РНКазы А смешивались с 1 М каждого осмолита.

Исследование собственной флуоресценции. Спектры собственной флуоресценции РНКазы А регистрировали при различных концентрациях ДКФ (от 2 до 10 мкМ) по крайней мере в трех повторностях на флуоресцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, США). В дальнейшем такие же эксперименты проводили в присутствии 0.1–1.0 М каждого из трех осмолитов и 10 мкМ ДКФ. Использовали концентрацию РНКазы А в 20 мкМ. Спектры эмиссии флуоресценции наблюдали, измеряя собственную флуоресценцию в диапазоне от 290 до 400 нм при длине волны возбуждающего света 278 нм. Ширина щели для возбуждения и эмиссии была равна 5 нм.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг проводили с использованием трехмерной структуры РНКазы А (PDB ID: 1FS3) в программе Autodock 4.2. Файл ДКФ получали из базы данных PubChem (PubChem CID: 5018304) в расширении .sdf и переводили в формат PDB с помощью программы OpenBabel. Заряды к атомам лиганда добавляли по схеме Кольмана. неполярные атомы водорода удаляли («сливали» с тяжелыми атомами), определяли количество торсионных степеней свободы. Расчеты докинга проводили на модели белка, преобразованной следующим образом: необходимые атомы водорода, заряды атомов по схеме Кольмана и параметры сольватации добавляли с помощью программы AutoDock Tools. Использовали ячейку $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}$ точек с шагом $0.375 \text{ \AA}$, сгенерированную в программе AutoGrid. Параметры программы

Таблица 1. Термическая денатурация РНКазы А в присутствии осмолитов и ДКФ при pH 7.0

	T_m , °C	ΔG_D° , ккал·моль ⁻¹)
ДКФ (мкМ)		
0.00	63.0	10.41
05.0	61.5	9.84
10.0	60.0	9.26
Глицин (М)		
0.00	63.0	10.41
0.50	63.6	10.75
1.00	64.4	10.81
Саркозин (М)		
0.00	63.0	10.41
0.50	63.8	10.69
1.00	65.1	11.24
Бетаин (М)		
0.00	63.0	10.41
0.50	64.9	11.14
1.00	66.4	11.59
Глицин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	60.0	9.26
0.50	62.8	10.15
1.00	63.9	10.96
Саркозин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	60.0	9.26
0.50	63.4	10.63
1.00	64.1	11.03
Бетаин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	60.0	9.26
0.50	64.1	10.81
1.00	65.6	11.34

Примечание. По трехкратным измерениям значения максимальных погрешностей от средних значений составляют 0.1–0.6 для T_m и 5–9% для ΔG_D° .

Autodock задавали по умолчанию, для расчета ван-дер-ваальсовых и электростатических термов использовали диэлектрические функции, зависящие от расстояния. Конечные изображения полученных при докинге комплексов получали в программе Discovery Studio 2.5 (Accelrys Software Inc., США).

Определение ферментативной активности. Активность РНКазы А измеряли для определения эффекта ДКФ в отсутствие и в присутствии осмолитов (глицина, саркозина и бетаина). Оценивали кинетические параметры – константу Михаэлиса (K_m) и константу катализа (k_{cat}). Субстрат (2',3'-циклический монофосфат) и фермент (РНКазы А) предварительно инкубировали при требуемой концентрации каждого компонента

раствора (ДКФ, глицина, саркозина и бетаина). Гидролиз субстрата РНКазой А в диапазоне концентраций 0.05–0.50 мг·мл⁻¹ отслеживали по изменению поглощения при 292 нм при температуре $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин на спектрофотометре V-730 UV/VIS. Кинетические параметры (K_m и k_{cat}) рассчитывали по уравнению (1) из графиков Михаэлиса–Ментен, где начальная скорость равна v , а концентрация субстрата – $[S]$.

$$v = V_{\max}[S] / (K_m + [S]). \quad (1)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данном исследовании анализировались разрушительные эффекты ДКФ на структуру и стабильность РНКазы А. Тепловую денатурацию РНКазы А проводили в отсутствие и в присутствии различных концентраций ДКФ при pH 7.0. Изменения были представлены в виде $\Delta\epsilon_{287}$ – разностного коэффициента молярной экстинкции как функции температуры. Кривые тепловой денатурации анализировали для определения значений T_m , представленных в табл. 1, где можно видеть, что ДКФ дестабилизировал белки. Поскольку осмолиты способны стабилизировать белки, оценивали их способность противодействовать дестабилизирующему эффекту ДКФ на структуру и стабильность белка. Для анализа действия осмолитов проводили тепловую денатурацию РНКазы А в присутствии различных концентраций осмолита и 10 мкМ ДКФ; было обнаружено, что, согласно значениям T_m (рис. 1), добавление осмолитов ведет к увеличению стабильности белка.

Стабильность белка (ΔG_D°) не определяется только одним показателем T_m , поскольку T_m не является хорошей мерой стабильности белка. Важными параметрами являются также ΔC_p и ΔH_m . Поэтому проводили измерения стабильности белка в контексте ΔG_D° (изменений свободной энергии Гиббса) с помощью ΔC_p (принятой за 1.20 ± 0.05 ккал/моль) и ΔH_m (данные не приведены), результаты представлены в табл. 1. В присутствии ДКФ значение ΔG_D° снижалось при увеличении концентраций ДКФ. Однако это значение в дальнейшем увеличивалось при добавлении осмолитов (рис. 2). Это согласуется с более ранними сообщениями, в которых показывалось, что осмолиты, такие, как сахара, аминокислоты и полиолы, увеличивают ΔG_D° РНКазы А [15, 16].

Для исследования структурных изменений в РНКазе А в отсутствие и в присутствии ДКФ и осмолитов снятие спектров КД проводили в дальней и ближней УФ-областях. КД в дальнем УФ – это метод исследования конформационных изменений в пептидном остове, в то время как КД в

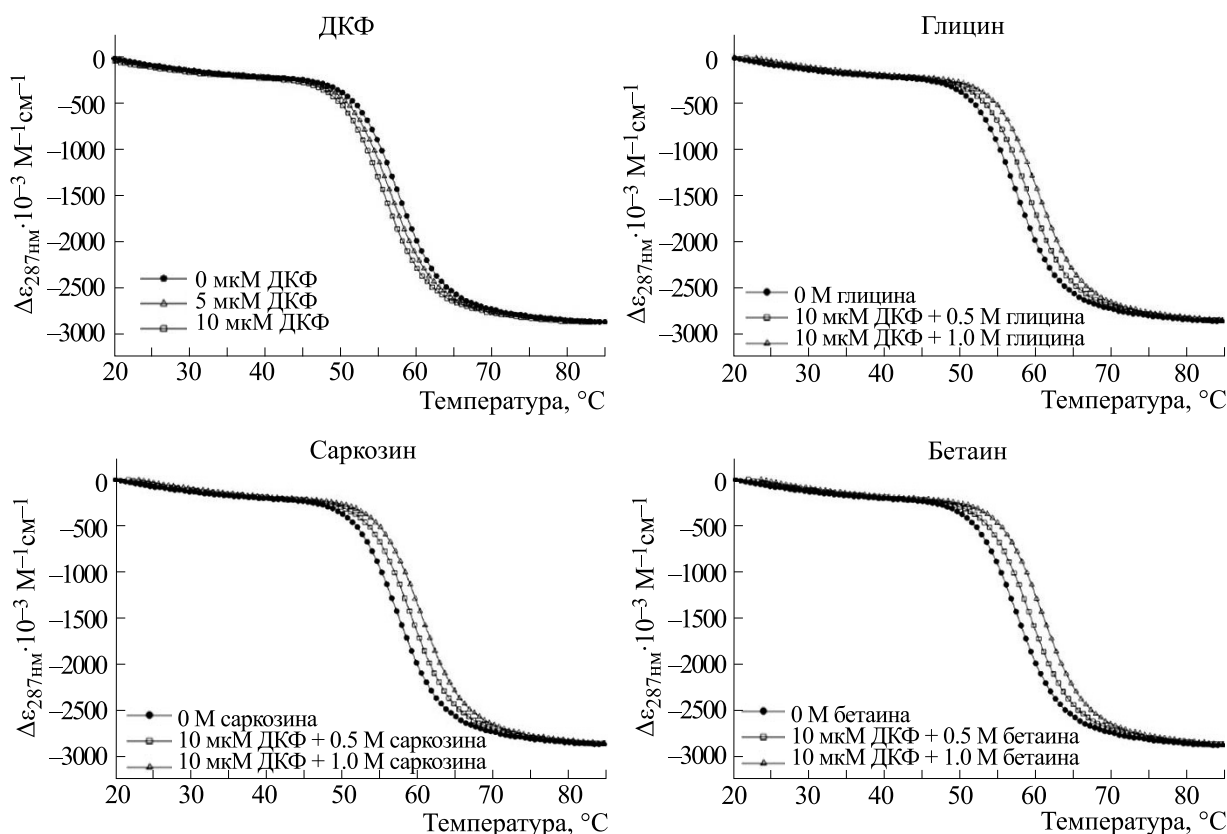


Рис. 1. Характерные профили тепловой денатурации РНКазы А в присутствии разных концентраций ДКФ и осмолитов при pH 7.0.

ближней УФ-области показывает эффект упаковки белка. В конформации остова пептидной цепи изменений (при 222 нм) не было, в то время как в ближней УФ-области наблюдались незначительные изменения КД-спектра после добавления осмолитов (рис. 3).

Тушение флуоресценции вызвано различными молекулярными взаимодействиями, такими, как молекулярные перестройки, реакции в возбужденном состоянии, перенос энергии, статическое и динамическое тушение. Параметр тушения собственной флуоресценции широко используется для изучения механизма взаимодействия белков с лекарствами или лигандами. В данной работе интенсивность эмиссии использовали для анализа взаимодействия между ДКФ и РНКазой А в присутствии различных концентраций осмолитов. Интенсивность эмиссии флуоресценции в диапазоне 290–340 нм после возбуждения светом с длиной волны 278 нм регистрировали при различных концентрациях ДКФ при pH 7.0 (рис. 4). Устойчивое снижение эмиссии флуоресценции наблюдалось с увеличением количества добавленного ДКФ вследствие тушения флуоресценции РНКазы А.

Для идентификации сайта связывания ДКФ в РНКазе А и остатков, участвующих в этом взаимодействии, проводили расчеты молекулярного

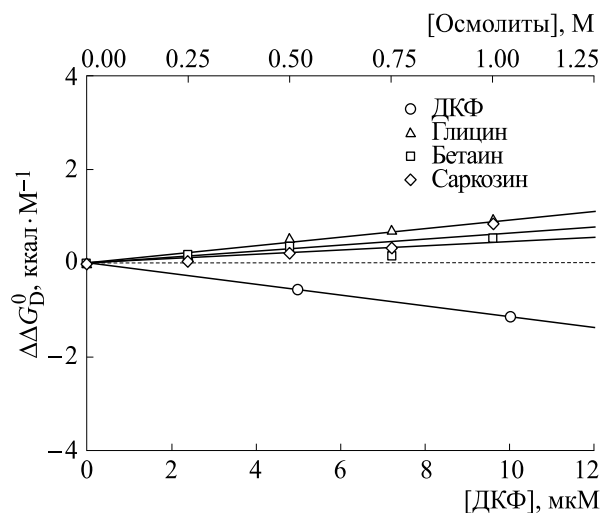


Рис. 2. Графики зависимости $\Delta\Delta G_D^0$ от концентрации осмолита в присутствии глицина (Δ), бетаина ($\square$), саркозина ($\diamond$) и ДКФ ($\circ$).

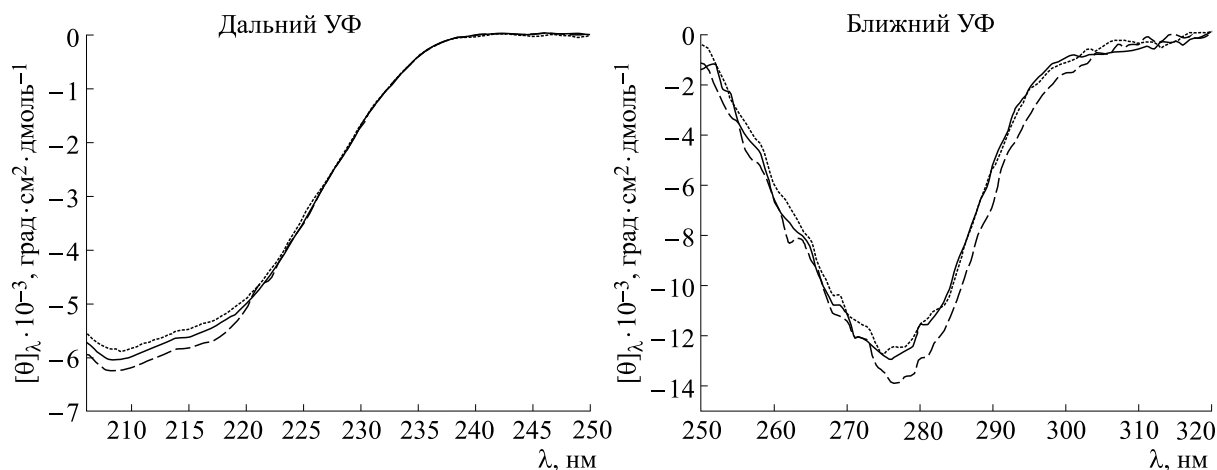


Рис. 3. Изменения вторичной и третичной структуры РНКазы А в присутствии осмолитов (бетаина) и ДКФ при pH 7.0. Символы обозначают РНКазу А (точки), РНКазу А + 10 мкМ ДКФ (пунктир), РНКазу А с 10 мкМ ДКФ и 1М бетаином (сплошная линия) для графиков в ближнем и дальнем УФ. Из осмолитов представлены данные только для бетаина для большей ясности восприятия.

докинга в программе AutoDock 4.2, были получены изображения финальных комплексов после докинга.

Поскольку структура определяет стабильность, стабильность также должна быть отражена в структуре белка. Измерения активности проводили для оценки k_{cat} и K_m РНКазы А при pH 7.0 при 25°C. Сначала эксперименты проводили при разных концентрациях ДКФ. Было обнаружено, что ДКФ увеличивает значения K_m , в то время как значения k_{cat} уменьшались. В отсутствие других растворенных веществ значения кинетических параметров РНКазы А согласуются с данными в более раннем сообщении [16]. В дальнейшем, при добавлении разных осмолитов и 10 мкМ ДКФ, было показано снижение K_m и увеличение k_{cat} .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Было обнаружено, что ДКФ дестабилизирует РНКазу А в дозо-зависимой манере, что может быть видно по снижению значений T_m в табл. 1 и сдвигу кривых денатурации на рис. 1. Предыдущие исследования показали увеличения доли связанной с белком фракции во время взаимодействия ДКФ с альбумином [17]. Также для ДКФ была показана способность связываться с белками плазмы крови и дестабилизировать их [2]. Осмолиты стабилизируют белок и увеличивают значения T_m . Механизм стабилизации осмолитами может быть связан с предпочтительным исключением осмолитов из белковых доменов, в то время как предпочтительное связывание денатурирующего агента вносит вклад в механизм де-

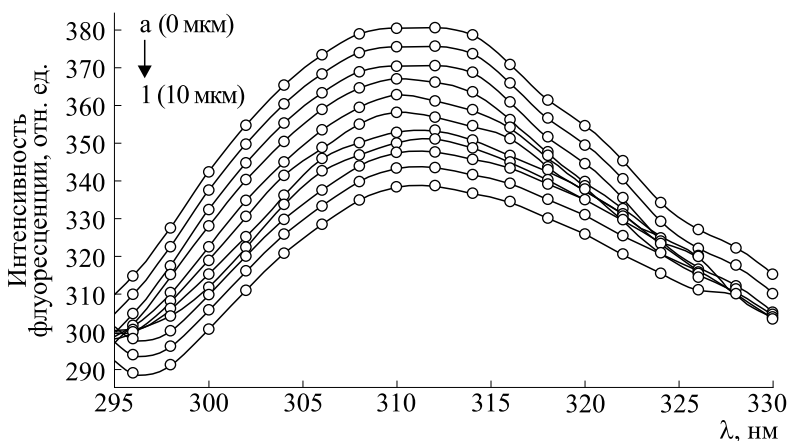


Рис. 4. Тушение флуоресценции РНКазы А, индуцированное ДКФ. Концентрация РНКазы А составляла 20 мкМ. Концентрации ДКФ были в диапазоне от 0 до 10 мкМ с шагом 1 мкМ. Собственную флуоресценцию белка определяли в 0.05 М какодилатном буферном растворе при pH 7.0 и 25°C, длина волны возбуждающего света составляла 278 нм.

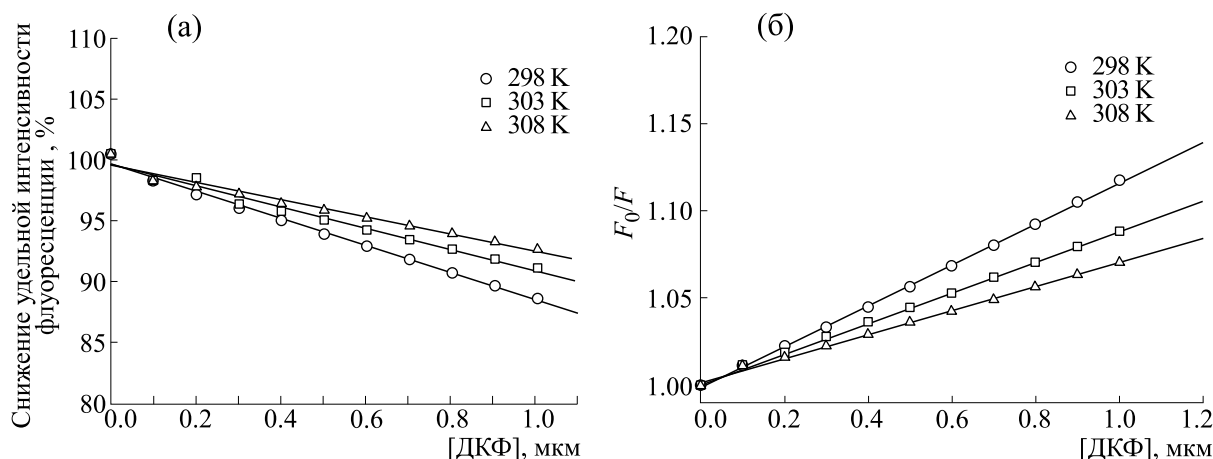


Рис. 5. Индуцированное ДКФ тушение флуоресценции РНКазы А при 298 К (○), 303 К (□) и 310 К (Δ): (а) — снижение удельной интенсивности флуоресценции на длине волны 308 нм, (б) — график Штерна–Фольмера для взаимодействий РНКазы А — ДКФ.

стабилизации [18, 19]. Таким образом, стабилизация или дестабилизация белка зависят от эффектов предпочтительного исключения или предпочтительного связывания [20]. Можно заключить, что снижение T_m белка в присутствии ДКФ обусловлено эффектом предпочтительного связывания, ведущим к дестабилизации белка, в то время как увеличение T_m при добавлении осмолитов вызвано эффектами предпочтительного исключения, в результате приводящими к стабилизации белка. Эффект вещества, сопутствующего белку в растворе, может быть объяснен его эффектом на равновесие денатурации $N \leftrightarrow D$ в нативных условиях, что может быть охарактеризовано параметром ΔG_D° (значение изменения энергии Гиббса (ΔG_D) в отсутствие сопутствующих веществ при 25°C). Эта энергия позволяет предсказать большую предпочтительность взаимодействия полярных групп остова полипептидной цепи с полярными группами осмолитов по сравнению с взаимодействиями остова с неполярными группами осмолитов [21]. Примерно то же самое касается термодинамики преимущественного взаимодействия со стабилизирующими или дестабилизирующими осмолитами [22–24]. Более того, зависимость ΔG_D° от концентрации сопутствующих веществ (ДКФ и осмолитов) линейна, что было показано ранее [25]. Среди всех проанализированных осмолитов бетаин показал максимальный стабилизирующий эффект (как по T_m , так и по ΔG_D°). Это было показано в более ранних работах [22, 23]. Защитный эффект бетаина может быть отнесен к сильному эффекту предпочтительной гидратации [24]. Упаковка хромофорных групп (тирозина или фенилаланина) может быть более плотной в присутствии осмолитов по сравнению с ДКФ.

Последовательное снижение собственной флуоресценции наблюдалось с увеличением количества добавляемого ДКФ, что вызвано тушением флуоресценции РНКазы А. У ДКФ было показано наличие трех тушащих групп, поэтому он обладает высокой эффективностью как тушитель [25]. Три остатка тирозина (Tyr-25, Tyr-73, Tyr-97) расположены в глубине белка [26]. Такой результат показал, что остаток Tyr сместился в менее гидрофобное окружение. Для исследования термодинамики связывания ДКФ (рис. 5) эксперименты по тушению проводили при различных температурах (298, 303 и 308 К). Наблюдалось снижение удельной интенсивности флуоресценции, после чего данные анализировали по уравнению Штерна–Фольмера [27]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q], \quad (2)$$

где F_0 и F — интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии ДКФ (тушителя), K_{SV} — константа Штерна–Фольмера, $[Q]$ — молярная концентрация ДКФ, k_q и τ_0 — константа скорости бимолекулярной реакции тушения и время жизни флуоресценции белка в отсутствие тушителя соответственно (табл. 2).

Значения K_{SV} во всех случаях имели порядок 10^4 M^{-1} , что отражает существенное взаимодействие между РНКазой А и ДКФ, которое может быть ответственно за реализацию механизма тушения. Так, значительное взаимодействие между человеческим сывороточным альбумином и имипенемом — основа механизма тушения [28]. Линейное снижение тушения при различных температурах указывает на существование только одного типа механизма тушения флуоресценции РНКазы А — либо статического, либо динамического. Также значение углового коэффициента

Таблица 2. Константы тушения Штерна–Фолмера и параметры связывания для взаимодействия РНКазы А и ДКФ при разных температурах

Температура, K	$K_{SV} \cdot 10^4, M^{-1}$	$k_q \cdot 10^{13}, M^{-1}c^{-1}$	$K_a \cdot 10^4, M^{-1}$	n	R^2
298	2.21	0.65	4.64	1.01	0.9959
303	1.69	0.45	3.24	1.00	0.9931
308	1.04	0.33	2.38	1.02	0.9968

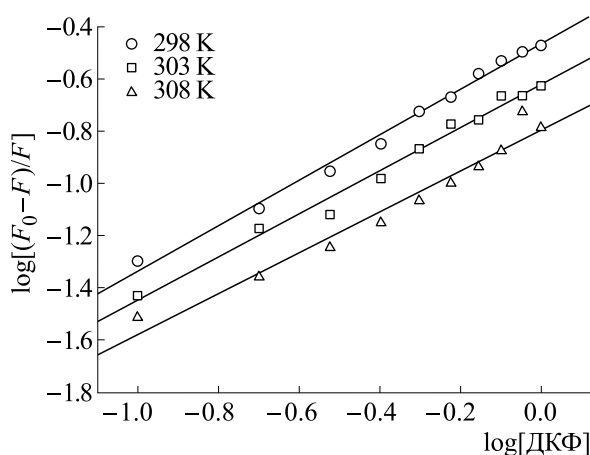
показывает присутствие только одного типа эквивалентного сайта связывания ДКФ. Отношение K_{SV} и τ_0 определяло значения k_q при различных температурах (табл. 2), значение τ_0 для РНКазы А было принято за $3.5 \cdot 10^{-9}$ с [29]. Результирующие значения k_q ($10^{13} M^{-1}c^{-1}$) были существенно выше, чем максимальная динамическая константа тушения ($10^{10} M^{-1}c^{-1}$). Это свидетельствует, что ДКФ-зависимое тушение происходило в результате образования комплекса. Процесс тушения хорошо описан вычислительно, он сильно зависит от температуры [28]. При высоких температурах динамическое тушение увеличивается вследствие более быстрой диффузии, а статическое тушение уменьшается вследствие диссоциации слабо ассоциированных комплексов. Таким образом, снижение K_{SV} и k_q позволяет предположить, что тушение флуоресценции РНКазы А в присутствии ДКФ происходит скорее за счет образования комплекса, а не за счет динамического тушения. Далее, значения константы связывания (K_a) и количества сайтов связывания (n) рассчитывали с применением уравнения Штерна–Фольмера, модифицированного следующим образом [30]:

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_a + n \log [Q]. \quad (3)$$

По рис. 6 и табл. 2 можно видеть линейный характер температурной зависимости $\log[(F_0 - F)/F]$ от $\log[Q]$, угловые коэффициенты и свободные слагаемые равны n и $\log K_a$ соответственно. Здесь константа связывания РНКазы А и ДКФ была равна $K_a = 4.64 \cdot 10^4 M^{-1}$ при 298 K, в молекуле РНКазы А имел место только один сайт связывания ДКФ.

Из результатов докинга можно заключить, что ДКФ связывается с РНКазой А и специфично взаимодействует с остатками Lys-41 и Phe-120 (рис. 7). Далее, результаты докинга показали, что во взаимодействии РНКазы А с ДКФ принимают участие водородные связи (с Lys-41, Phe-120, His-12 и Gln-11) и ван-дер-ваальсовы контакты (с Asp-121 и His-119) (рис. 7). Остатки, вовлеченные в связывание субстрата (Thr-45 и Ser-123 в «пиримидиновом» сайте и Gln-69, Asn-71 и Glu-111 в «пуриновом» сайте) и каталитические остатки (His-12 и His-119; Lys-7, Lys-41, Lys-66; Phe-120, Asp-121, Gln-11), а также ряд других остатков могут участвовать в поддержании целостности активного центра и определяют расположение молекул воды.

В термодинамическом равновесии, если смещение происходит вследствие дестабилизации РНКазы А диклофенаком что показано значениями ΔG_D° [нативное состояние $\leftrightarrow$ денатурирован-

**Рис. 6.** Модифицированные графики Штерна–Фольмера для тушения флуоресценции РНКазы А ДКФ при 298 K (○), 303 K (□) и 310 K (Δ).

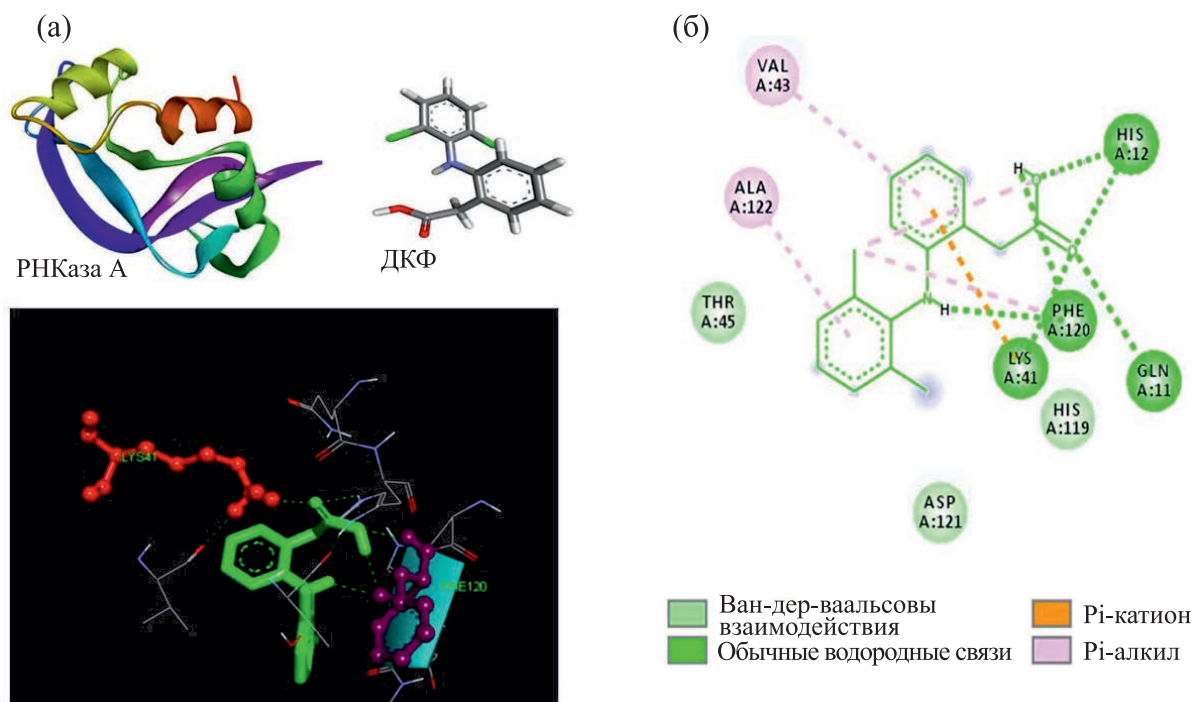


Рис. 7. Молекулярный докинг ДКФ с трехмерной структурой РНКазы А (PDB ID: 1FS3). (а) – Молекулярный докинг ДКФ на трехмерную структуру РНКазы А (1FS3); (б) – результаты докинга ДКФ с РНКазой А (1FS3) в формате ligplot (двумерная развертка).

ное состояние], то параметры активности ферментов тоже меняются. Смещение термодинамического равновесия вправо означает способность ДКФ связываться с ферментом [31]. Эти наблюдения полностью согласуются с ранее опубликованными данными по другим белкам [32].

Было обнаружено (см. табл. 3), что ДКФ увеличивает значения K_m , в то же время уменьшая значения k_{cat} , а при последующем добавлении различных осмолитов K_m уменьшалась, а k_{cat} — увеличивалась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании изучался механизм связывания ДКФ с РНКазой А в присутствии различных осмолитов и был показан его эффект на конформацию и стабильность РНКазы А. Структура и стабильность РНКазы А нарушаются при связывании ДКФ. Более того, связывание ДКФ с РНКазой А в присутствии осмолитов позволяет утверждать, что осмолиты стабилизируют белок. Для бетаина показан более существенный эффект, чем для двух других осмолитов. Данные результаты приводят к следующим умозаключениям: 1) присутствие ДКФ ведет к уменьшению стабильности белка в контексте как T_m , так и ΔG_D° , 2) добавление осмолитов к ДКФ ведет к увеличению стабильности белка, согласно значениям T_m

и ΔG_D° , 3) ДКФ влияет на третичную структуру белка, хотя на вторичную структуру подобное действие обнаружено не было, а осмолиты помогают восстановить структуру. Можно сделать вывод, что ДКФ дестабилизировал РНКазу А без каких-либо изменений в конформационном и структурном аспектах, а осмолиты предотвращают дестабилизирующий эффект ДКФ. Таким образом, может быть сделан вывод, что взаимодействие белка с лекарственным веществом в присутствии этих осмолитов может приводить к уменьшению высвобождения ДКФ до некоторой степени, что могло бы влиять на дозозависимость ответа на ДКФ в организме. Значит, связывание лекарства с белком в комбинации с осмолитами — важный критерий, к которому следует относиться с должным вниманием.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д-ру А.Н. Наганатхану из Индийского технологического института Мадраса за помощь в проведении УФ-КД-исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была поддержана грантом SERB (грантодержатель — факультет науки и технологий, грантодатель — правительство Индии, номер

Таблица 3. Параметры активности РНКазы А в присутствии и в отсутствие ДКФ и осмолитов при pH 7.0 и 25°C

	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$
ДКФ (мкМ)		
0.00	3.44 ± 0.03	0.99 ± 0.05
5.00	3.18 ± 0.02	1.14 ± 0.06
10.00	3.00 ± 0.04	1.35 ± 0.02
Глицин (М)		
0.00	3.44 ± 0.03	0.99 ± 0.05
0.50	3.13 ± 0.10	1.05 ± 0.05
1.00	3.06 ± 0.10	1.07 ± 0.07
Саркозин (М)		
0.00	3.44 ± 0.03	0.99 ± 0.05
0.50	3.71 ± 0.11	0.80 ± 0.05
1.00	4.21 ± 0.14	0.58 ± 0.03
Бетаин (М)		
0.00	3.44 ± 0.03	0.99 ± 0.05
0.50	3.37 ± 0.11	0.99 ± 0.04
1.00	3.62 ± 0.12	0.83 ± 0.06
Глицин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	3.00 ± 0.04	1.35 ± 0.02
0.50	3.06 ± 0.04	1.24 ± 0.07
1.00	3.13 ± 0.01	1.13 ± 0.04
Саркозин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	3.00 ± 0.04	1.35 ± 0.02
0.50	3.29 ± 0.01	1.26 ± 0.02
1.00	3.41 ± 0.03	1.15 ± 0.02
Бетаин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	3.00 ± 0.04	1.35 ± 0.02
0.50	3.47 ± 0.07	1.29 ± 0.07
1.00	3.52 ± 0.02	1.19 ± 0.01

Примечание. Эти значения были получены из ферментативных измерений после интенсивного диализа в течение 24 ч, каждое значение представляет собой среднюю величину из трех измерений $\pm$ ошибка среднего.

гранта SB/YS/LS-38/2014). М.Б. является получателем финансирования от факультета науки и технологий.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. H. Lin, D. M. Cocchetto, and D. E. Duggan, Clin. Pharmacokinet., **12** (6), 402 (1987). DOI: 10.2165/00003088-198712060-00002
2. K. K. H. Chan, K. H. Vyas, and K. D. Brandt, J. Pharm. Sci., **76** (2), 105 (1987). DOI: 10.1002/jps.2600760204
3. J. Santoro, C. González, M. Bruix, et al., J. Mol. Biol., **229** (3), 722 (1993). DOI: 10.1006/jmbi.1993.1075
4. R. T. Raines, Chem. Rev., **98** (3), 1045 (1998). DOI: 10.1021/cr960427h
5. S. H. Khan, N. Ahmad, F. Ahmad, and R. Kumar, IUBMB Life., **62** (12), 891 (2010). DOI: 10.1002/iub.406
6. J. Giri, Plant Signal. Behav., **6** (11), 1746 (2011). DOI: 10.4161/psb.6.11.17801
7. P. Yancey, M. Clark, S. Hand, et al., Science, **217** (4566), 1214 (1982). DOI: 10.1126/science.7112124
8. M. Auton and D. W. Bolen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102** (42), 15065 (2005). DOI: 10.1073/pnas.0507053102
9. S. N. Timasheff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99** (15), 9721 (2002). DOI: 10.1073/pnas.122253999
10. A. J. Saunders, P. R. Davis-Searles, D. L. Allen, et al., Biopolymers, **53** (4), 293 (2000). DOI: 10.1002/(SI-CI)1097-0282(20000405)53:4<293::AID-BIP2>3.0.CO;2-T
11. I. Haque, R. Singh, F. Ahmad, and A. A. Moosavi-Movahedi, FEBS Lett., **579** (18), 3891 (2005). DOI: 10.1016/j.febslet.2005.06.005
12. A. Sinha, S. Yadav, R. Ahmad, and F. Ahmad, Biochem. J., **345** (Pt 3), 711 (2000). DOI: 10.1042/bj3450711
13. R. Singh, I. Haque, and F. Ahmad, J. Biol. Chem., **280** (12), 11035 (2005). DOI: 10.1074/jbc.M410716200
14. Y. H. Chen, J. T. Yang, and H. M. Martinez, Biochemistry, **11** (22), 4120 (1972). DOI: 10.1021/bi00772a015
15. N. K. Poddar, Z. A. Ansari, R. K. B. Singh, et al., Biophys. Chem., **138** (3), 120 (2008). DOI: 10.1016/j.bpc.2008.09.013
16. S. Jamal, N. K. Poddar, L. R. Singh, et al., FEBS J., **276** (20), 6024 (2009). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07317.x
17. S. K. Dutta, S. K. Basu, and K. K. Sen, Indian J. Exp. Biol., **44** (2), 123 (2006).
18. K. Gekko and S. N. Timasheff, Biochemistry, **20** (16), 4667 (1981). DOI: 10.1021/bi00519a023
19. Y. Liu and D. W. Bolen, Biochemistry, **34** (39), 12884 (1995). DOI: 10.1021/bi00039a051
20. T. Arakawa, Y. Kita, and J. F. Carpenter, Pharm. Res., **8** (3), 285 (1991). DOI: 10.1023/a:1015825027737
21. T. O. Street, D. W. Bolen, and G. D. Rose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **103** (38), 13997 (2006). DOI: 10.1073/pnas.0606236103
22. L. R. Singh, T. A. Dar, S. Rahman, et al., Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics, **1794** (6), 929 (2009). DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.02.005
23. S. Knapp, R. Ladenstein, and E. A. Galinski, Extremophiles, **3** (3), 191 (1999). DOI: 10.1007/s007920050116

24. P. Prasanthan and N. Kishore, *J. Mol. Liq.*, **278**, 477 (2019). DOI: 10.1016/j.molliq.2019.01.071
25. E. Fernandes, T. B. Soares, H. Gonçalves, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (11), 3411 (2018). DOI: 10.3390/ijms19113411
26. M. Noronha, J. C. Lima, E. Paci, et al., *Biophys. J.*, **92** (12), 4401 (2007). DOI: 10.1529/biophysj.106.093625
27. J. R. Lakowicz and G. Weber, *Biochemistry*, **12** (21), 4161 (1973). DOI: 10.1021/bi00745a020
28. M. T. Rehman, H. Shamsi, and A. U. Khan, *Mol. Pharm.*, **11** (6), 1785 (2014). DOI: 10.1021/mp500116c
29. N. Barboy and J. Feitelson, *Photochem. Photobiol.*, **26** (6), 561 (1977). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1977.tb07533.x
30. M. Sharma, K. Chauhan, R. Shivahare, et al., *J. Med. Chem.*, **56** (11), 4374 (2013). DOI: 10.1021/jm400053v
31. X. Du, Y. Li, Y. L. Xia, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **17** (2), 144 (2016). DOI: 10.3390/ijms17020144
32. S. Khan, Z. Bano, L. R. Singh, et al., *PLoS One*, **8** (9), e72533 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0072533

The Organic Osmolyte Betaine Effectively Counteracts the Deleterious Effect of Diclofenac on Protein Structure and Stability

M. Basheeruddin*, N. Ahmed*, Kh.A. Khan*, and Sh. Jamal*

**School of Life Sciences, B.S. Abdur Rahman Crescent Institute of Science & Technology, Vandalur, Chennai, Tamil Nadu, 600048 India*

Understanding the physicochemical properties of pharmacy and the concept of pharmacophore is essential to devise guidelines for the synthesis of target-oriented drugs. In the present study, thermal denaturation, circular dichroism, intrinsic fluorescence, and docking were employed for studying the effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug, diclofenac sodium, on the stability and structure of bovine pancreatic ribonuclease (RNase A) taken as a model of an enzyme. Since drug-protein interaction is an important pharmacokinetic parameter of a drug, it was deemed significant to study the effects of diclofenac on protein structure and stability. When the thermodynamic parameters were assessed, it was shown that RNase-A was destabilized in the presence of diclofenac sodium in terms of T_m and ΔG_D° , while the addition of osmolytes stabilized the protein. In the presence of diclofenac sodium and osmolyte, there was a change in a tertiary structure of the protein but not in its secondary structure. Spectral results revealed a decrease in fluorescence intensity confirming fluorescence quenching of RNase-A by diclofenac sodium and osmolytes. Molecular docking analysis suggested that hydrogen bonds and Van der Waals are involved in the binding of RNase-A to diclofenac sodium. The RNase-A activity is decreased in the presence of diclofenac sodium while osmolyte can restore the RNase-A activity and the indices k_{cat} increase and K_m values decrease. This study presents new combination of drug therapy comprising diclofenac sodium and osmolytes to reduce the risk of adverse effects of diclofenac sodium.

Keywords: RNase-A, thermal denaturation, osmolytes, diclofenac

УДК 577.353

ОСОБЕННОСТИ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА И СКЕЛЕТНОГО МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С

© 2023 г. Л.Г. Бобылёва*, М.А. Тимченко*, Э.И. Якупова**,
И.М. Вихлянец*, ***, А.Г. Бобылёв*

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

**Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского
государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119234, Россия

***Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета,
ул. Карла Маркса, 76, Казань, 420015, Россия

E-mail: bobylev1982@gmail.com

Поступила в редакцию 07.04.2023 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Белковые олигомеры являются важными промежуточными звеньями на пути образования амилоидных фибрилл. При амилоидозах, например, болезни Альцгеймера, олигомеры способны оказывать токсическое действие на клетки. В данной работе описаны отличительные особенности олигомеризации мультидоменных мышечных белков — гладкомышечного титина и миозин-связывающего белка С (С-белка) скелетных мышц, состоящих из FnIII-подобных и IgC2-подобных доменов и способных формировать амилоидные аморфные агрегаты *in vitro*. С-белок в условиях низкой ионной силы (ниже физиологических значений) формировал стабильные олигомеры, не участвующие в дальнейшей агрегации. Титин гладких мышц формировал олигомеры в условиях высокой ионной силы ($\mu \sim 0.6$), которые являлись предшественниками амилоидных аморфных агрегатов этого белка. Полученные результаты расширяют представления о процессе белковой агрегации.

Ключевые слова: мультидоменные мышечные белки, миозин-связывающий белок С, титин, агрегация, амилоиды, олигомеризация, олигомеры.

DOI: 10.31857/S0006302923030055, EDN: FQJHUE

Процесс агрегации белка — это сложный и малоизученный процесс, который происходит в клетках живых организмов вследствие множества причин и связан либо с развитием патологических изменений, либо с выполнением определенных функций [1]. На одной из стадий амилоидной агрегации происходит образование олигомеров — надмолекулярных структур, состоящих из нескольких нековалентно-связанных молекул белка. Олигомеры представлены широким спектром морфологического разнообразия [2–4] и являются важными промежуточными продуктами процесса формирования фибриллярных агрегатов, как показано для различных амилоидогенных белков [5–8]. Известно, что олигомеры амилоидных белков обладают более выраженными цитотоксическими свойствами, чем их фибриллы, образующиеся, в частности, при таких заболеваниях как болезнь Альцгеймера и Паркинсона

[9–14]. Вследствие этого олигомеры являются перспективным объектом исследования с целью разработки лекарственных препаратов для лечения амилоидозов.

Известно, что помимо амилоидных фибрилл белки могут образовывать другие типы агрегатов, например, растворимые олигомеры и аморфные агрегаты. Имеется мнение, что амилоидными могут быть только фибриллы, в то время как аморфные агрегаты имеют неамилоидную природу, однако это спорная точка зрения. Аморфные агрегаты обычно образуются за более короткие промежутки времени, чем фибриллы. Для их образования не требуется какой-то особой укладки (конформации) белковой молекулы. Многие белки с неупорядоченной структурой, а также частично развернутые белки формируют аморфные агрегаты. Для образования упорядоченных фибрилл, как известно, необходимы особые условия,

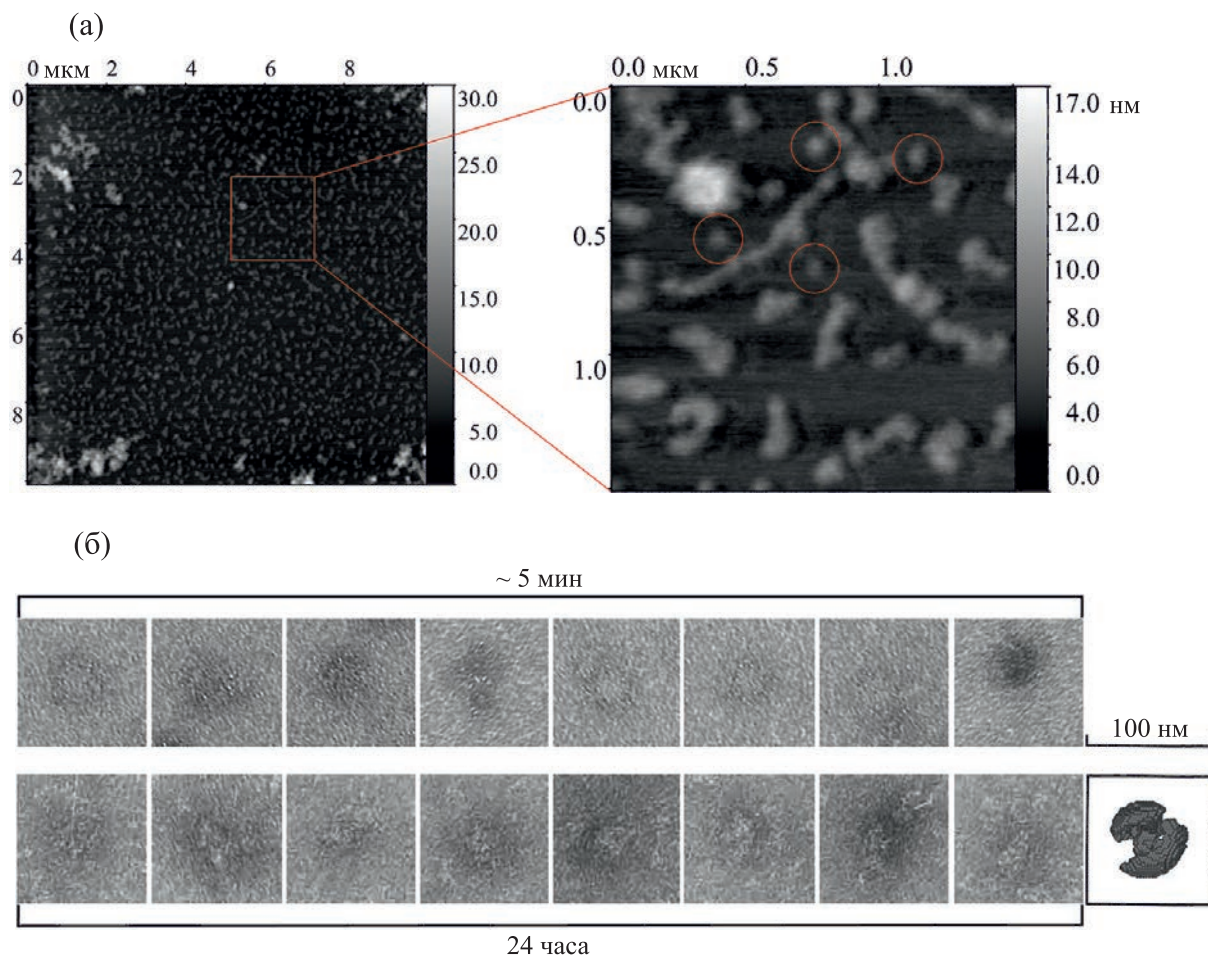


Рис. 1. Атомно-силовая микроскопия и электронная микроскопия олигомеров С-белка. (а) — Атомно-силовая микроскопия аморфных агрегатов и олигомеров С-белка, сформированных в течение 24 ч. Отдельно лежащие олигомеры показаны в светлых кругах. (б) — Электронная микроскопия олигомеров С-белка, сформированных в течение ~5 мин и 24 ч. Справа внизу приведена для сравнения смоделированная структура олигомера С-белка, полученная с помощью программы DAMMIF на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния [19]. Размер одного квадрата 100×100 нм. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин—КОН, pH 7.0, 4°C.

способствующие формированию специфической укладки в амилоидную структуру. Данная специфическая укладка может появляться уже на стадии формирования растворимых олигомеров [15].

Исследуемые нами титин и С-белок формируют амилоидные аморфные агрегаты [16–20]. Этот результат расходится с общепринятой научной точкой зрения, заключающейся в том, что амилоидными могут быть только высокоупорядоченные фибриллы. Таким образом, амилоидные свойства аморфных агрегатов титина и С-белка являются особенностью этих мышечных белков. Поэтому процесс олигомеризации у исследуемых белков представляет фундаментальный интерес.

Анализ проведенных нами исследований показал, что С-белок после образования крупных

аморфных агрегатов в течение первых пяти минут агрегации формирует ряд стабильных олигомеров, претерпевающих незначительный рост в течение последующих 16–24 часов агрегации [19]. На рис. 1 представлены данные атомно-силовой и электронной микроскопии, на которых показаны преимущественно олигомеры С-белка, имеющие сферическую форму с диаметром 30–50 нм и высотой 10 нм, сформированные в течение 5 мин и 24 ч агрегации. Примечательно, что смоделированная трехмерная структура олигомеров С-белка, полученная на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния, также близка к сферической (рис. 16) [19]. Таким образом, данные визуальных методов анализа, а также данные, полученные с помощью динамического светорассея-

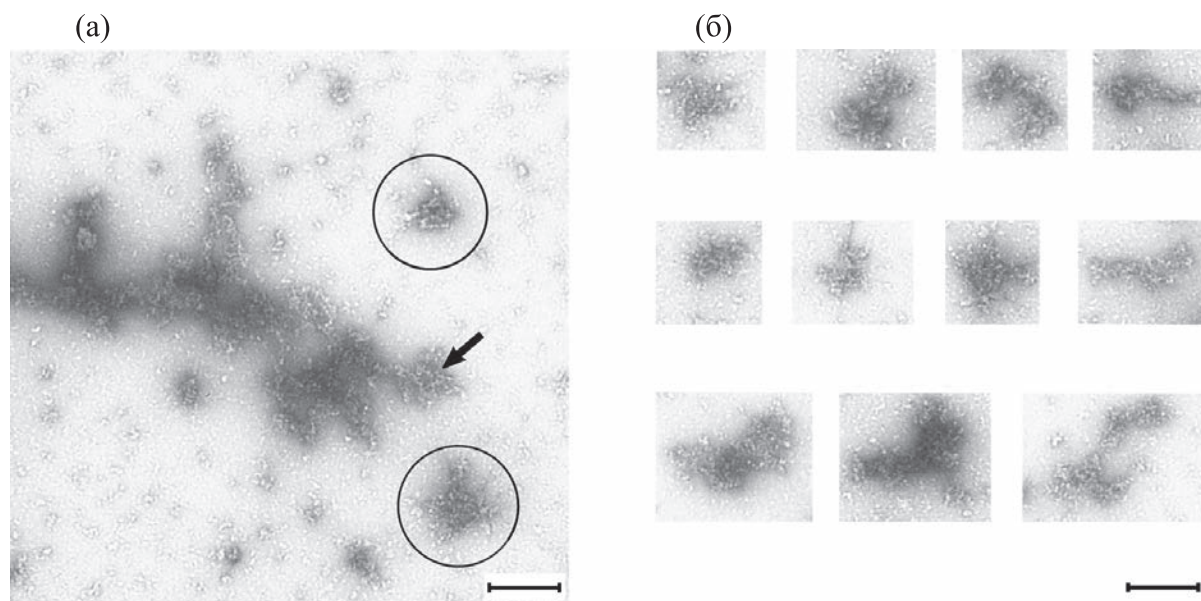


Рис. 2. (а) — Электронная микроскопия аморфных агрегатов и олигомеров гладкомышечного титина, сформированных в течение трех часов. Отдельно лежащие олигомеры показаны в черных кругах. (б) — Электронная микроскопия олигомеров гладкомышечного титина. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0, 4°C. Шкала 500 нм.

ния и показывающие появление олигомеров С-белка через 5 мин агрегации и незначительный их рост впоследствии [19], могут указывать на то, что олигомеры С-белка являются стабильными и не участвуют в образовании крупных агрегатов или фибрилл.

Согласно известной модели [15], на начальных этапах фибриллообразования мономерный амилоидогенный белок может образовывать одновременно несколько типов олигомерных форм с различной внутренней конформацией. Разные типы олигомеров могут давать начало более крупным агрегатам различной структуры, как фибриллярным, так и аморфным, либо представлять собой относительно стабильные структуры, не запускающие дальнейшую агрегацию [15]. К таковым относятся олигомеры С-белка. По результатам динамического светорассеяния количество мономеров С-белка в олигомере составляет 10–12; по данным малоуглового рентгеновского рассеяния молекулярная масса олигомера составляет 900 ± 60 кДа, а радиус гирации — 86 ± 4 Å [19].

Примечательно, что характеристики, полученные для олигомеров С-белка, близки к таковым для олигомеров белка YB-1 [21–23]. Учитывая большую разницу в структуре между YB-1 и С-белком, можно предположить, что способность формировать олигомеры со схожими характери-

ками (формой, размером) является признаком того, что существует общий механизм, по которому образуются олигомеры независимо от белка-предшественника.

Отдельного внимания заслуживает анализ структуры олигомеров титина. Способность этого белка формировать олигомеры была впервые показана в 2003 г. [24]. С помощью атомно-силовой микроскопии было обнаружено, что молекулы титина, выделенные из скелетных мышц кролика, при снижении ионной силы раствора (с 0.6 М до 0.2 М KCl) в течение 10 мин формировали олигомеры [24]. При этом авторы наблюдали присутствие как отдельно лежащих молекул титина, так и его олигомеров разного порядка — димеров, тримеров, тетрамеров и структур более высокого порядка. Мономеры в олигомерах титина взаимодействовали друг с другом глобулярными образованиями — головками, формируя уплотнение в центре олигомера [24]. Подобные олигомеры, по нашим данным, формирует и гладкомышечный титин [20]. Однако, в отличие от титина поперечно-полосатых мышц, гладкомышечный титин формировал олигомеры в условиях более высокой ионной силы (~ 0.6). т.е. для олигомеризации гладкомышечного титина не требовалось снижать ионную силу раствора, как это было необходимо в случае с титином поперечно-полоса-

тых мышц [24]. При снижении ионной силы олигомеры гладкомышечного титина, имеющие диаметр ~500 нм, формировали более крупные аморфные агрегаты (рис. 2).

На рис. 2а можно наблюдать крупный агрегат, отдельно лежащие олигомеры (черные круги) и множество более мелких частиц, предположительно мономеров белка. При этом видно, что крупный аморфный агрегат состоит из отдельных олигомеров (рис 2а, стрелка). Полученные данные указывают на то, что укрупнение и рост агрегатов гладкомышечного титина происходит за счет олигомеров этого белка.

Итак, оба исследованных нами белка формируют олигомеры. Однако С-белок при снижении ионной силы формирует группу стабильных олигомеров, которые не участвуют в дальнейшей его агрегации. Нельзя исключить, что формирование подобных стабильных олигомеров свидетельствует о некоем адаптивном механизме, созданном природой, предотвращающим дальнейшую агрегацию С-белка в клетках, которая могла бы приводить к негативным последствиям. Гладкомышечный титин, в отличие от С-белка, формирует олигомеры в условиях высокой ионной силы, демонстрируя этим высокую склонность к ассоциации. При понижении ионной силы олигомеры гладкомышечного титина формируют крупные аморфные агрегаты, которые способны дезагрегировать при повышении ионной силы [17, 20]. Подобные свойства титина, возможно, являются отражением какой-либо функциональной роли его олигомеров или агрегатов, образующихся в гладкомышечных клетках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-24-00805 (задача, касающаяся выделения и подбора условий для агрегации С-белка).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, S. A. Shumeyko, et al., *Biology (Basel)*, **10** (5), 394 (2021).
2. M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 561 (2010).
3. H. A. Lashuel, D. Hartley, B. M. Petre, et al., *Nature*, **418**, 291 (2002).
4. H. A. Lashuel, C. R. Overk, A. Oueslati, and E. Masliyah, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 38 (2013).
5. P. Narayan, A. Orte, R. W. Clarke, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 79 (2011).
6. N. Cremades, S. I. Cohen, E. Deas, et al., *Cell*, **149**, 1048 (2012).
7. S. L. Shammas, G. A. Garcia, S. Kumar, et al., *Nat. Commun.*, **6**, 7025 (2015).
8. J. Yang, A. J. Dear, T. C. T. Michaels, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 2493 (2018).
9. B. Winner, R. Jappelli, S. K. Maji, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4194 (2011).
10. M. J. Guerrero-Muñoz, D. L. Castillo-Carranza, S. Krishnamurthy, et al., *Neurobiol. Dis.*, **71**, 14 (2014).
11. K. A. Conway, S. J. Lee, J. C. Rochet, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 571 (2000).
12. J. P. Cleary, D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, et al., *Nat. Neurosci.*, **8**, 79 (2005).
13. F. Chiti and C. M. Dobson, *Biochemistry*, **86**, 27 (2017).
14. M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti, et al., *Nature*, **416**, 507 (2002).
15. V. N. Uversky *FEBS J.*, **277**, 2940 (2010).
16. A. G. Bobylev, O. V. Galzitskaya, R. S. Fadeev, et al., *Biosci. Rep.*, **36** (3), e00334 (2016).
17. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36** (9), 2237 (2018).
18. A. G. Bobylev, E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, et al., *Mol Biol. (Moscow)*, **54** (4), 643 (2020).
19. L. G. Bobyleva, S. A. Shumeyko, E. I. Yakupova, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 731 (2021).
20. A. G. Bobylev, E. I. Yakupova, and L. G. Bobyleva, *Int J Mol Sci.*, **24** (2), 1056. (2023).
21. V. M. Evdokimova, C. L. Wei, A. S. Sitikov, et al., *J. Biol. Chem.*, **270**, 3186 (1995).
22. S. R. Tafuri and A. P. Wolffe, *New Biol.*, **4**, 349 (1992).
23. M. A. Skabkin, O. I. Kiselyova, K. G. Chernov, et al., *Nucl. Acids Res.*, **32**, 5621 (2004).
24. M. S. Kellermayer, C. Bustamante, and H. L. Granzier, *Biochim. Biophys. Acta*, **1604** (2), 105 (2003).
25. S. Kumar and J. Walter, *Aging (Albany NY)*, **3** (8), 803 (2011).

Peculiarities of Oligomerization of Smooth Muscle Titin and Skeletal Myosin-Binding Protein C

L.G. Bobyleva*, M.A. Timchenko*, E.I. Yakupova**, I.M. Vikhlyantsev*, ***, and A.G. Bobylev*

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

***Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1, Moscow, 119234 Russia*

****Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, ul. Karla Marksa 76, Kazan, 420015 Russia*

Protein oligomers are important intermediates in the formation of amyloid fibrils. In amyloidoses, for instance, in Alzheimer's disease, oligomers are able to exert toxic effects on cells. This paper describes the distinctive features of oligomerization of multidomain muscle proteins such as smooth muscle titin and myosin-binding protein C (MyBP-C) of skeletal muscles, which consist of FnIII-like and IgC2-like domains and form amorphous amyloid aggregates *in vitro*. MyBP-C at low ionic strength (below physiological values) formed stable oligomers that did not participate in further aggregation. In high ionic strength conditions ($\mu \sim 0.6$), smooth muscle titin formed oligomers, which were precursors of amyloid amorphous aggregates of this protein. The results obtained help expand existing knowledge about the process of protein aggregation.

Keywords: multidomain muscle proteins, myosin-binding protein C, titin, aggregation, amyloids, oligomerization, oligomers

К ВОПРОСУ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ РЕСВЕРАТРОЛА С НУКЛЕОСОМАМИ

© 2023 г. Н.В. Малюченко*, #, Т.В. Андреева*, О.В. Гераськина*, Н.С. Герасимова*,
А.В. Любителев*, А.В. Феофанов*, В.М. Студитский*, **

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

**Программа эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия,
штат Филадельфия 19111-2497, США

#E-mail: mal_nat@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 30.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Природный полифенол ресвератрол обладает противовоспалительными, антиоксидантными, противоопухолевыми и геропротекторными свойствами. Широкий спектр активностей ресвератрола определяется его способностью модулировать разнообразные сигнальные пути в клетке и взаимодействовать с различными молекулами-мишенями. Известно, что ресвератрол взаимодействует с ДНК, но влияние этого взаимодействия на структуру хроматина не изучено. В настоящей работе исследовано влияние ресвератрола на структуру нуклеосомы — функциональной и структурной единицы хроматина. Методами флуоресцентной микроскопии одиночных нуклеосом на основе фёрстеровского резонансного переноса энергии и анализа изменений в электрофоретической подвижности нуклеосом в полиакриламидном геле установлено, что при концентрации ~100 мкМ ресвератрол оказывает влияние на конформацию линкерных участков ДНК и ограничивает конформационную динамику ДНК вблизи границы нуклеосомы, но не вызывает значительных изменений в упаковке нуклеосомной ДНК на октамере гистонов. Небольшое по сравнению с кверцетином влияние на структуру нуклеосомы предположительно определяется способом связывания ресвератрола в узкой бороздке ДНК.

Ключевые слова: ресвератрол, хроматин, нуклеосома, *spFRET*, *TIRF*.

DOI: 10.31857/S0006302923030067, **EDN:** FQONOR

Природный полифенол ресвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен) относится к группе производных стильбена и существует в виде *цис*- и *транс*-изомеров. Биологически активным является *транс*-изомер (рис. 1а) [1]. Ресвератрол синтезируется в виноградных, арахисовых и ягодных видах растений, включая чернику, клюкву, малину и шелковицу [2–4]. Большое количество ресвератрола накапливается в растениях в ответ на стресс, например, при воздействии ультрафиолетового излучения, озона, тяжелых металлов или после физического повреждения [2, 5, 6]. Доказана активация синтеза ресвератрола и его фунгицидное действие в ответ на атаку инфекционных агентов, в частности грибка *Botrytis cinerea* [4,5].

Сокращения: *spFRET*-микроскопия — флуоресцентная микроскопия одиночных нуклеосом на основе фёрстеровского резонансного переноса энергии, *TIRF* — флуоресценция при полном внутреннем отражении возбуждающего света.

Ресвератрол активирует врожденный защитный механизм растений и обеспечивает устойчивость к болезням. Поступая в организм человека вместе с пищей, ресвератрол потенциально может проявлять антиоксидантную, антиатеросклеротическую, антиагрегантную, противовоспалительную, антибактериальную, противовирусную, противогрибковую, геропротекторную, противоопухолевую и липолитическую активность [3, 7–13]. Множественность биологических эффектов ресвератрола определяется его способностью в микромолярном диапазоне концентраций модулировать различные клеточные сигнальные пути и взаимодействовать с функционально важными молекулами-мишенями, среди которых НАД⁺-зависимая деацетилаза (*SIRT1*), циклооксигеназы, липооксигеназы, ДНК-метилтрансферазы, факторы транскрипции (*NF-κB*), цитокины, ДНК-полимераза α, топоизомераза II, аденилатциклаза, фосфодиэстераза, аденозинмонофос-

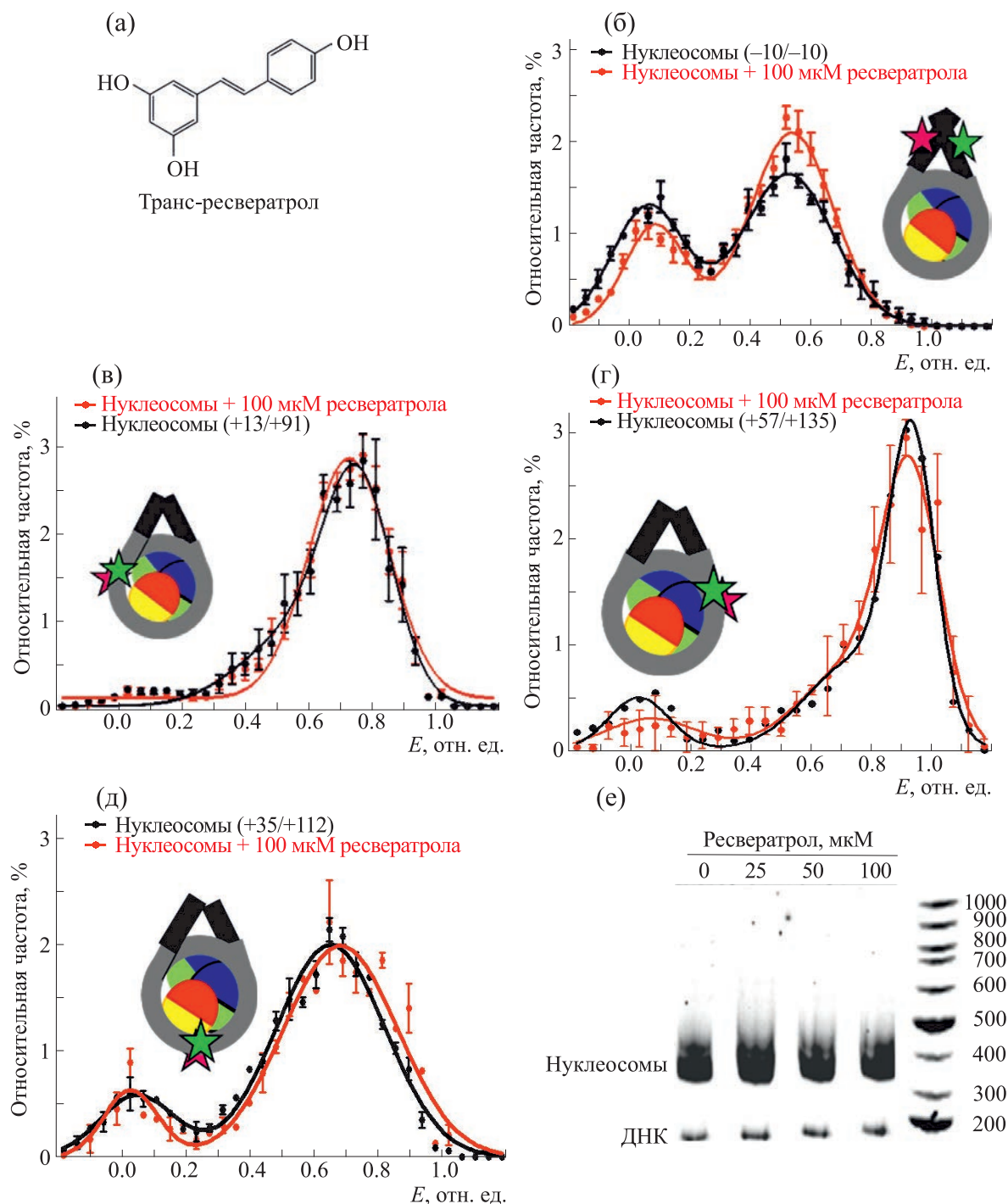


Рис. 1. Исследование взаимодействия ресвератрола с нуклеосомами методами spFRET-микроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле. (а) — Структурная формула транс-ресвератрола; (б)–(д) — профили распределения нуклеосом по эффективности FRET в присутствии и в отсутствие 100 мкМ ресвератрола. Исследованы нуклеосомы, в которых флуоресцентные метки Cy3/Cy5 находятся в спиральных линкерной ДНК на расстоянии 10 п.н. от границы кор-нуклеосомы (б), в соседних супервитках нуклеосомной ДНК вблизи границ кор-нуклеосомы в положениях 13 и 91 п.н. (в), в положениях 57 и 135 п.н. (г) или далеко от границы нуклеосомы в положениях 35 и 112 п.н. (д). На рис. (е) — электрофорез в полиакриламидном геле нуклеосом, проинкубированных с различными концентрациями ресвератрола (25, 50 и 100 мкМ).

фаткиназа, рибонуклеотидредуктаза, ароматаза и рецепторы эстрогена [14–17]. В настоящее время ведется более 150 клинических испытаний с использованием ресвератрола (<https://clinicaltrials.gov>). Растущий интерес к возможному применению ресвератрола в качестве лекарственного средства определяет необходимость токсикологических исследований данного полифенола, и в частности, его генотоксичности [17]. Установлено, что полифенол взаимодействует с ДНК [18–21], и предполагается, что изменения, индуцируемые им в структуре хроматина, могут являться триггером, запускающим сигнальную сеть, связанную с экспрессией серин-треониновой протеинкиназы АТМ и отвечающую за репарацию ДНК, остановку клеточного цикла и активацию апоптоза [17]. С целью проверки гипотезы о возможном влиянии ресвератрола на структуру хроматина в настоящей работе изучено взаимодействие этого полифенола с нуклеосомами. Нуклеосома является функциональной и структурной единицей хроматина, а исследования нуклеосом *in vitro* позволяют прояснить механизмы многих процессов, происходящих в клеточном ядре [22].

Для изучения взаимодействия с ресвератролом использовали моонуклеосомы, собранные на основе октамера гистонов и флуоресцентно-меченой матрицы ДНК, содержащей нуклеосом-позиционирующую последовательность. Исследования выполнены с применением методов флуоресцентной микроскопии одиночных нукле-

осом на основе фёрстеровского резонансного переноса энергии (spFRET-микроскопии) в растворе и анализа изменений в электрофоретической подвижности комплексов нуклеосом с ресвератролом в полиакриламидном геле. Динамика изменений структуры иммобилизованных нуклеосом в комплексе с ресвератролом была исследована методом spFRET-микроскопии на основе эффекта полного внутреннего отражения (TIRF-spFRET-микроскопии).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали *транс*-ресвератрол (*транс*-3,4',5'-тригидроксистерилбен) фирмы Roth (Германия).

Для spFRET-микроскопии флуоресцентно-меченные ДНК-матрицы длиной 187 п.н. получали методом полимеразной цепной реакции с использованием плазмиды pTZ57R, содержащей нуклеосом-позиционирующую последовательность 603 [23]. Для амплификации использовали синтетические олигонуклеотиды, меченные флуорофорами Cy3 и Cy5 («Lumiprobe», Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров для синтеза матрицы ДНК, меченной Cy3 и Cy5 по тимином в положениях 13 и 91 п.н. и 35 и 112 п.н. от начала последовательности 603, были опубликованы ранее [24]. Для синтеза матрицы ДНК, меченной Cy3 и Cy5 по тиминам в положениях 57 и 135 п.н. от начала последовательности 603, использовали следующие праймеры:

Д-прямой – 5'-CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCGGTTTCGCGCTCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGC[Cy3-dT]TAGGC-3';

Д-обратный – 5'-GAACCATGATGGGCACTGGGTACCCAGGGACT[Cy5-dT]GAAGTAATAAGGAC-3'.

Для мечения линкерных участков ДНК на расстоянии 10 п.н. от начала и конца нуклеосом-пози-

ционирующей последовательности в матрице ДНК длиной 227 п.н. [25] использовали праймеры:

Л-прямой – 5'-ACACGGCGCACTGCCAACCCAAACGACACCT[Cy3-dT]GCACGAG-3';

Л-обратный – 5'-TAAGGCGAATTCACAACCTTTTGGCAAGAAT[Cy5-dT]ATGAGCT-3'.

Полученные ДНК-матрицы использовали для сборки нуклеосом методом ступенчатого диализа против буферных растворов с понижающейся ионной силой [28]. Донором гистонов служил хроматин без линкерных гистонов, выделенный из эритроцитов кур, как описано ранее [28].

Для проведения экспериментов с использованием TIRF-микроскопии были синтезированы флуоресцентно-меченные моонуклеосомы с линкерным участком ДНК длиной 123 п.н. с биотином на 5'-конце.

Для этого флуоресцентно-меченные ДНК-матрицы инкубировали с ферментом TspRI, формируя «липкий» 3'-конец, и очищали методом препаративного электрофореза в 1.5%-м агарозном геле с добавкой 4 М мочевины. На ДНК-матрицах с «липким» концом собирали нуклеосомы по методике [28], как описано выше.

Биотинилированный линкерный фрагмент ДНК, готовили по методике [27], используя заправочные олигонуклеотиды:

bio282Forwhst – 5'-биотин-CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTA-3';

134rev40 – 5'-CGCGAACTGGGCCCCAGTGCCGGTGTGCTTGGGTTGGCT-3'.

Этот фрагмент ДНК обрабатывали ферментом TspRI для создания липкого 5'-конца и очищали методом препаративного электрофореза в 1.5%-м агарозном геле с добавкой 4 М мочевины, используя набор реактивов Cleanup Standard («Евроген», Россия). Полученный биотинилированный фрагмент ДНК лигировали к нуклеосоме с «липким» концом с использованием ДНК-лигазы фага T4 при 4°C в течение 16 ч.

Для spFRET-микроскопии в растворе использовали установку LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия) с системой детекции на основе лавинных фотодиодов как описано ранее [29]. Концентрацию нуклеосом в растворе (~1 нМ) подбирали таким образом, чтобы в фокусе лазера в любой момент времени находилось не более одной нуклеосомы. Время диффузии нуклеосомы через фокус лазера составляет <6 мс. Нуклеосомы в концентрации ~1 нМ, содержащие пару FRET-меток Cy3/Cy5, инкубировали с различными концентрациями ресвератрола (25–100 мкМ) в течение 20 мин в пробирках с низкой адгезией в буфере TB150 (20 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂, 150 мМ KCl, 1 мМ β-меркаптоэтанол). Концентрации ресвератрола были выбраны на основании данных о ДНК-тропных свойства полифенола [18, 19]. Препараты переносили в лунки силиконовой кюветы (Ibidi, Германия), прикрепленной к покровному стеклу (Assistent, Германия). Измеренные интенсивности флуоресценции меток Cy3 и Cy5 в составе одиночных нуклеосом использовали для расчета коэффициента близости *E*, как описано ранее [30]. Коэффициент *E* является аналогом эффективности FRET без учета поправок на квантовые выходы флуорофоров и чувствительность системы детекции. Для анализа измеренных сигналов и расчета частотных распределений нуклеосом по величине *E* использовали программу FRETty (<https://github.com/intbio/FRETty>). Выборку значений *E* измеренных частиц (не менее 3000 частиц) представляли в виде частотного распределения (*E*-профиля). Измерения выполняли не менее чем в трех независимых экспериментах, а рассчитанные *E*-профили усредняли и аппроксимировали линейной суперпозицией нескольких гауссовых распределений, описывающих отличающиеся по структуре субпопуляции нуклеосом.

Для измерений методом TIRF-spFRET-микроскопии биотинилированные нуклеосомы с метками в положениях 13 и 91 п.н. или 35 и 112 п.н. иммобилизовали на стеклах, покрытых монослоем полиэтиленгликоль-силана с 1%-й добавкой биотинилированного полиэтиленгликоль-силана и активированных стрептавидином, как описано ранее [27]. Измерения выполняли с использованием экспериментальной установки с чувствительностью на уровне одиночных моле-

кул на основе инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer D1 (Zeiss, Германия) с лазерным модулем и адаптором для TIRF-микроскопии [27]. Флуоресценцию Cy3 возбуждали лазером с длиной волны 514 нм, мощность на образце составляла 300 мкВт. Изображения нуклеосом регистрировали с помощью объектива αPlan-FLUAR100×/1.45 Oil (Zeiss, Германия) и системы OptoSplitII (Cairn Research Ltd., Великобритания) синхронно в каналах флуоресценции Cy3 и Cy5. Измерения выполняли в растворе 20 мМ Трис-НСl (pH 8.0), 150 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂. Ресвератрол добавляли к иммобилизованным нуклеосомам в конечной концентрации 100 мкМ из раствора 10 мМ в диметилсульфоксиде, инкубировали 10 мин, а затем анализировали методом TIRF-spFRET-микроскопии. В контрольных измерениях нуклеосомы прединкубировали (10 мин) с 1%-м диметилсульфоксидом. Временные серии изображений нуклеосом (100–150 изображений на серию) измеряли в течение 30 с с интервалом 300 мс (экспозиция 240 мс, нуклеосомы с метками в положениях 35 и 112 п.н.) или 200 мс (экспозиция 140 мс, нуклеосомы с метками в положениях 13 и 91 п.н.). В измеренных сериях для каждой нуклеосомы рассчитывали динамику величины *E* во времени и строили частотное распределение состояний нуклеосомы по величине *E*. С учетом данных, полученных методом spFRET-микроскопии в растворе, для дальнейшего анализа отбирали нуклеосомы, имеющие *E*-профили с максимумом > 0.4. Эти *E*-профили проверяли на соответствие нормальному распределению, используя критерий нормальности Д'Агостина–Пирсона. По общей совокупности данных для отобранных нуклеосом (50–100 частиц) рассчитывали обобщенное частотное распределение состояний нуклеосом по величине *E*, описывали его как суперпозицию двух нормальных (гауссовых) распределений и сравнивали в отсутствие и в присутствии ресвератрола.

Влияние ресвератрола на структуру нуклеосом изучали по изменению электрофоретической подвижности комплексов в 5%-м полиакриламидном геле в нативных условиях. Перед нанесением на гель нуклеосомы (2–3 нМ) инкубировали с различными концентрациями (25–100 мкМ) ресвератрола в буфере TB150 в течение 20 мин при 25°C. Электрофорез проводили в течение 1 ч при температуре 4°C. Полученные гели анализировали с помощью сканера Amersham Typhoon RGB Imager (Cytiva, США), регистрируя флуоресценцию меток, введенных в ДНК-матрицу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследований методом spFRET-микроскопии влияния ресвератрола на структуру нуклеосом в области линкерной ДНК использовали

нуклеосомы с метками в спиральных линкерной ДНК ($N(-10, -10)$, рис. 1б). Наличие и характер изменений в структуре нуклеосом анализировали, сравнивая профили распределения нуклеосом по величине E (E -профили), измеренные методом spFRET-микроскопии до и после инкубации нуклеосом с ресвератролом.

E -профили нуклеосом $N(-10, -10)$ характеризуются наличием двух приблизительно равных по величине пиков (рис. 1б). Пик в области больших значений E соответствует субпопуляции нуклеосом, у которых спирали линкерной ДНК в области расположения меток сближены друг с другом и находятся на расстоянии ~ 5 нм, а пик в области малых E — субпопуляции, в которой эти спирали находятся на увеличенном (7–8 нм) расстоянии друг от друга. Наличие у нуклеосом двух конформаций линкерной ДНК, распознаваемых методом spFRET-микроскопии, согласуется с данными, опубликованными ранее для нуклеосом с иным расположением меток в области линкерной ДНК [25]. Было обнаружено, что ресвератрол оказывает влияние на конформацию линкерных участков ДНК при концентрациях близких к 100 мкМ: субпопуляция нуклеосом со сближенными линкерами достоверно ($p < 0.05$) возрастает от 61 ± 1 до $71 \pm 4\%$ (рис. 1б).

Для изучения влияния ресвератрола на структуру нуклеосомы в коровой области использовали три варианта мечения нуклеосомной ДНК: вблизи границы нуклеосомы ($N(+13, +91)$ или $N(+57, +135)$, рис. 1в и 1д соответственно) и в области, удаленной от границы нуклеосомы ($N(+35, +112)$, рис. 1г). В этих нуклеосомах метки Су3 и Су5 располагались на соседних супервитках ДНК на расстоянии, обеспечивающем эффективный FRET между ними. E -профили всех вариантов нуклеосом, меченных в коровой области, характеризуются интенсивным пиком в области больших значений E и минорным пиком в области малых E (рис. 1в–д). Такие E -профили отражают доминирование в растворе субпопуляции нуклеосом с нативной укладкой супервитков нуклеосомной ДНК на октамере гистонов в области расположения меток. Минорный пик в области низких значений E отражает присутствие в растворе нуклеосом с нарушенной укладкой нуклеосомной ДНК, и/или свободной ДНК, образующейся при диссоциации нуклеосом. После инкубации нуклеосом с ресвератролом в концентрации 25–100 мкМ E -профили не изменяются (рис. 1в–д), что указывает на отсутствие ресвератрол-индуцированных изменений структуры в кор-нуклеосоме, включая области вблизи и на значительном удалении от границы нуклеосомы (рис. 1в–д).

Методом электрофореза в ПААГ в нативных условиях установлено, что при концентрациях

ресвератрола 25–100 мкМ он не вызывает ни диссоциации нуклеосом с появлением свободной ДНК, ни существенных изменений в подвижности нуклеосом, указывающих на значительное изменение структуры нуклеосом (рис. 1е), что согласуется с данными spFRET-микроскопии.

Измерения свободно диффундирующих нуклеосом методом spFRET-микроскопии характеризуют структуру нуклеосом только в момент их прохождения через фокус лазерного луча. Для изучения структурной динамики нуклеосомы были иммобилизованы через длинный биотинилированный фрагмент линкерной ДНК на поверхности монослоя полиэтиленгликоля, нанесенного на стекло, и исследованы методом TIRF-spFRET микроскопии (рис. 2). Сравнительный анализ E -профилей, построенных на основе всех измеренных в динамике структурных состояний (значений E) для выборки нуклеосом $N(+35, +112)$, не выявил ни до, ни после образования комплекса с ресвератролом (100 мкМ) существенных динамических изменений структуры нуклеосом в области, удаленной от ее границы (рис. 2д). Анализ иммобилизованных нуклеосом $N(+13, +91)$ с метками в положениях 13 и 91 п.н. показал, что E -профили индивидуальных нуклеосом на основе величин E , измеренных в динамике (рис. 2в,г), не соответствуют критерию нормальности (данные не показаны) и, по-видимому, отражают существование как минимум двух структурных состояний, в которых может находиться каждая нуклеосома. Аналогичный вывод был сделан при анализе E -профилей индивидуальных комплексов нуклеосом $N(+13, +91)$ с ресвератролом (100 мкМ). Сравнение E -профилей, рассчитанных на основе всех измеренных в динамике значений E для выборки нуклеосом $N(+13, +91)$ выявило отличия E -профилей нуклеосом и их комплексов с ресвератролом (рис. 2е). С учетом вывода о возможном существовании двух структурных состояний E -профили нуклеосом и их комплексов с ресвератролом были представлены в виде суперпозиции двух гауссовых пиков с максимумами 0.46 и 0.82 (рис. 2ж,з). Эти пики соответствуют двум конформациям, между которыми нуклеосома может осуществлять переход в динамике. Для нуклеосом $N(+13, +91)$ заселенности состояний $E = 0.46$ и $E = 0.82$ составляют соответственно 70 и 30%, а для комплексов с ресвератролом — 82 и 18%. Поэтому можно предположить, что ресвератрол вблизи границы нуклеосомы стабилизирует конформацию с $E = 0.46$, затрудняя переход нуклеосомы в конформацию с $E = 0.82$.

Исследования показали, что взаимодействие с нуклеосомой без внесения значительных изменений в ее структуру существенно отличает ресвератрол от полифенола кверцетина, который по данным spFRET-микроскопии при 24 мкМ вызывает значительные изменения в укладке нуклеосом-

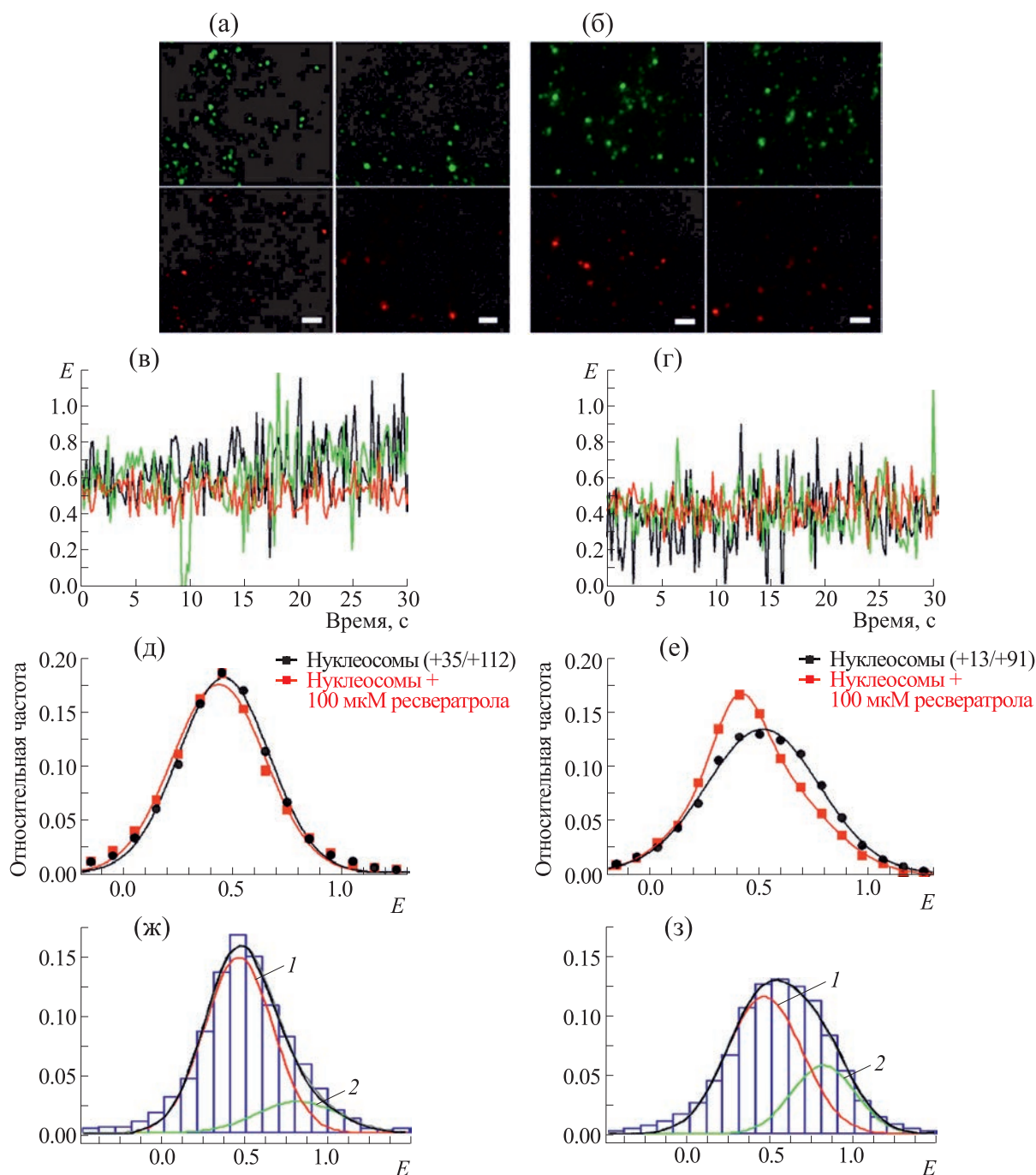


Рис. 2. Исследование взаимодействия ресвератрола с нуклеосомами методом TIRF-spFRET микроскопии. (а), (б) — Изображения одиночных иммобилизованных нуклеосом N(+35, +112) (а) и N(+13, +91) (б), полученные методом TIRF-микроскопии: флуоресценция Cy3 и Cy5 в результате FRET-эффекта в составе нуклеосом при возбуждении Cy3 длиной волны 514 нм. Масштабная метка — 2 мкм. (в), (г) — Измерения динамики величины FRET (E) одиночных нуклеосом N(+13, +91) в отсутствие (в) и в присутствии (г) ресвератрола (100 мкМ). Данные получены с временным разрешением 0.2–0.3 с. (д), (е) — Частотные распределения состояний нуклеосом N(+35, +112) (д) и N(+13, +91) (е) по величине E , рассчитанные на основе всех измеренных в динамике значений E для выборки иммобилизованных нуклеосом в отсутствие и в присутствии ресвератрола (100 мкМ). (ж), (з) — Представление E -профилей, показанных на панели (е), в виде суперпозиции (черная линия) двух гауссовых пиков с максимумами $E = 0.46$ (кривые 1) и $E = 0.82$ (кривые 2).

ной ДНК на октамере гистонов в 40% нуклеосом [31]. По данным спектроскопии кругового дихроизма и флуоресцентного анализа конкуренции

кверцетина с интеркалятором акридиновым оранжевым за связывание с ДНК, основным типом взаимодействия кверцетина с ДНК является

интеркаляция между парами нуклеотидов [21]. Ресвератрол, по данным спектроскопии ЯМР, кругового дихроизма и флуоресцентного анализа, связывается в узкой бороздке ДНК [20, 21, 32]. Анализ взаимодействия ресвератрола с ДНК из тимуса телят свидетельствует, что константа диссоциации комплекса варьирует в диапазоне 52–180 мкМ в зависимости от температуры раствора [18, 19]. Разница в типе взаимодействия кверцетина и ресвератрола с нуклеосомами, как предполагается, связана со стабилизированной планарной структурой кверцетина, облегчающей интеркаляцию [21].

Проведенные исследования позволяют заключить, что ресвератрол не обладает выраженной способностью дестабилизировать структуру хроматина в контексте нуклеосом. Однако для ресвератрола в комплексе с нуклеосомной ДНК возрастает вероятность взаимодействия с ферментами, которые участвуют в метаболизме ДНК и являются мишенями полифенола. В частности, адресность и функциональные последствия ингибирования топоизомеразы II [17, 33] нуклеосом-связанным ресвератролом могут быть существенно более выражены, чем в нуклеоплазме, а ингибирование ДНК-полимеразы α [17] может значительно затруднять репарацию нуклеосомной ДНК. В свою очередь, учитывая данные о слабом влиянии ресвератрола на структуру нуклеосом (рис. 1), наблюдаемые в клетках ресвератрол-опосредованная активация АТМ-киназы и последующий апоптоз [17, 33], вероятно, связаны с репликативным стрессом, а не с изменением структуры хроматина, вызываемым ресвератролом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» и ЦКП ИБХ 2020 (<http://ckp.ibch.ru/devices>).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Tangutoori, P. Baldwin, and S. Sridhar, *Maturitas*, **81** (1), 5 (2015).
2. M. Jhanji, C. N. Rao, and M. Sajish, *GeroScience*, **43**, 1171 (2021).
3. R. Pangeni, J. K. Sahni, J. Ali, et al., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **11**, 1285 (2014).
4. B. Tian and J. Liu, *J. Sci. Food Agricult.*, **100**, 1392 (2020).
5. L. Bavaresco, *Drugs Exp. Clin. Res.*, **29**, 181 (2003).
6. D. Delmas, A. Lancon, D. Colin, et al., *Curr. Drug Targets*, **7**, 423 (2006).
7. I. Arora, M. Sharma, and T. O. Tollefsbol, *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (18), 4567 (2019).
8. F. Islam, M. H. Nafady, M. R. Islam, et al., *Mol. Neurobiol.*, **59**, 4384 (2022).
9. S. A. Almatroodi, M. A. Alsahli, A. S. M. Aljohani, et al., *Molecules*, **27**, 2665 (2022).
10. A. Kumar, B. D. Kurmi, A. Singh, and D. Singh, *Exploration of Targeted Anti-Tumor Therapy*, **3**, 643 (2022).
11. D. Fan, C. Liu, Z. Zhang, et al., *Molecules*, **27** (21), 7524 (2022).
12. P. Pan, J. Li, W. Lin, and G. Long, *Intervirology*, **65**, 206 (2022).
13. K. I. Kirsanov, O. A. Vlasova, T. I. Fetisov, et al., *Adv. Mol. Oncol. (In Russian)*, **5** (4), 41 (2018).
14. L. X. Zhang, C. X. Li, M. U. Kakar, et al., *Biomed. Pharmacotherapy*, **143**, 112164 (2021).
15. A. Shaito, A. M. Posadino, N. Younes, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2084 (2020).
16. K. T. Howitz, K. J. Bitterman, H. Y. Cohen, et al., *Nature*, **425**, 191 (2003).
17. S. A. Gatz and L. Wiesmuller, *Carcinogenesis*, **29**, 321 (2008).
18. S. Zhang, X. Sun, Z. Jing, and F. Qu, *Spectrochim. Acta. Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy*, **82**, 213 (2011).
19. C. N. N'Soukpo-Kossi, P. Bourassa, J. S. Mandeville, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **151**, 69 (2015).
20. S. Kumar, P. Kumar, and M. S. Nair, *Spectrochim. Acta. Part A – Mol. Biomol. Spectroscopy*, **252**, 119488 (2021).
21. C. Ji, X. Yin, H. Duan, and L. Liang, *Int. J. Biol. Macromolecules*, **168**, 775 (2021).
22. O. I. Kulaeva, D. A. Gaykalova, N. A. Pestov, et al., *Nature Struct. Mol. Biol.*, **16**, 1272 (2009).
23. A. Thastrom, P. T. Lowary, H. R. Widlund, et al., *J. Mol. Biol.*, **288**, 213 (1999).
24. N. V. Malyuchenko, D. O. Koshkina, A. N. Korovina, et al., *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **75**, 142 (2020).

25. A. V. Lyubitelev, M. S. Mikhaylova, N. V. Maluchenko, et al., *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **71**, 108 (2016).
26. Н. С. Герасимова, А. Н. Коровина, Д. А. Афонин и др., *Биофизика*, **67**, 222 (2022).
27. K. S. Kudryashova, O. V. Chertkov, Y. O. Ivanov, et al., *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, **71**, 97 (2016).
28. D. A. Gaykalova, O. I. Kulaeva, V. A. Bondarenko, and V. M. Studitsky, *Methods Mol. Biol.*, **523**, 109 (2009).
29. N. V. Maluchenko, D. K. Nilov, S. V. Pushkarev, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (22), 12127 (2021).
30. K. S. Kudryashova, O. V. Chertkov, D. V. Nikitin, et al., *Methods Mol. Biol.*, **1288**, 395 (2015).
31. T. Andreeva, A. Lyubitelev, E. Bondarenko, et al., *Microscopy and Microanalysis*, **27**, 1740 (2021).
32. M. S. Nair, S. D'Mello, R. Pant, and K. M. Poluri, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **170**, 217 (2017).
33. B. Demoulin, M. Hermant, C. Castrogiovanni, et al., *Toxicology in vitro*, **29**, 1156 (2015).

On the Interaction of Resveratrol with Nucleosomes

**N.V. Maluchenko*, T.V. Andreeva*, O.V. Geraskina*, N. S. Gerasimova*, A.V. Lubitelev*,
A.V. Feofanov*, and V.M. Studitsky*, ****

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

***Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111-2497, USA*

The natural polyphenol resveratrol has anti-inflammatory, antioxidant, antitumor and geroprotective properties. The wide range of resveratrol activities is determined by its ability to modulate a variety of signaling pathways in the cell and interact with various target molecules. It is known that resveratrol interacts with DNA, but the effect of this interaction on the structure of chromatin has not been studied. In this work, we studied the effect of resveratrol on the structure of the nucleosome, the functional and structural unit of chromatin. Fluorescent microscopy of single nucleosomes based on Förster resonance energy transfer and analysis of changes in the electrophoretic mobility of nucleosomes in polyacrylamide gel showed that, at a concentration of ~100 μ M, resveratrol affects the conformation of DNA linker regions, limits the conformational dynamics of DNA near the nucleosome boundary, but does not cause significant changes in the folding of nucleosomal DNA on the histone octamer. A small effect of resveratrol on the structure of the nucleosome compared to quercetin is presumably determined by the binding mode of resveratrol in a minor groove of DNA.

Keywords: resveratrol, chromatin, nucleosome, spFRET, TIRF

ВЛИЯНИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛАЗЕРА НА СВОЙСТВА БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА *in vitro*

© 2023 г. Д.А. Серов*, Е.И. Нагаев*, А.И. Кулешова*, В.Е. Реут**, М.Е. Асташев*.*

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

**Белорусский государственный университет, просп. Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь

#E-mail: astashev@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.10.2022 г.

После доработки 09.11.2022 г.

Принята к публикации 16.11.2022 г.

Исследовано влияние хирургического лазера на физико-химические свойства молекул бычьего сывороточного альбумина. После воздействия лазерного излучения увеличивается оптическая плотность белковых растворов, уменьшается интенсивность флуоресценции, на спектре комбинационного рассеяния наблюдается существенное уменьшение интенсивности полосы α -спиралей, коэффициент преломления растворов существенно не изменился. При этом увеличивалась вязкость растворов альбумина, а псевдопластичность уменьшалась. Массовое повреждение полипептидной цепи белка не наблюдалось, напротив, наблюдалась интенсивная агрегация. Таким образом, при действии излучения хирургического лазера в растворе альбумина преобладают процессы частичной денатурации и агрегации, в меньшей степени повреждаются ароматические аминокислотные остатки, при этом не наблюдается фрагментация молекул альбумина.

Ключевые слова: лазерное излучение, оптический пробой, пространственная структура белка.

DOI: 10.31857/S0006302923030079, EDN: FQPRSL

Сегодня лазерная хирургия используется крайне широко, с помощью лазерной техники выполняются оперативные вмешательства в различные ткани и части тела (дерма, костная ткань, мышечная ткань, жировая ткань, сухожилия, почти все внутренние органы, глаза и т.п.) [1]. Разные ткани имеют различные оптические (коэффициент отражения, коэффициент преломления, спектральные характеристики, глубина проникновения излучения) и теплофизические (теплопроводность, теплоемкость) свойства [2]. Поэтому для каждой ткани и задачи внутри ткани необходимо подбирать длину волны лазерного излучения, длительность воздействия, частоту следования импульсов, плотность потока энергии и т.п. [3]. При лазерной хирургии разрушение происходит непосредственно в процессе воздействия лазерного излучения на ткань [4]. Обычно используются лазеры, плотность мощности излучения которых достаточна для удаления, разрушения или термического некроза клеток и тканей [5]. В настоящее время лазеры на основе активной среды Nd:YAG являются наиболее распространенными [6]. Популярность объясняется тем,

что при длине волны Nd:YAG-лазера 1064 нм большинство тканей имеют низкий коэффициент поглощения [7]. Из-за этого эффективная глубина проникновения такого излучения в ткани довольно велика, это обеспечивает хороший гемостаз и коагуляцию [8]. При этом при воздействии на ткань хирургических лазеров наблюдается развитие нелинейных процессов. Одним из наиболее часто регистрируемых нелинейных процессов является оптический пробой, быстропротекающий необратимый процесс превращения среды из прозрачной в сильно поглощающую под действием интенсивного излучения [9]. Оптический пробой происходит при превышении некоторых пороговых значений плотности энергии лазерного излучения [10]. Известно, что в присутствии наноразмерных примесей вероятность оптического пробоя слабопоглощающих сред увеличивается на несколько порядков [11]. Молекулы белков в силу своего размера также являются наноразмерными объектами. Сегодня неизвестно, могут ли молекулы белков, приводить к увеличению вероятности пробоя в фосфатном буфере. Также мало что известно об изменениях, которые могут происходить в молекулах белков при оптическом пробое.

Сокращение: БСА – бычий сывороточный альбумин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лазерное облучение. В качестве мишени был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА) (SigmaAldrich, США), растворенный в фосфатном буферном растворе (SigmaAldrich, США) в концентрации 0.5 мг/мл при pH 7.2. Раствор белка без лазерного воздействия был использован в качестве контроля. В качестве источника лазерного излучения использовали Nd:YAG-лазер NL300 (Ekspla, Литва) со следующими параметрами: длительность импульса $\tau = 4$ нс, частота $\nu = 1$ кГц, длина волны $\lambda = 532$ нм, энергия в импульсе $\epsilon = 2$ мДж. Излучение лазера фокусировалось в центре кюветы и перемещалось вдоль прямой линии длиной 1 см со скоростью 700 м/с при помощи гальвано-механической системы зеркал (рис. 1). Перемещение фокуса излучения в кювете обусловлено необходимостью инициирования пробоя в невозмущенной среде, а также избегания тепловой дефокусировки и дополнительного рассеяния на пузырьках образующегося газа [12].

Дифференциальная двухлучевая спектроскопия. Спектры поглощения образцов были получены с помощью спектрофотометра Cintra 4040 (GBC Scientific Equipment Ltd, Австралия). Измерения выполняли в кварцевых кюветах с длиной пути 10 мм при комнатной температуре ($\sim 22^\circ\text{C}$). Регистрацию спектров поглощения выполняли до воздействия, а также после 2.5, 5, 15 и 30 мин воздействия лазера. Для каждого варианта было выполнено не менее шести независимых измерений.

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Спектры комбинационного рассеяния были записаны с помощью микроскопа Senterra II (Bruker Optik GmbH, Германия) с каплей водного раствора БСА (5 мг/мл), высушенного на подложке из CaF_2 , в контроле и после 30 мин лазерного воздействия. Регистрацию вели при установленном объективе $50\times$, длине волны возбуждающего света 532 нм, мощности лазера 12.5 мВт, времени накопления 2 с. С каждого образца записывали не менее 100 спектров, которые далее усредняли. Для каждого варианта было выполнено как минимум три независимых измерения для обеспечения воспроизводимости. Для дальнейшей обработки спектров использовали программное обеспечение OPUS 8.2.28 (Bruker Optik GmbH, Германия). Обработка спектров включала следующие этапы: 1) коррекция методом «изогнутой резинки», 2) нормализация «Min-Max»; 3) сглаживание (число точек сглаживания 17) [13].

Динамическое рассеяние света. Гидродинамический размер частиц измеряли с помощью Zetasizer ULTRA Red Label (Malvern Panalytical Ltd., Великобритания). Для измерения брали 1 мл раствора БСА (5 мг/мл) до лазерного воздействия, через 5 и 30 мин после лазерного воздействия. Из-

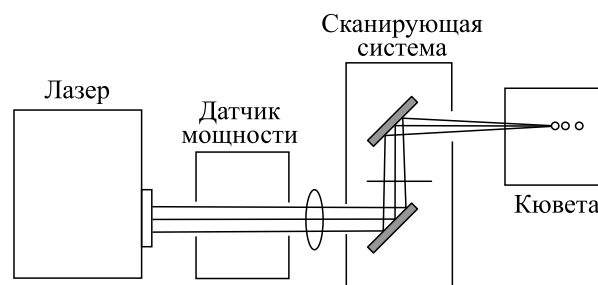


Рис. 1. Принципиальная оптическая схема установки для лазерного облучения растворов белков в условиях оптического пробоя.

мерение выполняли в пластиковых кюветах при комнатной температуре ($\sim 22^\circ\text{C}$). Для каждого варианта было выполнено пять независимых экспериментов. Интегральное распределение частиц в растворе по величине гидродинамического диаметра рассчитывали с помощью программного обеспечения ZS Xplorer по алгоритму, описанному в предыдущей работе [14].

Флуоресцентная спектроскопия. Спектры флуоресценции белковых растворов БСА были записаны с помощью спектрометра FP-8300 (JASCO Applied Sciences, Канада). Измерения выполняли при температуре $\sim 22^\circ\text{C}$ в кварцевой кювете с длиной пути 10 мм, содержащей 1.8 мл раствора БСА (5 мг/мл). Измерения выполняли до лазерного воздействия, через 5 и 30 мин воздействия. Для каждого варианта было выполнено три независимых эксперимента. При повторных измерениях максимальная интенсивность испускания изменялась не более чем на 2% [15].

Вискозиметрия. Измерения вязкости белковых растворов выполняли на вискозиметре SmartPave 102 (Anton Paar GmbH, Австрия) с измерительным набором DG26.7 и ячейкой C-PTD200. Для измерения использовали 3.8 мл образца. Все измерения выполняли при температуре в измерительной ячейке 25°C , в диапазоне скоростей смешения от 1000 до 100 с^{-1} . Для каждого варианта было выполнено три независимых эксперимента. Расчет вязкости выполняли с помощью программного обеспечения RheoCompass™ (Anton Paar GmbH, Австрия). Более детально процедуры, используемые при определении вязкости, описаны ранее [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании влияния времени воздействия лазерного излучения на оптическую плотность раствора БСА (рис. 2) было показано, что при воздействии лазерного излучения оптическое поглощение раствора БСА увеличивается. При этом оптическое поглощение в диапазоне

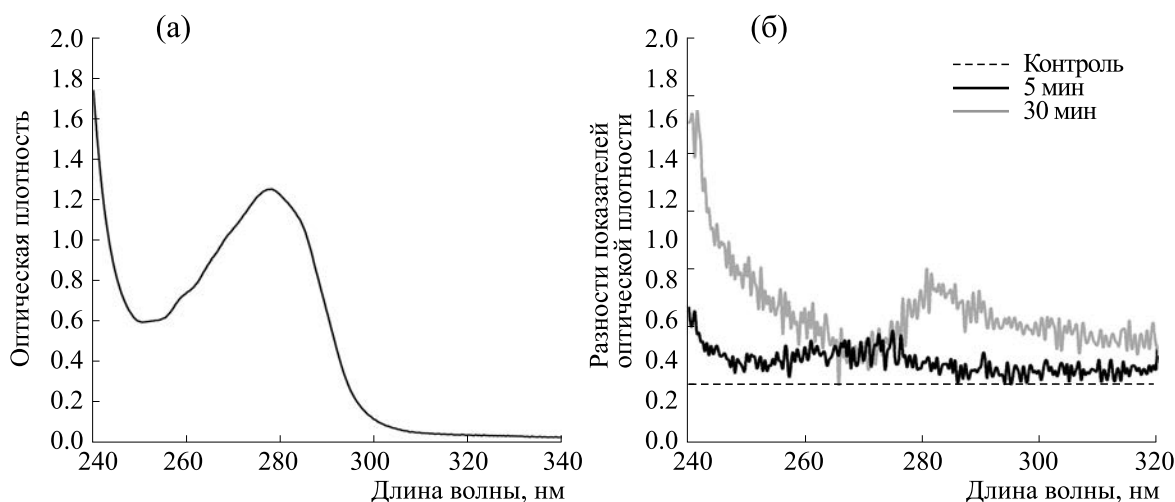


Рис. 2. Влияние времени лазерного облучения на оптическую плотность водного раствора БСА: (а) — спектр поглощения водного раствора БСА (0.5 мг/мл) в контроле; (б) — разности показателей поглощения в районе локального минимума 250 нм и максимума 280 нм. Данные получены с помощью дифференциальной двулучевой спектроскопии в субнанометровом разрешении. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение (для упрощения восприятия показаны значения SD для контроля и 30 мин экспозиции), $n = 6$.

длин волн 250–280 нм линейно растет в течение 30 мин воздействия. Поглощение раствора БСА увеличивается почти на 0.05 единицы оптической плотности как в локальном минимуме (~250 нм), так и в локальном максимуме (~280 нм). Нужно отметить, что подобные изменения происходят также в более длинноволновой области (>310 нм). Таким образом, наблюдается увеличение интенсивности поглощения и в спектральном диапазоне поглощения ароматических аминокислотных остатков, и в диапазоне >310 нм. Можно предполагать несколько вариантов объяснения полученных результатов: 1) наблюдается химическая модификация ароматических аминокислотных остатков, при которой возрастает оптическое поглощение; 2) поглощение изменяется за счет частичной денатурации белка; 3) оптическая плотность увеличивается из-за не специфического рассеяния, вызванного агрегацией белка.

При исследовании влияния времени воздействия лазерного излучения на флуоресценцию раствора БСА (рис. 3) показано, что максимум возбуждения флуоресценции наблюдается при 296 нм. Положение максимума возбуждения не изменяется после воздействия на раствор БСА лазерного излучения как в течение 5 мин, так и в течение 30 мин. Интенсивность флуоресценции за 5 мин воздействия лазерного излучения уменьшается на 2%, а при действии лазерного излучения в течение 30 минут — почти на 10%. Максимум пика эмиссии как для интактного белкового раствора, так и для раствора, подвергнутого воздействию лазерного излучения, находится в районе 337–338 нм. При этом форма пятна флуоресценции на 3D-картах существенно не изменя-

ется при воздействии лазерного излучения. Также на флуоресцентных 3D-картах наблюдается на порядок меньший по интенсивности пик ($I_{em}/I_{ex} = 335/254$ нм). При воздействии лазерного излучения в течение 30 мин наблюдается уменьшение интенсивности данного пика на 15%. Таким образом, показано, что при воздействии лазерного излучения на белковый раствор наблюдается незначительное уменьшение интенсивности флуоресценции ароматических аминокислотных остатков. Данное изменение может быть связано как с деградацией ароматических аминокислот, так и с изменением вторичной структуры молекулы.

Для исследования возможного изменения вторичной структуры молекулы белка при действии хирургического лазера использован метод микроскопии комбинационного рассеяния. Исследовано влияние времени воздействия лазерного излучения на спектр комбинационного рассеяния раствора БСА (рис. 4). Установлено, что после 30-минутного воздействия лазерного излучения в спектрах белка не наблюдалось существенных изменений. Из особенностей следует отметить уменьшение интенсивностей в пиках с максимумами 1570 и 1770 cm^{-1} . Вероятно, такое изменение интенсивности в сигнале комбинационного рассеяния может свидетельствовать только о незначительной перестройке внутри молекулы белка. Таким образом, установлено, что при действии излучения хирургического лазера произошли структурные изменения, однако нельзя однозначно утверждать, чем эти перестройки вызваны. Для выяснения этого вопроса был прецизи-

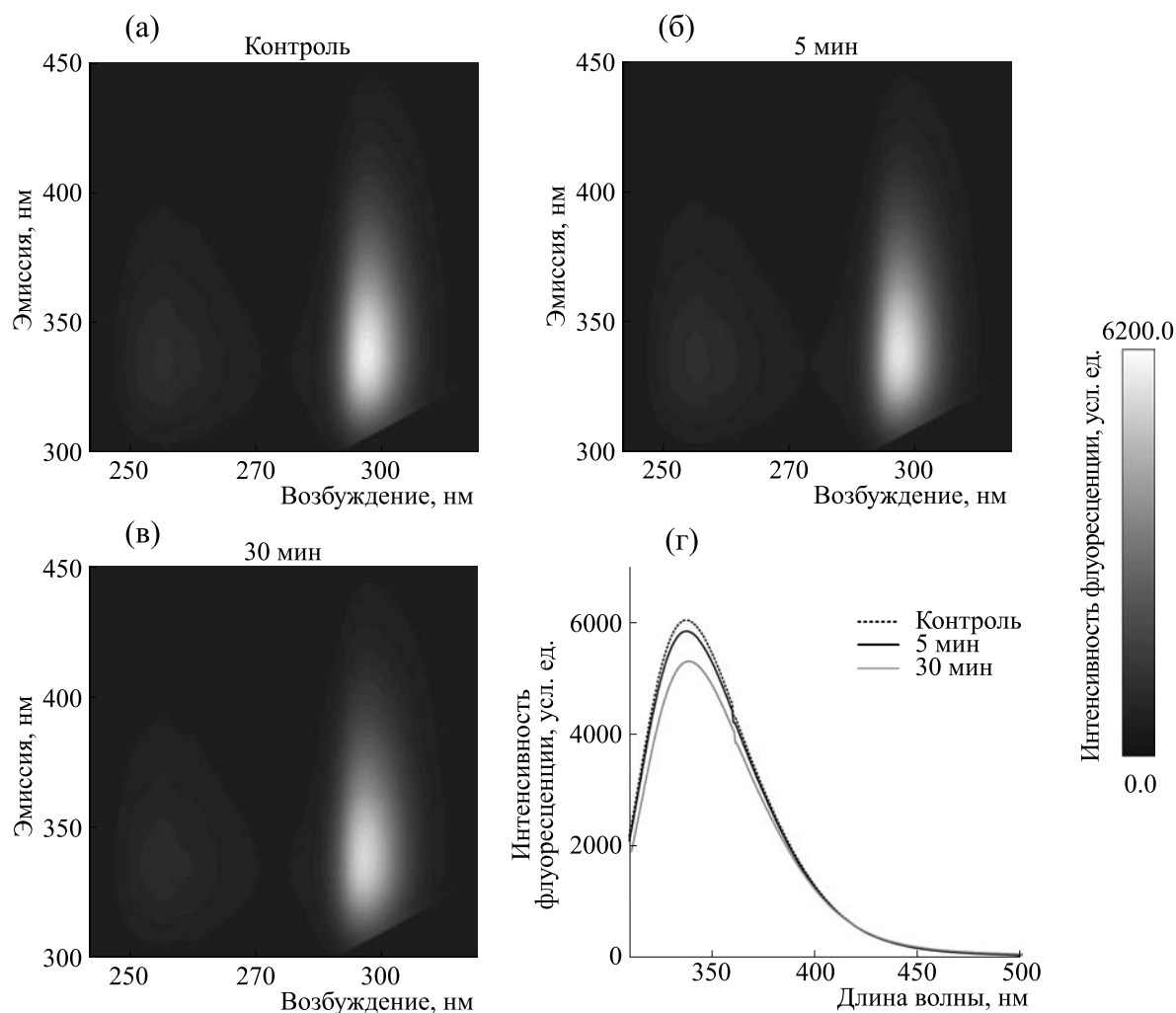


Рис. 3. Влияние времени лазерного облучения на флуоресценцию белкового раствора БСА с концентрацией 5 мг/мл. Представлены 3D-карты флуоресценции в контроле (а), после 5 мин (б) и 30 мин (в) лазерного облучения. По оси абсцисс — диапазон длин волн эмиссии в нм (I_{em}), по оси ординат — диапазон длин волн возбуждения в нм (I_{ex}). (г) — Спектры флуоресценции ($I_{ex} = 297$ нм) раствора БСА с концентрацией 5 мг/мл в контроле и после 5 и 30 мин лазерного облучения. Интенсивность флуоресценции выражена в относительных единицах с помощью шкалы градаций серого, которая одинакова для всех трех спектров.

онно измерен коэффициент преломления раствора бычьего сывороточного альбумина и проведены реологические исследования.

Исследовано влияние времени лазерного облучения на показатель рефракции раствора БСА при длинах волн 435.8, 589.3 и 632.8 нм (рис. 5). Показано, что показатель преломления раствора БСА существенным образом не меняется после воздействия лазерного излучения на всех исследованных длинах волн.

Белковые растворы являются неньютоновскими жидкостями, поэтому их вязкость необходимо исследовать при различных скоростях смешения. При исследовании влияния времени лазерного облучения на вязкость раствора БСА при различных скоростях смешения (рис. 6) было показано,

что для раствора БСА характерна псевдопластичность, которая характеризуется тем, что вязкость жидкости уменьшается при увеличении скоростей смешения или напряжений сдвига. Также показано, что воздействие лазерного излучения на растворы БСА приводит к увеличению вязкости. При этом при высоких скоростях смешения вязкость контрольного раствора и раствора, облученного в течение 30 мин, отличается менее чем на 10%. При низких скоростях смешивания вязкость контрольного раствора и раствора, облученного в течение 30 мин, почти не отличается, следовательно, лазерное облучение приводит к уменьшению псевдопластичности раствора БСА. Поскольку при высоких скоростях смешивания ($>400 \text{ с}^{-1}$) вязкость увеличивается, увеличивается

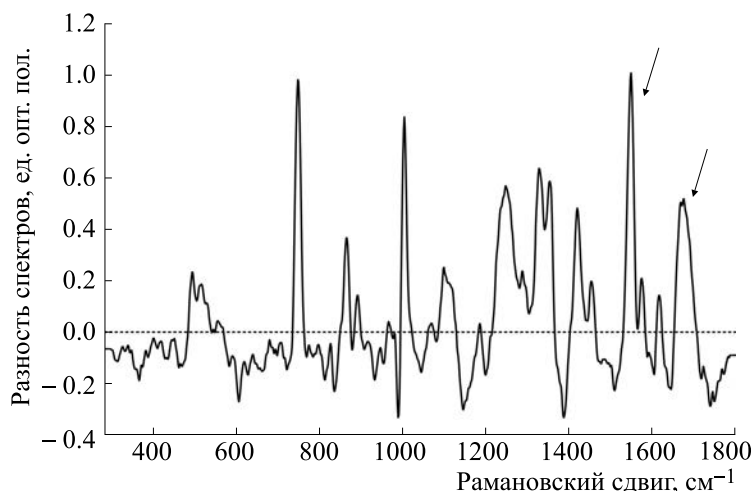


Рис. 4. Разность спектров комбинационного рассеяния раствора БСА (0.5 мг/мл) в контроле и после лазерного облучения в течение 30 мин. Данные получены с помощью рамановского микроскопа. Стрелками указано изменение интенсивности в пиках 1570 и 1770 см^{-1} .

и сопротивление перемещению одной их части жидкости относительно другой. Другими словами, молекулы белка более интенсивно взаимодействуют друг с другом, что обычно в белковых растворах приводит к их агрегации. Для проверки данного предположения была изучена динамика распределения по размерам светорассеивающих частиц в растворе БСА.

Результаты исследования влияние времени воздействия лазерного облучения на динамику

распределения по размерам БСА и его агрегатов в растворе представлены в табл. 1. Показано, что интактный препарат белка содержит индивидуальные молекулы БСА (средний гидродинамический диаметр около 3 нм), а также агрегаты со средним гидродинамическим диаметром 25 и 400 нм. На один агрегат размером 25 нм в растворе приходится около миллиона индивидуальных молекул БСА, на один агрегат с размером 200 нм — более миллиарда индивидуальных молекул БСА. При воздействии лазерного излучения не наблюдается увеличения среднего гидродинамического диаметра индивидуальных молекул БСА.

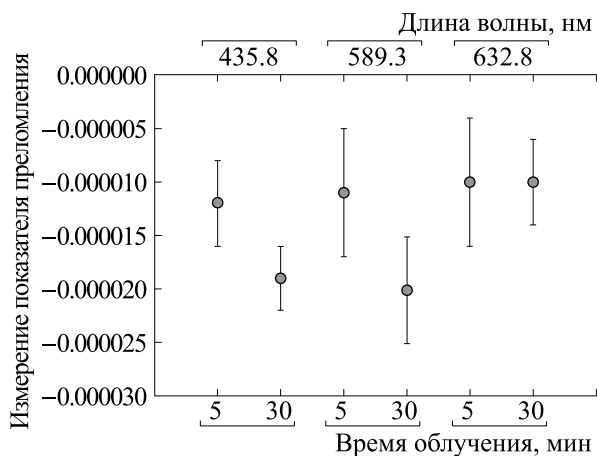


Рис. 5. Влияние времени лазерного облучения на показатель преломления водного раствора БСА при длинах волн 435.8, 589.3 и 632.8 нм. Время облучения лазером указано в подписи к оси абсцисс. По оси ординат — разность между значениями показателя преломления в соответствующем варианте эксперимента и контроле (до облучения лазером). Данные получены с помощью прецизионной рефрактометрии. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение, $n = 3$.

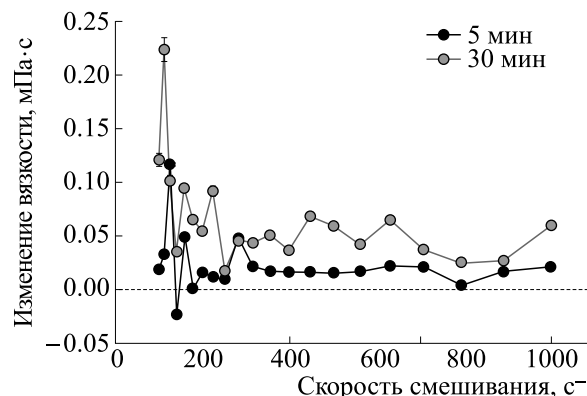


Рис. 6. Влияние времени лазерного облучения на вязкость водного раствора БСА при различных скоростях смешивания. Время облучения лазером указано в легенде рисунка. По оси ординат — разность между значениями вязкости в соответствующем варианте эксперимента и контроле (до облучения лазером). Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение, $n = 3$.

Таблица 1. Влияние лазерного облучения на эволюцию распределения по размерам молекул БСА и его агрегатов в водном растворе

№ пика	Размер, нм	Интенсивность, %
Контроль		
1	2.3	8.81 ± 0.89
2	24.9	2.73 ± 0.67
3	108.0	2.45 ± 0.84
5 мин облучения		
1	2.9	6.90 ± 0.44
2	27.8	2.69 ± 0.40
3	229.8	3.41 ± 1.30
30 мин облучения		
1	2.9	6.494 ± 0.52
2	32.3	2.66 ± 0.41
3	461.3	5.26 ± 0.36

Примечание. Данные получены методом динамического светорассеяния. Результаты представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение, $n = 5$.

При этом интенсивность светорассеяния на индивидуальных молекулах БСА при воздействии лазерного излучения в течение 30 мин уменьшается на 10–15%. Также за 30 мин воздействия лазером гидродинамический диаметр «малых» агрегатов увеличивается с 25 нм до 30 нм. Гидродинамический диаметр «больших» агрегатов за 30 мин воздействия увеличивается с 200 нм до 400 нм. При этом интенсивность светорассеяния на таких агрегатах увеличивается почти в два раза. На один агрегат с размером 400 нм приходится несколько триллионов индивидуальных молекул БСА. Само же количество «больших» агрегатов увеличилось более чем на один порядок величины.

ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что после воздействия лазерного излучения наблюдается увеличение интенсивности поглощения белковых растворов (рис. 2). При этом увеличение оптической плотности наблюдается как в диапазоне поглощения ароматических аминокислотных остатков, так и в более длинноволновой области (310 нм). Можно предполагать, что полученные данные могут свидетельствовать об изменениях в структуре белка [17]. Известно, что при оптическом пробое образуется большое количество как восстановительных, так и окислительных эквивалентов [18]. Наблюдается генерация ультрафиолетового излучения, ударных акустических волн, микрообъемов с существенным повышением температуры [19]. При таком наборе воздействий может наблюдаться 1) химическая модификация аминокислотных остатков; 2) фрагментация полипептидной цепи; 3) изменение третичной и вторичной структуры молекул

БСА; 4) частичная денатурация и 5) агрегация молекул. Нужно отметить, что похожий набор событий происходит с белками при действии окислительного стресса [20], который развивается в живых системах при действии на них различных физических и химических факторов [21], при развитии воспалений [22], гипоксии [23] и т.д.

Исследована флуоресценция белкового раствора БСА после воздействия лазерного излучения (рис. 3). Обычно максимум возбуждения приходится в диапазоне длин волн 275–290 нм [24], мы же зарегистрировали максимум в более длинноволновой области на 295 нм, что наблюдается при высоких концентрациях белка вследствие флуоресценции остатков ароматических аминокислот. Установлено, что при действии лазерного излучения интенсивность флуоресценции несколько уменьшается. При этом не наблюдается изменения максимума эмиссии. Химическая модификация флуорофора обычно влияет на форму пятна эмиссии на 3D-карте флуоресценции. Однако нами установлено, что форма пятна флуоресценции на 3D-картах существенно не изменяется. Таким образом, можно утверждать, что при действии оптического пробоя происходит незначительная деградация ароматических аминокислотных остатков. Для исследования возможного изменения вторичной структуры молекулы белка при оптическом пробое использован метод рамановской микроскопии (рис. 4). В спектрах БСА не наблюдалось существенных изменений, единственные изменения наблюдались в районе 1570 см^{-1} и 1770 см^{-1} . Данные изменения связаны с деградацией α -спиралей [25]. Изменения в структуре α -спиралей обычно ведут к частичной денатурации или агрегации молекул. При частичной денатурации происходит суще-

ственное увеличение количества молекул воды в гидратной оболочке белка, при этом наблюдается изменение в коэффициенте преломления [26]. Мы с высокой точностью измерили коэффициент преломления на разных длинах волн (рис. 5) и не зафиксировали существенных отличий. Агрегация молекул белка, в том числе и «мягкая», всегда приводит к изменению реологических свойств [27]. Установлено, что воздействие лазерного излучения с одной стороны приводит к увеличению вязкости растворов БСА, а с другой — уменьшает псевдопластичность коллоидного раствора (рис. 6). Такие изменения в растворе могут свидетельствовать о более интенсивном взаимодействии молекул белка друг с другом (агрегация) и об отсутствии фрагментации полипептидной цепи. Исследование эволюции по размеру светорассеивающих частиц в растворе БСА подтверждает развитие агрегации (табл. 1). Интересно, что после воздействия лазерного излучения не наблюдается сдвига пика индивидуальных молекул в область меньших размеров. Очевидно, что это свидетельствует об отсутствии массового повреждения полипептидной цепи и присутствии в растворе частей белковой молекулы. Фракция индивидуальных молекул после воздействия лазерного излучения уменьшает интенсивность светорассеяния, но не изменяет положение. При этом фракции агрегатов после воздействия лазерного излучения увеличиваются в размерах и имеют большую интенсивность светорассеяния, то есть в растворах БСА активно происходит агрегация [28]. Таким образом, при действии хирургического лазера в растворе БСА превалируют процессы частичной денатурации и агрегации, в меньшей степени повреждаются ароматические аминокислотные остатки, при этом не наблюдается фрагментации молекул белка.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2022-315 на организацию и развитие научного центра мирового уровня «Фотоника»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. И. Козлов. Лазерная медицина, **1** (1), 6 (1997).
2. К. М. Гираев, Н. А. Ашурбеков, М. А. Магомедов и др., Биофизика, **62** (4), 784 (2017).
3. Д. Г. Кочиев и И. А. Щербаков, Природа, № 3, 3 (2014).
4. Д. Г. Кочиев, С. А. Нарышкин, О. В. Теодорович и др., Оптика и спектроскопия, **119** (3), 424 (2015).
5. Т. Г. Кравченко, А. В. Лаппа и В. П. Турбабин, Лазерные технологии в медицине, **2**, 249-255 (1999).
6. Д. В. Еникеев, Е. А. Лаухтина, М. Р. Аршиев и др., Вестн. РАМН, **75** (2), 162 (2020).
7. Y. H. Rhee, H. Y. Ryu, J. C. Ahn, et al., J. Cosmetic Laser Therapy, 1-8 (2022).
8. A. M. Luke, S. Mathew, M. M. Altawash, et al., J. Lasers Med. Sci., **10** (4), 324 (2019).
9. S. V. Gudkov, I. V. Baimler, O. V. Uvarov, et al., Front. Physics, **8**, (2020).
10. E. Migal, E. Mareev, E. Smetanina, et al., Nonlinear Optics and Applications XI. — SPIE, **11026**, 126 (2019).
11. I. V. Baimler, V. K. Chevokin, V. A. Podvyaznikov, et al., Front. Physics, **9**, (2021).
12. M. Zhilnikova, E. Barmina, I. Pavlov, et al., J. Phys. Chem. Solids, **160**, 110356 (2022).
13. V. S. Novikov, V. V. Kuzmin, S. M. Kuznetsov, et al., Spectrochim. Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **255**, 119668 (2021).
14. N. V. Penkov, Physics of Wave Phenomena, **28** (2), 135 (2020).
15. M. N. Moskovskiy, A. V. Sibirev, A. A. Gulyaev, et al., Photonics, **8** (12), (2021).
16. V. I. Mashchenko, N. N. Sitnikov, I. A. Khabibullina, et al., Polymer Sci., Ser. A, **63** (2), 91 (2021).
17. R. M. Sarimov, V. N. Binhi, T. A. Matveeva, et al., Int. J. Mol. Sci. **22** (5), (2021).
18. E. V. Barmina, A. V. Simakin, and G. A. Shafeev, Chem. Phys. Lett., **678**, 192 (2017).
19. I. V. Baimler, A. B. Lisitsyn, D. A. Serov, et al., Front. Physics, 604 (2020).
20. С. В. Пинчук, И. Б. Василевич, А. Ю. Молчанова и др., Биофизика, **67** (4), 776 (2022).
21. V. I. Bruskov, A. V. Chernikov, V. E. Ivanov, et al., Physics of Wave Phenomena, **28** (2), 103 (2020).
22. N. V. Andrianova, D. B. Zorov, and E. Y. Plotnikov, Biokhimiya, **85** (12), 1591 (2020).
23. M. Savyuk, M. Krivonosov, T. Mishchenko, et al., Antioxidants (Basel, Switzerland), **9** (8), (2020).
24. F. W. Teale and G. Weber, Biochem. J., **65** (3), 476 (1957).
25. E. S. Allakhverdiev, V. V. Khabatova, B. D. Kossalbayev, et al., Cells, **11** (3), (2022).
26. R. M. Sarimov, T. A. Matveyeva, and V. N. Binhi, J. Biol. Phys., **44** (3), 345-360 (2018).
27. M. Klost, C. Brzeski, and S. Drusch, Food Hydrocolloids, **108**, 106036 (2020).
28. N. F. Bunkin, A. V. Shkirin, B. W. Ninham, et al., ACS Omega, **5** (24), 14689 (2020).

Influence of Laser Radiation of a Surgical Laser on the Structure of Bovine Serum Albumin Molecules *in vitro*

D.A. Serov*, E.I. Nagaev*, A.I. Kuleshova*, V.E. Reut, and M.E. Astashev***

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

***Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Belarus*

The influence of laser radiation of a surgical laser on the physicochemical properties of bovine serum albumin molecules was studied. After exposure to laser radiation, the optical density of protein solutions increases, the fluorescence intensity decreases, a significant decrease of the intensity of the α -helix band on the Raman spectrum is observed and the refractive index of protein solution did not significantly change. However, the viscosity increased, and the pseudoplasticity of aqueous solutions of albumin decreased. There was no massive damage to the protein polypeptide chain, on the contrary, intensive aggregation was observed. Thus, in a bovine serum albumin solution subjected to contact action of laser radiation, the processes of partial denaturation and aggregation prevail, aromatic amino acid residues of the protein are damaged to a lesser extent, and fragmentation of albumin molecules is not observed.

Keywords: laser radiation, optical breakdown, spatial structure of a protein

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЭНДОЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ МИКРОМИЦЕТОВ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОЧАСТОТНОГО ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2023 г. И.О. Макаров*, Д.А. Ключев*, В.Ф. Смирнов*,[#] О.Н. Смирнова*, Н.А. Аникина*, Н.В. Дикарева*, А.Ю. Шишкин*

*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, просп. Гагарина, 23, Нижний Новгород, 603950, Россия

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

Поступила в редакцию 27.09.2021 г.

После доработки 18.01.2023 г.

Принята к публикации 01.02.2023 г.

Исследовано действие низкочастотного импульсного магнитного поля (1.5 Гц) и низкоинтенсивного лазерного излучения (0.3 и 0.7 Вт) на активность эндоцеллюлярных оксидоредуктаз микромицетов, являющихся активными агентами биодеструкции промышленных материалов – *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*. Исследуемые физические факторы имели дозозависимые эффекты на активность внутриклеточных оксидоредуктаз грибов (каталазу, пероксидазу): отмечены как увеличение, так и снижение активности ферментов. Увеличение активности ферментов может способствовать проявлению адаптационных свойств грибов к действию таких физических факторов как низкоинтенсивное лазерное излучение и магнитное поле. Снижение активности эндокаталазы и эндопероксидазы под воздействием указанных факторов возможно подавляет жизнедеятельность микроорганизмов.

Ключевые слова: низкочастотное импульсное магнитное поле, низкоинтенсивное лазерное излучение, микромицеты, эндокаталаза, эндопероксидаза.

DOI: 10.31857/S0006302923030080, EDN: FQTDGG

Известно, что микроскопические грибы способны в качестве источников питания использовать различные субстраты как природного, так и синтетического происхождения. К последним относятся многочисленные материалы и изделия из них [1–3].

Высокая деструктивная активность микромицетов обусловлена мощностью, лабильностью и разнообразием их ферментных систем. Деструкция материалов грибами может быть оценена двояко. С одной стороны, необходимо предотвращать процессы биodeградации и биодеструкции полимерных материалов и изделий из них, т.е. способствовать ресурсосбережению. С другой стороны, высокая деструктивная активность грибов может быть использована для разработки биотехнологий по утилизации техногенных отходов, которыми могут являться, в том числе и отработанные полимерные материалы. Это будет спо-

собствовать решению проблемы защиты окружающей среды от антропогенных воздействий. Также необходимо помнить и о том, что среди грибов могут быть и условно-патогенные представители видов, способные вызвать микогенные аллергии, микотоксикозы и микозы [4].

Все вышеизложенное говорит о важности регуляции метаболизма микромицетов, что, несомненно, скажется как на их деструктивной активности, так и на жизнедеятельности в целом.

В качестве таких регуляторов используются химические и физические факторы. Если действие химических факторов на метаболизм грибов достаточно хорошо изучено, то действие физических факторов в этом плане исследовано недостаточно.

В последнее время в качестве таких факторов используют электромагнитное излучение, например, низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) и магнитные поля (МП) различной природы и интенсивности [5, 6].

Сокращения: НИЛИ – низкоинтенсивное лазерное излучение, МП – магнитное поле.

Ранее нами исследовано действие низкочастотного импульсного магнитного поля и низкоинтенсивного лазерного излучения на мицелиальные грибы — активные биодеструкторы различных полимерных материалов [6, 7].

Установлено, что данные факторы по-разному действуют на споры и вегетативный мицелий грибов. Исследуемые физические факторы имели дозозависимые эффекты на активность внеклеточных оксидоредуктаз грибов (каталазу, пероксидазу); отмечены как увеличение, так и снижение активности ферментов.

Представляло интерес продолжить исследование в этом плане и изучить действие низкочастотного импульсного электромагнитного поля и низкоинтенсивного лазерного излучения на активность эндооксидоредуктаз (каталазы, пероксидазы) микромицетов — деструкторов полимерных материалов, что и явилось целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования служили следующие штаммы мицелиальных грибов, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ИБФМ РАН, Пушкино, Московская обл.): *Penicillium cyclopium* Westling BKM F-265, *Aspergillus niger* van Tieghen BKM F-1119, *Alternaria alternata* (Fr. Keissler BKM F-1120). Эти виды микромицетов являются биодеструкторами различных промышленных материалов и хорошими продуцентами оксидоредуктаз, в частности каталазы и пероксидазы [8].

В качестве физического фактора, воздействующего на грибы, использовали низкочастотное импульсное электромагнитное поле. Для создания поля использовали источник VL2 (пачки по 20 импульсов длительностью 227 мкс с амплитудой магнитной индукции 1.5 мТл, следующие с частотой 1.5 Гц) и применяли генератор фирмы Elektro-Biology Inc. (США).

Также для воздействия на микромицеты использовался многомодовый полупроводниковый InGaP/GaAs/InGaAs-лазер полоскового типа, изготовленный в НИФТИ ННГУ (Нижний Новгород. Режим работы лазера непрерывный, длина волны генерации 980 нм. Изучали воздействие лазера на двух показателях мощности — 0.3 и 0.7 Вт, мощность плотности потока излучения составляла 1 и 2.3 Вт/см² соответственно. Диапазон мощности выбран нами для исключения влияния теплового эффекта на объекты исследований.

Для определения активности эндооксидоредуктаз грибы выращивали в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл с 250 мл жидкой питательной среды Чапека—Докса при перемешивании

(200 об/мин) и температуре $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Время культивирования составляло 10 суток, после чего навески мицелия по 300 мг подвергали воздействию: 1) лазерного излучения, время экспозиции для каждой мощности составляло 5 и 10 мин, 2) электромагнитного поля, время экспозиции составляло 30, 90 и 150 мин. После облучения мицелий помещали в колбы Эрленмейера емкостью 100 мл с 50 мл жидкой питательной среды Чапека—Докса и культивировали еще 10 суток в тех же условиях.

Для оценки активности эндооксидоредуктаз навеску мицелия гриба (500 мг) отделяли от культуральной среды, дезинтегрировали, центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, затем отбирали супернатант для проведения анализа.

Общую активность ферментов (каталазы, пероксидазы) грибов определяли спектрофотометрически на приборе UVmini 1240 (Shimadzu, Япония): каталазную — при длине волны 240 нм по убыли H₂O₂ [9], пероксидазную — при длине волны 535 нм по окислению *para*-фенилендиамина [10]. За единицу активности каждого фермента принимали изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 мин в пересчете на 1 мг белка.

Содержание белка в мицелии определяли методом Лоури—Фолина [11].

Все результаты, полученные не менее чем в трех независимых экспериментах и не менее чем в трех-пяти повторностях, обрабатывали с помощью программ Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2007. Оценку достоверности различий средних значений проводили по критерию Стьюдента для уровня вероятности не менее 95%. На рисунках приведены средние значения всех опытов со стандартными ошибками [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что оксидоредуктазы играют важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов, в том числе микроскопических грибов. Экстрацеллюлярные ферменты участвуют в трансформации различных субстратов природного и синтетического происхождения. Эндооксидоредуктазы участвуют в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза.

В ходе экспериментов нами было установлено, что для всех исследованных грибов была обнаружена активность эндокаталазы и эндопероксидазы. Все грибы имели разную активность данных ферментов. Максимальная активность каталазы обнаружена у *Aspergillus niger*, минимальная — у *P. cyclopium*. Максимальная активность эндопероксидазы была выявлена у *P. cyclopium*, а минимальная у *Alternaria alternata*. Все это говорит о

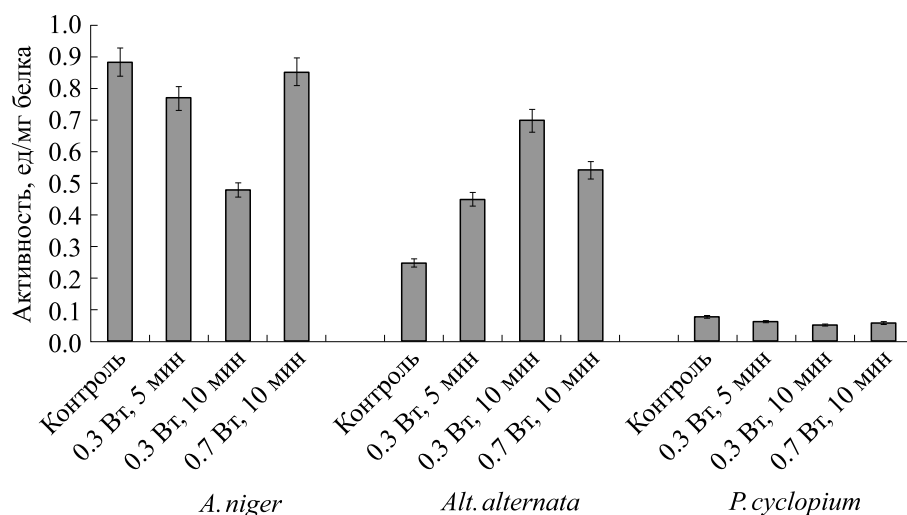


Рис. 1. Влияние НИЛИ на активность эндокатализы грибов.

разных физиолого-биохимических особенностях исследуемых объектов.

Полученные данные, представленные на рис. 1, позволяют сказать, что НИЛИ вызвало снижение активности внутриклеточной катализы *Aspergillus niger* при слабом кратковременном и долговременном воздействиях, при этом минимальная активность фермента отмечена при слабом долговременном воздействии. Таким образом, можно выделить тенденцию снижения активности фермента по мере увеличения времени слабого воздействия мощностью 0.3 Вт.

При анализе данных, полученных при изучении воздействия НИЛИ на активность внутриклеточной катализы *P. cyclopium*, можно подчеркнуть, что при всех вариантах воздействия НИЛИ оказывало ингибирующий эффект на активность

фермента, достигающий максимума при слабом долговременном воздействии. Как для *P. cyclopium*, так и для *A. niger* характерно снижение активности катализы при увеличении времени воздействия.

Хотелось бы подчеркнуть, что для *Alternaria alternata* оказалось свойственно увеличение активности внутриклеточной катализы при всех вариантах воздействия, достигающее при слабом долговременном воздействии максимума более чем в 2.5 раза больше активности контрольного образца.

Интерпретируя результаты, представленные на рис. 2, хотелось бы отметить, что для *Aspergillus niger* характерно увеличение активности внутриклеточной пероксидазы при всех выбранных вариантах воздействия НИЛИ, достигающее мак-

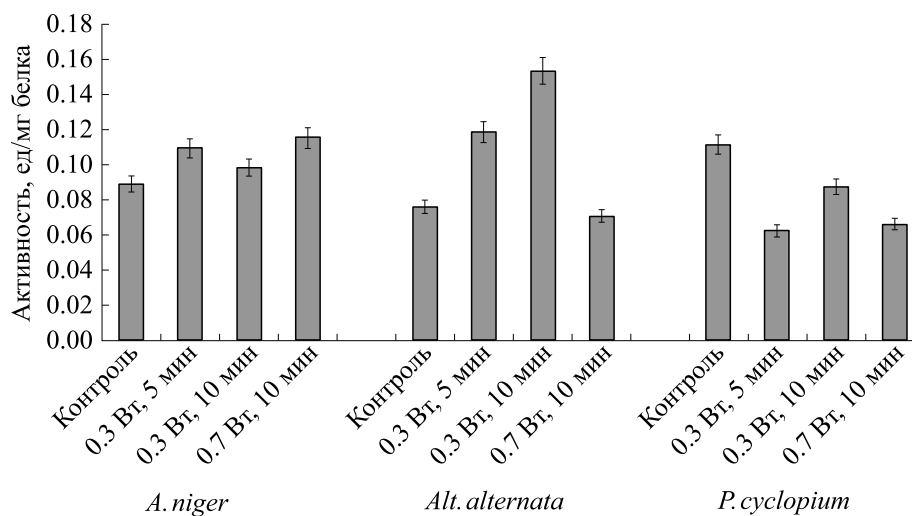


Рис. 2. Влияние НИЛИ на активность эндопероксидазы грибов.

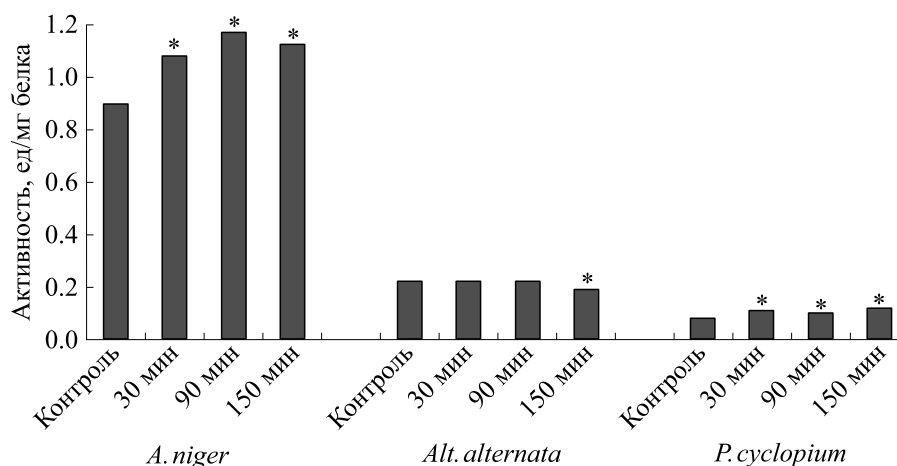


Рис. 3. Влияние МП на активность эндокаталазы грибов.

симула при сильном долговременном воздействии.

Увеличение времени слабого воздействия мощностью 0.3 Вт продемонстрировало тенденцию возвращения активности к сравнимым с контролем уровням, так как прирост активности внутриклеточной пероксидазы при слабом кратковременном воздействии вдвое больше, чем прирост активности при слабом долговременном воздействии.

Для *P. cyclopium* воздействие НИЛИ на активность внутриклеточной пероксидазы продемонстрировало значительный ингибирующий эффект при всех вариантах воздействия, достигающий своего максимума при слабом кратковременном воздействии. Стоит отметить, что увеличение времени воздействия в два раза также приводит к увеличению устойчивости ферментативной активности к воздействию исследуемого фактора.

У *Alternaria alternata* отмечалось увеличение ферментативной активности при слабом кратковременном и долговременном воздействии, достигающее максимума при воздействии излучением мощностью 0.3 Вт в течение 10 мин, в то время как сильное долговременное воздействие не привело к значимым по сравнению с контролем изменениям. Следует отметить, что активность внутриклеточной пероксидазы *Alternaria alternata* пропорционально возрастает при увеличении времени воздействия НИЛИ мощностью 0.3 Вт.

Ингибирующее действие НИЛИ на микроорганизмы, в том числе и на грибы, было показано в работах [6, 13–15]. Механизм воздействия НИЛИ на живые организмы, в том числе и на микроорганизмы на сегодня недостаточно изучены. Известно, что с помощью воздействия источника света различной природы можно влиять на коли-

чество живых клеток, их пространственную ориентацию и физиологию [16].

Учитывая, что интенсивность НИЛИ в наших экспериментах не приводила к нагреванию клеток грибов, механизмы, связанные с термическим воздействием на клетки, исключаются. Комплекс биохимических процессов в тканях организма, происходящих при взаимодействии фотонов света с клетками-мишенями, носит название фотобиомодуляции [17]. Известно, что свет может оказывать антимикробное действие посредством возбуждения белков клеточных рецепторов. Подобное фотовозбуждение может в конечном итоге повлиять на ключевые физиологические сигнальные пути, вызывая апоптоз и гибель клеток.

По мнению ряда авторов, фотобиостимуляция может вызвать образование активных форм кислорода в достаточном количестве, чтобы вызвать инактивацию ряда ферментов, повредить структуры клетки и в конечном счете вызвать их гибель [18–22].

Далее нами исследовалось воздействие магнитного поля на эндооксидоредуктазы (рис. 3 и 4). На рис. 3 показаны результаты по исследованию действия слабого импульсного магнитного поля на активность внутриклеточной каталазы исследуемых микромицетов. Действие физического фактора на микромицет *Alternaria alternata* вызывало снижение активности эндокаталазы при экспозиции в магнитном поле в течение 150 мин. При действии МП в течение 30 и 90 мин активность не изменялась. Во всех вариантах эксперимента наблюдалось значительное увеличение активности эндокаталазы гриба *A. niger* в пределах 20–30%.

Магнитное поле оказывало существенный стимулирующий эффект и на активность эндокаталазы гриба *P. cyclopium* во всех трех вариантах

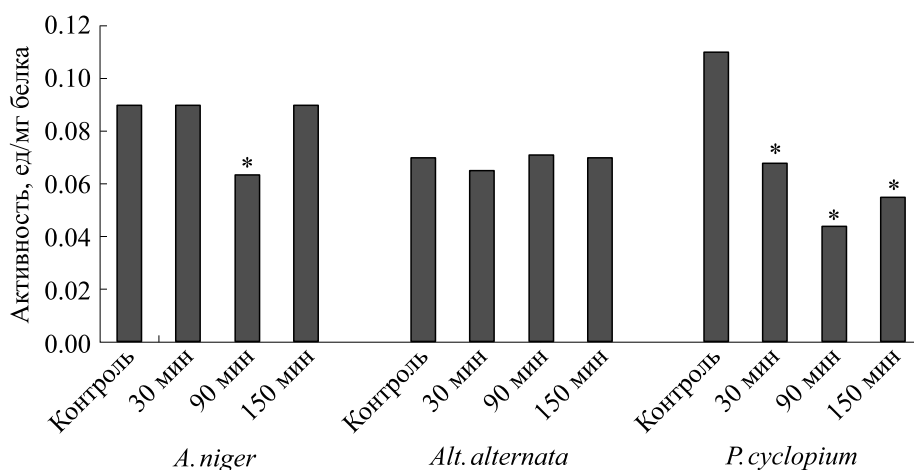


Рис. 4. Влияние МП на активность эндопероксидазы грибов.

эксперимента. При 30-минутной экспозиции в магнитном поле увеличение активности составило 47% в сравнении с контрольными показателями. При действии в течение 90 мин активность фермента увеличилась на 31%, а при действии в течение 150 мин — на 57%.

На рис. 4 отражены полученные данные по исследованию действия слабого импульсного магнитного поля на эндопероксидазную активность грибов.

Можно отметить, что, в отличие от действия данного фактора на каталазу, в случае с пероксидазой не обнаружено увеличение активности этого фермента.

Эндопероксидазная активность у гриба *Alternaria alternata* несколько снижалась при 30 минутной экспозиции в магнитном поле, тогда как при 90-минутной экспозиции она слегка повышалась (на 3.6% по сравнению с контролем), а при 150-минутной экспозиции оставалась неизменной. У *A. niger* же наблюдалось значительное снижение (на 25% по сравнению с контролем) эндопероксидазной активности при 90-минутной экспозиции.

Значительное ингибирование эндопероксидазной активности *P. cyclopium* магнитным полем происходило независимо от длительности воздействия. Так, эффект ингибирования был наиболее выражен при 90- и 150-минутной экспозиции, а именно, было показано снижение активности эндопероксидазы в сравнении с контролем до 39.9% и 50.7% соответственно. При 30-минутной экспозиции в магнитном поле наблюдалось меньшее, но все же значительное ингибирование эндопероксидазной активности.

Сравнивая действие МП на пероксидазу и каталазу грибов, можно отметить, что в случае с каталазой нами не отмечалось эффекта ингибирования данного фермента. При всех вариантах

длительности воздействия у всех грибов, напротив, в подавляющем большинстве случаев наблюдалось стимулирование активности этого фермента.

Действие МП на пероксидазу грибов не приводило к стимуляции ее активности, а для *P. cyclopium* наблюдалось подавление активности этого фермента во всех вариантах эксперимента.

Механизмы воздействия магнитных полей на живые организмы, которые вероятно имеют место и в наших экспериментах, до конца не исследованы. В литературе обсуждаются различные пути влияния данного фактора, как на отдельные биологические молекулы, так и на различные клеточные структуры. Среди них: влияние на реакции с участием радикальных пар [23–25], влияние на протоны воды и гидратированность биологически активных молекул [25, 26], влияние на ионы металлов, как свободные, так и связанные с ключевыми регуляторными белками [25, 27–30], влияние на цитоскелет [25, 31] и связанные с ним процессы выхода белков во внешнюю среду. В работах [6, 32, 33], также как и в наших исследованиях, было продемонстрировано, что магнитное поле может оказывать как положительный, так и отрицательный эффект на грибные оксидоредуктазы, увеличивая или снижая их активность. В некоторых литературных источниках сообщается, что воздействию МП подвергаются биологические молекулы, содержащие ферромагнитные металлы (цинк, железо) в структуре каталазы и пероксидазы, в результате чего активность данных ферментов может меняться [6, 34]. Также обнаружено, что эффективность воздействия на микроскопические грибы импульсного магнитного поля выше в сравнении с постоянным и переменным полями [6, 35]. Меньшая чувствительность каталазной активности к воздействию МП по сравнению с пероксидазной отмечалась и ра-

нее [7, 32, 34]. Для грибов этот факт особенно интересен, поскольку для них характерны каталазы-пероксидазы — белки, несущие одновременно две ферментативные активности [7, 36], и может свидетельствовать о меньшей подверженности магнитному воздействию на структуры молекул, отвечающих за каталазную активность. В работах [25, 37] не отмечалось под воздействием переменных магнитных полей статистически значимого возрастания уровня экспрессии оксидоредуктаз. В работах [25, 38] было зарегистрировано повышение уровня свободнорадикального окисления после воздействия нетеплового электромагнитного поля. Показано, что магнитное поле стабилизирует свободные радикалы, увеличивая, таким образом, их концентрацию в клетках и, следовательно, вероятность возникновения окислительных повреждений, что приводит к нарушению окислительно-восстановительного гомеостаза клеток и, как следствие, к изменению активности эндоцеллюлярных каталазы и пероксидазы.

При сравнении действия НИЛИ и МП на исследуемые ферменты можно отметить, что первый фактор в большем количестве исследованных вариантах воздействия вызывал стимуляцию активности данных ферментов. Отдельно необходимо указать на то, что действие МП и НИЛИ приводило к снижению пероксидазной активности у гриба *P. cyclopium*.

Неоднозначность действия МП и НИЛИ на активность эндоцеллюлярной каталазы и пероксидазы, а также наблюдаемый дозозависимый эффект могут быть связаны с физиолого-биохимическими особенностями исследуемых грибов, а именно, с наличием у них механизмов адаптации к действию физических факторов, что позволяет им реагировать соответствующим образом на поддержание окислительно-восстановительного потенциала клеток грибов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе экспериментов нами отмечалась неоднозначность действия исследуемых факторов на эндокаталазу и эндопероксидазу. Имело место, как увеличение, так и снижение активности исследуемых оксидоредуктаз микромицетов. Увеличение активности ферментов, на наш взгляд, может способствовать проявлению адаптационных свойств грибов в плане сохранения их окислительно-восстановительного гомеостаза на соответствующем уровне при действии таких физических факторов как НИЛИ и МП. При этом снижение активности эндокаталазы и эндопероксидазы позволяет предположить, что НИЛИ и МП негативно действуют на окислительно-восстановительный гомеостаз клетки, что может

сказаться на подавлении жизнедеятельности микромицетов. Проведенные нами исследования расширяют наши представления о действии МП и НИЛИ на метаболизм микроскопических грибов деструкторов промышленных материалов, что может иметь практическую значимость при разработке методов использования этих факторов в качестве регуляторов жизнедеятельности микромицетов в процессе биodeградации ими материалов как природного, так и синтетического происхождения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» (ННГУ им. Н.И. Лобачевского).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (базовая часть Государственного задания, проект № 0729-2020-0053).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. A. Shah, *Biotechnol. Adv.*, **26**, 246 (2008).
2. О. А. Легонькова и Л. А. Сухарева, *Тысяча и один полимер от биостойких до биоразлагаемых* (РадиоСофт, М., 2004).
3. В. Ф. Смирнов, И. О. Макаров, Д. А. Ключев и др., *Экология и промышленность России*, **24** (10), 67 (2020).
4. В. Б. Антонов, Н. А. Беляков, Н. В. Васильева и др., *Биоповреждение больничных зданий и их влияние на здоровье человека* (СПб МАПО, СПб., 2008).
5. Е. Ю. Быстрова, Е. В. Богомолова, Ю. М. Гаврилов и др., *Микология и фитопатология*, **43** (5), 438 (2009).
6. И. О. Макаров, Д. А. Ключев, В. Ф. Смирнов и др., *Микробиология*, **88** (1), 83 (2019).
7. Е. С. Касатова и др., *Микология и фитопатология*, **51** (2), 99 (2017).
8. Е. Л. Пехташева, А. Н. Неверов, Г. Е. Заиков и О. В. Стоянов, *Вестн. Казанского технологич. ун-та*, **8**, 222 (2012).
9. Y. Li, H. E. Shellhorn, *J. Biomol. Techniques*, **18**, 185 (2007).

10. P. Nagaraja, A. Shivakumar, and S. A. Kumar, *Anal. Sci.*, **25**, 1243 (2009).
11. Р. Досон и др., *Справочник биохимика* (Мир, М., 1991).
12. А. И. Кобзарь, *Прикладная математическая статистика* (Физматлит, М., 2006).
13. А. С. Касумьян и О. В. Азовская, *Смоленский мед. альманах*, **1**, 31 (2015).
14. В. М. Инюшин, *Лазерный свет и живой организм* (КазГУ, Алма-Ата, 1970).
15. H. M. Yusef and M. E. Allam, *Mycopathologia et mycologia applicata*, **33** (2), 81 (1967).
16. R. Salimbeni, *Archeometria* Muhely, **3** (1), 34 (2006).
17. Т. Г. Гришачева, Дис. ... канд. биол. наук (Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 2019).
18. D. Tisch and M. Schmoll, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85** (5), 1259 (2009).
19. L. Pereira-Pardo and C. Korenberg, *J. Cult. Herit.*, **31**, 236 (2018).
20. T. Rivas, J. S. Pozo-Antonio, and M. L. de Silanes, *Appl. Surf. Sci.*, **440**, 467 (2018).
21. В. А. Доровских, Е. А. Бородин и Г. П. Бородина, в сб. *Лазер и здоровье-99* (1999), 435.
22. В. Е. Кузмичев, М. А. Каплан и Г. В. Чернова, *Физ. медицина*, **5** (1–2), 65 (1996).
23. A. Pazur, C. Schimek, and P. Galland, *Central Eur. J. Biol.*, **2** (4), 597 (2007).
24. А. В. Дроздов и др., *Биофизика*, **55** (4), 740 (2010).
25. Е.С. Касатова, Дис. ... канд. биол. наук (Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 2011).
26. A. V. Zolotaryuk, A. V. Savin, and E. N. Economou, *Phys. Rev. Lett.*, **73** (21), 2871 (1994).
27. В. В. Леднев, *Биофизика*, **41**, 224 (1996).
28. А. Б. Узденский, *Биофизика*, **45** (5), 888 (2000).
29. В. В. Леднев, *Биофизика*, **41** (1), 224 (2003).
30. В. Н. Бинги и А. Б. Рубин, *Биомедицинские технологии и радиоэлектроника*, **2–4**, 63 (2007).
31. U. Lins and M. Farina, *Antonie van Leeuwenhoek*, **85**, 335 (2004).
32. A. Manoliu et al., *Analele Științifice ale Universității "Al. I. Cuza" din Iași. Biofizică, Fizică medicală și Fizica mediului*, **1**, 77 (2005).
33. L. Potenza, R. Saltarelli, E. Polidori et al., *Can. J. Microbiol.*, **58** (10), 1174 (2012).
34. Е. А. Новичкова и В. Г. Подковкин, *Вестник СамГУ*, **70**, 183 (2009).
35. A. Treu and E. Larnøy, *Int. Biodet. Biodeg.*, **114**, 244 (2016).
36. M. Zamocky, P.G. Furtmuller, and C. Obinger, *Biochem. Soc. Trans.*, **37**, 772 (2009).
37. J. Sinclair, et al., *Proteomics*, **6** (17), 4755 (2006).
38. D. Crouzier, et al., *Pathol. Biol.*, **57** (3), 245 (2009).

Changes in the Activity of Micromycete Endocellular Oxidoreductases under the Influence of Low-Frequency Pulsed Magnetic Field and Low-Intensity Laser Radiation

I.O. Makarov*, D.A. Klyuev*, V.F. Smirnov*, O.N. Smirnova*, N.A. Anikina*,
N.V. Dikareva*, and A.Yu. Shishkin*

*National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, prosp. Gagarina 23, Nizny Novgorod, 603950 Russia

This study aims to investigate the effects of low-frequency pulsed magnetic field (1.5 Hz) and low-intensity laser radiation (0.3 and 0.7 W) on the activity of micromycete endocellular oxidoreductases that catalyze biodegradation of industrial materials such as *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus niger*, and *Alternaria alternata*. The investigated physical factors had dose-dependent effects on the activity of fungal endocellular oxidoreductases (catalase and peroxidase): increases and decreases in the activities of enzymes have been observed. An increase in the activity of enzymes can contribute to the manifestation of the adaptive properties of fungi against the action of such physical factors as low-intensity laser radiation and magnetic field. A decrease in the activity of endocatalase and endoperoxidase under the influence of these factors may suppress the vital activity of microorganisms.

Keywords: low-frequency pulsed magnetic field, low-intensity laser radiation, micromycetes, endocatalase, endoperoxidase

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ПО СПЕКТРУ НАТИВНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК

© 2023 г. Б.Л. Ихлов*, #

*Пермский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Букирева, 15/1, Пермь, 614998, Россия

#E-mail: boris.ichlov@gmail.com

Поступила в редакцию 16.05.2022 г.

После доработки 14.07.2022 г.

Принята к публикации 19.07.2022 г.

Задачей исследования является обнаружение низкочастотного (относительно инфракрасного и ультрафиолетового) резонансного поглощения электромагнитного поля сантиметрового диапазона молекулами ДНК на частоте, соответствующей собственной частоте крутильных колебаний спирали нативной ДНК с целью установления связи между длиной ДНК (ее спектром) и типом бактерии. Вместо раствора ДНК стандартно были использованы культуры различных бактерий, содержащих ДНК, для спиралей которых проведен расчет резонансных частот крутильных колебаний. Культуры помещали в пробирки или кювету и подвергали облучению СВЧ-генератора. Проведен теоретический анализ реакции ДНК на внешнее сантиметровое излучение, определены резонансные частоты ДНК трех типов бактерий: *E. coli* M17, *M. avium* и *Mycobacterium tuberculosis*. Обнаружено пиковое поглощение сверхвысокочастотного электромагнитного поля культурами бактерий на частотах, близких к расчетным собственным частотам крутильных колебаний спиралей ДНК данных типов бактерий: 10.271, 10.317 и 10.356 ГГц соответственно.

Ключевые слова: крутильные колебания, плотность потока мощности, электромагнитное поле, сверхвысокая частота.

DOI: 10.31857/S0006302923030092, EDN: FRFWLB

Как известно, возбужденная молекула ДНК бактерий способна излучать микроволны в сверхвысокочастотном (СВЧ) диапазоне [1]. Естественно предположить, что молекула ДНК поглощает электромагнитные волны в том же СВЧ-диапазоне.

Воздействие разных частот и интенсивностей СВЧ электромагнитного поля на бактерии исследовалось только в плане оценки выживаемости, митотической активности, скорости деления клеток, стимуляции или в плане работы регуляторных систем бактерий [2, 3]. Непосредственное воздействие на ДНК в культуре бактерий изучалось в миллиметровом диапазоне, некоторые частоты были идентифицированы авторами как собственные (резонансные) частоты различных типов колебаний молекулы ДНК, например, конформные, коллективные колебания больших молекулярных групп в ДНК, а также как резонанс водородных связей [4, 5].

Воздействие микроволн сантиметрового диапазона на ДНК в части крутильных колебаний

спиралей ДНК остается слабо изученным. В работе [6] было изучено воздействие сантиметровых волн на клетки хомяка и выявлено, что под воздействием СВЧ происходят мутагенные процессы, в которые вовлечены молекулы ДНК, обнаружено также, что СВЧ вызывает изменение в синтезе и структуре ДНК. В работе [7] проведено исследование действия СВЧ на ДНК, обнаружено, что СВЧ дезактивирует бактериальные клетки, сделано предположение, что бактериальная инактивация может быть объяснена деактивацией генов, регулирующих окисление, и повреждением ДНК. В частности, бактерии золотистого стафилококка облучались импульсным полем с пиковой частотой 3.5 ГГц.

В чем механизм изменений структуры ДНК или дезактивации генов и в чем состояла дезактивация бактерий – осталось нераскрытым. Ранее лишь предполагалось, что ДНК имеет собственные частоты конформационных колебаний в данном спектре [1; 8, с. 345].

В работах [9, 10] путем воздействия СВЧ электромагнитного поля на штаммы *E. coli* ATCC 25922, *M. avium* 104 и *Mycobacterium tuberculosis*

Сокращение: СВЧ – сверхвысокочастотный.

$H_{37}R_y$ (*Pasteur*) ATCC 25618, были получены косвенные доказательства, что определенные резонансные частоты возбуждают в спиральх молекул ДНК бактерий крутильные колебания.

Цель данного исследования — провести прямой эксперимент, показывающий, что нативные молекулы ДНК способны поглощать электромагнитное излучение в СВЧ-диапазоне резонансным образом.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В клеточных организмах, помимо ДНК, нет молекул, которые бы соответствовали сантиметровому диапазону. Не только у макромолекул имеется СВЧ-спектр, например, вращательный спектр трифторйодметана (CF_3I) лежит в диапазоне 6–18 ГГц, для аммиака (NH_3 , инверсионное расщепление энергетических уровней) — в диапазоне 3.00–1.33 ГГц, для молекулы ND_3 — 1.7–2.0 ГГц. Однако, с одной стороны, таких молекул нет в живых клетках, во-вторых, вращательно-колебательные спектры клеточных макромолекул располагаются вне сантиметрового диапазона, в УФ- и ИК-областях, те же спектры содержащихся в клетке катиона NH_4^+ или анионов $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^{2-} , SO_4^{2-} тоже находятся в терагерцовой и ИК-областях. Таким образом, резонанс крутильных колебаний ДНК в СВЧ-диапазоне отдален от спектров других молекул клетки и может быть легко определен. СВЧ-излучение затрагивает к клетке исключительно молекулы ДНК.

Оценим, возможно ли обнаружение поглощения молекулами ДНК не в растворе ДНК, а в ткани или в культуре бактерий. В 1 см^3 , например, ткани печени — 200 млн. клеток, т.е. имеем порядков 10^8 . Плюс 4 порядка — единица точности, скажем, газоанализатора. Если число пар нуклеотидов 10^6 – 10^7 , то получаем $8 + (6-7) + 4 = 18$ –19 порядков. Для сравнения: число Лошмидта, т.е. число молекул в см^3 — порядка 10^{19} . Если за образец брать, скажем, чувствительные ЭПР-спектрометры, работающие в диапазоне СВЧ, то их чувствительность — 10^{-12} – 10^{-14} (от числа Авогадро). Следовательно, чувствительности обычных анализаторов спектра для ткани достаточно с избытком.

Число колоний бактерий в 1 мл суспензии — порядка 10^{10} , то есть, с учетом 6 порядков, которые добавляют миллионы нуклеотидов ДНК, обычный анализатор СВЧ-спектра вполне способен обнаружить поглощение молекулами ДНК.

Воздействие СВЧ электромагнитного поля на диполи цепи ДНК ввиду ее макроскопической

длины может иметь только классический характер, крутильные колебания ее спирали описываются классическими законами. Если рассмотреть квантовый осциллятор, уравнение для волновой функции записывается в виде:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + \frac{m\omega^2 x^2}{2} \psi = E\psi.$$

Здесь $\hbar$ — постоянная Планка, m — масса осциллятора, ω — круговая частота, ψ — волновая функция, x — координата, E — энергия. Уравнение имеет решение, выражаемое через полиномы Эрмита, при этом выражение для энергии должно выглядеть следующим образом:

$$E_n = \hbar\omega(n + \frac{1}{2}), n = 0, 1, 2, 3...$$

В случае крутильных колебаний уравнение приобретает вид

$$-\frac{2\hbar^2}{md^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial \phi^2} + \frac{Gd^2 \phi^2}{8} \psi = E\psi,$$

где G — жесткость осциллятора, d — его длина, ϕ — угол поворота. Тогда

$$E_n = \frac{2\hbar}{m} \sqrt{\frac{G}{J}} (n + \frac{1}{2}).$$

Здесь J — момент инерции элементарного осциллятора на спирали, $J = md^2/4$. Теперь пусть момент инерции увеличивается вследствие увеличения длины на dr . Тогда уравнение запишется в следующем виде:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} (\frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2}{\partial \phi^2}) \psi + \frac{Gr^2 \phi^2}{8} \psi = E\psi,$$

где r — радиус осциллятора, т.е. координата, которая изначально не дискретна. Но каждому уровню энергии в полуклассическом приближении можно поставить в соответствие радиус $r_n = an^2$, где $a = \hbar/kme^2$ — боровский радиус ($k = 1/4\pi\epsilon_0$, ϵ_0 — электрическая постоянная, m — масса, e — заряд электрона).

В случае атома Бора изменение орбиты происходит за счет поглощения кванта электромагнитного поля, в случае дипольного осциллятора — за счет подкачки энергии ферментами. В классическом случае при колебаниях с собственной частотой f_0 энергия $E = G$, поскольку $E = J\omega^2/2$, и увеличение радиуса не ведет к изменению энергии, а только к снижению частоты в соответствии с законом сохранения момента импульса. Классический крутильный маятник не имеет спектра колебательных мод, в спектре частот — лишь единственная собственная частота f_0 . Если же уровни энергии дискретны, очевидно, что увеличение

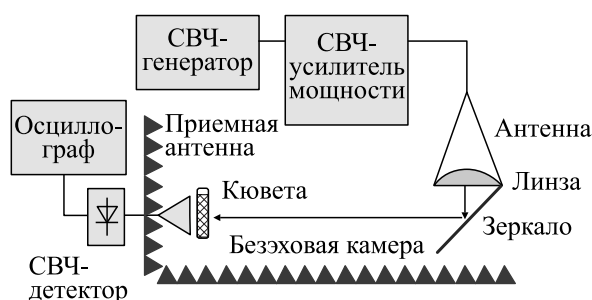


Рис. 1. Принципиальная схема установки.

диаметра осциллятора и соответственно снижение частоты тоже должны носить дискретный характер. Например, если упрощенно представить энергию как возрастающую $E_{n+1} = aE_n$, и по аналогии с атомом Бора представить возрастание радиуса $r_{n+1} = br_n$, где a и b — возрастающие целочисленные функции от натурального ряда n и больше единицы, то

$$\omega_{n+1} = \sqrt{\frac{a}{b}} \omega_n.$$

Таким образом, две первые ближайшие частоты отличаются друг от друга примерно в полтора раза, что опровергается экспериментом — указанные различия частот в полтора раза не обнаруживаются.

Поэтому вместо уравнения Шредингера, чтобы получить выражение для собственной частоты, можно использовать формализм Лагранжа, при этом ДНК при скручивании ведет себя как стержень [11, 12], классическим, а не квантовым образом.

ДНК бактерий — кольцевая, кольцо компактифицировано в соцветие. При возбуждении в молекуле крутильных колебаний число пар оснований на один виток ее спирали ($\gamma = 10$) изменяется, и, поскольку порядок зацеплений составляет $Lk = N/y = \text{const}$ (Lk — порядок зацепления, N — число пар оснований в молекуле), в спирали возникает топологическое напряжение. Вследствие этого собственная частота крутильных колебаний молекулы меняется — ввиду изменения жесткости.

В модели стержня резонансная частота электромагнитного поля обратно пропорциональна корню квадратному из N :

$$f = kN^{-1/2}, \quad (1)$$

где N — число пар нуклеотидов, коэффициент $k = 21.75$ определяется с помощью экспериментальных данных, включает в себя интегральным образом компактификацию ДНК, возникающие топологические напряжения и ее окружение. Это общая формула крутильных колебаний любой

ДНК [13], для $N = 400$ расчет дает частоту порядка 1 ТГц, что совпадает с результатом, приведенным в работе [14]. В процесс репликации частота крутильных колебаний спирали ДНК понижается [13].

Таким образом, вследствие неквантовости сантиметровой спектр нативных ДНК прост, состоит из единственной линии и легко прочитывается.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах исследовали культуру *E. coli* M17 с концентрацией $(3-5) \cdot 10^8$ КОЕ в 1 мл или, по способу приготовления культуры, порядка 10^8 молекул ДНК на 1 мл, коэффициент оптической плотности раствора — 1.3%. Культуры доводили до стационарной фазы и далее, чтобы исключить эффекты репликации и соответственно сверхспирализации, помещали в физиологический раствор.

Использовали нетепловой уровень плотности потока мощности СВЧ-излучения 2.5 мВ/см^2 . Длина ДНК — 4483110 п.н., рассчитанная по формуле (1) частота — 10.272 ГГц.

Чтобы исключить эффекты репликации и сверхспирализации, культуры готовили не в питательной среде, а в физиологическом растворе, исследования проводили при температуре 21°C .

На рис. 1 приведена принципиальная схема экспериментальной установки. Источником излучения являлся СВЧ-генератор Agilent Technologies E82570 1 (США), для усиления сигнала до 1 Вт использовали усилитель мощности Agilent Technologies E82570 (США). Плотность потока мощности СВЧ-излучения составляла примерно 2.5 мВ/см^2 . В качестве антенны использовали чувствительный усилитель ДКВ-8 (Россия).

Для определения резонансной частоты опыты проводили по следующей методике: цифровым осциллографом измеряли напряжение на выходе детектора, которое было пропорционально мощности СВЧ-излучения (детектор работал на квад-

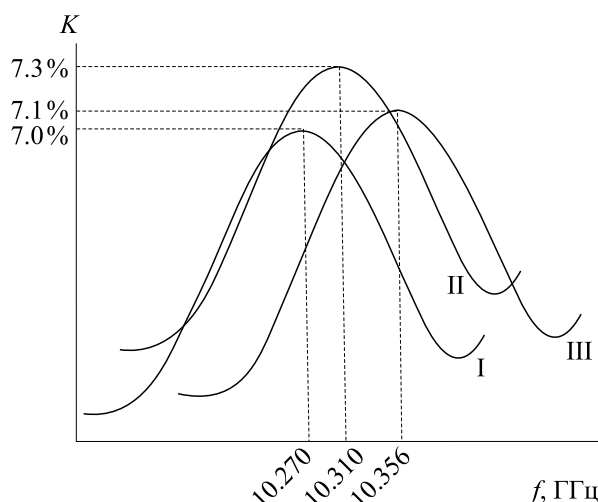


Рис. 2. Зависимость коэффициента поглощения от частоты излучения.

ратичном участке вольт-амперной характеристики). Исследования проведены в частотном диапазоне от 8.5 до 11.0 ГГц. Для грубой оценки шаг изменения частоты составлял 0.1 ГГц, затем, после определения суженного диапазона — 0.01 ГГц и, наконец, вблизи резонансной частоты — 0.001 ГГц.

Установлено, что на резонансной частоте $f_0 = 10.272 \pm 0.001$ ГГц коэффициент поглощения культурой бактерий довольно низкий, что объясняется малой концентрацией бактерий, соответственно малой концентрацией макромолекул ДНК в физиологическом растворе и малым объемом исследуемой жидкости. Если на несколько порядков увеличить число бактерий, чтобы коэффициент оптической плотности культуры в пробирке с физиологическим раствором составил 7.3%, то коэффициент поглощения существенно увеличивается. При приближении кюветы к приемной антенне коэффициент поглощения возрастал, было установлено оптимальное расстояние в 13 см.

Обычно для проведения подобных экспериментов используют пробирки, однако при наличии батареи пробирок имеет место дифракционный эффект на отдельных пробирках и интерференция вторичных волн в месте расположения приемной антенны. Чтобы исключить подобные эффекты, пробирки были заменены плоскопараллельной кюветой из органического стекла с размерами сечения 100×78 мм, что совпадает с размерами раскрытия приемной антенны, и толщиной 14 мм. Кювету устанавливали на оптимальном расстоянии, вплотную к приемной антенне.

Чтобы исключить спектр физиологического раствора и кюветы и получить эффективное поглощение, измерения проводили дважды: с кюве-

той, заполненной 4%-м физиологическим раствором, и с раствором исследуемой культуры.

Рассчитаны коэффициенты поглощения СВЧ-излучения кюветой с физиологическим раствором и с раствором исследуемой культуры.

В 1 мл содержится порядка 10^{26} молекул (по известной формуле через число Авогадро, массу 1 мл и молярную массу $N_A m/\mu$) физиологического раствора, поэтому с учетом малой концентрации культуры *E. coli* M17 (10^8 молекул ДНК), эффекты переоблучения молекул можно не учитывать и для расчета поглощения параллельного монохроматического пучка излучения в поглощающей среде использовать закон Бугера—Ламберта $I = I_0 \exp(-kx)$, где I_0 и $I(x)$ — интенсивности падающего и прошедшего на глубину x излучения, k — коэффициент поглощения на соответствующей частоте.

Таким образом, ввиду закона Бугера—Ламберта коэффициент поглощения определяли по отношению напряжений U :

$$K = U_{\text{без бактерий}} / U_{\text{с бактериями}} \quad (2)$$

(U_0 нормируется к единице). Полученная зависимость коэффициента поглощения от частоты излучения приведена на рис. 2.

Расчет коэффициента поглощения. С помощью формулы (2) получены следующие значения: коэффициенты поглощения вдали от резонанса — 0.823 и 0.838, резонансное поглощение на уровне половинной мощности — 0.823 и 0.772.

1. Нерезонансное поглощение, средний уровень: $K_{\text{не рез}} = (0.823 + 0.838)/2 \approx 0.83$.

2. Резонансное поглощение на уровне половинной мощности: $K_{\text{рез/2}} = (0.83 + 0.772)/2 \approx 0.8$.

3. Резонансное поглощение на частоте резонанса $K_{\text{рез}_f0} = 0.83 - 0.772 \approx 0.058$.

Принимая 0.83 за 100%, получаем поглощение 7.0%.

Расчет погрешности измерений, связанной с разными уровнями нерезонансного поглощения справа и слева от резонансной частоты:

$$K_{\text{рез}_f0_слева} = 0.823 - 0.772 = 0.051.$$

Принимая 0.823 за 100%, получаем $K_{\text{рез}_f0_слева} = 6.197\% \approx 6.2\%$.

$$K_{\text{рез}_f0_справа} = 0.838 - 0.772 = 0.066.$$

Принимая 0.838 за 100%, получаем $K_{\text{рез}_f0_справа} = 7.876\% \approx 7.9\%$.

Среднее значение составляет $(6.2 + 7.0 + 7.9)/3 = 7.033 \approx 7.0\%$, как и было рассчитано раньше, но теперь видна погрешность — 0.8% вниз и 0.9% вверх, можно считать $\pm 0.9\%$.

С учетом толщины стенок кюветы 3 мм толщины слоя жидкости $x = 17$ мм, при этом коэффициент нерезонансного поглощения составляет $k_{\text{не_рез}} = (0.11 + 0.01) \text{ см}^{-1}$, а резонансного на частоте $f_0 = 10.272 \text{ ГГц}$ — $k_{\text{рез}} = (0.04 + 0.01) \text{ см}^{-1}$. Таким образом, суммарное резонансное и нерезонансное поглощение на указанной частоте составляет $k_{\text{рез}} + k_{\text{не_рез}} = (0.15 + 0.01) \text{ см}^{-1}$.

Добротность резонансной системы на уровне половинного резонансного поглощения, рассчитанная по формуле $Q = f_0 / (f_v - f_n)$, равна 1030, где f_v и f_n верхняя и нижняя границы полосы резонансного поглощения на уровне половинной мощности. Это большая величина, поэтому пик резонансного поглощения достаточно выделен.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку собственная частота крутильных колебаний ДНК зависит от длины спирали ДНК, для разных клеток она отличается по величине.

Для ДНК бактерий она составляет порядка 10 ГГц, для ДНК человека — от 1.91 до 4.29 ГГц. Внешнее поле при совпадении частоты поля с собственной частотой колебаний ДНК возбуждает в молекуле крутильные колебания, которые препятствуют репликации ДНК, вследствие чего после нескольких «неудачных» подготовок к делению (шести клеточных циклов) клетка погибает [6]. Таким образом, факт резонансного поглощения электромагнитного поля СВЧ диапазона молекулами ДНК доказан косвенно фактом резонансного снижения выживаемости клеток бактерий на расчетной частоте.

В ходе эксперимента на резонансной частоте $f_0 = 10.271 \pm 0.001 \text{ ГГц}$ на культуре *E. coli* M17 получено эффективное поглощение $7.0 \pm 0.8\%$ (рис. 2, кривая I). Определенная резонансная частота в погрешности совпадает с результатами предыдущих опытов ($f_0 = 10.272 \pm 0.001 \text{ ГГц}$) и близка к расчетной по формуле (1) величине 10.26 ГГц.

На культуре *M. Avium* 104 с коэффициентом оптической плотности 7.0% эффективное поглощение составило 7.3%, резонансная частота — $f_0 = 10.317 \pm 0.001 \text{ ГГц}$ и близка к расчетной величине 10.31 ГГц (рис. 2, кривая II).

На культуре *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv с коэффициентом оптической плотности 6.9–7.1% $f_0 = 10.356 \pm 0.001 \text{ ГГц}$ и близка к расчетной по формуле (1) величине 10.36 ГГц (рис. 2, кривая III).

С учетом концентрации бактериальной культуры $m = (3-5) \cdot 10^8 \text{ см}^{-3}$ в слое физиологического раствора площадью $S = 1 \text{ см}^2$ и толщиной $l = 1.7 \text{ см}$ содержится $M = (5.1-8.5) \cdot 10^8$ бактерий, соответственно, столько же молекул ДНК. Это позволяет провести оценку микроскопического сечения σ поглощения СВЧ-излучения отдельной молекулой ДНК на резонансной частоте:

$$\sigma_f = \sigma_{\text{нерез}} + \sigma_{\text{рез}} = \frac{k_{\text{нерез}}}{M} + \frac{k_{\text{рез}}}{M} = (1,8 \pm 0,5)10^{-10} \text{ см}^{-1} + (0,7 \pm 0,2)10^{-10} \text{ см}^{-1} = (2,5 \pm 0,5)10^{-10} \text{ см}^{-1}.$$

Актуальность данного расчета в том, что знание макроскопического сечения поглощения позволяет проводить расчеты коэффициентов поглощения в зависимости от концентрации бактерий и толщины слоя бактериального раствора.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование является прямым доказательством резонансного поглощения молекул

ДНК в СВЧ-спектре. Поглощение электромагнитного поля культурами бактерий имело место почти строго на той частоте, которая соответствовала расчетным собственным частотам крутильных колебаний соответствующих молекул ДНК. Таким образом, доказано, что эффект поглощения нативными молекулами ДНК электромагнитного поля сверхвысокой частоты существует, и эта частота является собственной частотой крутильных колебаний молекул ДНК.

Тот момент, что график резонансного поглощения не имеет стандартного вида и несимметричен вблизи точки резонанса, объясняется отношением D/L , где D — диаметр спирали ДНК, L — ее длина; для того, чтобы достичь симметрии, необходимо провести достаточно много измерений и усреднить их.

Небольшое число исследований отчасти извиняет тот факт, что весьма сходные результаты получены на трех различных типах бактерий, точно так же, как оказались весьма сходны результаты экспериментов по влиянию микроволн резонансной частоты на выживаемость разных типов бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе [15] сообщается о согласованных усилениях двух независимых лабораторий, которые включали измерение диэлектрических свойств водных растворов кольцевых молекул ДНК в диапазоне частот 1–10 ГГц. Не было обнаружено резонансного поглощения или какой-либо формы усиленного поглощения. Эти данные сомнительны, поскольку в работе [1] исследовались именно водные растворы кольцевых ДНК, и было обнаружено, что возбужденные пикосекундным лазером молекулы ДНК излучают на частоте нескольких гигагерц.

В работе [16] при исследовании ДНК плазмид тоже не было выявлено резонансного поглощения в диапазоне от 5 до 20 ГГц. Однако, во-первых, собственные частоты крутильных колебаний спиралей ДНК зависят от длины кольцевых ДНК, которая весьма различается у разных бактерий. Например, для *E. coli* M17, *E. coli hcr' exr'*, для микобактерий эта частота выше 10 ГГц, для *E. coli* ATCC 25922 — равна 9.6 ГГц. Размеры плазмид варьируют от менее чем одной тысячи до 400–600 тыс. пар оснований, в десятки и сотни раз меньше, соответствующие частоты крутильных колебаний ДНК плазмид располагаются в диапазоне терагерц.

Во-вторых, как уже было показано выше, в клетке бактерии на излучение волн сантиметрового диапазона способны реагировать исключительно молекулы ДНК. Как уже было сказано, коэффициент в формуле (1) интегральным образом включает в себя, кроме жесткости компактифицированной ДНК, влияние ее окружения. В водных растворах это окружение отсутствует, поэтому коэффициент и частота будут иными.

Это наиболее важный момент, поскольку именно он позволяет связать пик поглощения с типом бактерии. Поэтому исследование может быть положено в основу метода идентификации различных типов бактерий и для диагностики бактериальных заболеваний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит В.В. Новикову (Пермская фармацевтическая академия), В.А. Дробкову (Клинический фтизиопульмонологический медицинский центр в Перми) и И.Г. Вольхина (ПГНИУ) за помощь в работе.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Аншелевич, А. В. Вологодский, А. В. Лукашин и М. Д. Франк-Каменецкий, Журн. эксперим. и теорет. физики, **66**, 2163 (1974).
2. O. A. Tiphlova and T. J. Karu, Photochem. Photobiol., **48** (1), 467 (1988).
3. Г. В. Козьмин и В. И. Егорова, Биомед. технологии и радиоэлектроника, № 3, 61 (2006).
4. B. M. Fischer, M. Walther, and P. Jepsen, Physics in Medicine and Biology, **47**, 3807 (2002). DOI: 10.1088/0031-9155/47/21/319.
5. T. Globus, I. Sizov, and B. Gelmont, Adv. Biosci. Biotechnol., **4**, 493 (2013) DOI: 10.4236/abb.2013.43A065
6. V. Garaj-Vrhovac, D. Horvat, and Z. Koren, Mutat. Res. Lett., **243** (2), 87 (1990). DOI: 10.1016/0165-7992(90)90028-I
7. P. Shaw, et al., Sci. Reports, **11** (1), 1 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-93274-w
8. В. Бинги, Принципы электромагнитной биофизики (Физматлит, М., 2011).
9. Б. Л. Ихлов, Ф. В. Мельниченко и А. Ю. Ощепков, Вестн. новых мед. технологий, **24** (2), 141 (2017).
10. Б. Л. Ихлов, А. А. Шурыгин и В. А. Дробкова, Туберкулез и болезни легких, **97** (1), 25 (2019). DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-1-25-27
11. A. A. Traves and J. M. T. Thompson, In *The Mechanics of DNA*, Ed. by J.M.T. Thompson (Theme Issue of Phil. Trans. Roy. Soc. A, **362** (1820), 1265) (2004).
12. T. Strick, J.-F. Allemand, V. Croquette, and D. Bensimon, Progr. Biophys. Mol. Biol., **74**, 115 (2000).
13. Б. Л. Ихлов, Вестн. новых мед. технологий, **25** (2), 121 (2018).
14. А. Н. Ковалева, И. Л. Маневич, А. А. Мусиенко и А. В. Савин, Высокомолекуляр. соединения. Сер. А, **51** (7), 1174 (2009).
15. C Gabriel, E. H. Grant, R. Tata, et al., Nature, **328** (6126), 145 (1987). DOI: 10.1038/328145a0
16. I. J. Bigio, T. R. Gosnell, P. Mukherjee, and J. D. Saffer. Biopolymers, **33** (1), 147 (1993). DOI: 10.1002/bip.360330114

Identification of Pathogenic Bacteria Using the Spectra of Native DNA Molecules**B.L. Ikhlov*****Perm State National Research University, ul. Bukireva, 15/1, Perm, 614998 Russia*

The purpose of detecting low-frequency (relative to infrared and ultraviolet) resonance absorption of an electromagnetic field in the centimeter wavelength range using DNA molecules at a frequency corresponding to the natural frequency of torsional vibrations of the native DNA helix is to find a relationship between the length of DNA (its spectrum) and the type of a bacterium. Instead of DNA solution, cultures of different bacteria that contained DNA were used and the resonance frequencies of torsional vibrations of the helices in DNA molecules were calculated for them. The cultures were placed in test tubes or in a cuvette and were subjected to microwave irradiation. Theoretical analysis was carried out with respect to the DNA reaction to external centimeter radiation and the resonant DNA frequencies of three types of bacteria such as *E. coli* M17, *M. avium* and *Mycobacterium tuberculosis* were determined. Peak absorption of the ultrahigh-frequency electromagnetic field by bacterial cultures was detected at frequencies close to the calculated natural frequencies of torsional vibrations of DNA helices of the said types of bacteria: 10.271 GHz, 10.317 GHz and 10.356 GHz, respectively.

Keywords: torsional vibrations, power flux density, electromagnetic field, microwave frequencies

АНАЛИЗ ПОКРЫТИЯ ALU-ПОВТОРОВ ВЫРОВНЕННЫМИ ГЕНОМНЫМИ ПРОЧТЕНИЯМИ

© 2023 г. Г.С. Тамазян*, А.А. Канапин*, А.А. Самсонова*

**Институт трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского государственного университета,
Университетская наб., 7–9, Санкт-Петербург, 199034, Россия*

E-mail: a.samsonova@spbu.ru

Поступила в редакцию 06.12.2022 г.

После доработки 06.12.2022 г.

Принята к публикации 11.01.2023 г.

Alu-повторы занимают значительную часть генома человека и оказывают большое влияние на процессы, связанные с поддержанием целостности генома. Одним из основных способов изучения вариативности в геноме, включая Alu-повторы, является геномное секвенирование и последующее выравнивание полученных прочтений на последовательность референсного генома. Ключевой характеристикой выравнивания является глубина покрытия участков референсного генома размещенными на них прочтениями. В данной работе мы предлагаем новый метод анализа покрытия в регионах Alu-повторов и примыкающих к ним геномных регионов прочтениями из набора данных полногеномного секвенирования и исследуем распределение средних величин покрытия в двух указанных разновидностях геномных регионов.

Ключевые слова: секвенирование генома, выравнивание прочтений, геномные повторы.

DOI: 10.31857/S0006302923030109, EDN: FRPXRZ

Alu-повторы представляют собой короткие ретротранспозоны, т. е. геномные элементы способные к образованию новых копий посредством механизма «copy–paste». Средняя длина Alu-повтора составляет около 300 пар нуклеотидов (п. н.), поэтому их также относят к типу SINE (short interspersed nuclear elements, короткие рассеянные ядерные элементы). Alu-повторы широко распространены в геномах приматов, в частности в геноме человека они составляют около 11% от общей его длины [1, 2] в количестве около одного миллиона копий, преимущественно расположенных в интронах и межгенных промежутках [3, 4]. Новые вставки Alu-повторов в геноме приводят к разнообразным негативным последствиям для организма хозяина, таким как мутации генов, нарушение структуры регуляторных сайтов и сайтов сплайсинга, а также возникновение новых сайтов неаллельной рекомбинации, приводящей к образованию вариантов копийности (CNV, copy number variants) [5–10]. Данные процессы вносят существенный вклад в нарушение стабильности генома, особенно в случае онкологических заболеваний, когда механизмы по-

давления активности мобильных элементов нарушены.

Жизненный цикл Alu-повторов включает в себя обратную транскрипцию РНК, считанной с геномных копий. Поскольку сами элементы не содержат кодирующих участков, для этого используется обратная транскриптаза, кодируемая другими типами ретроэлементов, таких как LINE (long interspersed nuclear repeats, длинные рассеянные ядерные повторы). Изучение динамики распространения мобильных элементов в геноме принципиально важно при исследовании таких феноменов, как клональная эволюция опухолевых клеток, в ходе которой они приобретают устойчивость к лекарственным средствам. Ранее нами была разработана математическая модель, описывающая динамику появления новых геномных копий LINE- и SINE-элементов в условиях конкуренции за клеточные ресурсы, такие как АТФ и рибосомы [11]. Тем не менее, наиболее полную информацию о динамике числа копий транспозонов в геноме можно в основном получить из данных полногеномного секвенирования. Существует значительное число алгоритмов и способов поиска вставок мобильных элементов в геном, таких как RepeatMasker [12], SINE_scan [13], Transposome [14] и другие. Эти методы в основном используют статистические подходы,

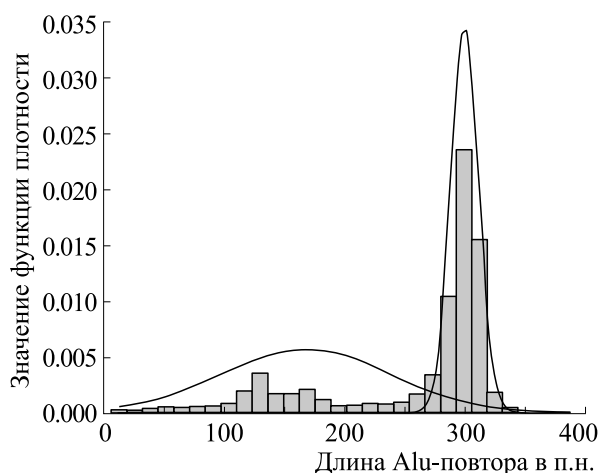


Рис. 1. Гистограмма распределения длин Alu-повторов и оценка распределения длин в виде смеси двух нормальных распределений. Плотности нормальных распределений красного и синего цвета соответствуют частичным и полным Alu-повторам.

анализ спектра нуклеотидных k -меров, анализ расщепленных фрагментов выровненных на геном прочтений (split reads) и другие.

Одной из ключевых характеристик для вычислительного анализа Alu-повторов является глубина покрытия референсного генома выровненными прочтениями. Особенности реализации алгоритмов выравнивания прочтений в соответствующих программах (например, BWA [15]) могут приводить к системным ошибкам в получаемых выравниваниях в силу наличия большого числа сходных между собой Alu-последовательностей в геноме. В данной работе мы рассматриваем глубину покрытия Alu-повторов и примыкающих к ним регионов выровненными прочтениями для целых повторов и их фрагментов на примере одного образца из проекта «1000 геномов» [16]. Представленный в работе метод может быть распространен как на другие данные секвенирования, так и на геномные регионы иного рода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источники данных. Представленный в работе анализ использует следующие наборы данных: выровненные парные прочтения (paired-end reads) для одного образца из проекта «1000 геномов» (идентификатор образца HG00448), полученная программой RepeatMasker аннотация повторов в сборке последовательности генома человека hg19 (загружена с веб-сайта программы <https://www.repeatmasker.org>) и размеры последовательностей используемой сборки генома человека. Для ускорения вычислений были рассмотрены выравнивания только на собранной после-

довательности 20-й хромосомы генома человека. Выровненные прочтения были представлены одним файлом в формате BAM [17, 18], аннотированные повторы — в выходном формате программы RepeatMasker.

Выделение геномных повторов. Регионы Alu-повторов в последовательности 20-й хромосомы генома человека были выделены из файла аннотации RepeatMasker с помощью библиотеки `ruGenomics-ext` из состава пакета `ruGenomics` [19]. Анализ распределения длин Alu-повторов для разделения полных и частичных повторов был проведен в среде R [20] с помощью пакета `mcLust` [21].

Обработка выровненных прочтений. Распределение длин выровненных прочтений было проанализировано с помощью Python-скрипта из набора `ruGenomics-examples`, входящего в пакет `ruGenomics`. Длины прочтений оказались лежащими в диапазоне от 43 до 81 п. н. включительно. Средний размер вставки (то есть расстояние между выровненными парными прочтениями) был оценен программой `CollectInsertSizeMetrics` из пакета `Picard` [22] и составил 480 п. н. По наибольшей длине прочтения и средней величине размера вставки была вычислена длина примыкающего к повтору региона для последующего анализа покрытия: $81 + 480 + 81 = 642$ п. н. Координаты примыкающих к Alu-повторам регионов были определены из координат повторов с использованием программы `flank` из пакета `BED-Tools` [23]. Усредненные величины покрытия в Alu-повторах и примыкающих регионах были получены из BAM-файла выровненных прочтений применением программы `bedcov` из пакета `SAM-tools` [17, 24].

Анализ величин покрытия. Alu-повторы были разделены на полные и частичные согласно модели смеси двух нормальных распределений их длины (см. рис. 1). Оценки математического ожидания распределений составили 168 и 300 п. н. соответственно для частичных и полных Alu-повторов; оценки стандартного отклонения — соответственно 70 и 12 п. н.. Мы также исключили из дальнейшего анализа регионы со средним значением покрытия больше 9 прочтений на п. н. Количества рассматриваемых и исключенных регионов приведены в табл. 1, число исключенных из-за высокого покрытия регионов — 0.15% от их общего числа.

Распределения величин покрытия рассмотренных регионов показаны с помощью графиков вида «ящик с усами» (boxplots) на рис. 2 и 3. Нам не удалось обнаружить статистически значимую разницу в среднем покрытии между полными и частичными повторами с примыкающими к ним регионами (см. рис. 2): применение критерия Уэлча для двух выборок (Welch two sample t -test)

Таблица 1. Разбиение рассматриваемых регионов по их типу, полноте соответствующих Alu-повторов и уровню покрытия регионов выровненными прочтениями

Тип повтора	Тип региона	Количество регионов	
		с покрытием < 9	с покрытием > 9
полный	повтор	20667	18
полный	примыкающий	20659	26
частичный	повтор	8402	22
частичный	примыкающий	8404	20

дало значение вероятностного уровня (p -value), равное 0.271. Разница в среднем покрытии между повторами и примыкающими к ним регионами оказалась статистически значимой для обоих видов повторов (см. рис. 3): применение критерия Уэлча дало 95%-е доверительные интервалы для разницы в покрытии от 0.521 до 0.555 прочтений на п. н. для полных Alu-повторов и от 0.344 до 0.409 прочтений на п. н. для частичных Alu-повторов.

К распределениям покрытия повторов и примыкающих регионов был также применен реализованный в R-пакете mclust метод оценивания смеси нормальных распределений. В обоих случаях наиболее подходящими по байесовскому информационному критерию (Bayesian information criterion, BIC) оказались модели смеси двух нормальных распределений: для повторов — с одинаковыми дисперсиями, для примыкающих регионов — с разными. Оценки параметров моделей приводятся в табл. 2. Среди повторов отмечается определенная доля регионов с повышенным средним значением покрытия (компонента 2), причем регионы с более высоким покрытием

больше представлены среди неполных повторов (см. табл. 3). Среди примыкающих к повторам регионов подобной значимой разницы в распределении обнаружено не было (см. табл. 4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные результаты показывают, что распределения глубины покрытия Alu-повторов и примыкающих к ним регионов не показывают системных ошибок, которых можно было бы ожидать из-за особенностей алгоритмов выравнивания прочтений. Распределения глубины покрытия как для повторов, так и для примыкающих регионов можно описывать с помощью простых статистических моделей вида смеси нормальных распределений. Статистически значимую разницу в представленности полных и частичных Alu-повторов в компонентах смеси нормальных распределений и отсутствие такой разницы для примыкающих к повторам регионов можно объяснить тем, что частичные Alu-повторы могут показывать большее разнообразие в своей копийности в геноме. Представленный в рабо-

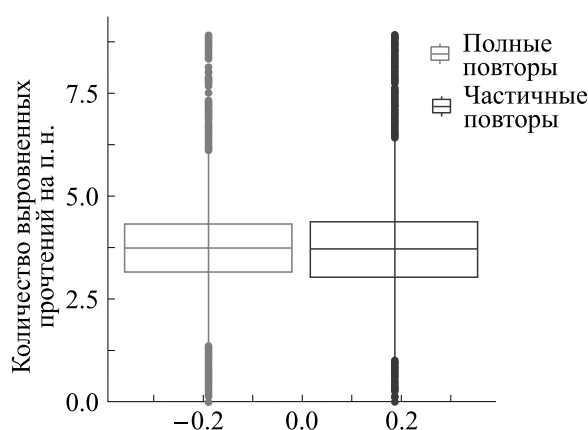


Рис. 2. Распределение средних величин покрытия регионов Alu-повторов вместе с примыкающими к ним регионами в зависимости от типа Alu-повторов: полных или частичных. Распределения показаны в виде «ящичков с усами». Утолщенная линия показывает медианное значение, границы «ящичка» — квантили 25% и 75%, «усы» — 95%-й доверительный интервал в предположении о нормальном распределении значений покрытия, точки — выбросы согласно тому же самому предположению.

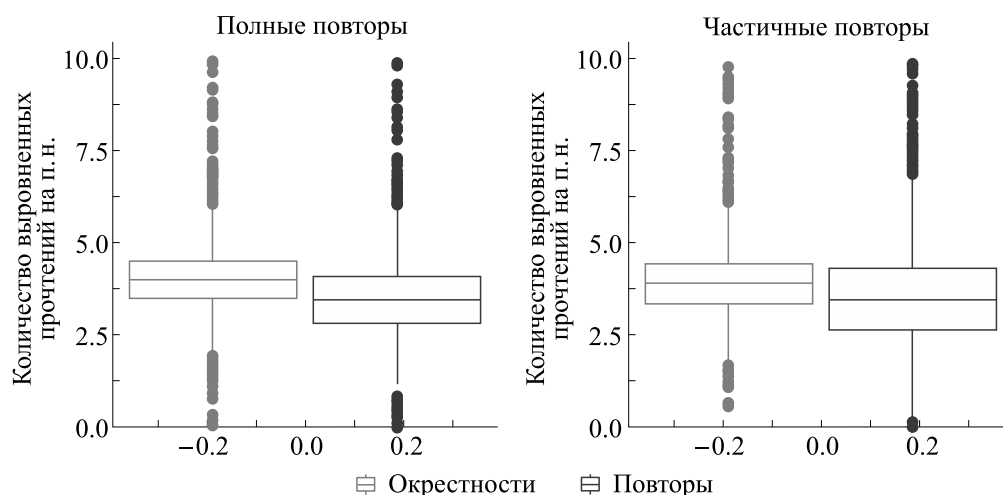


Рис. 3. Распределение средних величин покрытия регионов Alu-повторов и примыкающих к ним регионов (окрестностей) в виде «ящиков с усами».

Таблица 2. Параметры представления распределений средней величины покрытия для Alu-повторов и примыкающих к ним регионов в виде смеси двух нормальных распределений

Параметр	Повторы		Примыкающие регионы	
	Компонента 1	Компонента 2	Компонента 1	Компонента 2
Среднее	3.40	5.87	3.96	4.30
Стандартное отклонение	0.99	0.99	0.74	1.52
Доля регионов	97%	3%	96.5%	3.5%

Примечание. Величины стандартного отклонения и среднего даны в количестве прочтений на п. н. в регионах рассматриваемого рода. Модель для повторов задает равную дисперсию (и, следовательно, стандартные отклонения) для обоих компонент распределения, в отличие от модели для примыкающих регионов.

Таблица 3. Таблица сопряженности для регионов Alu-повторов в соответствии с их полнотой и принадлежности к одной из двух компонент в ранее построенной модели смеси двух нормальных распределений

Вид повтора	Количество в компоненте 1	Количество в компоненте 2
Полный	20518	149
Частичный	8085	317

Таблица 4. Таблица сопряженности для примыкающих к Alu-повторам регионов в соответствии с полнотой соответствующих регионам повторов и их принадлежности к одной из двух компонент в ранее построенной модели смеси двух нормальных распределений

Вид соответствующего региону повтора	Количество в компоненте 1	Количество в компоненте 2
Полный	20565	94
Частичный	8356	48

Примечание. Применение точного критерия Фишера не приводит к отвержению нулевой гипотезы о равномерности распределения регионов от повторов обоих видов в компонентах смеси распределений.

те алгоритм оценки значений покрытия секвенирования для геномных повторов можно расширить как на большее число секвенированных образцов, так и на геномные регионы другого рода.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. A. Batzer and P. L. Deininger, *Nat. Rev. Genet.*, **3** (5), 370 (2002).
2. F. Hormozdiari, M. K. Konkel, J. Prado-Martinez, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** (33), 13457 (2013).
3. E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, et al., *Nature*, **409** (6822), 860 (2001).
4. J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, et al., *Science*, **291** (5507), 1304 (2001).
5. F. C. Chen, Y. Z. Chen, and T. J. Chuang, *Bioinformatics*, **25** (11), 1419 (2009).
6. J. M. Chen, E. Masson, C. Le Marechal, et al., *Cytogenet Genome Res*, **123** (1–4), 102 (2008).
7. P. Deininger, *Genome Biol.*, **12** (12), 236 (2011).
8. L. M. Payer, J. P. Steranka, W. R. Yang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114** (20), E3984 (2017).
9. S. Shen, L. Lin, J. J. Cai, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (7), 2837 (2011).
10. I. Vorechovsky, *Hum. Genet.*, **127** (2), 135 (2010).
11. S. Pavlov, V. V. Gursky, M. Samsonova, et al., *Life (Basel)*, **11** (11), 1209 (2021). DOI: 10.3390/life11111209
12. A. Smit, R. Hubley, and P. Green, *RepeatMasker Open-4.0* (accessed 03/18/2022).
13. H. Mao and H. Wang, *Bioinformatics*, **33** (5), 743 (2017).
14. S. E. Staton and J. M. Burke, *Bioinformatics*, **31** (11), 1827 (2015).
15. H. Li and R. Durbin, *Bioinformatics*, **25** (14), 1754 (2009).
16. S. Fairley, E. Lowy-Gallego, E. Perry, et al., *Nucl. Acids Res.*, **48** (D1), D941 (2020).
17. H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, et al., *Bioinformatics*, **25** (16), 2078 (2009).
18. J. K. Bonfield, J. Marshall, P. Danecek, et al., *Giga-science*, **10** (2), giab007 (2021). DOI: 10.1093/giga-science/giab007
19. G. Tamazian, N. Cherkasov, A. Kanapin, et al., in *BGRS/SB-2022* (Novosibirsk, Russia, 2022), pp. 1121–1122.
20. R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R Foundation for Statistical Computing, 2022).
21. L. Scrucca, M. Fop, T. B. Murphy, et al., *The R Journal*, **8** (1), 289 (2016).
22. Broad Institute, *Picard: A set of command line tools for manipulating high-throughput sequencing data* (2022).
23. A. R. Quinlan and I. M. Hall, *Bioinformatics*, **26** (6), 841 (2010).
24. P. Danecek, J. K. Bonfield, J. Liddle, et al., *Giga-science*, **10** (2), giab008 (2021). DOI: 10.1093/giga-science/giab008

Analysis of Coverage of Alu Repeats by Aligned Genomic Reads

G.S. Tamazian*, A.A. Kanapin*, and A.A. Samsonova*

**Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7–9, St. Petersburg, 199034 Russia*

Alu repeats occupy a notable part of the human genome and greatly affect processes related to genome integrity maintenance. One of the basic methods for studying variation in a genome, including Alu repeats is genome sequencing followed by mapping the sequenced reads to a reference genome sequence. The key feature of the read alignment is the depth of reference genome region coverage by mapped reads. In this paper, a new method is proposed for analyzing the coverage of Alu repeats and their flanking regions by whole-genome sequencing reads and the distribution of mean coverage in two aforementioned region types is explored.

Keywords: genome sequencing, read alignment, genomic repeats

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ЦЕЛОСТНОСТИ ГЕНОМА ЛЬНА

© 2023 г. А.А. Канапин*, А.А. Самсонова*,#

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

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

Поступила в редакцию 06.12.2022 г.

После доработки 06.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Последние достижения в области методов высокопроизводительного секвенирования позволили разработать инновационный подход к оценке стабильности и целостности генома. Глубина сигнала покрытия в определенной точке генома может указывать на потерю целостности ДНК в регионе. В данной работе мы превратили ранее разработанную метрику локальной целостности генома, оценивающую равномерность сигнала покрытия, в количественный признак и провели поиск связанных с ним генетических вариантов в геноме льна. Другими словами, мы применили методологию *x*QTL (т.е. *x* Quantitative Trait Loci, где *x* — обозначение произвольной количественной характеристики, связанной с определенным регионом генома, например, уровень экспрессии генов, степень покрытия рибосомами и т.д.) для выявления геномных регионов, вероятно способствующих потере целостности генома и, возможно, участвующих в поддержании стабильности генома. Анализ, проведенный с использованием данных полногеномного секвенирования 100 образцов льна, позволил идентифицировать гены, вероятно, принимающие участие в поддержании стабильности генома у льна и, возможно, в целом у растений, а также обозначить новые процессы, связанные с данным процессом.

Ключевые слова: стабильность генома, целостность генома, полногеномное секвенирование, локусы количественных признаков, геномика растений, лен, *Linum usitatissimum* L.

DOI: 10.31857/S0006302923030110, EDN: FRUWBQ

Поддержание стабильности и целостности генома является одним из наиболее важных клеточных процессов, обеспечивающих нормальное функционирование организма и передачу наследственных признаков в ряду поколений. Нарушения в работе этих механизмов приводят к повышению уровня геномных аберраций, таких как хромосомные перестройки, варианты копийности и другие структурные вариации. Данные процессы достаточно хорошо изучены у животных и человека, особенно в связи с патологическими и онкологическими заболеваниями, возникающие в результате нарушения нормального функционирования механизмов защиты генома и поддержания его целостности [1–7].

У растений роль структурных вариаций, возникающих как следствие нарушения целостности генома, высока в силу масштабности вносимых ими изменений в геном растения [1, 2, 8]. Изменения эпигенетического ландшафта, нарушения механизмов упаковки хроматина, репликации и трансляции ДНК могут приводить к тому, что те или иные участки генома с большей или меньшей

вероятностью подвергнутся изменениям и приобретут структурные варианты. Методы секвенирования нового поколения дают возможность получить прямую или косвенную информацию о состоянии различных геномных регионов. В частности, данные о глубине покрытия секвенирования позволяют предсказывать структурные варианты и варианты копийности [9, 10]. В то же время, использование сигнала покрытия, а именно информации о количестве фрагментов секвенирования, выравненных на референсный геном в той или иной его точке может служить индикатором целостности генома. Количество фрагментов секвенирования, картированных на тот или иной локус генома, зависит от концентрации геномной ДНК ему соответствующей, и, следовательно может варьироваться при несбалансированных хромосомных перестройках, таких как делеции и дупликации. Ранее нами был разработан прототип количественной метрики локальной целостности генома, основанный на анализе свойств сигнала глубины покрытия секвенирования [11]. В работе, результаты которой представлены ниже, метрика используется в качестве ко-

личественного признака для анализа ассоциаций типа xQTL (Quantitative Trait Loci, локусы количественного признака) [12–14], что позволило идентифицировать гены, вероятно участвующие в поддержании целостности генома у растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходных данных были использованы результаты секвенирования 100 образцов льна (*Linum usitatissimum* L.), секвенированных по протоколу Illumina парными прочтениями длиной по 100 п.о., средняя глубина покрытия секвенирования составляла 20×. Образцы льна были получены из коллекции Федерального научного центра лубяных культур (Институт льна, Торжок, Россия) [15]. Выравнивание фрагментов секвенирования на геном льна версии GCA_000224295.2_ASM22429v2 проводили при помощи программы bwa mem [16]. Поиск однонуклеотидных замен проводили с помощью программы NGSEP, версия 4.0.0 [17]. Предварительная фильтрация найденных вариантов с порогом по следующим параметрам: MAF > 0.05 (Minor Allele Frequency, частота минорного аллеля), частота встречаемости варианта — не ниже 0.85. Общее число вариантов, использованных для анализа, составляло 1873082 после фильтрации с указанными параметрами.

Вычисление метрики локальной стабильности генома проводили по ранее описанной методике [11] в регионах длиной 16384 п.о. на всех 15 хромосомах. Для более точного анализа ассоциаций были рассчитаны значения 10 ковариат при помощи пакета PEER, версия 1.3 [18]. Значения метрики локальной стабильности генома использовали в качестве количественного признака в анализе xQTL (quantitative trait loci, локусы количественного признака). Для поиска *цис*- и *транс*-вариантов, ассоциированных со значениями метрики, применяли пакет QTLtools, версия 1.3.1 [19]. Пороговое значение параметра FDR (false discovery rate, доля ложноположительных значений) для фильтрации обнаруженных вариантов составляло 0.01. Общее число однонуклеотидных вариантов, обнаруженных в данном анализе, составило 4630; из них для более детального рассмотрения были отобраны только те, которые попадали в кодирующие участки генома — общим числом 1020 вариантов в 947 генах. Анализ обогащенности для категорий GO (Gene Ontology), соответствующих данным генам, проводили в пакете программ XGR [20]. Функциональную аннотацию белков льна проводили при помощи поиска гомологов с белками *Arabidopsis thaliana* и идентификации функциональных доменов, представленных в базе данных Pfam [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ метрики локальной стабильности генома как количественного признака позволил идентифицировать 4481 однонуклеотидный вариант, ассоциированный с ней. С целью функциональной аннотации генов, содержащих обнаруженные варианты (общим числом 923), мы провели анализ обогащенности категориями Gene Ontology (GO), результаты приведены на рис. 1.

Наличие таких категорий, как GO:0003678 — DNA helicase activity и GO:0006260 — DNA replication указывает на участие белков, принадлежащих к данным категориям, в процессах, связанных с функционированием генетического аппарата клетки и, следовательно, имеющих прямое отношение к стабильности генома. В частности, следует отметить такие гены, как *Lus10036982* — DNA polymerase alpha 2, *Lus10005256* и *Lus10016124* — AAA-АТФазы, *Lus10023341* — DNA repair (Rad51) family protein, *Lus10020209* — ankyrin repeat family protein, *Lus10024204* — basic leucine-zipper, *Lus10030531* — Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein, *Lus10024246* — WRKY DNA-binding protein, *Lus10013294* — DEAD/DEAH box helicase.

Значительная часть белков также способна связываться с АТФ и АДФ, что следует из анализа сверхпредставленности доменов Pfam (см. табл. 1)

Значительная доля белков включает домены типа TIR (Toll- interleukin receptor), выполняющие сигнальную рецепторную функцию, ассоциированную с врожденным иммунитетом у животных и, вероятно, иммунным ответом у растений [22, 23]. Однако роль доменов такого типа в растениях, в частности, в процессах, обеспечивающих устойчивость к патогенам, еще остается не конца изученной.

Большинство генетических вариантов, ассоциированных с метрикой локальной целостности генома и обладающих способностью связываться с АТФ и АДФ принадлежат к генам двух типов — Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) и NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein (рис. 2).

Эти белки содержат домены, связывающиеся с нуклеиновыми кислотами и нуклеотидами, такие как NB-ARC [24], Rossmann-fold [25], P-loop АТФ/ГТФазы [26] и играют важную роль в процессах, связанных с устойчивостью к патогенам. Однако другие их функции все еще остаются мало исследованными. В частности, белки, относящиеся к классу TIR-NBS-LRR являются активаторами многих сигнальных каскадов, модифицируя различные типы протеинкиназ. Таким образом, они могут оказывать прямое влияние на поддержание стабильности генома за счет реакции на изменения внешней и внутренней среды клетки.

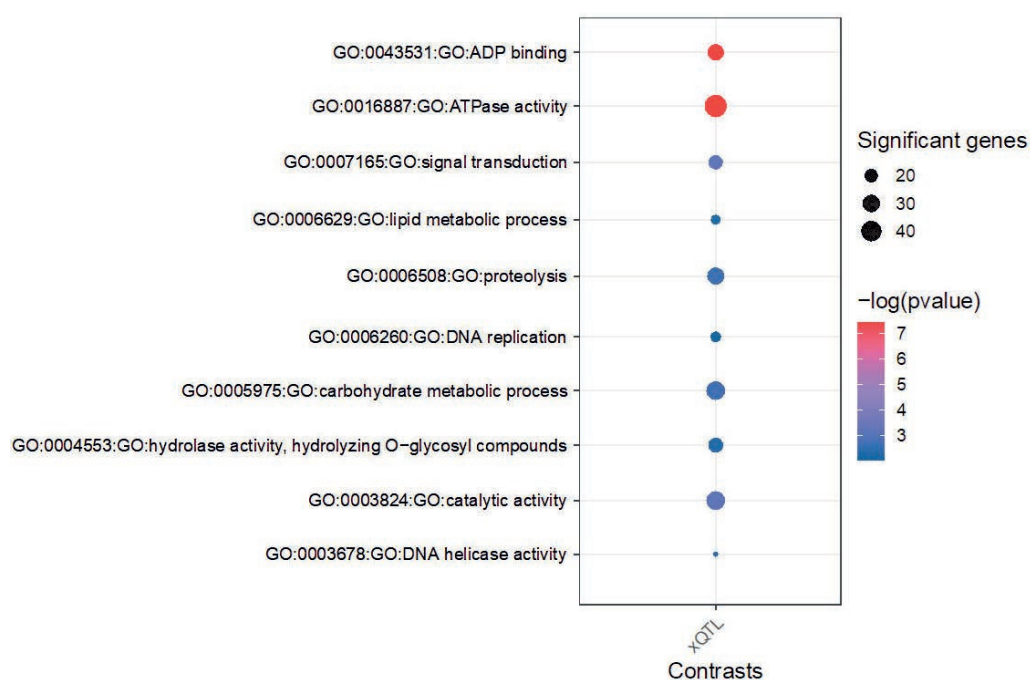


Рис. 1. Категории Gene Ontology, сверхпредставленные в генах, несущих варианты, ассоциированные с метрикой стабильности генома. Размер точки пропорционален количеству генов, аннотированных данной категорией GO, интенсивность окраски соответствует обратному логарифму p -value.

Можно предположить, что АТФазная активность белков, кодируемых идентифицированными генами, в той или иной форме связана с затратами энергии АТФ на процессы поддержания и восстановления стабильности генома. Поскольку мно-

гие процессы защиты растений от патогенов связаны с модификацией эпигенетического ландшафта, возможно, что сходные процессы также ассоциированы с поддержанием целостности генома на разных уровнях.

Таблица 1. Домены Pfam, сверхпредставленные в генах, ассоциированных с метрикой стабильности генома

PFAM ID	PFAM name	Число генов	p -value
PF01582	TIR	21	4.90E-09
PF13676	TIR_2	21	4.90E-09
PF00004	AAA	35	6.20E-08
PF00931	NB-ARC	27	8.50E-08
PF13191	AAA_16	44	1.40E-07
PF13401	AAA_22	39	3.30E-06
PF05729	NACHT	25	3.50E-06
PF13855	LRR_8	44	6.20E-06
PF01637	ATPase_2	17	7.50E-06
PF12799	LRR_4	46	9.60E-06
PF00432	Prenyltrans	8	1.80E-05

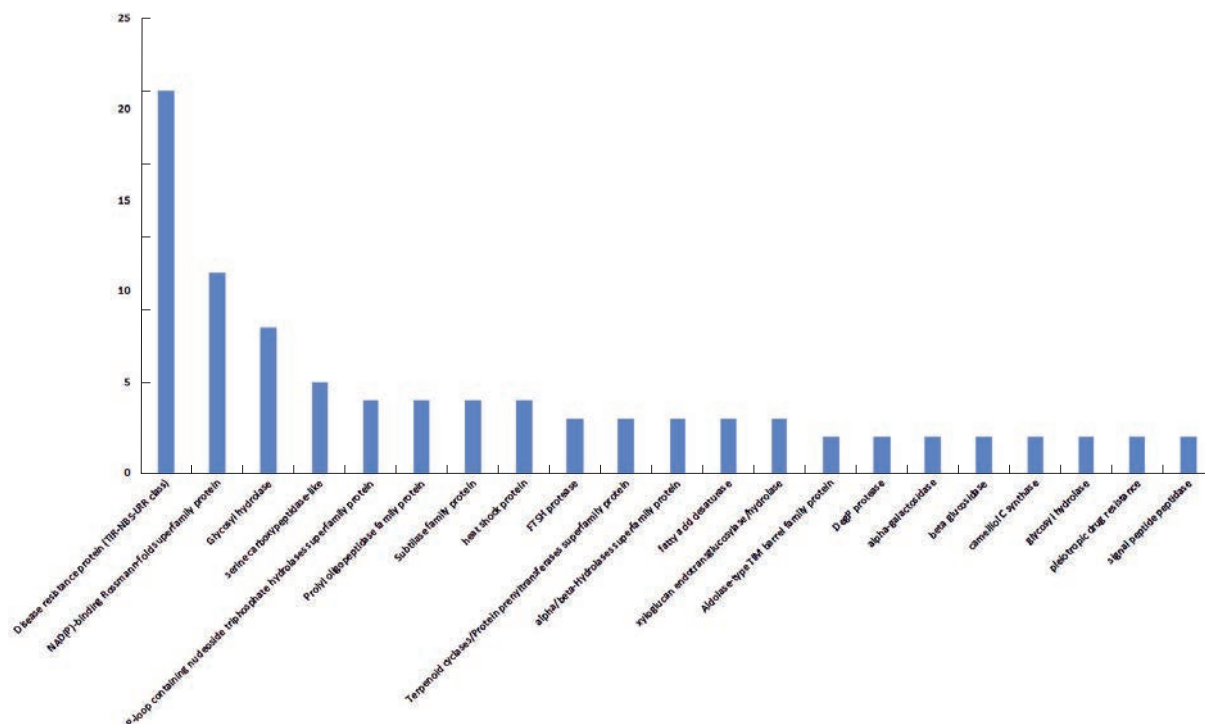


Рис. 2. Распределение генов по функциональной аннотации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Z. N. Lye, M. D. Purugganan, *Trends Plant Sci.*, **24**, 352 (2019).
2. Y. Yuan, P. E. Bayer, J. Batley, and D. Edwards, *Plant Biotechnol. J.*, **19**, 2153 (2021).
3. S. Nik-Zainal, *Genome Med.*, **11**, 1 (2019).
4. A. Janssen, S. U. Colmenares, and G. H. Karpen, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **34**, 265 (2018).
5. S. S. Ho, A. E. Urban, and R. E. Mills, *Nat. Rev. Genet.*, **1** (2019).
6. E. M. Kass, M. E. Moynahan, and M. Jasin, *MOL-CEL*, **62**, 777 (2016).
7. N. Andor, C. C. Maley, and H. P. Ji, *Cancer Res.*, **77**, 2179 (2017).
8. A. Dolatabadian, D. A. Patel, D. Edwards, and J. Batley, *Theor. Appl. Genet.*, **130**, 2479 (2017).
9. A. Abyzov, A. E. Urban, M. Snyder, and M. Gerstein, *Genome Res.*, **21**, 974 (2011).
10. V. Boeva, et al., *Bioinformatics*, **28**, 423 (2011).
11. A. Samsonova, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 2665 (2021).
12. D. Arends, et al., *Bioinformatics*, **28**, 1042 (2012).
13. B. Ng, et al., *Nat. Neurosci.*, **20**, 1 (2017).
14. Y. Ma, H. Klein, and P. L. D. Jager, *Brain Pathol.*, **30**, 984 (2020).
15. М. А. Дук, А. А. Канапин, А. А. Самсонова и др., *Биофизика*, **67**, 234 (2022).
16. H. Li and R. Durbin, *Bioinformatics*, **26**, 589 (2010).
17. D. Tello, et al., *Bioinformatics*, **35**, 4716 (2019).
18. O. Stegle, L. Parts, M. Piipari, et al., *Nat. Protoc.*, **7**, 500 (2012).
19. H. Ongen, et al., *Nat. Commun.*, **8**, 1 (2017).
20. H. Fang, B. Knezevic, K. L. Burnham, and J. C. Knight, *Genome Med.*, **8**, 1 (2016).
21. J. Mistry, et al., *Nucl. Acids Res.*, **49**, gkaa913 (2020).
22. J.-M. Zhou and Y. Zhang, *Cell*, **181**, 978 (2020).
23. D. Lapin, O. Johannndrees, Z. Wu, et al., *Plant Cell*, **34**, 1479 (2022).
24. S. J. Riedl, W. Li, Y. Chao, et al., *Nature*, **434**, 926 (2005).
25. N. Boes, K. Schreiber, E. Härtig, et al., *J. Bacteriol.*, **188**, 6529 (2006).
26. D. D. Leipe, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, and L. Aravind, *J. Mol. Biol.*, **317**, 41 (2002).

Genetic Determinants of Flax Genome Integrity

A. A. Kanapin* and A.A. Samsonova*

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

Recent advances in high-throughput sequencing methods have enabled development of an innovative approach to evaluation of genome stability and integrity. The depth of the coverage signal at a particular location of the genome may indicate the loss of DNA integrity in the region. In this work, the previously developed metric of local genome integrity that estimates the uniformity of coverage signal is considered a quantitative trait and a search for genetic variants associated with the uniformity of coverage signal in flax genome is performed. In particular, quantitative trait locus (xQTL) analyses (i.e., x Quantitative Trait Loci, where x is the designation of an arbitrary quantitative characteristic associated with a particular genome region; for example, the level of gene expression, the degree of ribosome coverage, etc.) have been applied to identify genomic regions that most likely contribute to loss of genome integrity and are, probably, involved in the maintenance of genome stability. The analysis carried out using information on whole-genome sequence assembly of 100 flax samples enabled identification of genes potentially implicated in genome integrity maintenance in flax and, possibly, in plants in general and also revealed novel processes associated with the maintenance of genome integrity.

*Keywords: genome stability, genome integrity, whole genome sequencing, quantitative trait loci, plant genomics, flax, *Linum usitatissimum* L.*

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ МЕДЛЕННЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ В ПРОЦЕССЕ ПЕРВИЧНОГО СЕНСОРНОГО КОДИРОВАНИЯ НОЦИЦЕПТИВНОЙ ИНФОРМАЦИИ

© 2023 г. Е.А. Скребенков*., Б.В. Крылов**, О.Л. Власова*

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

**Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, наб. Макарова, 6, Санкт-Петербург, 199034, Россия

#E-mail: skrebenkovea@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 20.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Натриевые каналы Nav1.8 ноцицепторов участвуют в кодировании ноцицептивных сигналов полимодальных ноцицепторов, причем только высокочастотная составляющая этого импульсного ответа информирует мозг о болевом повреждающем воздействии. Специфическое снижение функциональной активности указанных каналов должно приводить к «выключению» именно этой высокочастотной компоненты, что позволит сохранить нормальное функционирование полимодальных механо-, термо- и хеморецепторов в случае возникновения хронической боли. Для ее лечения в арсенале практической медицины отсутствуют безопасные анальгетики, длительное использование которых было бы совершенно безопасным. Методом математического моделирования на основании ионной теории Ходжкина–Хаксли исследован механизм специфической модуляции функциональной активности каналов Nav1.8 и его роль в первичном сенсорном кодировании ноцицептивной информации. Этот механизм основан на уменьшении потенциалочувствительности указанных каналов за счет снижения эффективного заряда, переносимого их активационным воротным устройством. Впервые показано, что это приводит к полному восстановлению нормальной функции «стимул–ответ» ноцицептивного нейрона. При этом специфически устраняется только высокочастотная компонента ответа его мембраны. Этого же эффекта можно добиться и при снижении плотности медленных натриевых каналов. Однако очевидно, что во втором случае действие фармакологических субстанций, претендующих на роль анальгетиков, будет менее специфично, поскольку становится вероятным их взаимодействие с другими представителями суперсемейства натриевых каналов.

Ключевые слова: ноцицепция, ионная теория, математическое моделирование.

DOI: 10.31857/S0006302923030122, EDN: FRUYXH

Ноцицептивная система занимает особое место среди сенсорных систем организма, являясь своеобразным шестым чувством [1]. Однако в тех случаях, когда болевое ощущение утрачивает свою защитную функцию, необходимую для формирования о повреждающем воздействии, возникает хроническая боль. К сожалению, в арсенале практической медицины сегодня отсутствуют безопасные и эффективные средства, способные заменить опиаты и опиоиды при лечении сильной хронической боли. По-новому подойти к решению этой проблемы позволяет поиск специфических модуляторов функциональной активности одного из представителей суперсемейства натриевых каналов, а именно медленных натриевых каналов Nav1.8. Эти каналы являются

маркерами ноцицептивных нейронов [2], выполняя в их мембране важнейшую функцию генерации высокочастотной компоненты импульсного ответа. Именно эта высокочастотная компонента ответов полимодальных ноцицепторов несет информацию о повреждающем болевом воздействии, а их низкочастотная импульсная активность передает в центральную нервную систему информацию об интенсивности адекватного (например, механического или температурного) стимула. Поэтому важнейшей (как теоретической, так и практической) задачей является выяснение механизма специфической модуляции функциональной активности каналов Nav1.8, кодирующих именно ноцицептивную информацию [3]. Очевидно, что очень сложно подобрать фармако-

логическую субстанцию, способную в случае экспериментального применения строго специфически модулировать каждый из двух важнейших параметров, определяющих функциональную активность указанных каналов. В первую очередь это относится к параметру, определяющему потенциалочувствительность, а именно к величине эффективного заряда их активационного воротного устройства (Z_{eff}). Другим важнейшим параметром служит плотность каналов Nav1.8 в мембране этого первичного сенсорного нейрона. Применение метода математического моделирования создает уникальную возможность выяснения специфической роли каждого из указанных параметров при условии, что все остальные характеристики указанного канала и других мембранных ионных каналов, участвующих в генерации ответов ноцицептивного нейрона, остаются неизменными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование генерации импульсной активности ноцицептивного нейрона. Модель типа Ходжкина–Хаксли мембраны сенсорного нейрона может быть описана следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{1}{C_m} [-I_{\text{leak}}(E) - I_{\text{Na}}(E) - I_K(E) + I_{\text{ext}}], \quad (1.1)$$

$$I_{\text{leak}}(E) = g_{\text{leak}}(E - E_{\text{leak}}), \quad (1.2)$$

$$I_{\text{Na}}(E) = g_{\text{Na}} m^3 h (E - E_{\text{Na}}), \quad (1.3)$$

$$I_K(E) = g_K n^4 (E - E_K), \quad (1.4)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(E)(1 - m) - \beta_m(E)m, \quad (1.5)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(E)(1 - h) - \beta_h(E)h, \quad (1.6)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(E)(1 - n) - \beta_n(E)n, \quad (1.7)$$

где E — трансмембранная разность потенциалов; t — время; C_m — емкость мембраны; I_{leak} , I_{Na} и I_K — токи утечки, натриевых и калиевых ионов соответственно, I_{ext} — внешний ток, представляющий стимул; g_{leak} , g_{Na} и g_K — максимальные проводимости утечки, натриевых и калиевых ионов соответственно; E_{leak} , E_{Na} и E_K — потенциалы реверсии токов утечки, натриевых и калиевых каналов соответственно; m , h и n — переменные Ходжкина–Хаксли натриевых и калиевых каналов, которые изменяются с течением времени и зависят от трансмембранной разности потенциалов; $\alpha_m(E)$, $\beta_m(E)$, $\alpha_h(E)$, $\beta_h(E)$, $\alpha_n(E)$ и $\beta_n(E)$ — константы скоростей переходов, описывающие потенциалозависимости изменения переменных m , h и n . Уравнения 1.1–1.7 представляют базовую модель, которая позволяет осуществить моделирование генерации потенциалов действия.

Моделирование ответов мембраны в присутствии медленного натриевого тока Nav1.8, определяющего ноцицептивную компоненту зависимости «стимул–ответ», осуществляли следующим образом:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{1}{C_m} [-I_{\text{leak}}(E) - I_{\text{Na}}(E) - I_K(E) - I_{\text{Nav1.8}}(E) + I_{\text{ext}}], \quad (2.1)$$

$$I_{\text{Nav1.8}} = g_{\text{Nav1.8}}(E - E_{\text{Na}}). \quad (2.2)$$

Уравнения, описывающие поведение переменных m , h , n приведены ниже в параграфе «Параметры уравнений воротных переменных».

Расчет Z_{eff} активационного воротного устройства медленного натриевого тока $\text{Na}_{\text{v1.8}}$. Оценку Z_{eff} выполняли методом Алмерса [4] на основе следующего уравнения:

$$\frac{g_{\text{Na}}(E)}{g_{\text{Na}}^{\text{max}} - g_{\text{Na}}(E)} = \text{const} \cdot e^{(Z_{\text{eff}} e_0 E)/(kT)}, \quad (3.1)$$

где e_0 — величина элементарного заряда, k — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура.

Уравнение (2.2) использовали для построения функции Алмерса:

$$L(E) = \ln \frac{g_{\text{Na}}(E)}{g_{\text{Na}}^{\text{max}} - g_{\text{Na}}(E)}, \quad (3.2)$$

где $g_{\text{Na}}(E)$ — потенциалозависимость хордовой проводимости, которая характеризует число открытых медленных натриевых каналов (числитель), $g_{\text{Na}}^{\text{max}}$ — ее максимальное значение, поэтому в знаменателе функции Алмерса учитывается число закрытых каналов.

Расчет тангенса угла наклона $L(E)$ при низких значениях трансмембранной разности потенциалов (стремящихся к минус бесконечности) позволяет оценить Z_{eff} .

Параметры уравнений воротных переменных. Параметры натриевого тока I_{Na} :

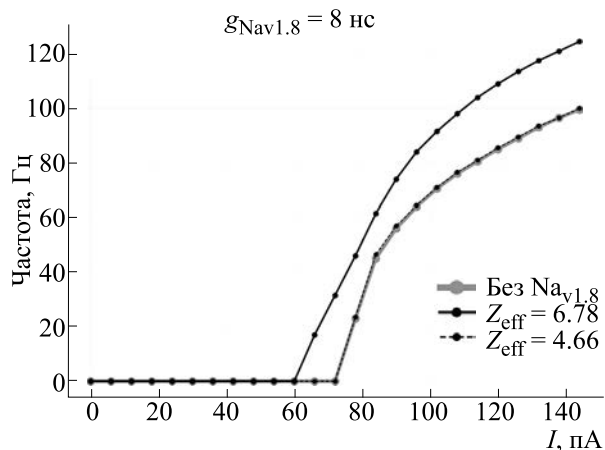


Рис. 1. Зависимость «стимул–ответ» для трех моделей. Серая кривая («Без Nav1.8») – базовая модель, не учитывающая вклад медленного натриевого тока. Темная кривая – с учетом вклада медленного натриевого тока с «контрольной» потенциалочувствительностью, т.е. величина эффективного заряда (Z_{eff}) активационного воротного устройства в этом случае была равна 6.78 элементарного заряда. Пунктирная кривая моделирует «эффект обезболевания», т.е. снижение Z_{eff} до величины 4.66 приводит к устранению высокочастотной компоненты импульсной активности ноцицептивного нейрона.

$$\alpha_m = 1.024 \frac{(E - 47) / 4}{e^{(E-47)/4} - 1}, \quad (4.1.1)$$

$$\beta_m = 1.4 \frac{(E + 26) / 5}{e^{(E+26)/5} - 1}, \quad (4.1.2)$$

$$\alpha_h = 0.0256 e^{-(E+31)/18}, \quad (4.1.3)$$

$$\beta_h = 0.8 / (1 + e^{-(E+8)/5}), \quad (4.1.4)$$

Параметры калиевого тока I_K :

$$\alpha_n = 0.16 \frac{-(E + 48) / 5}{e^{-(E+48)/5} - 1}, \quad (4.2.1)$$

$$\beta_n = 0.5 e^{-(E+53)/40}. \quad (4.2.2)$$

Параметры медленного натриевого тока $I_{\text{Nav1.8}}$:

$$\alpha_m = 2.85 - \frac{2.84}{1 + e^{(E-1.16)/13.95}}, \quad (4.3.1)$$

$$\beta_m = \frac{7.62}{1 + e^{(E+46.5)/8.83}}, \quad (4.3.2)$$

$$h_\infty = \frac{1}{1 + e^{(u+32.4)/4}}, \quad (4.3.3)$$

$$\tau_h = 1.218 + 42 \cdot e^{-(u+38.1)^2 / (2 \cdot 15.2^2)}, \quad (4.3.4)$$

$$\frac{dh}{dt} = (h_\infty - h) / \tau_h. \quad (4.3.5)$$

Параметры уравнений воротных переменных были адаптированы на основе данных, полученных экспериментально в работах [5, 6].

Численные решения уравнений были получены при помощи библиотеки Brian Simulator для языка программирования Python [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние медленного натриевого тока на зависимость «стимул–ответ». Физиологическая роль тока Nav1.8 (уравнение (2.2)) может быть наглядно продемонстрирована при построении функции «стимул–ответ» (рис. 1).

Результаты расчетов показывают, что учет вклада медленного натриевого тока проявляется, во-первых, в сдвиге функции «стимул–ответ» влево, в сторону меньших стимулирующих токов. Генерация повторных ответов здесь начинается при стимулирующих токах, которые на 12 пА меньше, чем в базовой модели, не учитывающей их вклад. Во-вторых, наблюдается изменение крутизны исследуемой кривой. Учет вклада медленных натриевых каналов проявляется в том, что в базовой модели переход от линейного участка кривой к ее нелинейному участку (отрицательно ускоряющейся части) происходит раньше и более ярко выражен, чем в модели с медленным натриевым током. Так, в рамках базовой модели смена с линейного роста на отрицательное ускорение происходит примерно на уровне 85 пА входного тока, а для модели с медленным током – примерно на уровне 95 пА. Таким образом, в диапазоне величин стимулирующего тока 80–120 пА частота повторных ответов растет с большей скоростью для модели с медленным током: 0.925 Гц/пА для базовой модели и 1.25 Гц/пА – для модели с медленным натриевым током. Наибольшее влияние вклада тока Nav1.8 проявляется при низких значениях стимулирующего тока (рис. 1).

Наиболее важным результатом, на наш взгляд, явилось обнаружение сильного корректирующего действия снижения потенциалочувствительности медленных натриевых каналов. Так, уменьшение Z_{eff} до величины 4.66 приводит к восстановлению «контрольных» величин частоты импульсной активности сенсорного нейрона при моделировании его функции «стимул–ответ» (рис. 1). При этом, очевидно, специфически снижается именно высокочастотная компонента повторных ответов, которая кодирует ноцицептивную информацию, передаваемую от ноцицепторов в центральную нервную систему.

Влияние плотности каналов Nav1.8 на зависимость «стимул–ответ». На рис. 2 показаны несколько кривых «стимул–ответ» для различных значений $g_{\text{Nav1.8}}$. Увеличение плотности каналов

Nav1.8, которое в модели представлено переменной $g_{Nav1.8}$, приводит к общему увеличению частоты ответов мембраны, а также к более низким входным стимулам, необходимым для инициации ритмической активности.

Кривая (рис. 2) для самой низкой плотности каналов позволяет наиболее отчетливо увидеть различие ответов базовой модели и модели с учетом медленного тока Nav1.8. Наибольшая близость значений частоты ответов наблюдается в районе стимула 90 пА, как раз в зоне смены характера кривой с высокого линейного роста на «замедляющийся» рост для базовой модели. Кроме того, у кривой для модели с $g_{Nav1.8} = 5$ нСм отсутствует настолько же заметная смена характера кривой «стимул–ответ».

Кроме общего увеличения частоты ответов с ростом плотности каналов Nav1.8 также сдвигается точка расхождения кривых для базовой и Nav1.8-моделей. Зона качественного различия характеров кривых сдвигается в сторону более низких стимулов: около 90 пА для $g_{Nav1.8} = 5$ нСм и около 70 пА для $g_{Nav1.8} = 10$ нСм.

Однако при значительном различии в росте в зоне расхождения, для более сильных стимулов не наблюдается изменение характера роста, только общий сдвиг в сторону больших частот ответов.

Влияние каналов Nav1.8 на рисунок импульсной активности мембраны ноцицептивного нейрона. Проведенные расчеты показывают, что импульсные ответы на воздействие постоянного тока наблюдаются в широком диапазоне его величин — от 75 до 140 пА. При учете вклада медленных натриевых каналов заметно снижается длительность межимпульсного интервала (рис. 3 и 4). Сравнивая ритмическую активность, представленную на рис. 3 и на рис. 4, легко видеть, что этот эффект становится менее заметным. Очевидно, что снижение Z_{eff} с контрольного значения до величины 4.66 приводит к практически минимальному отличию межимпульсных интервалов установившихся повторных ответов. Отметим также, что прогрессивное увеличение последовательных межимпульсных интервалов, называемое адаптацией к действию постоянного стимула, проявляется очень слабо только в записи на рис. 3б при $Z_{eff} = 4.66$ в том случае, когда величина стимулирующего тока составляла 85 пА.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным результатом нашей работы явилось выяснение той специфической физиологической роли, которую выполняет часть молекулы медленного натриевого канала Nav1.8, его активационное воротное устройство, в процессе кодиро-

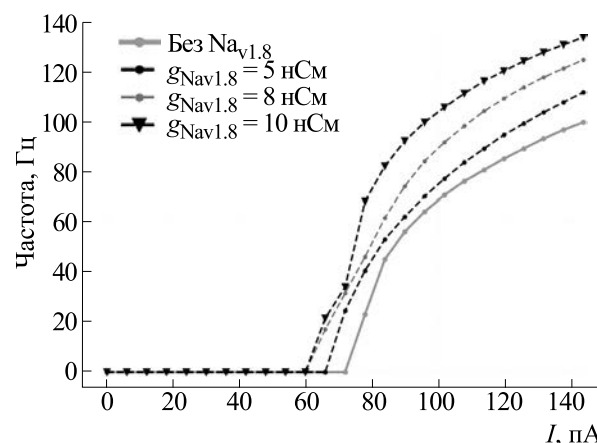


Рис. 2. Кривая «стимул–ответ» для различных проводимостей медленного натриевого тока.

вания ноцицептивных сигналов. Как было отмечено выше, указанные каналы могут считаться маркерами тех первичных сенсорных нейронов заднекорешковых ганглиев спинного мозга, афференты которых являются ноцицепторами. Величина эффективного заряда, переносимого при открывании канала в ответ на деполяризующий стимул, оказалась критически важным параметром, модулирующим возбудимость ноцицептивной мембраны. Это позволяет по-новому подойти к решению проблемы хронической боли, возникающей в том случае, когда ноцицептивный сигнал уже выполнил свою информационную функцию и стал для организма «негативным побочным эффектом». Тончайшее воздействие на активационное воротное устройство, рассматриваемое в качестве мишени для атакующих молекул и приводящее к снижению Z_{eff} , ведет, в свою очередь, к снижению высокочастотной компоненты импульсного ответа ноцицепторов и к купированию хронической боли. Этот подход оказался перспективным при использовании в качестве атакующих молекул аргинин-содержащих коротких пептидов, которые сегодня могут претендовать на роль анальгетических лекарственных субстанций [8, 9]. Наши расчеты показывают, что снижение потенциалочувствительности каналов Nav1.8 за счет уменьшения Z_{eff} всего лишь на 2.12 величины элементарного заряда приводит к устранению высокочастотной (болевой) компоненты импульсных ответов полимодальных ноцицепторов и к восстановлению их нормальной функции «стимул–ответ» (рис. 1). Отметим, что более очевидный механизм снижения возбудимости ноцицепторов за счет уменьшения плотности каналов Nav1.8 также приводит к снижению высокочастотной компоненты повторных ответов (рис. 2). При этом, однако под-

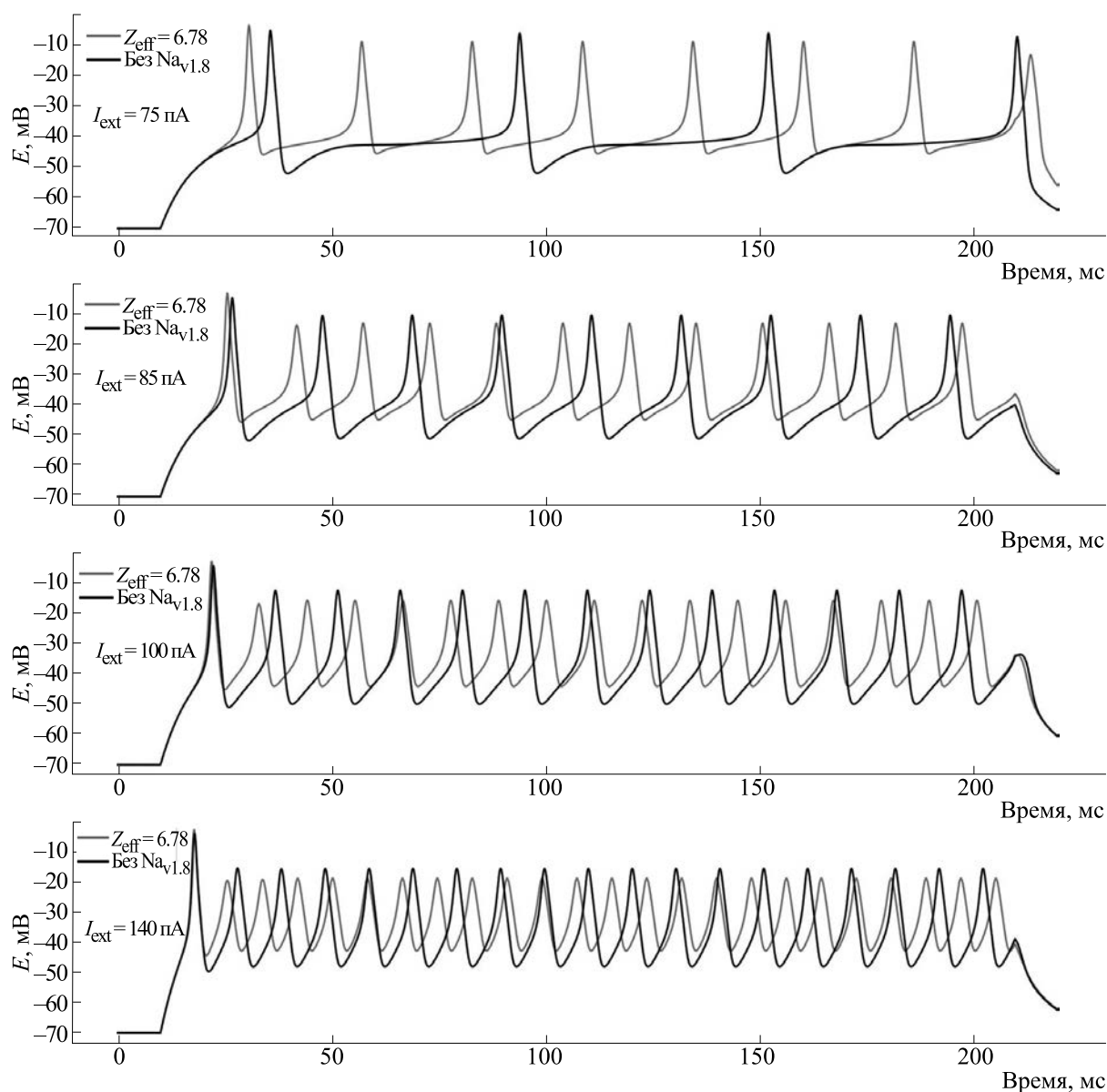


Рис. 3. Импульсная активность модели с медленным натриевым током ($Z_{\text{eff}} = 6.78$); «Без Nav1.8» — базовая модель, генерирующая импульсную активность.

бор субстанций, способных специфически воздействовать только на каналы Nav1.8, оставляя остальных представителей суперсемейства потенциалочувствительных натриевых каналов интактными, представляется очень сложным. Единственным примером реализации рассматриваемого механизма может служить действие очень низких «эндогенных» концентраций убаина, который запускает каскад внутриклеточной сигнализации, ведущий к снижению экспрессии гена SCN10A, продуцирующего каналы Nav1.8 [10]. Также можно отметить, что модель электровозбудимой мембраны ноцицептивного нейрона, раз-

работанная в настоящей работе, позволяет с хорошей точностью воспроизвести экспериментальные записи повторных ответов (рис. 3 и 4). Форма нервного импульса, межимпульсный интервал, адаптационные процессы соответствуют экспериментальным записям ритмической активности ноцицептивного нейрона [3].

Можно заключить, что разработанная математическая модель будет востребована для дальнейшего анализа экспериментальных данных, получаемых при исследовании действия субстанций эндогенной и экзогенной природы, претендую-

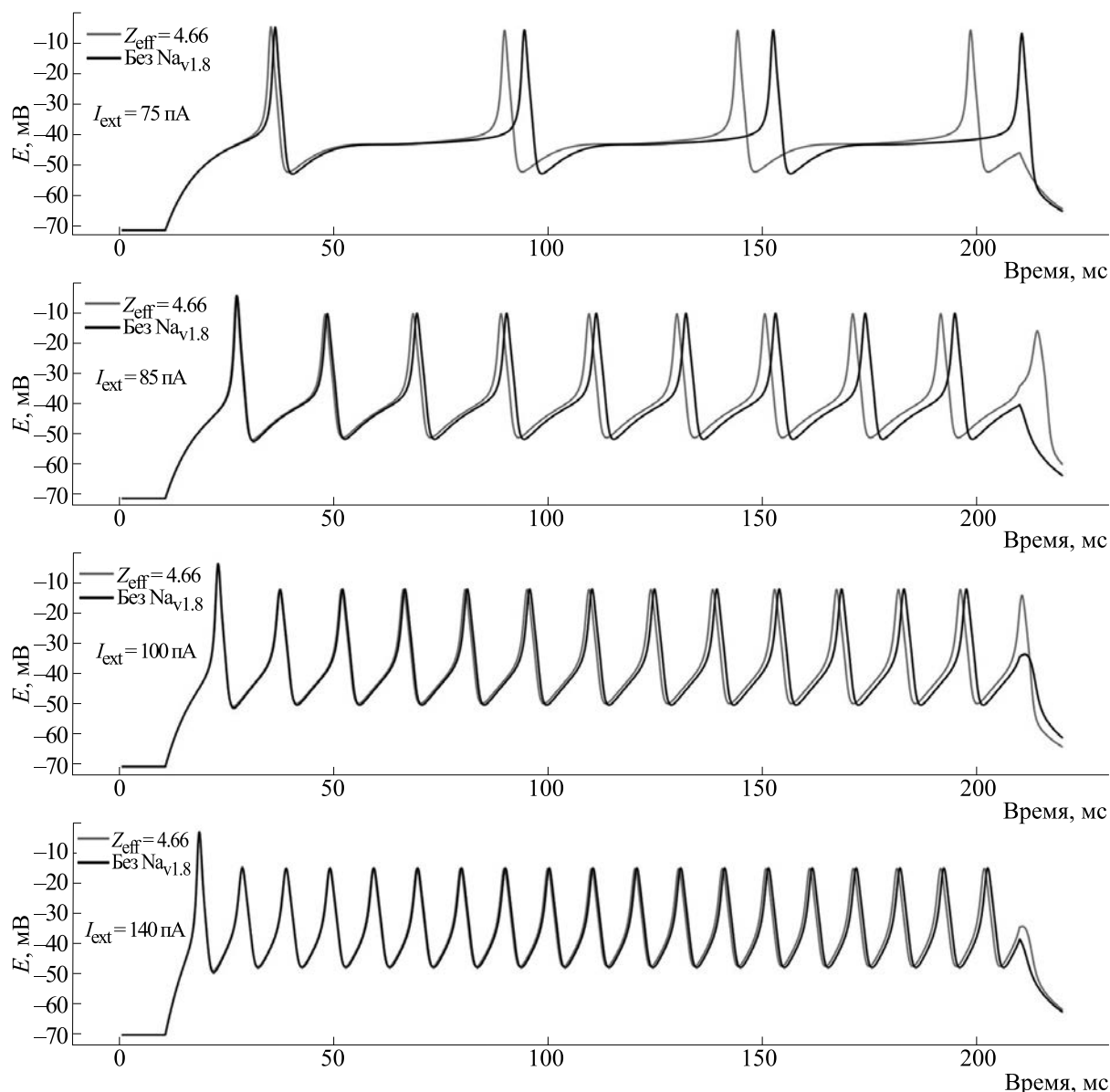


Рис. 4. Импульсная активность модели с медленным натриевым током со сниженным эффективным зарядом ($Z_{\text{eff}} = 4.66$); «Без $\text{Nav}_{1.8}$ » – базовая модель, генерирующая импульсную активность.

щих на роль новых анальгетиков, способных заменить опиаты при лечении хронической боли.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственной программы ГП-47 «Научное и технологическое развитие Российской Федерации (2019–2030)», тема 0134-2019-0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sensory Coding in the Mammalian Nervous System, ed. by G. Somjen (Springer, USA, 1972). DOI: 10.1007/978-1-4684-8190-7
2. D. L. Bennett, X. A. J. Clark, J. Huang, et al., *Physiol. Rev.*, **99** (2), 1079 (2019). DOI: 10.1152/physrev.00052.2017

3. B. V. Krylov, I. V. Rogachevskii, T. N. Shelykh, and V. B. Plakhova, *Frontiers in Pain Science* (Bentham Science Publishers Ltd., Sharjah, 2017).
4. W. Almers, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **82**, 96 (1978). DOI: 10.1007/bfb0030498
5. O. Barkai, R. H. Goldstein, Y. Caspi, et al., *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, ID181 (2017). DOI: 10.3389/fn-mol.2017.00181
6. P. L. Sheets, J. O. Jackson, S. G. Waxman, et al., *J. Physiol.*, **581** (3), 1019 (2007). DOI: 10.1113/jphysiol.2006.127027
7. M. Stimberg, R. Brette, and D. F. Goodman, *Elife*, **8**, e47314 (2019). DOI: 10.7554/eLife.47314
8. I. V. Rogachevskii, V. B. Plakhova, V. A. Penniyaynen, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (11), 5993 (2022). DOI: 10.3390/ijms23115993
9. V. B. Plakhova, D. M. Samosvat, G. G. Zegrya, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (18), 10640 (2022). DOI: 10.3390/ijms231810640
10. V. B. Plakhova, V. A. Penniyaynen, I. V. Rogachevskii, et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **98** (11), 785 (2020). DOI: 10.1139/cjpp-2020-0197

Physiological Role of Slow Sodium Channels in Primary Sensory Coding

E.A. Skrebenkov*, B.V. Krylov**, and O.L. Vlasova*

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

**Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, Saint-Petersburg, 199034 Russia

Nav1.8 sodium channels of nociceptors participate in encoding signals generated by polymodal nociceptors and only the high-frequency component of this impulse response alerts the brain to tissue damage and provides information about the location and type of pain. Specific reduction of the functional activity of these channels should help in “switching off” this high-frequency component, hence, the possibility of retaining the normal functioning of polymodal mechanoreceptors, thermoreceptors, and chemoreceptors in case of chronic pain. From general medical practice, it is known that in the treatment of pain, there are no safe analgesics, the use of which as a long-term therapy would be completely safe. Mathematical modeling based on the Hodgkin and Nuxley formulation describing the flow of ionic currents was used to understand the mechanism of specific modulation of the functional activity of Nav1.8 channels and its role in primary sensory encoding of nociceptive information. This mechanism is based on a reduction in the potential sensitivity of these channels due to a decrease in the effective charge transferred by their activation gating structure. It is shown for the first time that this leads to a complete restoration of the normal function of the stimulus-response of the nociceptive neuron. At the same time, only the high-frequency component of its membrane response is specifically eliminated. The same effect can be achieved by reducing the density of slow sodium channels. However, it is obvious that in the second case, the action of pharmacological substances which are supposed to be called analgesics will be less specific since the interaction with other representatives of the superfamily of sodium channels might turn out to be feasible.

Keywords: nociception, ionic theory, mathematical modeling

ЭКТАЦИТОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЮ НА ФОНЕ УПОТРЕБЛЕНИЯ ПРИРОДНЫХ ЦЕОЛИТОВ

© 2023 г. А.П. Вохминцев*,#

*Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России,
Одесская ул., 54, Тюмень, 625023, Россия

#E-mail: 646224@mail.ru

Поступила в редакцию 13.12.2022 г.

После доработки 26.12.2022 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Представлены данные о влиянии диеты, содержащей порошкообразный природный цеолит Мысовского месторождения (ХМАО–Югра), на способность эритроцитов беспородных белых крыс изменять форму в сдвиговом потоке в норме и при гипотермическом воздействии. Для оценки деформируемости эритроцитов использован метод лазерной дифрактометрии, реализованный в усовершенствованном эктацитометре. В качестве сравнения использован хорошо изученный и активно применяющийся в изготовлении лекарств и нутрицевтиков цеолит Холинского месторождения (Забайкальский край). Показано, что гипотермия вызывает значительное повышение индекса деформируемости эритроцитов крыс и повышение липопероксидации по сравнению с показателями контрольных животных. Такие изменения стали результатом макроцитоза, доказанного цитометрически. Употребление в пищу порошка натурального цеолита оказывало антиоксидантные и мембранопротекторные эффекты на опытные группы животных. Упомянутые эффекты заключались в достоверном увеличении индекса деформируемости эритроцитов на фоне снижения процессов перекисного окисления липидов и расширения кривой Прайса-Джонса влево по сравнению с подвергнутыми гипотермии животными, не употреблявшими цеолиты. Полученные результаты демонстрируют общность биологических эффектов природных цеолитов, содержащих клиноптилолит и характеризуют цеолиты Мысовского месторождения как потенциальное сырье для лекарственных препаратов.

Ключевые слова: лазерная дифрактометрия, эритроциты, деформируемость, гипотермия, природный цеолит, эктацитометр.

DOI: 10.31857/S0006302923030134, EDN: FRWIRD

В климатических условиях севера Тюменской области живые организмы, в том числе человек, часто подвергаются действию низких температур. Периферическое звено эритрона оперативно реагирует на гипотермию и играет важную роль в поддержании гомеостаза организма в экстремальных условиях, обусловленных воздействием факторов внешней среды [1, 2].

Влияние на животных холода как экстремального фактора среды приводит к гормональным сдвигам, усилению катаболизма, росту оксидативного стресса [3, 4]. Одной из первых исполнительных систем, включающихся в ответ на переохлаждение, является кровь [4, 5]. Нарастание липопероксидации — перекисного окисления ли-

пидов (ПОЛ) в мембранах эритроцитов неминуемо ведет к снижению деформируемости — способности красных клеток крови к упругой деформации. С этой физической характеристикой связаны способность эритроцитов к самопроизвольной агрегации и сдвиговой дезагрегации, а также процессы газообмена и конечная оксигенация органов и тканей. Деформируемость красных клеток крови приводит к усилению внутриклеточной конвекции кислорода, что обеспечивает высокую скорость переноса кислорода внутри эритроцита при его относительно низком коэффициенте диффузии. Как следствие, снижение деформируемости эритроцитов ведет к ухудшению тканевой оксигенации, уменьшению продолжительности жизни эритроцитов и их разрушению.

Сокращения: ПОЛ — перекисное окисление липидов, ID — индекс деформируемости (элонгации) эритроцитов.

Рядом исследователей было установлено [6, 7], что процессы ПОЛ могут существенно снижаться частицами цеолитов — водных алюмосиликатов, — биологическая активность которых по-прежнему привлекает внимание специалистов в области северной (и не только!) адаптологии, особенно в свете разработки цеолитовых месторождений в Югре [8].

В связи с этим целью данной работы явилось изучение деформируемости эритроцитов крыс в условиях нормально функционирующего организма и гипотермии на фоне употребления цеолитового порошка, добытого на месторождении в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре. Деформируемость эритроцитов характеризуется индексом деформируемости (ID). Зависимость ID от напряжения сдвига характеризует способность эритроцитов к деформируемости при различных скоростях сдвига [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе для измерения ID эритроцитов крыс нами был использован портативный эктацитометр — прибор, разработанный и сконструированный на кафедре анатомии и физиологии человека и животных Тюменского государственного университета [10]. Функционирование прибора основано на принципах лазерной дифрактометрии.

Дифракционную картину динамики деформируемости эритроцитов записывали при помощи видеокамеры в видеофайлы (использовали программу Movie Maker). ID эритроцитов определяли как частное разности и суммы большой и малой полуосей эллипсов дифракционных картин при помощи специализированной программы Ecto-1.

В качестве экспериментальных животных были выбраны широко используемые в подобных работах белые нелинейные крысы. Все животные были половозрелыми самцами, с массой тела 165 ± 15 граммов. Чтобы исключить влияние годичных ритмов, исследование проводили в зимние месяцы. Общее количество экспериментальных животных составляло 128 особей. Животные были разделены на шесть групп: контрольная ($n = 16$) и первая опытная группа ($n = 16$) — интактные животные, содержавшиеся в стандартных условиях при $t = 21\text{--}24^\circ\text{C}$ и со стандартным рационом без ограничений в воде, с естественной сменой освещенности; вторая ($n = 24$) и третья ($n = 24$) опытные группы — животные, содержащиеся в аналогичных условиях и ежедневно получавшие порошкообразный природный цеолит Мысовского месторождения (цеолит 1), добываемый в пойме реки Большая Люлья (Березовский район ХМАО—Югры), производитель — ООО

НПО «ИНТЕРЛИТ» (г. Ханты-Мансийск). Цеолитовый порошок серо-зеленоватого цвета был представлен фракцией менее 0.472 мм. Минерал представлял собой естественную природную смесь алюмосиликатов седьмой минералогической группы с преобладанием клиноптилолита (не менее 75%) и семейства монтмориллонита-каолинита (не менее 15%). В качестве инертных примесей присутствовали кальцит и кварц [11]. Минералы первого месторождения интересны нам в свете активной разработки цеолитовых месторождений в ХМАО—Югре и определения возможности их применения в клинической практике [8].

Для сравнения биологических эффектов цеолитов четвертая ($n = 24$) и пятая ($n = 24$) опытные группы получали хорошо изученный и часто используемый в производстве лекарств и нутрицевтиков обогащенный порошкообразный природный цеолит Холинского месторождения (цеолит 2), добываемый в Монголо-Забайкальской цеолитоносной провинции, Забайкальский край, производитель — АО НПФ «Новь» (г. Новосибирск). Цеолит представлял собой порошок светло-серого цвета без запаха и нейтральный на вкус. Дисперсность составляла 0.35 ± 0.05 мм. Химический состав минеральной составляющей (в %): Si — 38.4—46.1; Al — 6.2—7.3; Fe — 1.05—3.15; Mg — 0.09—1.2; K — 2.24—4.15; Mn — 0.0154—0.308, что соответствует клиноптилолиту. Технические условия производства обогащенных цеолитов допускают наличие небольшого числа примесей: монтмориллонита, диоксида кремния SiO_2 , кристобалита и альбита $\text{Na}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$ [12]. Порошки подмешивали в корм животным из расчета 0.25 г/кг массы тела в течение 20 суток. Навеску цеолитового порошка массой 40—45 мг тщательно размешивали в порции каши из зерновой смеси массой 8—10 г. Животных кормили кашей утром натощак в индивидуальных клетках (до полного съедания порции каши). Остальной объем зерновых и овощей употреблялся животными в общих кормушках.

На 10-е и 20-е сутки эксперимента половину животных первой, третьей и пятой групп подвергали холодовому воздействию — помещали на трое суток в холодовую камеру при температуре $0\text{--}+4^\circ\text{C}$. Продолжительность пребывания животных в холодовой камере была выбрана исходя из работ Т. М. Бондаренко с соавт. [13, 14]. По окончании эксперимента животных декапитировали, кровь собирали в центрифужные гепаринизированные пробирки для дальнейших исследований. В качестве групп сравнения использовали животных контрольной, а также второй и четвертой опытных групп.

Для получения эритроцитарной массы кровь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. От-

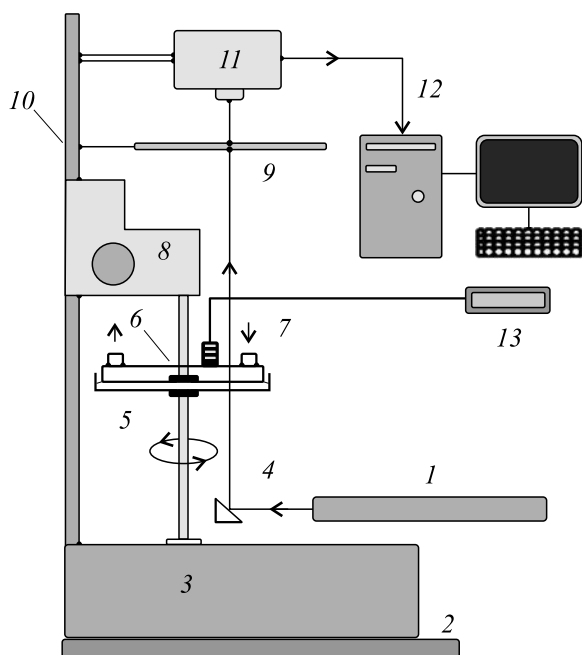


Рис. 1. Схема портативного эктацитометра: 1 – лазер, 2 – металлическая опора, 3 – серводвигатель, 4 – зеркало, 5 – нижний цилиндрический стакан ячейки Куэтта с пробой крови, 6 – верхний цилиндрический стакан ячейки Куэтта с водяным термостатом, 7 – датчик температуры, 8 – механизм регулирования ширины реологического зазора, 9 – экран, 10 – вертикальный крепежный стержень, 11 – цифровая видеокамера, 12 – персональный компьютер, 13 – цифровое табло термодатчика.

бирали плазму; лейкоцитарную пленку, образовавшуюся на поверхности эритроцитов, удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Эритроцитарную массу промывали охлажденным физиологическим раствором три раза.

Количество и диаметр эритроцитов исследовали при помощи стандартных методик [15]. Общее содержание гемоглобина определяли гемоглобинцианидным методом фотометрически.

Для экстракции липидов мембран эритроцитов использовали смесь растворителей гептана и изопропилового спирта в объемном соотношении 1:1. Содержание общих липидов, первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (малоновый диальдегид) продуктов ПОЛ оценивали фотометрически на фотоэлектроколориметре «КФК-2» (Россия) согласно инструкциям к тест-наборам фирмы «Pliva – Lachema» (Чехия).

О достоверности различий показателей судили по *t*-критерию Стьюдента. Обнаруженные нами различия считались статистически значимыми при двустороннем уровне их достоверности $p < 0.05$, при котором вероятность данного события составляла 95% [16].

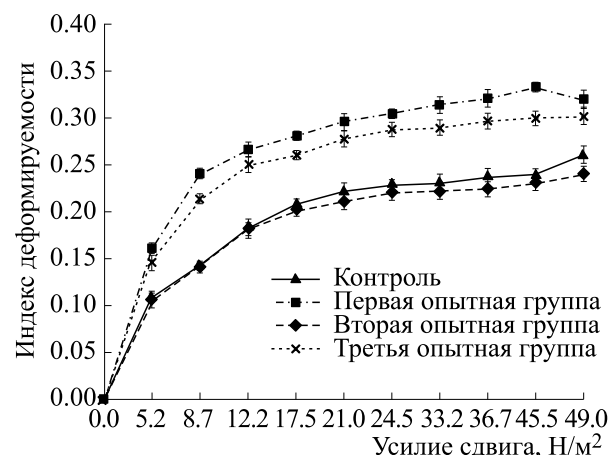


Рис. 2. Зависимость индекса деформируемости эритроцитов крыс от усилия сдвига на 10-е сутки эксперимента (цеолит 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение влияния гипотермии на деформируемость эритроцитов. Пребывание в течение трех суток в холодовой камере вызывало значительное достоверное изменение деформируемости эритроцитов опытных групп крыс на разных усилиях сдвига.

Как видно из графиков, представленных на рис. 1 и 2, деформируемость эритроцитов животных, подвергнутых переохлаждению на 10-е сутки эксперимента, оказалась значительно выше показателей контрольной группы. Так, в сравнении с контрольной группой животных ID эритроцитов крыс первой опытной группы был в среднем на $38 \pm 5\%$ ($p < 0.01$) выше, в третьей опытной группе этот показатель был выше на $27 \pm 3\%$ ($p < 0.01$), а в пятой опытной группе – на $24 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) выше. При этом максимальное отклонение от нормальных показателей (40–70%) демонстрировал ID эритроцитов на низких усилиях сдвига ($\tau = 5.2\text{--}12.2 \text{ Н/м}^2$).

Эритроциты интактных животных, употреблявших цеолитовые добавки из разных месторождений (вторая и четвертая опытные группы), характеризовались недостоверным снижением ID относительно контроля ($p > 0.05$) за исключением максимального усилия сдвига (при $\tau = 49 \text{ Н/м}^2$, $p < 0.05$).

Через 20 суток употребления цеолитов эктацитометрическая картина деформируемости эритроцитов крыс в разных опытных группах была схожей за исключением второй и четвертой групп (рис. 3 и 4). Здесь, в отличие от 10-х суток эксперимента, ID эритроцитов был выше, чем в контроле, в среднем на $4.0 \pm 0.6\%$ ($p > 0.05$) для второй группы и на $5.0 \pm 1.4\%$ ($p > 0.05$) – для четвер-

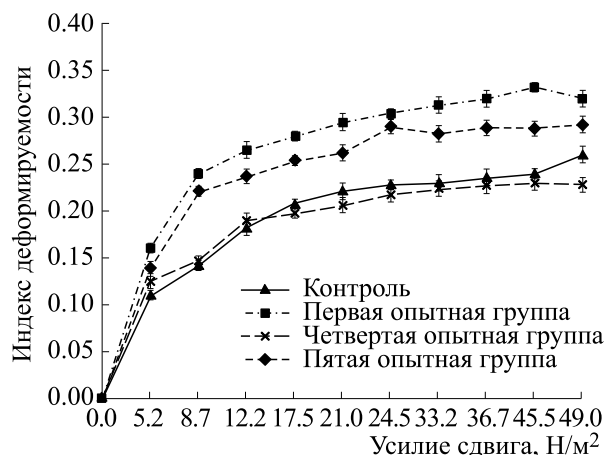


Рис. 3. Зависимость индекса деформируемости эритроцитов крыс от усилия сдвига на 10-е сутки эксперимента (цеолит 2).

той опытной группы. Обращает на себя внимание заметное снижение ID эритроцитов на низких усилиях сдвига в четвертой опытной группе по сравнению с измерениями, произведенными на 10-е сутки эксперимента. Так, при $\tau = 5.2 \text{ Н/м}^2$ ID был меньше на $10.3 \pm 0.7\%$ ($p < 0.01$), а при $\tau = 12.2 \text{ Н/м}^2$ этот показатель был достоверно ниже на $14.2 \pm 1.2\%$ ($p < 0.01$).

Эритроциты крыс, употреблявших цеолит и подвергавшихся гипотермии (третья и пятая опытные группы) через 20 суток после начала употребления цеолитовых порошков, характеризовались достоверно сниженной ($p < 0.05$) деформируемостью на всех скоростях сдвига в сравнении с животными этих же групп, выведенными из эксперимента после 10 суток употребления минеральных добавок. При этом максимальные отклонения ID были зафиксированы на средних усилиях сдвига ($\tau = 17.5 - 24.5 \text{ Н/м}^2$).

Для проверки гипотез о причинах описанных выше микрореологических изменений крови нами были проведены дополнительные тесты: исследовано общее количество эритроцитов и их диаметр, а также получены данные о содержании гемоглобина и продуктов ПОЛ в эритроцитах.

Изучение влияния гипотермии на общее количество эритроцитов, их диаметр, а также содержание гемоглобина и интенсивность процессов ПОЛ. На 10-е сутки эксперимента общее количество эритроцитов во всех опытных группах крыс достоверно повышалось ($p < 0.01$), за исключением животных, подвергнутых гипотермии и не получавших цеолитовую добавку (табл. 1). В данной группе наблюдалось снижение данного параметра на $7.2 \pm 0.2\%$ ($p < 0.05$), при этом содержание гемо-

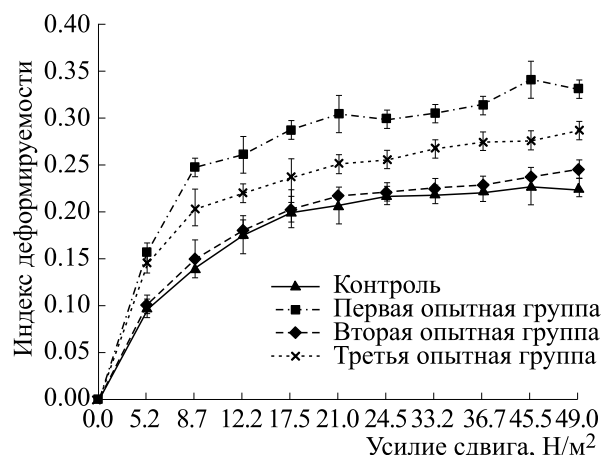


Рис. 4. Зависимость индекса деформируемости эритроцитов крыс от усилия сдвига на 20-е сутки эксперимента (цеолит 1).

глобина снизилось на $11.3 \pm 0.2\%$ ($p < 0.01$) по сравнению с контрольными значениями, что свидетельствует о циркуляции в кровотоке животных первой группы молодых форм эритроцитов, обладающих пониженным содержанием гемоглобина. Данные эритроцитометрии, представленные в виде кривых Прайса-Джонса (рис. 5 и 6) демонстрируют увеличение числа эритроцитов с диаметром больше 8.5 мкм по сравнению с контрольной группой животных.

Обращает на себя внимание группа животных, употреблявших югорский цеолит (третья опытная группа). Здесь общее содержание эритроцитов возросло на 9.4% ($p < 0.01$), что, очевидно связано с большей устойчивостью эритроцитов к гемолизу, индуцированному ПОЛ. Кривая Прайса-Джонса для животных этой группы не была смещена вправо, как у крыс первой группы, но была далека от контрольного распределения. В крови присутствовали микро-, макро- и нормоциты со сдвигом в область молодых клеток.

В ходе работ по определению продуктов ПОЛ в мембране эритроцитов максимальный прирост первичных (на 84%, $p < 0.01$) и вторичных (на 114%, $p < 0.01$) продуктов ПОЛ на фоне значительного снижения содержания общих липидов наблюдался в первой опытной группе. Крысы третьей и пятой опытных групп имели большую резистентность к процессам ПОЛ в сравнении с животными первой группы.

Эксперимент, проведенный на 20-е сутки приема цеолитов, показал следующие результаты (табл. 2): изменения в количественном составе эритроцитов и содержании гемоглобина носили

Таблица 1. Количество эритроцитов, концентрация гемоглобина и состояние процессов липопероксидации в мембране эритроцитов в эксперименте на 10-е сутки употребления цеолита

Исследуемые показатели	Контроль (n = 8)	Первая опытная группа (интактные + охлаждение) (n = 8)	Вторая опытная группа (интактные + цеолит 1) (n = 12)	Третья опытная группа (охлаждение + цеолит 1) (n = 12)	Четвертая опытная группа (интактные + цеолит 2) (n = 12)	Пятая опытная группа (охлаждение + цеолит 2) (n = 12)
Эритроциты, $10^{12}/л$	7.22 ± 0.03	$6.70 \pm 0.09^{**}$	$7.39 \pm 0.12^*$	$7.9 \pm 0.04^*$	$7.34 \pm 0.2^*$	$7.72 \pm 0.11^*$
Гемоглобин, г/л	154.70 ± 0.92	$137.20 \pm 1.41^*$	$157.90 \pm 0.54^*$	$159.30 \pm 1.2^*$	$158.1 \pm 0.42^*$	$158.9 \pm 1.05^*$
Общие липиды, мг/мл	2.19 ± 0.3	$1.52 \pm 0.2^{**}$	2.4 ± 0.4	$1.93 \pm 0.1^*$	2.23 ± 0.2	$2.06 \pm 0.2^*$
Диеновые конъюгаты, нмоль/мг	55.8 ± 2.3	$102.7 \pm 3.7^{**}$	$43.4 \pm 2.3^*$	$69.3 \pm 1.8^*$	$47.1 \pm 3.6^*$	$86.4 \pm 5.1^*$
Малоновый диальдегид, нмоль/мг	5.7 ± 0.3	$12.2 \pm 0.6^{**}$	$4.1 \pm 0.2^*$	$7.7 \pm 0.2^{**}$	$3.2 \pm 0.26^{**}$	$8.1 \pm 0.31^{**}$

Примечание. Результаты приведены в виде $M \pm m$. Отличия достоверны: по сравнению с контролем: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

тот же характер, что и в ранее проведенном эксперименте.

Анализ кривой Прайса–Джонса (рис. 7 и 8) у крыс второй и четвертой групп, получавших цеолиты, свидетельствует о том, что основной объем их эритроцитарной массы был представлен зрелыми нормоцитами. Количество микро- и макроцитов было снижено по сравнению с контролем, что мы склонны связывать со стимуляцией

эритропоэза, вызванной употреблением цеолитов [17].

Этот факт подтверждает сравнительный анализ кривых Прайса–Джонса в опытах на 10-е и 20-е сутки. В мазках крови животных третьей и

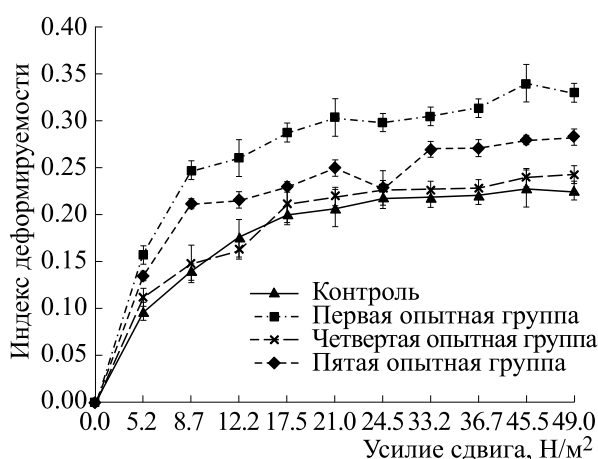
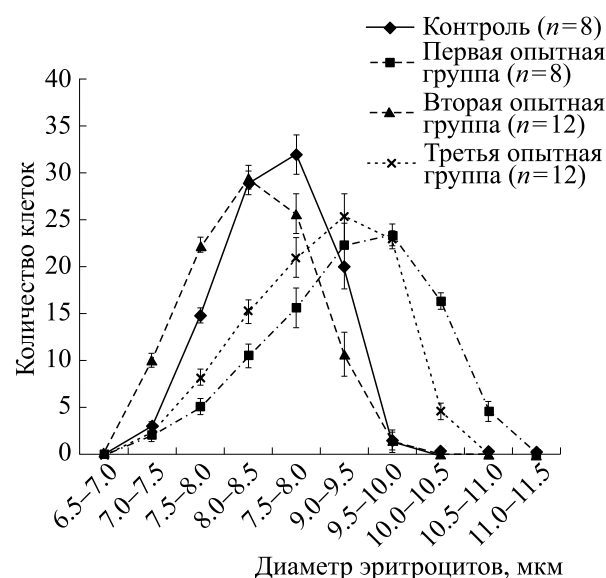
**Рис. 5.** Зависимость индекса деформируемости эритроцитов крыс от усилия сдвига на 20-е сутки эксперимента (цеолит 2).**Рис. 6.** Распределение эритроцитов по диаметру у крыс контрольной и опытных групп животных, употреблявших цеолит 1 и подвергнутых переохлаждению на 10-е сутки эксперимента (кривая Прайса–Джонса).

Таблица 2. Количество эритроцитов, концентрация гемоглобина и состояние процессов липопероксидации в мембране эритроцитов в эксперименте на 20-е сутки употребления цеолита

Исследуемые показатели	Контроль (n = 8)	Первая опытная группа (интактные + охлаждение) (n = 8)	Вторая опытная группа (интактные + цеолит 1) (n = 12)	Третья опытная группа (охлаждение + цеолит 1) (n = 12)	Четвертая опытная группа (интактные + цеолит 2) (n = 12)	Пятая опытная группа (охлаждение + цеолит 2) (n = 12)
Эритроциты, $10^{12}/л$	7.12 ± 0.04	$6.52 \pm 0.12^{**}$	7.17 ± 0.03	$7.64 \pm 0.12^{* \times}$	$7.24 \pm 0.09^{*}$	$7.72 \pm 0.26^{* \times}$
Гемоглобин, г/л	152.30 ± 0.71	$124.50 \pm 1.73^{**}$	$159.20 \pm 0.14^{*}$	$168.30 \pm 1.22^{* \times}$	$161.40 \pm 0.31^{*}$	$171.00 \pm 0.23^{* \times}$
Общие липиды, мг/мл	2.3 ± 0.2	$1.60 \pm 0.13^{*}$	2.43 ± 0.12	2.26 ± 0.30	$2.56 \pm 0.16^{*}$	2.32 ± 0.08
Диеновые конъюгаты, нмоль/мг	57.3 ± 3.8	$117.5 \pm 4.1^{**}$	$45.1 \pm 2.2^{*}$	61.8 ± 2.1	$41.0 \pm 3.1^{*}$	$66.4 \pm 1.8^{*}$
Малоновый диальдегид, нмоль/мг	5.6 ± 0.7	$11.7 \pm 0.8^{*}$	$3.70 \pm 0.51^{*}$	$6.2 \pm 0.1^{*}$	$3.60 \pm 0.22^{*}$	$6.70 \pm 0.24^{**}$

Примечание. Результаты приведены в виде $M \pm m$. Отличия достоверны: по сравнению с контролем: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$. Отличия достоверны между первой, третьей и пятой опытными группами: $\times$ – $p < 0.05$.

пятой экспериментальных групп на 20-е сутки, в отличие от аналогичных крыс на 10-е сутки эксперимента, наблюдалось пониженное содержание эритроцитов большого диаметра, общее смещение кривой влево и размещение вершины в

пределах средних значений для нормоцитов крыс.

Аналогичным образом проявляли себя и антиоксидантные свойства цеолитов. Антиокислительная система эритроцитов крыс, получавших в пищу цеолиты, оказалась гораздо более устойчивой к негативному влиянию холодового фактора,

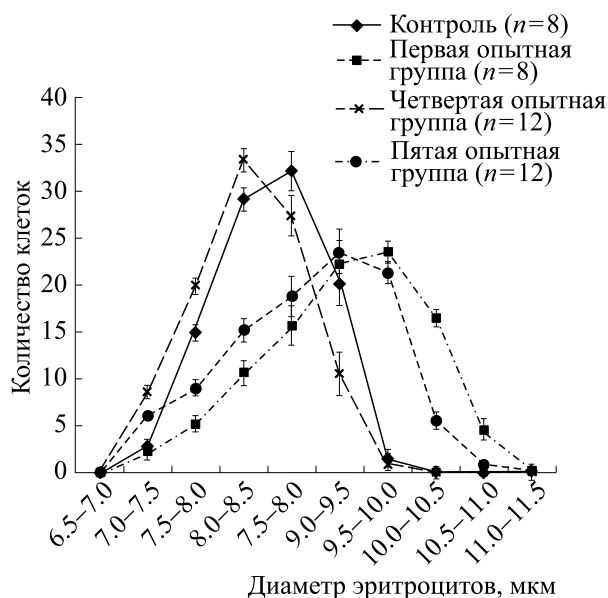


Рис. 7. Распределение эритроцитов по диаметру у крыс контрольной и опытных групп животных, употреблявших цеолит 2 и подвергнутых переохлаждению на 10-е сутки эксперимента (кривая Прайса-Джонса).



Рис. 8. Распределение эритроцитов по диаметру у крыс контрольной и опытных групп животных, употреблявших цеолит 1 и подвергнутых переохлаждению на 20-е сутки эксперимента (кривая Прайса-Джонса)

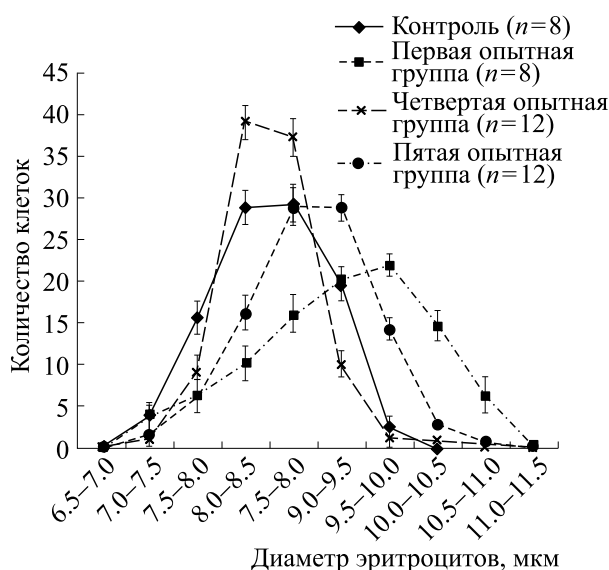


Рис. 9. Распределение эритроцитов по диаметру у крыс контрольной и опытных групп животных, употреблявших цеолит 2 и подвергнутых переохлаждению на 20-е сутки эксперимента (кривая Прайса–Джонса).

как в сравнении с первой группой, так и при сопоставлении результатов, полученных после 10-ти и 20-ти суток употребления цеолитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наряду с агрегацией деформируемость эритроцитов — важнейшая микрореологическая характеристика, которая отражает способность этих клеток изменять свою форму при прохождении микроциркуляторного русла, что обеспечивает оптимальную газотранспортную функцию этими клетками. Данная способность претерпевает определенные изменения на фоне гипотермии.

Известно, что охлаждение эритроцитов *in vitro* приводит к значительному снижению их способности к деформации [18]. Этот факт связан с увеличением вязкости липидного бислоя и фазовыми переходами в мембранных липидах. В живых организмах подобного эффекта не наблюдается. Даже понижение общей температуры тела практически всегда приводит к увеличению деформируемости красных клеток крови. Это обусловлено возросшей энергетической потребностью организма, которая реализуется при помощи активации антигипоксических механизмов.

На начальной стадии реализации антигипоксического эффекта, посредством симпатoadrenalовой реакции происходит выброс в кровь депонированных в депо эритроцитов. Такие клетки крови обладают меньшим диаметром при неизменном содержании гемоглобина [19]. Платой за

чрезмерное наполнение гемоглобином служит снижение деформируемости таких клеток, что приводит к повышению вязкости цитоплазмы. Помимо этого, на снижение деформируемости депонированных эритроцитов в значительной мере оказывает влияние умеренно сниженный pH окружающего пространства в синусоидах селезенки [19]. Такая гематологическая картина часто сопровождает реакции организма к слабым и средней силы раздражителям и продемонстрирована в работах [18, 20]. Несколько сниженный ID эритроцитов животных второй и четвертой групп по отношению к контролю на 10-е сутки эксперимента, вероятно, является следствием подобного рода эффекта в ответ на появление в рационе порошкообразных цеолитов, что подтверждают результаты эритроцитометрии. Со временем эритроциты, вышедшие из депо, подвергаются эритродиерезу. Уже на 20-е сутки эксперимента ID эритроцитов животных в этих группах сравнялся со значениями в контрольной группе и даже превзошел их.

В случае сильного либо продолжительного воздействия раздражителя происходит активация эритропоэза в костном мозге. В работе [21] было показано резкое возрастание содержания эритроцитов в крови крыс в ответ на воздействие различного рода физиологических стрессов, причем при анализе возрастного состава наблюдалось доминирование молодых форм клеток, отличающихся большим диаметром и повышенной способностью к деформации. Причиной этого является многофакторная стимуляция продукции эритропоэтина [22, 23].

В наших экспериментах у крыс, подверженных переохлаждению наблюдался анизоцитоз со смещением кривых Прайса–Джонса вправо. Преобладающие в крови макроциты характеризуются гипергликемией, которая вызывает усиленное поглощение глюкозы, необходимой эритроцитам для синтеза макроэргов [18]. В то же время происходят биохимические перестройки в цитоскелете клеток под действием ряда эффекторов [18].

Это приводит к еще большей деформационной лабильности красных клеток крови, что позволяет кровеносной системе полностью удовлетворять кислородные потребности организма. Но поддержание высокой способности к деформации — энергетически затратный процесс [24], способствующий снижению антиоксидантной защиты клеток. Известно, что окисление продуктами ПОЛ как липидных, так и белковых компонентов мембраны эритроцитов ведет к увеличению ригидности их мембраны. Здесь, очевидно, очень полезным оказывается снижение свободнорадикальных процессов в клетках за счет антиоксидантного действия цеолитов у животных третьей и пятой опытных групп, причем цеолиты до-

бываемые на территории ХМАО—Югры демонстрируют более высокий антиоксидантный эффект. Концентрация продуктов ПОЛ в мембране эритроцитов находилась в обратной зависимости от срока приема минералов. Различные авторы [6, 7, 11] связывают антиоксидантное действие цеолитов с их влиянием на синтез ряда ферментов антиокислительной защиты.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о многогранной роли цеолитов в обеспечении нормального функционирования организма в экстремальных условиях. Особо показателны выраженные гемореологические и антиоксидантные эффекты цеолитов.

Исследователями давно отмечается широкое распространение свободнорадикальных процессов в крови в норме и при патологии, а также наличие и высокая активность множества ферментов антиоксидантной защиты. Длительная гипотермия характеризуется широким развитием перекисной липодеструкции, что в значительной степени сказывается на деформируемости эритроцитов.

Природные цеолиты выступают в данном процессе в качестве мембранопротекторов и антиоксидантов. Механизм реализации их функций, возможно, кроется в высокой сорбционной и ионообменной способности. Насыщая организм необходимыми микроэлементами, и выводя токсины, цеолиты нормализуют гомеостаз, снабжают многочисленные ферменты необходимыми минеральными кофакторами, тем самым повышая антиоксидантную устойчивость организма.

Данные, полученные в этом исследовании, отлично согласуются с результатами, полученными нами ранее для цеолитов Шивыртуйского месторождения [25], и демонстрируют общность биологических эффектов цеолитовых минералов, содержащих клиноптилолит, но добываемых в разных регионах России. Это позволяет отнести Мысовское цеолитовое месторождение в ХМАО—Югре к перспективным источникам цеолитового сырья для производства минеральных добавок и лекарственных препаратов с выраженными мембранопротекторными, антиоксидантными и адаптогенными свойствами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все проведенные процедуры соответствовали этическим стандартам институционального

и/или национального исследовательского комитета, а также Хельсинкской декларации 1964 г. и ее более поздним поправкам или сопоставимым этическим стандартам, что подтверждается заключением локального этического комитета Ханты-Мансийской государственной медицинской академии (ХМГМА) (протокол заключения № 48 от 07.06.2019 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. С. Депутат, И. Н. Дерябина, А. Н. Нехорошкова и др., Журн. мед.-биол. исслед., **5** (3), 5 (2017).
2. Ю. Г. Солонин и Е. Р. Бойко, Известия Коми НЦ УрО РАН, **32** (4), 70 (2017).
3. С. Г. Кривошеков, Н. К. Белишева, Е. И. Николаева и др., Экология человека, № 7, 17 (2016).
4. H. Mugele S. J. Oliver, D. Gagnon, et al., *Experim. Physiol.*, **106** (1), 350 (2021).
5. А. А. Говорухина и Е. Н. Слюсарь, Экология человека, № 5, 32 (2020).
6. S. Kraljević Pavelić, J. Simović Medica, D. Gumbarević, et al., *Front. Pharmacol.*, **9**, 1 (2018).
7. A. Mastinu, A. Kumar, G. Maccarinelli, et al., *Molecules*, **24** (8), 1 (2019).
8. Б. Н. Бекетов и Е. А. Перунова, Университетская медицина Урала, № 3, 8 (2016).
9. А. В. Приезжев, А. Е. Луговцов, А. Ю. Тюрина и др., Биофизика, **51** (5), 833 (2006).
10. А. В. Белкин и др., А. с. 2002106955/14(007161), МПК 7 G01N 33/483, 33/49, № 2236009 (2004).
11. М. А. Гагаро, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (Тюменский государственный университет, Тюмень, 2007).
12. Экспертное заключение № 01/ЭС-496-15 от 08 апреля 2015 года. Испытательная лаборатория ТОО «Нутритест». Протокол испытаний № 17Р от 20 января 2015 года.
13. Т. И. Бондаренко, А. А. Кричевская, И. В. Шейкина и Е. В. Кирюхина, Укр. биохим. журн., **62** (5), 34 (1990).
14. Т. И. Бондаренко, А. А. Кричевская и Е. Ю. Крупенникова, Физиол. журн. СССР **71** (3), 279 (1985).
15. Д. И. Гольдберг и Е. Д. Гольдберг, *Справочник по гематологии* (Томск, 1980).
16. Т. Гринхальх, *Основы доказательной медицины* (Гэотар-мед, М., 2019).
17. А. Г. Карташев и А. К. Баскурян, Физиол. журн., **41**, 14 (1995).
18. Р. Р. Сайфиев, Дис. ... канд. биол. наук (Тюменский государственный университет, Тюмень, 2002).
19. С. П. Чумакова, О. И. Уразова, А. П. Зима и В. В. Новицкий, Гематология и трансфузиология, **63** (4), 343 (2018).
20. А. В. Белкин, В. В. Марынских, Н. В. Турбасова и А. Д. Шалабодов, Вестник ТюмГУ, № 3, 234 (2007).

21. Е. Е. Витриченко, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (Харьковский медицинский институт, Харьков, 1987).
22. Ю. М. Захаров, Ю. Ю. Мельников, Н. В. Тишевская и С. А. Шевяков, Университетская медицина Урала, **55** (4), 59 (2015).
23. L. F. Bennett, C. Liao, and R. F. Paulson, *Methods Mol. Biol.*, **1698**, 91 (2018).
24. K. K. Kalsi and J. Gonzalez-Alonso, *Exp. Physiol.*, **97** (3), 419 (2012).
25. А. П. Вохминцев и В. С. Соловьев. Вестник ТюмГУ, № 3, 28 (2008).

Ektacytometry: Characterization of the Erythrocytes of Rats Subjected to Hypothermia and Receiving Natural Zeolites

A.P. Vokhmintsev*

**Tyumen State Medical University, Odesskaya ul. 54, Tyumen, 625023 Russia*

The article presents data as to the effect of a diet containing natural zeolite, taken from the Mysovsky mine (Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Ugra), and applied in powdered form on the ability of erythrocytes of white outbred rats to change their shape in shear flow under normal and hypothermic conditions. To assess the deformability of erythrocytes, a laser diffraction technique combined with a redesigned version of the ektacytometer has been used in this work. For comparison, zeolite from the Kholinsky mine (Zabaykalsky Krai), which is well-studied and widely used for medicines and nutraceuticals has been provided. It has been shown that hypothermia causes a significant increase in the parameter such as erythrocyte deformability in rats in a cold group and is associated with enhanced lipid peroxidation when compared to animals in a control group. These alterations were a result of macrocytosis, revealed by flow cytometry analysis. Natural zeolite powder used in animal feeds had antioxidant and membrane-protective effects on animals in both groups. These included a significant increase in the parameter such as erythrocyte deformability with a decrease in lipid peroxidation processes and expansion of the Price-Jones curve to the left, unlike those observed in animals subjected to hypothermia but not receiving zeolites. The results obtained demonstrated that the biological effects of natural zeolite-containing preparation which contains a clinoptilolite component are similar and that zeolites from the Mysovsky mine can be used as a potent raw material for drugs.

Keywords: laser diffraction, erythrocytes, deformability, hypothermia, natural zeolite, ektacytometer

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

© 2023 г. Н.Д. Федорова^{*,#}, Д.А. Сумбатьян^{*}, А.В. Соколов^{**}, М.В. Филатов^{*},
А.П. Трашков^{*}, Е.Ю. Варфоломеева^{*}

^{*}Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», мкр. Орлова роща, 1, Гатчина, Ленинградская обл., 188300, Россия

^{**}Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376, Россия

[#]E-mail: fedorova_nd@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Нейтрофилы — ведущие клетки системы врожденного иммунитета и основная популяция лейкоцитов, отвечающая за первичную реакцию организма на различные инфекционные частицы. Последние уничтожаются нейтрофилами благодаря процессам фагоцитоза и каскада реакций, включающих реакцию респираторного взрыва. В результате реакции респираторного взрыва нейтрофилы продуцируют активные формы кислорода и галогенов, мощные цитотоксические агенты, разрушающие частицы в фаголизосоме. Все перечисленные процессы требуют регуляции, поскольку чрезмерная активация нейтрофилов может привести к опосредованному активными формами кислорода повреждению тканей, окружающих очаг воспаления. Белки острой фазы воспаления претендуют на роль регуляторов воспаления. Ранее нами было показано участие церулоплазмينا в ингибировании реакции респираторного взрыва нейтрофилов в образцах крови. Фибриноген, напротив, увеличивал интенсивность реакции респираторного взрыва. Не для всех белков острой фазы воспаления и особенно их комбинаций детально изучено влияние на функции нейтрофилов. В данной работе впервые исследовано влияние ряда белков острой фазы воспаления (С-реактивного белка, сыровороточного амилоида А, альфа-1-кислого гликопротеина и фибриногена) на способность нейтрофилов периферической крови к реакции респираторного взрыва с помощью проточной цитометрии с регистрацией продукции активных форм кислорода в клетках в составе образцов периферической крови. Обнаружены достоверные изменения способности нейтрофилов к выработке активных форм кислорода для ряда комбинаций изученных белков острой фазы воспаления. Исследование взаимодействия церулоплазмينا и фибриногена с нейтрофилами периферической крови выявило их мембранную локализацию. Представляется перспективным идентифицировать рецепторы для белков острой фазы воспаления на мембране нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, белки острой фазы воспаления, реакция респираторного взрыва, цитометрия, конфокальная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302923030146, EDN: FRZBBU

Белки, синтез которых значимо изменяется в ответ на различные патологические процессы (воспаление, повреждение, злокачественные новообразования), а также во время беременности, называются белками острой фазы воспаления (БОФ). К этой группе относят белки, концентрация которых в плазме крови увеличивается на 25% и более в первые 7 суток воспалительного процесса. Повышение концентрации БОФ, как правило, обусловлено цитокинами, коррели-

рует с тяжестью течения воспалительного заболевания и его стадией. Поэтому БОФ используются в клинической практике как маркеры воспалительного процесса и повреждений, а также для отслеживания течения заболеваний и оценки эффективности лечения. Тем не менее, использование анализа БОФ для дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний ограничено из-за ряда проблем, в том числе неспецифичности и сложности сравнения результатов анализа БОФ с помощью подходов, основанных на различных видах антител либо реакциях, катализируемых БОФ.

Сокращения: БОФ — белки острой фазы воспаления, РРВ — реакция респираторного взрыва, СРБ — С-реактивный белок, САА — сыровороточный амилоид А, α1AGP — альфа-1-кислый гликопротеин.

Нейтрофилы, будучи клетками врожденного иммунитета, принимают активное участие в воспалительном процессе. Их основная роль заключается в миграции к месту повреждения или воспаления, захвате инфекционных частиц и их разрушении. Долгое время считалось, что преимущественной функцией нейтрофилов является фагоцитоз, в процессе которого активированный нейтрофил поглощает патоген, а затем разрушает его, высвобождая в фаголизосому активные формы кислорода и различные протеолитические ферменты [1–3]. Активные формы кислорода образуются НАДФН-оксидазным комплексом после активации нейтрофила посредством каскада реакций, известного как реакция респираторного взрыва (РРВ) [4–7]. Процесс активации нейтрофила включает стадию праймирования [8]. На этой стадии нейтрофил претерпевает ряд функциональных изменений, взаимодействуя с разнообразными праймирующими агентами, список которых постоянно пополняется. Одним из таких функциональных изменений является изменение способности нейтрофила к выработке активных форм кислорода, что крайне важно для эффективного уничтожения патогенов.

Известно, что функциональная активность нейтрофилов периферической крови модулируется *in vivo* различными цитокинами и хемокинами [9], а также провоспалительными белками и БОФ. При вирусной инфекции и остром воспалении нейтрофилы, мигрирующие к месту повреждения тканей, переходят в праймированное состояние, и их способность к РРВ возрастает [10–12]. Кроме того, показано, что снижение интенсивности РРВ нейтрофилов в периферической крови во время беременности обусловлено увеличением концентрации в крови белка острой фазы церулоплазмينا [13]. Основываясь на этих фактах, мы предположили, что некоторые БОФ могут быть вовлечены в праймирующую стадию активации нейтрофилов.

Ранее нами было показано наличие высокой вероятности участия некоторых БОФ в процессе праймирования нейтрофилов [13, 14]. Учитывая наличие стандартного распределения нейтрофилов в цельной крови по их способности вырабатывать O_2^- для здоровых доноров [15, 16], мы сравнили его с полученными данными для образцов с добавлением белков интереса. Мы выбрали несколько белков острой фазы воспаления (С-реактивный белок (СРБ), сывороточный амилоид А (САА), альфа-1-кислый гликопротеин (α1AGP) и фибриноген) в качестве объектов дальнейшего изучения. Выбор белков основывался на совпадении времени максимального изменения концентрации белков острой фазы воспаления в крови со временем достижения максимального уровня

праймирования нейтрофилов при развитии ОРВИ [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Доноры. Исследование проводили с использованием цельной крови здоровых доноров. Всего в исследовании приняли участие 14 человек, проживающих в Северо-Западном регионе России. Забор крови осуществляли из локтевой вены в вакуумные гепариновые пробирки Lind-Vac (Эстония), рассчитанные на 3–4 мл крови.

Цитометрическая методика регистрации реакции респираторного взрыва в нейтрофилах с использованием гидроэтидина. Реакцию респираторного взрыва измеряли согласно оригинальной проточноцитометрической методике [15] в образцах цельной периферической крови. В качестве контроля использовали образцы без добавления форболового эфира. В экспериментах по изучению влияния на нейтрофилы периферической крови белков острой фазы воспаления – С-реактивного белка, сывороточного амилоида А, альфа-1-кислого гликопротеина (все – производства Cloud-Clone Corp, США), фибриногена и церулоплазмينا БОФ добавляли к образцам крови в концентрации 35 мкг/мл для СРБ, САА, α1AGP и фибриногена и 0.4 мг/мл для церулоплазмينا. После добавления БОФ образцы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре перед добавлением форболового эфира (10 нг/мл). Интенсивность флуоресценции экспериментальных и контрольных образцов крови измеряли после инкубации (1.5 ч, 37°C) на проточном цитометре Cell Lab Quanta (Beckman Coulter, США). Количественным показателем интенсивности реакции респираторного взрыва являлась усредненная интенсивность флуоресценции, испускаемой стимулированными нейтрофилами.

Получение флуоресцентно меченых белков (церулоплазмينا и фибриногена). Препараты церулоплазмينا и фибриногена были получены из стабилизированной цитратом натрия плазмы крови доноров. Церулоплазмин выделяли с помощью хроматографии на колонках с UNOsphere Q и с неомицин-агарозой, для удаления следов тромбина препарат фильтровали через колонку с бензамидин-агарозой [17]. Фибриноген выделяли с помощью фракционирования глицином и сульфатом аммония, с последующей очисткой с помощью хроматографии на UNOsphere Q. Препараты церулоплазмينا и фибриногена флуорохромировали с помощью AF 488 и Cyanine 5 соответственно, используя N-гидроксисукцинимидные эфиры красителей (#1820 и #3020, «Lumiprobe», Россия). Придерживаясь соотношения 4 моля красителя на 1 моль белка, добавляли 20 мкл 1 мМ растворов эфиров красителей в диметилсульфоксиде на 1 мл 5 мкМ растворов бел-

ков в 200 мМ NaHCO₃, реакцию проводили в темноте в течение 2 ч при 4°C. Затем растворы белков помещали в центрифужные ячейки для концентрирования белков (VivaSpin 6, предел удерживания 30 кДа, Sartorius, Германия), проводя не менее 5 циклов 10-кратного концентрирования и разбавления фосфатно-солевым буфером, из раствора удаляли следы красителя и заменяли буфер. Полученные препараты анализировали на отсутствие агрегатов с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле без детергентов [18], у церулоплазмينا оценивали сохранность парафенилендиамина-оксидазной активности [13]. Включение меток и концентрацию меченых белков оценивали по поглощению при 495 нм для AF 488 ($\epsilon_{495} = 71800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и при 646 нм для Cy5 ($\epsilon_{646} = 250000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), с использованием факторов коррекции при 280 нм — 0.10 для AF 488 и 0.04 для Cy5.

Локализация взаимодействия белков с нейтрофилами. Периферическую кровь, отобранную в вакуумные гепариновые пробирки Lind-Vac (InterVacTechnology, Эстония) центрифугировали при 252 g в течение 15 мин. Далее слой плазмы переносили в пробирки Эппендорф и центрифугировали в тех же условиях (252 g, 15 мин) для осаждения тромбоцитов. Белую пленку лейкоцитов с небольшим количеством эритроцитов объединяли с центрифугированной плазмой в новых пробирках и окрашивали Hoechst 33342 (до конечной концентрации 10 мкг/мл), чтобы иметь возможность визуально отделить нейтрофилы от прочих клеток крови по флуоресценции и морфологии их ядра. Также добавляли флуоресцентно меченые белки (использовали церулоплазмин, меченый Alexa488, и фибриноген, меченный Cy5). Образцы инкубировали в течение 30 мин. Далее суспензию клеток помещали на предварительно обработанную в течение трех-четырех часов 0.001%-м раствором поли-L-лизина (Sigma-Aldrich, Merck, США) поверхность оптической чашки Петри для конфокальной микроскопии (обработанная поверхность, боросиликатное стекло, стерильная). После инкубации в течение 30–40 мин, необходимой для закрепления нейтрофилов на подложке, образец исследовали с использованием конфокального микроскопа (TCS SP5 SMD FLCS, Leica, Германия). Если эритроцитов слишком много, то перед исследованием на конфокальном микроскопе их избыток осторожно убирали и заполняли образец плазмой.

Статистический анализ. Эксперименты были повторены три раза ($n = 3$), средние значения были рассчитаны как $\bar{X}_m = (1/n)\sum X_i$, где X_i является значением каждой последующей выборки. Стандартная ошибка была выражена как S^*/n , где

$$S^* = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X}_m)^2}{(n-1)}},$$

доверительный интервал был рассчитан как $\bar{X}_m \pm (S^*/n^{1/2})t_{n-1, 1-\alpha/2}$, где t было найдено в таблице значений при условии, что в наших экспериментах $\alpha = 0.05$. Различия между средними значениями более чем двух групп были проанализированы с помощью метода ANOVA с последующим тестом Даннета.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитометрическая оценка функциональной активности нейтрофилов периферической крови. Для здоровых доноров нейтрофилы периферической крови характеризуются однотипной интенсивностью РРВ (при измерении в цельной крови), рассматриваемой нами как норма.

Добавление САА к образцам цельной крови здоровых доноров не повлияло на результаты измерения, как и добавление a1AGP (рис. 1а).

Добавление СРБ привело к снижению интенсивности РРВ, в то время как добавление СРБ совместно с САА не привело к каким-либо значимым отклонениям от нормы (рис. 1б).

В нашей предыдущей работе было показано, что фибриноген вносит вклад в увеличение интенсивности РРВ нейтрофилов. Чтобы получить больше информации о влиянии фибриногена на активность нейтрофилов, мы также провели эксперимент по оценке интенсивности РРВ нейтрофилов после добавления фибриногена совместно с САА. На рис. 1в показано, что существенных отличий от эффекта, достигаемого добавлением только фибриногена, нет. Стоит отметить, что добавление a1AGP совместно с фибриногеном не повлияло на наблюдаемый эффект. На рис. 1г видно, что интенсивность РРВ нейтрофилов значимо не отличается для образцов с добавлением только церулоплазмينا и с совместным добавлением церулоплазмينا и фибриногена.

Локализация взаимодействия белков острой фазы воспаления с нейтрофилами периферической крови. Для более подробного изучения взаимодействия с нейтрофилами периферической крови белков острой фазы воспаления, значимо влияющих на их функциональную активность (фибриноген и церулоплазмин), мы визуализировали локализацию этого взаимодействия, используя конфокальную микроскопию (рис. 2). На рис. 3 видно, что взаимодействие церулоплазмينا с нейтрофилом локализовано на мембране клетки.

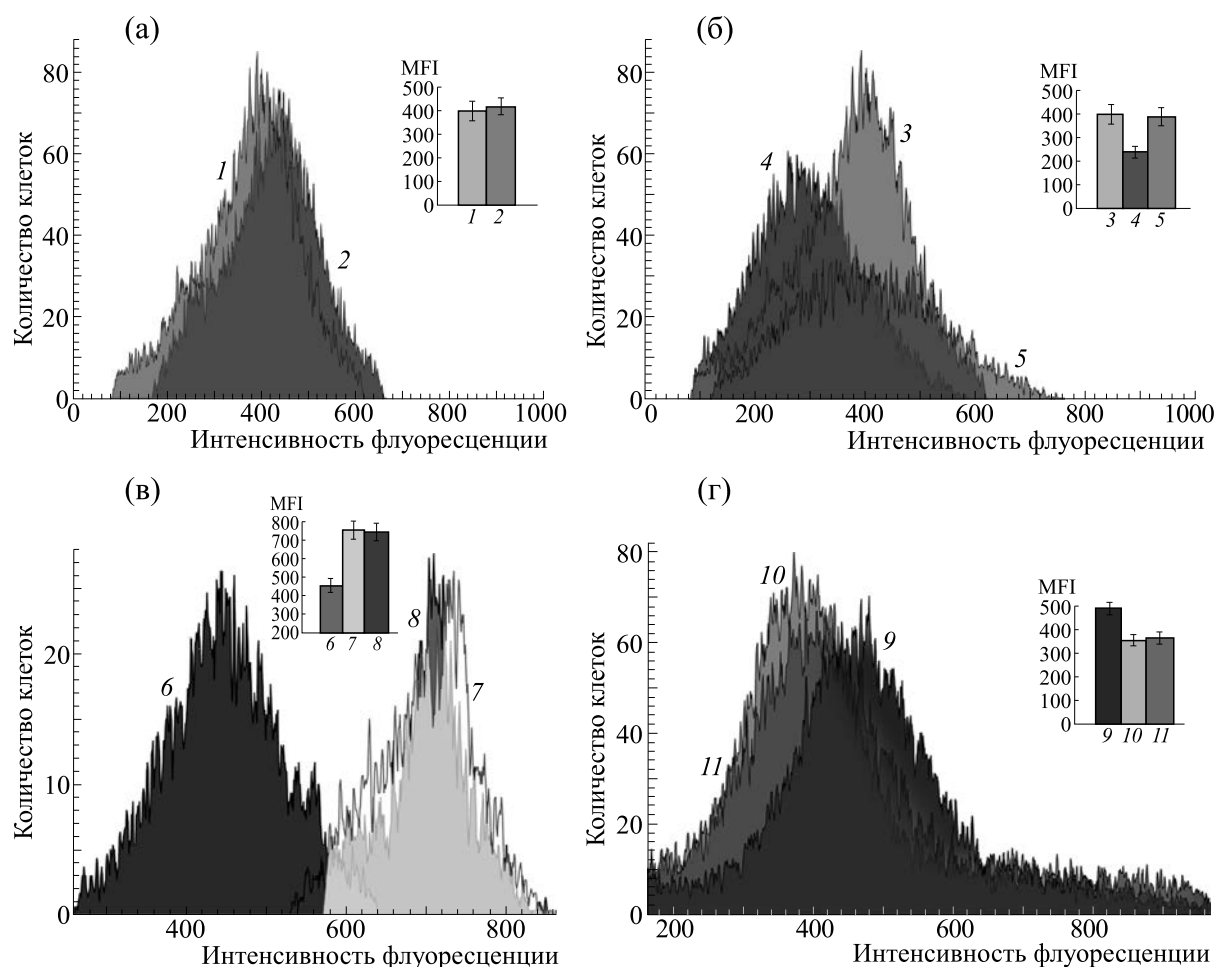


Рис. 1. Интенсивность реакции респираторного взрыва нейтрофилов с добавлением различных белков острой фазы воспаления. (а) – Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции: 1 – контрольные измерения, 2 – образцы с добавлением САА (35 мкг/мл), 3 – образцы с добавлением а1АГР (35 мкг/мл). (б) – Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции: 4 – контрольные измерения, 5 – образцы с добавлением СРБ (35 мкг/мл), 6 – образцы с добавлением СРБ и САА (по 35 мкг/мл). (в) – Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции: 7 – контрольные измерения, 8 – образцы с добавлением фибриногена (35 мкг/мл), 9 – образцы с добавлением фибриногена и САА (по 35 мкг/мл). (г) – Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции: 10 – контрольные измерения, 11 – образцы с добавлением церулоплазмينا (0.4 мг/мл), 12 – образцы с добавлением церулоплазмينا и фибриногена (0.4 мг/мл и 35 мкг/мл соответственно). На врезках: MFI – усредненная интенсивность флуоресценции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Многие работы указывают на участие различных белков в регуляции функций нейтрофилов [19, 20–23], в том числе фибриногена, а1АГР, САА и СРБ, однако все они концентрируются на нейтрофилах, уже вышедших в эпителиальные ткани либо начинающих процесс экстравазации. Все эксперименты по оценке функциональной активности в указанных работах проводились на нейтрофилах, выделенных из крови, либо на клетках линии HL-60. Наше же исследование фокусируется на нейтрофилах периферической крови и на модификациях их функциональной активности (происходящих до начала экстравазации). Кроме того, показанный в приведенных работах характер влияния данных белков на

функциональную активность нейтрофилов не согласуется с нашими данными. Это подтверждает крайнюю чувствительность нейтрофилов к внешним условиям [24]: функциональная активность нейтрофилов значительно зависит от микроокружения, следовательно, и способы ее модификации также могут различаться в зависимости от местоположения нейтрофилов, их клеточного окружения (в эпителии или периферической крови). Кроме того, состав плазмы крови подразумевает больший диапазон соединений, способных воздействовать на нейтрофилы, изменяя их функциональную активность (по сравнению с эпителиальной тканью).

Влияние соединений микроокружения нейтрофилов на их функциональную активность, а

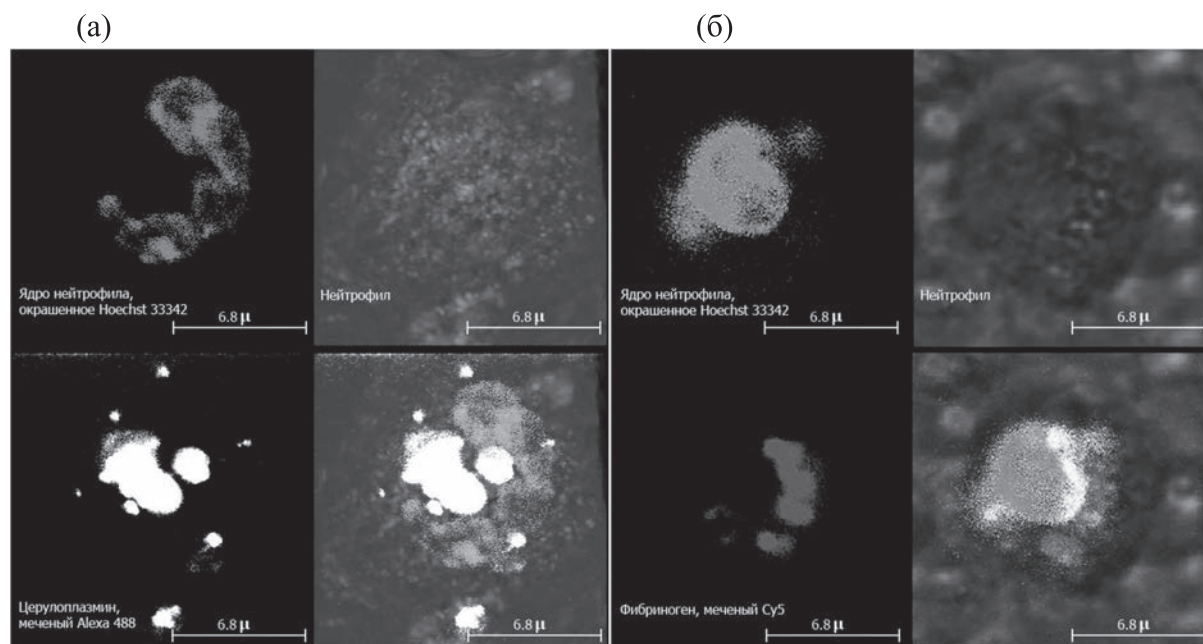


Рис. 2. Визуализация взаимодействия нейтрофила с церулоплазмином (а) и фибриногеном (б).

также значимость этого влияния для патологических процессов — предмет повышенного интереса исследователей в последние несколько лет [25–29]. Не в последнюю очередь это связано с изучением роли нейтрофилов в развитии COVID-19 [26], однако появляется много инте-

ресных работ, рассматривающих неоднозначное участие нейтрофилов и в опухолевых процессах [27–29]. В этих работах в основном рассматривается модулирующее влияние различных цитокинов и хемокинов на реализацию нейтрофилами функций.

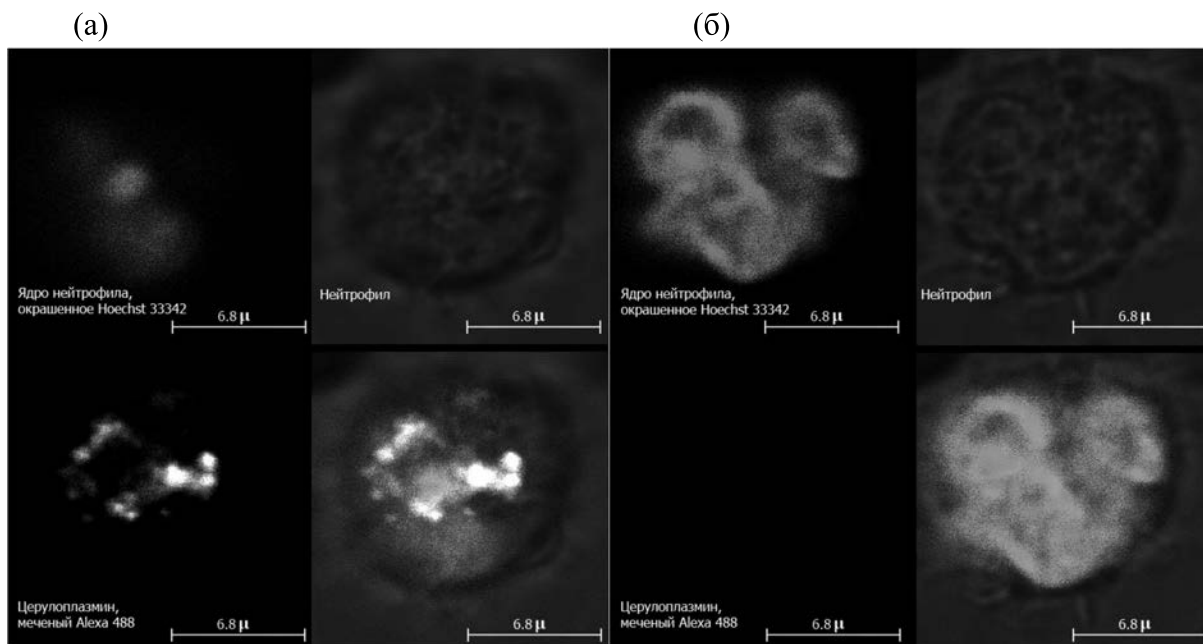


Рис. 3. Визуализация взаимодействия нейтрофила с церулоплазмином на мембране нейтрофила: (а) — конфокальный срез на поверхности нейтрофила, (б) — конфокальный срез ниже поверхности нейтрофила.

Результаты нашего исследования подтверждают предположение о том, что некоторые БОФ, наряду с цитокинами, оказывают влияние на функциональную активность нейтрофилов периферической крови. Взаимодействие БОФ с нейтрофилами может происходить на стадии праймирования последних. В другой нашей работе [14] мы продемонстрировали влияние вирусной инфекции и повышенных концентраций фибриногена на функциональную активность нейтрофилов периферической крови. Влияние СРБ, показанное в этой работе, совпадает с изменениями, наблюдаемыми на второй день развития острой респираторной вирусной инфекции. Более того, получены новые интересные данные о совместном влиянии белков острой фазы воспаления на функциональную активность нейтрофилов в периферической крови. Мы показали отличие совместного влияния двух белков (СРБ и САА) на интенсивность РРВ нейтрофилов периферической крови от влияния, оказываемого ими по отдельности. Все эти факты в совокупности могут быть подтверждением вклада БОФ в реализацию нейтрофилами своей функции, а именно, способность к выработке активных форм кислорода. Также, полученные нами данные подтверждают высокую значимость микроокружения для реализации нейтрофилами своей функции, так как они отличаются от результатов, полученных ранее на выделенных нейтрофилах. Локализация взаимодействия БОФ с нейтрофилом на его мембране, для фибриногена показанная и в более ранних работах [30, 31], указывает на мембранный характер механизма влияния БОФ на функциональную активность нейтрофилов и очерчивает дальнейшее направление исследования данного явления.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный номер №121060200125-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Использование биологического материала человека (крови) было одобрено заключением локального этического комитета НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ №09-2021/2-ЛЭК от 20.09.2021 г. Все измерения проводили в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 г. От всех участвующих доноров было получено письменное информированное согласие на проведение исследования. Все клинические данные были обезличены.

стии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 г. От всех участвующих доноров было получено письменное информированное согласие на проведение исследования. Все клинические данные были обезличены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. H. Kaufmann, *Nat. Immunol.*, **9**, 705 (2008).
2. N. Borregaard, et al., *Trends Immunol.*, **28**, 340 (2007).
3. P. Nordenfelt and H. Tapper, *J. Leukoc. Biol.*, **90**, 271 (2011).
4. T. L. Leto and M. Geiszt, *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1549 (2006).
5. O. Soehnlein, *J. Mol. Med.*, **87**, 1157 (2009).
6. M. Klemke, G. H. Wabnitz, F. Funke, et al., *Immunity*, **29**, 404 (2008).
7. B. D. Hock, K. G. Taylor, N. B. Cross, *Immunology*, **137**, 249 (2012).
8. El-Benna, et al., *Immunol. Rev.*, **273**, 180 (2016).
9. Berton, et al., *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **26**, 160 (1996).
10. M. R. White, E. Crouch, J. Vesona, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **289**, L606 (2005).
11. G. Thomas and B. Rogues, *FEBS Lett.*, **26**, 169 (1972).
12. K. L. Hartshorn, K. Sastry, D. Brown, et al. *J. Immunol.*, **151**, 1 (1993).
13. E. Y. Varfolomeeva, E. V. Semenova, A. V. Sokolov, et al., *Free Radic. Res.*, **50**, 909 (2016).
14. Н. Д. Федорова, Д. А. Сумбатян, М. А. Стукова и др., *Актуальные вопросы биологич. физики и химии*, **6** (1), 115 (2021).
15. M. Filatov, E. Varfolomeeva, and E. Ivanov, *Biochem. Mol. Med.*, **55**, 116 (1995).
16. E. Yu. Varfolomeeva, E. I. Ivanov, E. A. Drobchenko, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **149**, 485 (2010).
17. A. V. Sokolov, L. Acquasaliente, V. A. Kostevich, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **86**, 279 (2015).
18. B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).
19. G. Berton, et al., *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **26**, 160 (1996).
20. K. Prasad, *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, **9** (3), 203 (2004). DOI: 10.1177/107424840400900308
21. L. Björkman, J. Karlsson, A. Karlsson, et al., *J. Leukoc. Biol.*, **83** (2), 245 (2008). DOI: 10.1189/jlb.0607-408. Epub 2007 Nov 5. PMID: 17984291
22. M. J. Costello, H. Gewurz, J. N. Siegel, *Clin. Exp. Immunol.*, **55** (2), 465 (1984).
23. E. Hatanaka, F. P. Ribeiro, and A. Campa, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **38** (1), 81 (2003). DOI: 10.1016/S0928-8244(03)00112-3
24. M. Blanter, et al., *Front. Immunol.*, **13**, Art. ID 820058 (2022). DOI: 10.3389/fimmu.2022.820058
25. Li, et al., *Cell Commun. Signal.*, **17**, 147 (2019).
26. D. Wendisch, O. Dietrich, T. Mari, et al., *Cell*, **184** (26), 6243.e27(2021).
27. S. Jaillon, A. Ponzetta, D. Di Mitri, et al., *Nat. Rev. Cancer*, **20**, 485 (2020).

28. E. J. H. van Houtum, C. Büll, L. A. M. Cornelissen, et al., *Front. Immunol.*, **12**, 790317 (2021).
29. D. F. Quail, B. Amulic, M. Aziz, et al., *J. Exp. Med.*, **219** (6), e20220011 (2022).
30. S. Kamath and G. Y. Lip, *QJM: Int. J. Med.*, **96** (10), 711 (2003). DOI: 10.1093/qjmed/hcg129
31. H. S. Goodridge, A. J. Wolf, and D. M. Underhill, *Immunol. Rev.*, **230** (1), 38 (2009). DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x

The Effect of Acute Phase Proteins on the Activity of Peripheral Blood Neutrophils

N.D. Fedorova*, D.A. Sumbatian*, A.V. Sokolov, M.V. Filatov*,
A.P. Trashkov*, and E.Yu. Varfolomeeva***

**Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»,
mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, Leningrad Region, 188300 Russia*

***Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

Neutrophils are the leading cells of the innate immune system and the main population of leukocytes responsible for the primary reaction of the organism to various infectious agents. The latter are destroyed by neutrophils during the processes of phagocytosis and a cascade of reactions, including the respiratory burst. As a result of the respiratory burst, neutrophils produce reactive oxygen and halogen species, which are powerful cytotoxic agents which destroy foreign particles in the phagolysosome. All of these processes require strict regulation, since excessive activation of neutrophils may lead to higher production of reactive oxygen species thereby causing tissue damage in the focus of inflammation. Acute phase proteins may play a role as regulators of inflammatory processes. Our previous works have shown that ceruloplasmin is involved in the inhibition of the respiratory burst of neutrophils in whole blood samples. Fibrinogen, on the contrary, increased the intensity of respiratory burst. A detailed characterization of the effects acute phase proteins exert on peripheral blood neutrophils' functions has been studied not for all acute phase proteins and especially their combinations. In this paper, for the first time, the flow cytometer and registration of reactive oxygen species production in peripheral blood cells have been used to study the effects of several acute phase reactants (C-reactive protein, serum amyloid A, alpha-1-acid glycoprotein and fibrinogen) on the ability of peripheral blood neutrophils to activate respiratory burst. The results showed that significant changes in the capacity of reactive oxygen species production by neutrophils were seen for a set of combinations of the studied acute phase proteins. The study of the interaction of ceruloplasmin and fibrinogen with peripheral blood neutrophils revealed that they were localized to the membrane. It seems promising to identify receptors for acute phase proteins at the neutrophil membrane.

Keywords: neutrophils, acute phase proteins, respiratory burst, cytometry, confocal microscopy

ВЛИЯНИЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ ЛИГАНДОВ ИЗ ГРУППЫ ДИМЕРНЫХ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ DBA(*n*) И DBPA(*n*) В КОМБИНАЦИИ С γ -ИЗЛУЧЕНИЕМ НА ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД И РАЗМЕР ПУЛА СТОЛОВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ MCF-7

© 2023 г. К.А. Чурюкина^{*,#}, О.Н. Матчук^{*,**}, А.Д. Каприн^{***,****,*****}, С.А. Иванов^{*,*****}, В.С. Коваль^{*****}, А.Ф. Арутюнян^{*****}, А.Л. Жузе^{*****}, И.А. Замулаева^{*,**}

^{*}Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии МЗ РФ, ул. Маршала Жукова, 10, Обнинск, Калужская область, 249031, Россия

[#]E-mail: churiukina@inbox.ru

^{**}Объединенный институт ядерных исследований, ул. Жолио-Кюри, 6, Дубна, Московская область, 141980, Россия

^{***}Национальный медицинский исследовательский центр радиологии МЗ РФ, ул. Королева, 4, Обнинск, Калужская область, 249036, Россия

^{****}Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии МЗ РФ, 2-й Боткинский проезд, 3, Москва, 125284, Россия

^{*****}Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198, Россия

^{*****}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Россия

Поступила в редакцию 05.12.2022 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Лучевая терапия является одним из основных методов лечения злокачественных новообразований, в том числе рака молочной железы. Однако известно, что она может приводить к увеличению количества опухолевых стволовых клеток, которые резистентны к традиционным противоопухолевым воздействиям и, как полагают, ответственны за развитие рецидивов и метастазов. Поэтому значительный интерес представляет разработка средств элиминации опухолевых стволовых клеток, особенно в комбинации с ионизирующими излучениями. В работе изучены эффекты одиночного и комбинированного действия новых серий узкобороздочных лигандов ДНК – димерных бисбензимидазолов DBA(*n*) и DBPA(*n*) (где *n* – число метиленовых групп между двумя бисбензимидазольными блоками) и γ -излучения на клетки рака молочной железы человека линии MCF-7 *in vitro*. В частности, выбраны соединения с максимальным цитотоксическим действием и связыванием с клетками, а затем изучено влияние последних на популяцию CD44⁺CD24^{low} опухолевых стволовых клеток и радиационно-индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход по критерию экспрессии виментина. Показано увеличение уровня экспрессии этого белка и одновременно относительного количества опухолевых стволовых клеток после одиночного действия γ -излучения в дозе 4 Гр. Соединения DBPA (1,4) в комбинации с облучением блокировали радиационно-индуцированную экспрессию виментина и снижали относительное количество опухолевых стволовых клеток в 1.7 и 4.1 раз по сравнению с облучением ($p = 0.041$ и $p = 0.005$) соответственно. При этом происходило уменьшение абсолютного количества опухолевых стволовых клеток в 2.8 и 12.0 раз по сравнению с облучением ($p = 0.029$ и $p = 0.004$) соответственно. Напротив, одиночное и комбинированное с γ -излучением действие DBA(5,7) увеличивало уровень экспрессии виментина и эти же соединения при комбинированном применении с облучением увеличивали относительное количество опухолевых стволовых клеток в 3.1 и 3.6 раза ($p = 0.006$ и $p = 0.005$) соответственно по сравнению с облучением. Абсолютное количество опухолевых стволовых клеток возрастало при этом в 2.2 и 1.5 раза ($p = 0.017$ и $p = 0.032$), соответственно. Полученные данные показывают тесную связь процесса эпителиально-мезенхимального перехода и формирования пула опухолевых стволовых клеток после радиационного воздействия, а также свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения DBPA(1,4) как средств элиминации опухолевых стволовых клеток в условиях *in vivo*.

Ключевые слова: димерные бисбензимидазолы, опухолевые стволовые клетки, эпителиально-мезенхимальный переход, ионизирующее излучение, комбинированное воздействие, проточная цитометрия, виментин.

DOI: 10.31857/S0006302923030158, EDN: FSECZO

По данным Всемирной организации здравоохранения рак молочной железы является наиболее часто встречающимся злокачественным новообразованием среди женщин. Так, в 2020 г. было зарегистрировано свыше 2.2 млн новых случаев [1]. Несмотря на прогресс в лечении злокачественных новообразований молочной железы, основанный на применении комбинированных методов, включающих радио-, химио-, гормоно- и таргетную терапию, существует высокий риск развития метастазов и рецидивов, в связи с устойчивостью некоторых клеток опухоли к терапии. Поэтому основная цель в борьбе со злокачественными новообразованиями заключается в преодолении терапевтической резистентности и предотвращении рецидива заболевания. В настоящее время имеются убедительные доказательства того, что опухоли, в том числе и рак молочной железы, имеют иерархическую организацию и управляются небольшой долей клеток, обладающей свойствами стволовых — опухолевыми стволовыми клетками (ОСК) или опухоль-иницирующими [2, 3]. Эти клетки не только отвечают за инициацию, рост и развитие опухолей, но также участвуют в метастазировании и формировании резистентности к лечению, включая лучевую терапию [4–7]. Поэтому многие исследователи полагают, что именно ОСК определяют эффективность лечения злокачественных новообразований.

Для идентификации и выделения ОСК в опухолях разных локализаций используется целый ряд иммунофенотипических и функциональных маркеров. Например, для ОСК молочной железы характерен иммунофенотип $CD44^{+}CD24^{-/low}$ [8, 9]. Показано, что клетки $CD44^{+}CD24^{-/low}$ иницируют развитие опухоли, являются более радио- и химиорезистентными по сравнению с остальными (не стволовыми) клетками рака молочной железы, способствуют метастазированию и, более того, воздействие редкоизионизирующего излучения может приводить к увеличению их количества [10–16]. Одними из основных механизмов, которые участвуют в формировании пула ОСК после облучения, являются процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), который усиливается под влиянием радиационного воздействия, и радиационная инициация программы дедифференцировки опухолевых клеток в ОСК [17–23].

Сокращения: ОСК — опухолевые стволовые клетки; ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход; DB(*n*), DBA(*n*), DBPA(*n*) — димерные бисбензимидазолы различных серий (dimeric bisbenzimidazoles, *n* — число метиленовых групп в линкере); ФИТЦ — флуоресцеинизотиоцианат; МТТ — 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолия бромид (methyl thiazolyl tetrazolium).

Как известно, тесно связанные друг с другом процессы ЭМП и дедифференцировки, опосредованы сложным комплексом эпигенетических механизмов, включая ремоделирование хроматина, модификации гистонов, метилирование ДНК и др. [24–27]. Поэтому стремительно растет количество публикаций, изучающих важную роль эпигенетических механизмов в изменениях критически важной популяции ОСК в ответ на противоопухолевые воздействия, в том числе на облучение. Подобные исследования способствуют разработке средств, направленных на элиминацию ОСК и/или повышение их чувствительности к известным противоопухолевым воздействиям. В этой связи значительный интерес представляют оригинальные низкомолекулярные ДНК-связывающие соединения из класса димерных бисбензимидазолов (dimeric bisbenzimidazoles — DB), которые связываются с АТ-парами двуцепочечной ДНК по узкой бороздке. В основной структуре DB находятся два бисбензимидазольных блока, соединенных между собой олигометиленовым линкером с разным числом (*n*) метиленовых групп (рис. 1). Оказалось, что DB являются ингибиторами ферментов, участвующих в ремоделировании хроматина, таких как ДНК-метилтрансфераза и эукариотическая ДНК-топоизомераза I [28–31]. Нами показано, что соединения, созданной ранее серии DB(*n*) (где *n* = 1–11), являются высокотоксичными для общей популяции опухолевых клеток рака молочной железы линии MCF-7 [32], а DB(5,7) эффективно снижают пул ОСК после комбинированного применения с ионизирующим излучением и, что важно, блокируют радиационно-индуцированный ЭМП [16, 33]. Однако соединения серии DB(*n*) труднорастворимы в водных растворах, что существенно влияет на проведение клеточных исследований *in vitro* и затрудняет их использование в условиях *in vivo*. Поэтому в данной работе мы впервые оценили и сравнили действие новых серий DB — водорастворимых соединений DBA(*n*), где *n* = 1,3,5,7,9,11, и DBPA(*n*), где *n* = 1–4 (рис. 1) — на опухолевые клетки линии MCF-7 после однократного действия и в комбинации с ионизирующим излучением. Серия DBA(*n*) отличается от серии DB(*n*) наличием на концах молекул N,N-диметилпропилкарбоксамидных групп вместо N-метилпиперазиновых, что повышает их гидрофильность. В свою очередь серия DBPA(*n*) отличается от серии DBA(*n*) наличием в олигометиленовом линкере, связывающем два бисбензимидазольных блока, 1,4-пиперазина, что превращает молекулы DBPA(*n*) при нейтральных pH в тетракаатионы, способствуя их лучшей растворимости в водной среде и повышает их аффинность к ДНК. Соединения DBA(5,7) и DBPA(1,4), которые продемонстрировали максимальные цитотоксические эффекты и связывание с клетка-

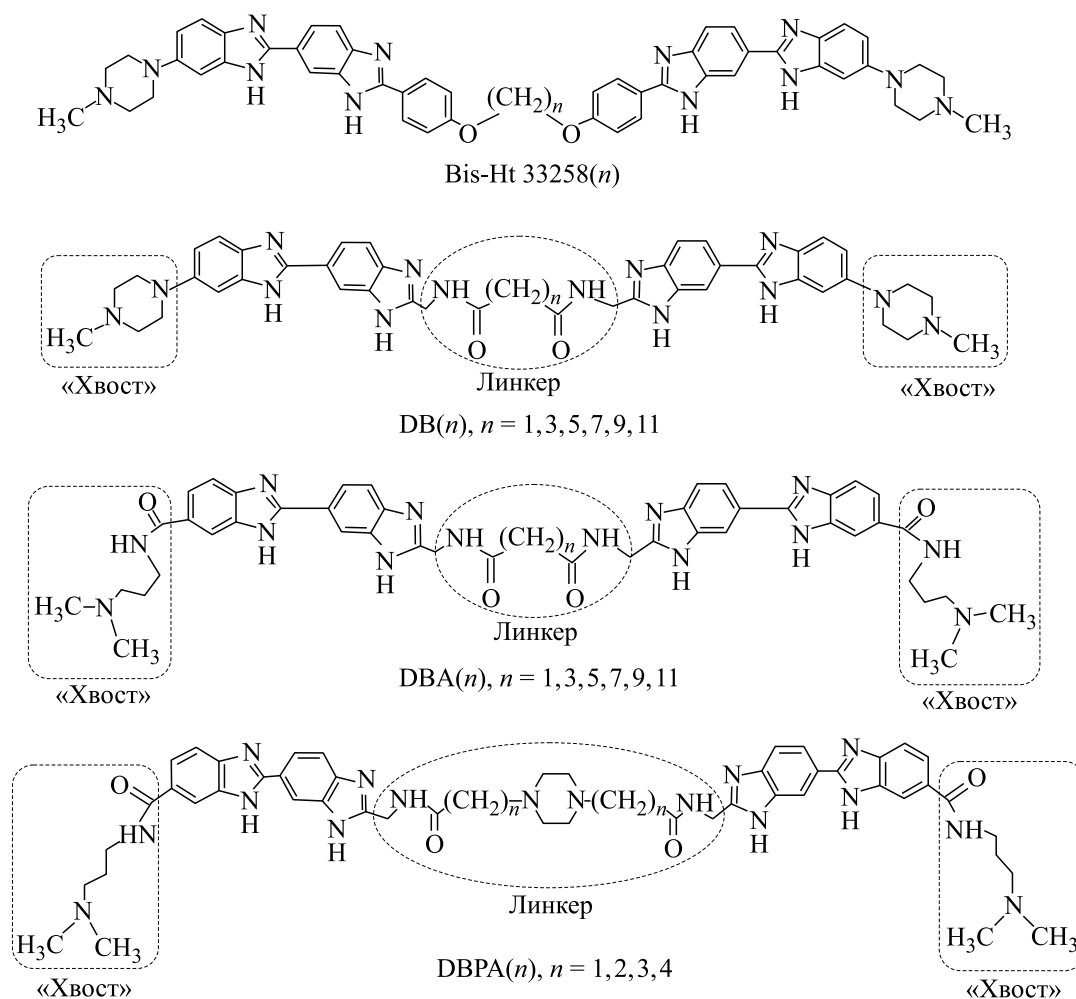


Рис. 1. Химические структуры Bis-Ht 33258 и димерных бисбензимидазолов DB(*n*), DBA(*n*), DBPA(*n*), где *n* — метиленовые группы, соединяющие два бисбензимидазольных блока.

ми, были изучены в плане их влияния на размер пула ОСК и радиационно-индуцированный ЭМП по критерию экспрессии виментина — одного из основных белковых маркеров ЭМП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в полной питательной среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота (Biosera, Франция), стрептомицин (50 мг/л, «ПанЭко», Россия), пенициллин (50000 ед/л, «ПанЭко», Россия), и L-глутамин (292 мг/л, «ПанЭко», Россия) в пластиковых культуральных флаконах (Corning, США). Инкубацию клеток проводили в CO₂-инкубаторе (Shellab, США) при 37°C в увлажненной

атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки рассевали два раза в неделю, снимая с флаконов с помощью растворов Версена и Трипсина («ПанЭко», Россия).

Исследуемые соединения. Изучаемые серии димерных бисбензимидазолов (DB) были синтезированы в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Исследуемые соединения являются низкомолекулярными флуоресцентными аналогами димеров красителя Хёхст 33258 (Bis-Ht 33258), которые способны нековалентно и сайт специфично связываться с АТ-парами малой бороздки ДНК, при этом занимая до одного ее витка. Соединения между сериями отличаются структурой линкера, а внутри серии отличаются между собой числом *n* — метиленовых групп, соединяющим два бисбензимидазольных блока (рис. 1).

Первая серия DB представлена флуоресцентными и хорошо растворимыми в воде соединени-

ями DBA(*n*), где $n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$. Линкерами между двумя бисбензимидазольными блоками являются производные алифатических дикарбоновых кислот, олигометиленовые цепочки которых обладают конформационной подвижностью и низким сродством к сахаро-фосфатному остову и парам оснований ДНК. Для улучшения растворимости в водных растворах и увеличения аффинности к ДНК гидрофобные фенильные ядра в концевых группах Ht 33258 заменены на гидрофильные CONH-группы (рис. 1). Подробное описание метода синтеза DBA(*n*) приведено в работе [34].

Во второй серии соединений — DBPA(*n*) ($n = 1, 2, 3, 4$) — для увеличения растворимости в воде в структуру олигометиленового линкера введен остаток 1,4-пиперазина, увеличивающий положительный заряд молекулы, а концевые остатки N-метилпиперазина заменены на N-диметиламинопропилкарбоксамидные группы (рис. 1). Методика синтеза DBPA(*n*) описана в работе [35].

Оценка одиночного действия DBA(*n*) и DBPA(*n*) на общее количество и жизнеспособность клеток линии MCF-7. Клетки снимали со дна культуральных флаконов после 72-часовой инкубации с изучаемыми соединениями в концентрациях 5–100 мкМ/л в полной питательной среде и определяли их количество с помощью камеры Горяева.

Жизнеспособность клеток, обработанных DBA(*n*) и DBPA(*n*), оценивали с помощью стандартного метилтетразолиевого теста (МТТ-теста) через 72 ч после добавления соединений. Для этого клетки рассеивали в 96-луночные планшеты (Corning Costar, США) по 5000 клеток в лунку. Через сутки в лунки вносили исследуемые соединения в концентрациях 5–100 мкМ/л. После 72-часовой инкубации клеток с соединениями в полной питательной среде, среду с ДВ сливали и добавляли к клеткам реактив МТТ (Sigma, США) по 150 мкл в лунку в концентрации 0.25 мг/мл бессывороточной среды DMEM. Планшеты инкубировали в темноте при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 3 ч. После инкубации с реактивом МТТ, к клеткам добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида. Окраску регистрировали при длине волны более 545 нм на микропланшетном фотометре для иммуноферментного анализа STAT FAX 2100 (Awareness Tech. Inc., США). Полученные данные использовали для определения ингибирующих концентраций IC₅₀ и IC₃₀ по критериям снижения общего количества клеток и их жизнеспособности по сравнению с интактным контролем, если удавалось добиться ингибирующего эффекта.

Определение интенсивности связывания DBA(*n*) и DBPA(*n*) с клетками и субклеточного распределения. Проточная цитометрия с УФ-лазером и флуоресцентная микроскопия были использованы

для количественной оценки связывания исследуемых соединений с клетками и изучения их субклеточного распределения благодаря способности соединений образовывать флуоресцирующие комплексы с двуцепочечной ДНК и при этом иметь схожие друг с другом спектры поглощения в УФ-области и флуоресценции [28, 34, 35]. Для оценки количества димерных бисбензимидазолов, связавшихся с клетками через 24 ч после пересева к ним добавляли DBA(1,3,5,7,9,11), или DBPA(1,2,3,4) в концентрациях 5–100 мкМ/л. Через 72 ч после добавления соединений клетки извлекали из флаконов в фосфатно-солевом буфере и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Vantage (BD Biosciences, США), оснащенный двумя лазерами с длинами волн 488 нм и 364 нм. Первый лазер использовался для анализа светорассеяния клеток и выделения региона для последующего изучения флуоресценции. Флуоресценцию DBA(*n*) и DBPA(*n*) измеряли в синей области спектра (424/44 нм) при $\lambda_{\text{возб}} = 364$ нм.

Субклеточное распределение DBA(*n*) изучали с помощью лазерной сканирующей микроскопии через 72 ч инкубации этих соединений в концентрации 20 мкМ/л с клетками. Анализ проводили на лазерном конфокальном микроскопе TCS SPE 4000 (Leica Microsystems, Германия). Для возбуждения флуоресценции DBA(*n*) использовали твердотельный лазер с длиной волны 405 нм. Диапазон регистрации флуоресценции был задан в пределах 410–550 нм. Субклеточное распределение DBPA(*n*) изучали через 72 ч инкубации этих соединений в концентрации 20 мкМ/л с клетками с помощью флуоресцентной микроскопии (из-за отсутствия технической возможности работать на конфокальном микроскопе). Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе Optiphot-2 (Nicon, Япония) при увеличении объектива 40× с использованием блока флуоресцентных фильтров UV-2A (длина волны возбуждения флуоресценции составляла 330–380 нм, регистрации — более 420 нм).

Отдельно оценивали связывание DBA(5,7) и DBPA(1,4) с CD44⁺CD24^{−/low} ОСК и остальными клетками. Через 72 ч после инкубации с соединениями в концентрации 20 мкМ/л клетки извлекали из флаконов, затем окрашивали с помощью антител к CD44 и CD24, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) и фикоэритрином, как подробно описано ниже, и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Vantage. Для измерения флуоресценции ФИТЦа и фикоэритрина использовали стандартные светофильтры 530/30 и 585/42 нм соответственно (при $\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм). Интенсивность флуоресценции DBA(*n*) и DBPA(*n*) измеряли в синей области спектра (424/44 нм) при $\lambda_{\text{возбуждения}} = 364$ нм.

Данные о флуоресценции ФИТЦа, фикоэритрина и изучаемых соединений записывали в файл. При последующей обработке данных с помощью программы CellQuestPro (BD Biosciences, США) выделяли регион клеток $CD44^{+}CD24^{-/low}$, после чего анализировали интенсивность флуоресценции DBA (5,7) и DBPA(1,4) в этом регионе и в остальных клетках отдельно.

Определение количества опухолевых стволовых клеток $CD44^{+}CD24^{-/low}$ после одиночного и комбинированного действия DBA(5,7) или DBPA(1,4) и ионизирующего излучения. Через 24 ч после посева к клеткам добавляли указанные соединения в конечной концентрации 20 мкМ/л. Клетки инкубировали с соединениями 24 ч в стандартных условиях и подвергали воздействию γ -излучения на установке «Рокус-АМ» (Россия) в дозе 4 Гр при мощности дозы 1.5 Гр/мин. Часть образцов только облучали, часть — только инкубировали с исследуемыми соединениями в течение 72 ч. Контролем служили интактные клетки.

Через 48 ч после облучения клетки извлекали из флаконов в холодный раствор Хэнкса и инкубировали со смесью моноклональных антител к CD44, меченных ФИТЦем (BD Biosciences, США), и антител к CD24, меченных фикоэритрином (BD Biosciences, США), из расчета по 20 мкл антител на 1 млн клеток. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела соответствующих изотипов к гемоцианину улитки, конъюгированные с теми же флуорохромами, что и антитела к указанным поверхностным маркерам (BD Biosciences, США). Пробы инкубировали с антителами в течение 30 мин на льду в темноте, затем отмывали в фосфатно-солевом буфере и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Vantage. Для измерения флуоресценции ФИТЦа использовали узкополосные фильтры 530/30 нм, для фикоэритрина — 585/42 нм. Полученные данные об интенсивности прямого и бокового светорассеяния, флуоресценции ФИТЦа и фикоэритрина записывали в файл, который обрабатывали с помощью программы CellQuestPro (BD Biosciences, США). Определяли относительное количество (в %) ОСК с иммунофенотипом $CD44^{+}CD24^{-/low}$ среди неповрежденных клеток, выделенных по параметрам прямого и бокового светорассеяния по общепринятой методике. Абсолютное количество ОСК $CD44^{+}CD24^{-/low}$ определяли путем умножения доли этих клеток на общее количество клеток во флаконе, определенное с помощью камеры Горяева.

Определение экспрессии виментина после одиночного и комбинированного действия DBA(5,7) или DBPA(1,4) и ионизирующего излучения. Использовали те же условия комбинированного

воздействия, что при исследовании количественных изменений пула ОСК, т.е. концентрация соединений составляла 20 мкМ/л, доза облучения — 4 Гр, а время после облучения (48 ч) было выбрано по результатам проведенных ранее исследований [16, 33]. По окончании инкубации с исследуемыми соединениями клетки снимали со дна культуральных флаконов, из каждого флакона отбирали аликвоты по 250 тыс. клеток, которые фиксировали и до анализа хранили в ацетоне при -20°C . Перед окрашиванием клетки трехкратно отмывали в фосфатно-солевом буфере с 1%-м бычьим сывороточным альбумином, после чего инкубировали с моноклональными антителами к виментину, меченными фикоэритрином (BD Biosciences, США), в течение 1 ч при комнатной температуре в соотношении 5 мкл антител/250 тыс. клеток. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела того же изотипа к гемоцианину улитки, конъюгированные с фикоэритрином (BD Biosciences, США). После инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител в фосфатно-солевом буфере и немедленно анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD Biosciences, США) по показателям интенсивности прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции фикоэритрина. С помощью программы CellQuestPro определяли среднюю интенсивность флуоресценции фикоэритрина в клетках после исключения дедбриса по показателям светорассеяния.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили по критерию Манна–Уитни, с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Для построения графиков и определения IC_{30} и IC_{50} использовали программу Origin 6.0 (Microcal Software Inc., США). Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторах. Полученные результаты объединяли. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическое действие DBA(n) и DBPA(n) на общую популяцию клеток MCF-7 при их одиночном применении. Как установлено с помощью МТТ-теста, инкубация клеток MCF-7 с DBA(1,3,5,7,9,11) не влияла на жизнеспособность общей массы опухолевых клеток (табл. 1). Но количество клеток, которые оставались на дне культуральных флаконов после обработки трипсином и версеном, снижалось после инкубации с DBA(n), причем этот эффект был выражен в наибольшей степени в случае DBA(5,7). Значения IC_{30} и IC_{50} для соединений серии DBA(n), которые соответствуют концентрациям, вызываю-

Таблица 1. Ингибирующие концентрации IC_{30} и IC_{50} (мкМ/л) соединений DBA(*n*) по двум критериям оценки эффектов после инкубации с клетками MCF-7 в течение 72 ч

Критерии оценки эффектов	DBA(1)		DBA(3)		DBA(5)		DBA(7)		DBA(9)		DBA(11)	
	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}
Количество клеток (подсчет клеток в камере Горяева)	24 1	43 6	27 7	55 0	21 0	40 2	19 7	36 3	24 4	44 0	30 2	45 7
Жизнеспособность (МТТ-тест)	Ингибирование жизнеспособности клеток не установлено, поэтому IC_{30} и IC_{50} не вычисляли											

Таблица 2. Ингибирующие концентрации (мкМ/л) IC_{30} и IC_{50} соединений DBPA(*n*) по двум критериям оценки эффектов после инкубации с клетками MCF-7 в течение 72 ч

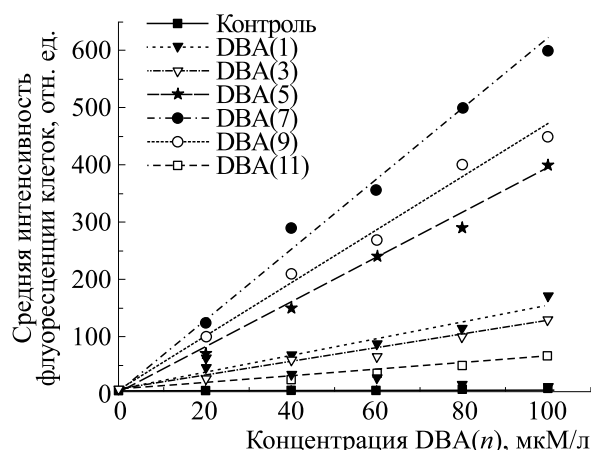
Критерии оценки эффектов	DBPA(1)		DBPA(2)		DBPA(3)		DBPA(4)	
	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}	IC_{30}	IC_{50}
Количество клеток (подсчет клеток в камере Горяева)	15 5	24 9	21 1	45 2	27 5	47 6	20 0	34 5
Жизнеспособность клеток (МТТ-тест)	32 5	55 4	52 3	87 5	60 1	100 0	37 4	61 3

щим снижение количества клеток во флаконе на 30 и 50% соответственно, приведены в табл. 1.

Соединения DBPA(1,2,3,4) оказались цитотоксичными для общей популяции клеток MCF-7. Все соединения этой серии DB значительно уменьшали как количество опухолевых клеток, так и их жизнеспособность по данным МТТ-теста. Как показано в табл. 2, соединения DBPA(1,4) продемонстрировали наиболее выраженное ингибирующее действие на клетки линии MCF-7 по обоим используемым критериям (жизнеспособности и количеству клеток).

Интенсивность связывания с клетками и субклеточное распределение DBA(*n*) и DBPA(*n*). При оценке интенсивности связывания с клетками первой серии изучаемых соединений – DBA(*n*) – результаты проточной цитофлуориметрии показали, что флуоресценция клеток возрастала после инкубации с любым из соединений DBA(1–11), а при использовании концентрации 40 мкМ/л и более была выше по сравнению с контрольной аутофлуоресценцией (рис. 2). Наблюдалась линейная зависимость интенсивности флуоресценции клеток от концентрации этих соединений в среде культивирования. При этом интенсивность флуоресценции клеток, инкубированных с DBA(5,7,9) была существенно выше, чем при ин-

кубации с DBA(1,3,11). Однако по данным лазерной сканирующей микроскопии изучаемые соединения практически не проникали в клетки и соответственно не накапливались в ядрах, но DBA(5,7,9) образовывали ярко светящиеся конгломераты с наружной стороны клеточной мембраны и в межклеточном пространстве (рис. 3).

**Рис. 2.** Зависимость средней интенсивности флуоресценции клеток линии MCF-7 от концентрации DBA(*n*), где *n* = 1, 3, 5, 7, 9, 11.

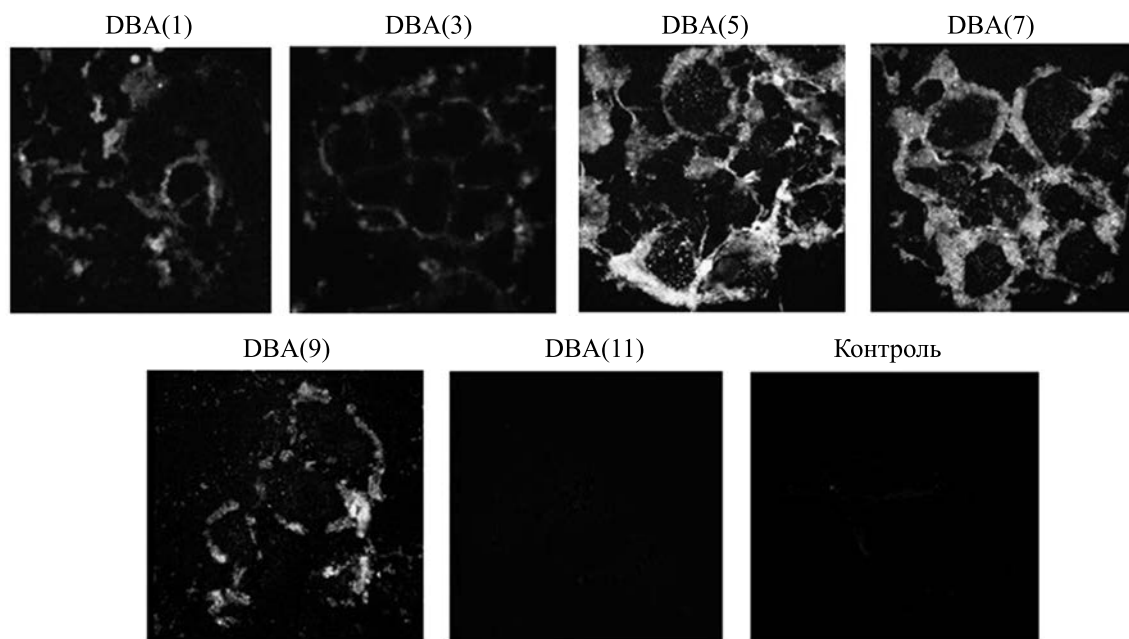


Рис. 3. Фотографии клеток линии MCF-7, инкубированных с DBA(n), где $n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$, в концентрации 20 мкМ/л в течение 72 ч, полученные с помощью лазерной сканирующей микроскопии (увеличение объектива $\times 63$, $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм, $\lambda_{\text{эмис}} = 410\text{--}550$ нм).

Следует отметить что, если до анализа на флуоресцентном микроскопе не отмывать клетки от среды культивирования, содержащей DBA(n), то визуализируются массивные скопления флуоресцирующего материала, который распределяется независимо от клеток, что является характерным признаком агрегации DBA(n) в культуральной среде.

По данным проточной цитометрии интенсивность флуоресценции клеток, инкубированных с

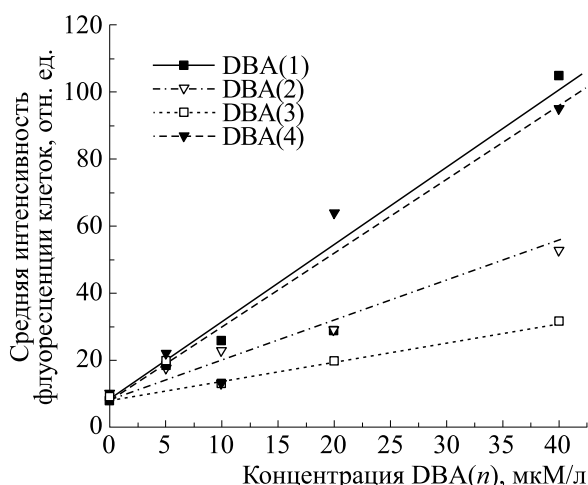


Рис. 4. Зависимость средней интенсивности флуоресценции клеток линии MCF-7 от концентрации DBA(n), где $n = 1, 2, 3, 4$.

DBPA(1,2,3,4), была статистически значимо выше таковой в контроле при всех использованных концентрациях (рис. 4). Наблюдалась линейная зависимость интенсивности флуоресценции клеток от концентрации этих соединений в среде культивирования. Наибольшее связывание продемонстрировали два соединения — DBPA(1) и DBPA(4). При этом оба соединения проникали в клеточные ядра, где распределялись достаточно равномерно (рис. 5). Цитоплазма относительно слабо окрашивалась этими соединениями, которые распределялись там в виде небольших гранул. Интересно, что спектр флуоресценции цитоплазматических гранул смещался в более длинноволновую область по сравнению с ядерной флуоресценцией. DBPA(2,3) связывались с клетками значительно слабее, чем остальные соединения ($p < 0.01$ при концентрации 40 мкМ/л). При этом интенсивность флуоресценции ядер при применении DBPA(2,3) была значительно ниже по сравнению с таковой после инкубации с DBPA(1,4).

Таким образом, для дальнейшего исследования эффектов действия серии соединений DBA(n) на ОСК и ЭМП были выбраны DBA(5) и DBA(7) в концентрации 20 мкМ/л, которые в наибольшей степени снижали количество клеток, оставшихся на дне культуральных флаконов при высоком связывании с клеточной поверхностью. По совокупности свойств (высокое связывание с клетками, накопление в ядрах и наиболее выраженное ингибирующее действие) из серии

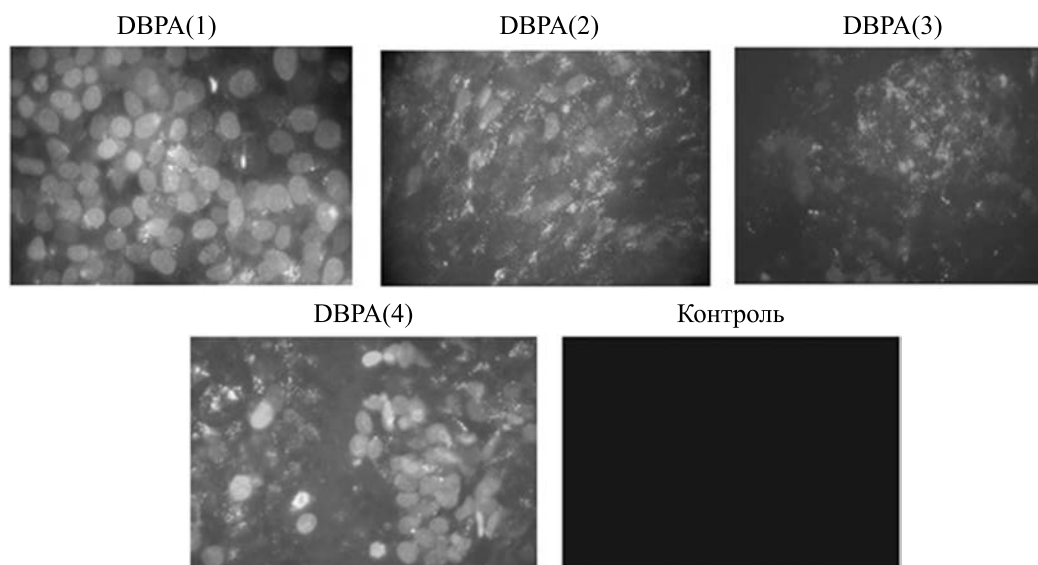


Рис. 5. Фотографии клеток линии MCF-7, инкубированных с DBPA(n), где $n = 1, 2, 3, 4$, в концентрации 20 мкМ/л в течение 72 ч, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии (увеличение объектива $\times 40$, $\lambda_{\text{возб}} = 330\text{--}380$ нм, $\lambda_{\text{эмис}} > 420$ нм).

DBPA(n) были выбраны два соединения — DBPA(1) и DBPA(4) в концентрации 20 мкМ/л.

Интенсивность связывания DBA(5,7) и DBPA(1,4) с опухолевыми стволовыми и остальными клетками. Результаты проточнocyтoметрического исследования интенсивности связывания соединений DBA(5,7) отдельно с ОСК и остальными клетками представлены на рис. 6. Показано, что инкубация как с DBA(5), так и с DBA(7) приводит к значительному увеличению флуоресценции ОСК и остальных клеток по сравнению с контролем ($p < 0.001$), что соответствует результатам исследования общей популяции клеток (рис. 2 и 3). При этом установлено, что ОСК связывают DBA(5) в 4.9 раза, а DBA(7) — в 4.2 раза интенсивнее, чем остальные клетки ($p < 0.005$ в обоих случаях).

Соединения DBPA(1,4), также как и первая серия DBA(n), более эффективно окрашивали ОСК, чем остальные клетки ($p < 0.001$). Важно, что, несмотря на высокую экспрессию в ОСК транспортеров откачки многих химических веществ, исследуемые DBPA(1) и DBPA(4) накапливались в ОСК интенсивнее в 3.8 и 4.0 раза, чем в остальных клетках соответственно ($p < 0.01$ в обоих случаях) (рис. 7).

Изменение относительного и абсолютного количества опухолевых стволовых клеток $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{low}}$ после одиночного и комбинированного действия DBA(5,7) или DBPA(1,4) и γ -излучения. Эффекты одиночного и комбинированного действия исследуемых DB и γ -излучения на ОСК оценивали через 48 ч после облучения по изменению относительного и абсолютного количества клеток с

иммунофенотипом $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{low}}$, который часто используется для выявления ОСК молочной железы, в том числе в культуре линии MCF-7.

Установлено, что однократное облучение в дозе 4 Гр приводит к увеличению относительного количества клеток $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{low}}$ в среднем в 2.0 раза по сравнению с контролем ($p = 0.04$) (рис. 8 и 9).

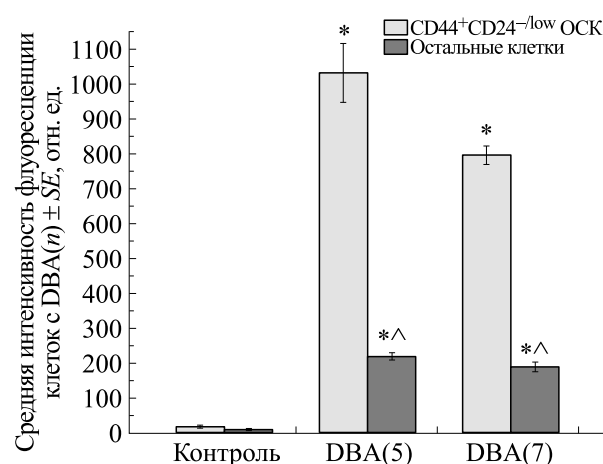


Рис. 6. Средняя интенсивность флуоресценции $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{low}}$ ОСК и остальных клеток линии MCF-7, инкубированных с DBA(5) или DBA(7) в концентрации 20 мкМ/л, по данным витального исследования с помощью проточной цитофлуориметрии: * — $p < 0.001$ при сравнении с интенсивностью контрольной аутофлуоресценции, ^ — $p < 0.005$ при сравнении с флуоресценцией соответствующего соединения в популяции ОСК.

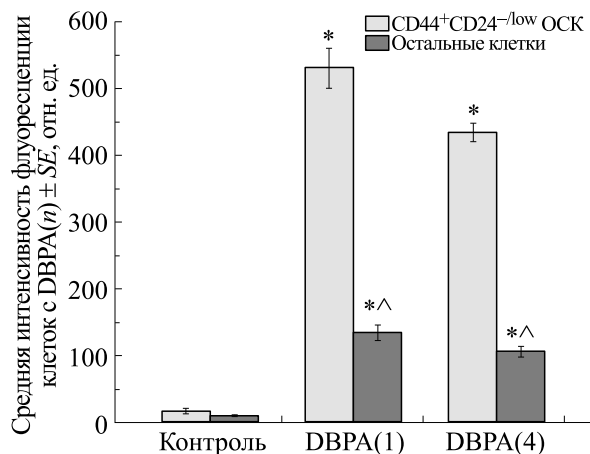


Рис. 7. Средняя интенсивность флуоресценции CD44⁺CD24^{-low} ОСК и остальных клеток линии MCF-7, инкубированных с DBPA(1) или DBPA(4) в концентрации 20 мкМ/л, по данным витального исследования с помощью проточной цитофлуориметрии: * — $p < 0.001$ при сравнении с интенсивностью контрольной аутофлуоресценции, ^ — $p < 0.01$ при сравнении с флуоресценцией соответствующего соединения в популяции ОСК.

Для соединений DBA(5) и DBA(7) показано, что, как после одиночного, так и после комбинированного действия с γ -излучением, относительное количество ОСК статистически значимо возрастает (рис. 8). Так, DBA(5) и DBA(7) в комбинации с ионизирующим излучением увеличивают относительное количество клеток CD44⁺CD24^{-low} в 3.1 и 3.6 раза по сравнению с облучением ($p = 0.006$ и $p = 0.005$ соответственно).

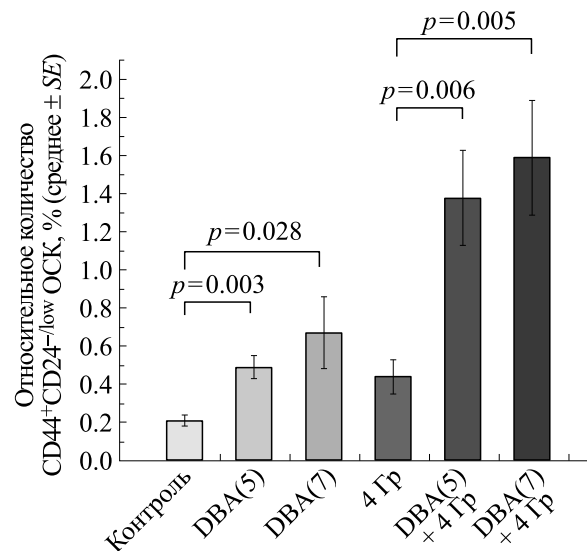


Рис. 8. Изменение относительного количества CD44⁺CD24^{-low} ОСК после одиночного и комбинированного действия DBA(5) или DBA(7) в концентрации 20 мкМ/л и γ -излучения в дозе 4 Гр. Указаны величины p при сравнении экспериментальных групп, продемонстрировавших статистически значимые различия.

По сравнению с интактным контролем эффект выражен еще сильнее: DBA(5) и DBA(7) в комбинации с облучением увеличивают относительное количество ОСК в 6.6 и 7.6 раза соответственно ($p < 0.001$ в обоих случаях). Одиночное действие DBA(5) и DBA(7) также приводит к значительному увеличению относительного количества ОСК

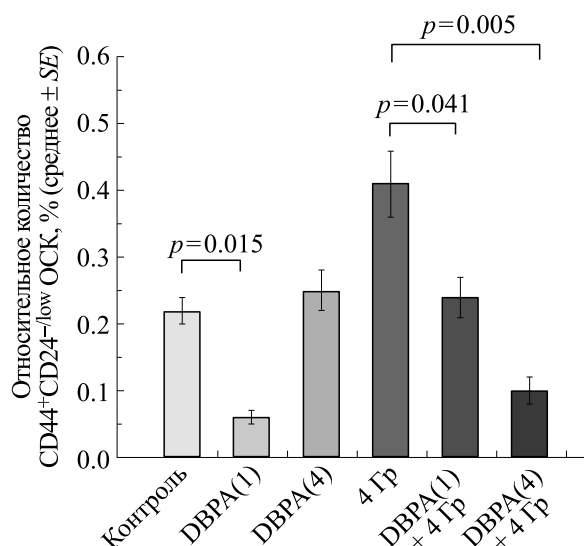


Рис. 9. Изменение относительного количества CD44⁺CD24^{-low} ОСК после одиночного и комбинированного действия DBPA(1) или DBPA(4) в концентрации 20 мкМ/л и γ -излучения в дозе 4 Гр. Указаны величины p при сравнении экспериментальных групп, продемонстрировавших статистически значимые различия.

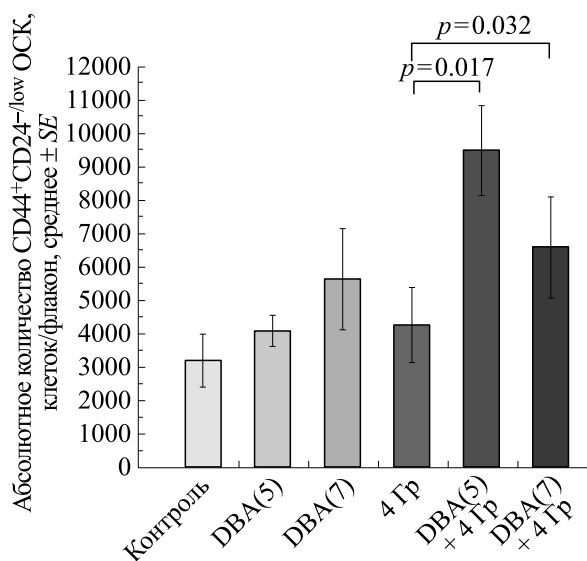


Рис. 10. Изменение абсолютного количества $CD44^+CD24^{-/low}$ ОСК после одиночного и комбинированного действия DBA(5) или DBA(7) в концентрации 20 мкМ/л и γ -излучения в дозе 4 Гр. Указаны величины p при сравнении экспериментальных групп, продемонстрировавших статистически значимые различия.

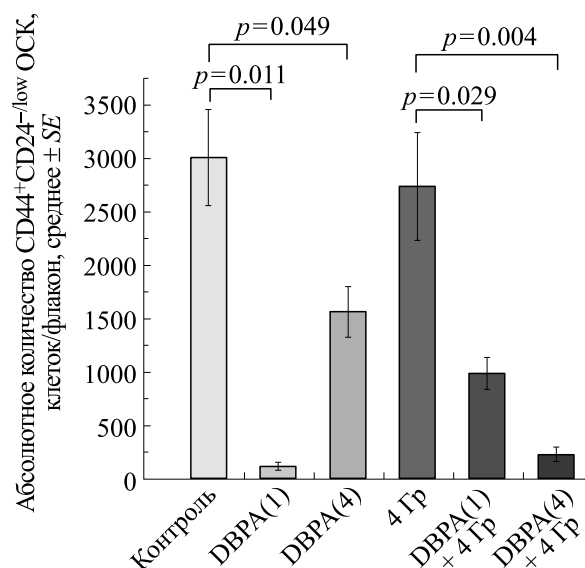


Рис. 11. Изменение абсолютного количества $CD44^+CD24^{-/low}$ ОСК после одиночного и комбинированного действия DBPA(1) или DBPA(4) в концентрации 20 мкМ/л и γ -излучения в дозе 4 Гр. Указаны величины p при сравнении экспериментальных групп, продемонстрировавших статистически значимые различия.

по сравнению с интактным контролем — в 2.3 и 3.2 раза ($p = 0.003$ и $p = 0.028$ соответственно).

Напротив, для соединений DBPA(1) и DBPA(4) из второй серии DB показана способность снижать относительное количество клеток $CD44^+CD24^{-/low}$ после облучения (рис. 9). Так, предварительная инкубация клеток с DBPA(1) перед облучением снижает долю ОСК в 1.7 раза по сравнению с одиночным действием облучения ($p = 0.041$), с DBPA(4) — в 4.1 раза ($p = 0.005$). Интересно, что и одиночное действие DBPA(1) приводит к значительному снижению относительного количества ОСК в 3.7 раза по сравнению с интактным контролем ($p = 0.015$).

На рис. 10 представлено изменение абсолютного количества клеток $CD44^+CD24^{-/low}$ после комбинированного действия DBA(5,7) и облучения. Показано, что комбинированное действие DBA(5) или DBA(7) и облучения в дозе 4 Гр значительно увеличивает абсолютное количество клеток $CD44^+CD24^{-/low}$ по сравнению с одиночным действием облучения в 2.2 и 1.5 раза соответственно ($p = 0.017$ и $p = 0.032$). Кроме того наблюдается тенденция к повышению абсолютного количества ОСК при одиночном применении как DBA(5), так и DBA(7) при сравнении с интактным контролем.

В отношении второй серии DB установлено, что в комбинации с ионизирующим излучением как DBPA(1), так и DBPA(4) значительно снижают

абсолютное количество клеток $CD44^+CD24^{-/low}$ по сравнению с одиночным облучением и контролем (рис. 11). Так, DBPA(1) в комбинации с облучением приводит к снижению абсолютного количества ОСК в 3.0 раза по сравнению с контролем и в 2.8 раза по сравнению с облучением ($p = 0.027$ и $p = 0.029$ соответственно). Использование DBPA(4) в комбинации с облучением приводит к еще более выраженному эффекту: различия по сравнению с одиночным облучением достигают 12 раз ($p = 0.004$).

Изменение белковой экспрессии виментина после одиночного и комбинированного действия DB(5) или DB(7) и γ -излучения. Результаты оценки белковой экспрессии виментина в общей культуре опухолевых клеток MCF-7 представлены на рис. 12 и 13. Из рисунков следует, что в интактном контроле связывание антител к виментину не отличалось от неспецифического связывания, что указывает на отсутствие экспрессии виментина в общей массе опухолевых клеток этой линии. При этом через 48 ч после облучения в дозе 4 Гр наблюдалось специфическое связывание антител с виментином — одним из основных маркеров ЭМП ($p = 0.03$), что свидетельствует об индукции ЭМП под влиянием γ -излучения.

Отмечалась тенденция к повышению экспрессии виментина по сравнению с интактным контролем после инкубации клеток с соединениями DBA(5) и DBA(7) в течение 72 ч, а также в течение 24 ч перед облучением и 48 ч после него (рис. 12).

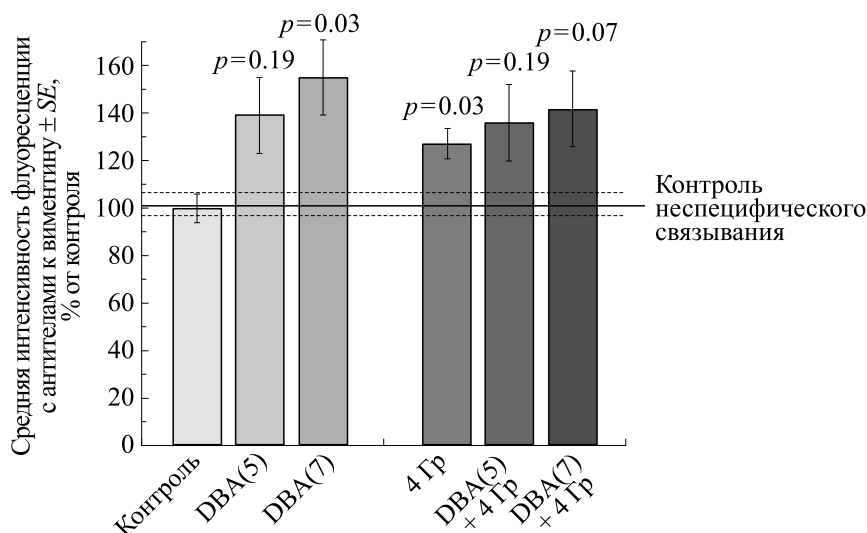


Рис. 12. Интенсивность связывания клеток линии MCF-7 с антителами к виментину после одиночного и комбинированного действия DBA(5) или DBA(7) и облучения в дозе 4 Гр по данным проточной цитометрии. Сплошная горизонтальная линия показывает среднюю интенсивность флуоресценции клеток после обработки контрольными иммуноглобулинами (изотипический контроль неспецифического связывания), пунктирные линии отмечают стандартную ошибку ($\pm SE$) средней интенсивности флуоресценции в контроле неспецифического связывания. Указаны величины p при сравнении с необлученным контролем (образцами после инкубации с антителами к виментину).

В случае DBA(7) различия достигали статистической значимости ($p = 0.03$). Как было показано выше, под влиянием этих же соединений происходило увеличение количества ОСК как при их одиночном действии, так и при комбинированном применении с ионизирующим излучением (рис. 8 и 9). Напротив, соединения из второй изу-

чаемой серии DBPA(1,4) блокировали радиационно-индуцированный ЭМП, снижая уровень связывания антител к виментину до контрольных значений неспецифического связывания (рис. 13). Интересно, что эти же соединения в комбинации с облучением снижали относительное и абсолютное количество ОСК по сравнению

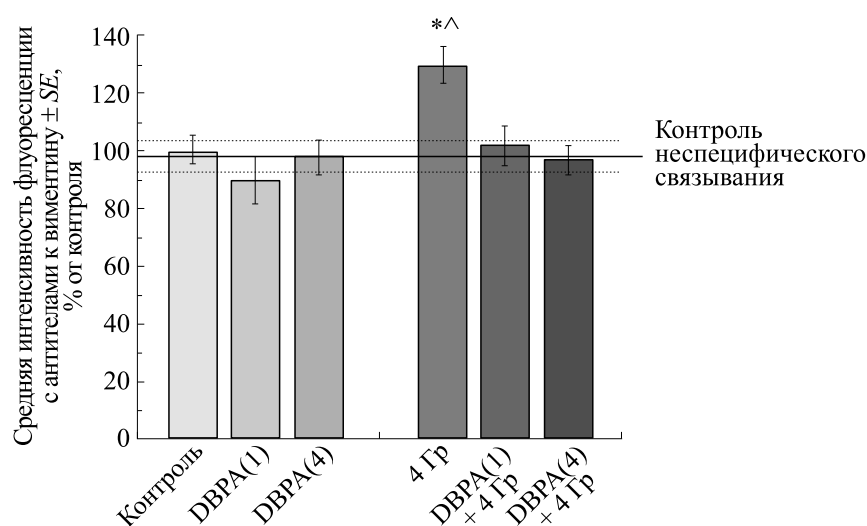


Рис. 13. Интенсивность связывания клеток линии MCF-7 с антителами к виментину после одиночного и комбинированного действия DBPA(1) или DBPA(4) и облучения в дозе 4 Гр по данным проточной цитометрии. Сплошная горизонтальная линия показывает среднюю интенсивность флуоресценции клеток после обработки контрольными иммуноглобулинами (изотипический контроль неспецифического связывания). Пунктирные линии отмечают стандартную ошибку ($\pm SE$) средней интенсивности флуоресценции в контроле неспецифического связывания; * — $p = 0.03$ при сравнении с интактным контролем, ^ — $p = 0.02$ при сравнении с контролем неспецифического связывания.

с одиночным действием ионизирующего излучения (рис. 9 и 11).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перспективным направлением развития противоопухолевой терапии является разработка соединений, связывающихся с узкой бороздкой двуцепочечной ДНК, которая важна для функционирования большого числа ДНК-зависимых ферментов и аллостерической регуляции транскрипционных факторов [36–39]. Известно, что узкобороздочные лиганды, нековалентно взаимодействующие с ДНК и занимающие специфические последовательности в промоторах генов, приводят к обратимому нарушению связывания с ДНК факторов транскрипции и ряда ферментов, участвующих в процессах репликации, репарации и компактизации ДНК (топоизомеразы I, метилтрансферазы и др.). В отличие от традиционных противоопухолевых препаратов на основе интеркаляторов, такие соединения не приводят к значительному искажению пространственной структуры ДНК и характеризуются низкой мутагенностью [40]. Поэтому узкобороздочные лиганды ДНК из класса димерных бисбензимидазолов, разрабатываемые российскими химиками на протяжении ряда последних лет, представляют значительный интерес в плане разработки на их основе противоопухолевых средств.

В данной работе нами были изучены две серии водорастворимых соединений из класса DB, отличающиеся между собой структурой линкера — DBA(1–11) и DBPA(1–4). Для этих серий DB нами показаны различия по цитотоксичности и способности связываться с опухолевыми клетками линии MCF-7 в адгезионной культуре *in vitro*. Соединения DBA(*n*), в отличие от DBPA(*n*), не проявили цитотоксическую активность по результатам МТТ-теста, но количество прикрепленных к подложке клеток после инкубации с первыми снижалось. Кроме того, DBA(*n*) не накапливались, в отличие от DBPA(*n*), ни в цитоплазме, ни в ядрах клеток, а связывались с клеточной поверхностью. Очевидно, что DBA(*n*) взаимодействуют с поверхностными рецепторами и способны влиять на адгезионные свойства клеток в зависимости от количества связавшихся молекул: так, DBA(5,7), которые интенсивнее всего связываются с клеточной поверхностью, в наибольшей степени снижают количество прикрепленных клеток. Соединения DBPA(*n*) проникают внутрь клеток, связываются с ядерной ДНК и, вероятнее всего, оказывают цитотоксическое дей-

ствие на клетки путем ингибирования активности ферментов, реализующих метаболизм ДНК.

Для дальнейшего изучения действия DB на ОСК были отобраны по два соединения из каждой изучаемой серии, характеризующиеся высоким связыванием с клетками и относительно высокой цитотоксичностью/способностью уменьшать количество опухолевых клеток — DBA(5,7) и DBPA(1,4). Показано, что ОСК, идентифицированные по иммунофенотипу CD44⁺CD24^{-/low}, связывают выбранные соединения из обеих серий значительно сильнее, чем остальные клетки. Эти данные следует признать весьма обнадеживающими в плане направленного воздействия изучаемых соединений именно на ОСК, тем более, что, как показывают многочисленные исследования, ОСК способны более эффективно откачивать во внеклеточную среду многие химические соединения, включая традиционные химиопрепараты [41].

Интересно, что высокое связывание DBA(5,7) с ОСК не приводило к снижению их относительного количества, как можно было ожидать. Напротив, относительное и абсолютное количество ОСК возрастало как после одиночного, так и после комбинированного действия этих соединений с γ -излучением. В то же время соединения DBPA(1,4) значимо нивелировали стимулирующее действие облучения на ОСК, снижая количество этих клеток. Можно было предположить, что причина разнонаправленного действия изученных соединений заключается не только в их разной способности проникать внутрь клеток и связываться с ядерной ДНК, но и в различной способности влиять на ЭМП, который в настоящее время считается одним из ключевых механизмов, объясняющих изменение пула ОСК после различных терапевтических воздействий, в том числе и ионизирующего излучения. В основе этого предположения, с одной стороны, лежат данные литературы и результаты собственных исследований об увеличении пула ОСК за счет индукции ЭМП [16, 20, 33, 42]. Известно, что этот процесс, приводящий к дедифференцировке и приобретению свойств ОСК, регулируется на разных уровнях, включая клеточную передачу сигналов (JAK2/STAT3 и др.), контроль транскрипции (SNAIL, Twist, Zeb и др.) и эпигенетические модификации (метилование ДНК, модификации гистонов и др.) [43, 44]. С другой стороны, установлено, что блокаторы ЭМП снижают количество ОСК и их использование считается очень перспективным в сочетании с традиционными противоопухолевыми воздействиями [45–47]. Более того, показана возможность ингибирования

ния ЭМП с помощью разнообразных модификаторов структуры хроматина [48–50], включая димерные бисбензимидазолы серии DB(*n*) [16, 33].

Полученные результаты подтвердили предположение о разнонаправленном влиянии изученных соединений DBA(5,7) и DBPA(1,4) на радиационно индуцируемый ЭМП как важный фактор, регулирующий формирование пула ОСК при комбинированных воздействиях. Так, в случае комбинации DBPA(1,4) и ионизирующего излучения показано отсутствие экспрессии виментина (одного из основных маркеров ЭМП), что свидетельствует о блокировании радиационно-индуцированного процесса ЭМП. Важно, что эти же соединения, как и ожидалось, снижали абсолютное и относительное количество ОСК после комбинированного действия с ионизирующим излучением. Вероятно, DBPA(1,4) как и соединения другой, изученной ранее серии DB(*n*), обладают способностью ремоделировать хроматин путем ингибирования ферментов, участвующих в компактизации/декомпактизации ДНК, таких как ДНК-метилтрансфераза и эукариотическая ДНК-топоизомераза I и/или регулировать факторы транскрипции. Так, недавно было показано [35], что DBPA(*n*) ингибируют гистон-подобный белок H-NS в клетках *E. Coli*, который, как известно, поддерживает компактизацию бактериальных хромосом и является супрессором большой группы бактериальных генов. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения механизмов действия DBPA(*n*) на эукариотические клетки и, в частности, опухолевые.

В то же время экспрессия виментина была зарегистрирована нами при раздельном и комбинированном действии DBA (5,7) и ионизирующего излучения, что свидетельствует о стимуляции ЭМП в культуре клеток MCF-7 под влиянием этих воздействий. Усиление ЭМП может объяснять, по крайней мере частично, обнаруженный нами эффект увеличения пула ОСК при воздействии этих соединений. Учитывая, что DBA(5,7) не проникают внутрь клеток (возможно, из-за агрегации в среде культивирования), они не взаимодействуют с ДНК-метилтрансферазой и другими ферментами клеточного ядра, следовательно, не оказывают прямого влияния на их активность. Вероятно, на мембране клеток находятся DBA-связывающие рецепторы, которые осуществляют передачу сигнала внутрь клетки и запускают процесс ЭМП. Для идентификации таких DBA-связывающих рецепторов необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, результаты данного исследования, во-первых, доказывают тесную связь

ЭМП и формирования пула ОСК и, во-вторых, в случае серии соединений DBPA(*n*) подтверждают данные ряда авторов о возможности применения ингибиторов ДНК-метилтрансфераз в противоопухолевой терапии, направленной на опухолевые стволовые клетки [51–53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено, что DBA(*n*) не проникают в опухолевые клетки линии MCF-7, но DBA(5,7) взаимодействуют с рецепторным аппаратом на плазматической мембране и индуцируют ЭМП, что приводит к увеличению пула ОСК. Напротив, DBPA(*n*) накапливаются в ядрах, что особенно хорошо выражено в случае DBPA(1,4), снижают радиационно-индуцированный ЭМП и нивелируют стимулирующее действие γ -облучения на пул ОСК, в результате чего количество ОСК снижается. Полученные данные показывают тесную связь процессов ЭМП и формирования пула ОСК: в случаях, когда удается снизить экспрессию маркеров ЭМП (под влиянием DBPA(1,4), количество ОСК снижается, и, наоборот, при индукции ЭМП (под влиянием DBA(5,7) количество ОСК увеличивается.

DBPA(1,4) представляются весьма перспективными соединениями в плане дальнейшего их изучения как средств элиминации и повышения радиочувствительности ОСК в условиях *in vivo*.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-75-10025).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Статистика по раку молочной железы (26.03.2021) [Электронный ресурс]: официальный сайт Всемирной организации здравоохранения. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/factsheets/detail/breast-cancer>.
2. M. Kakarala and M. S. Wicha, *J. Clin. Oncol.*, **26** (17), 2813 (2008).
3. S. Taurina and H. Alkhalif, *Neoplasia*, **22** (12), 663 (2020).

4. P. Zhu and Z. Fan, *Biophys. Rep.*, **4** (4), **178** (2018).
5. N. K. Lytle, A. G. Barber, and T. Reya, *Nat. Rev.*, **18**, 669 (2018).
6. T. Zhang, H. Zhou, K. Wang, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **147**, 112616 (2022).
7. X. Zeng, C. Liu, J. Yao, et al., *Pharmacol. Res.*, **136**, 105320 (2021).
8. M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (7), 3983 (2003).
9. F. F. de Beça, P. Caetano, R. Gerhard, et al., *J. Clin. Pathol.*, **66**, 187 (2013).
10. R. Camerlingo, G. A. Ferraro, F. D. Francesco, et al., *Oncol. Rep.*, **31**, 1127 (2014).
11. W. Li, H. Ma, J. Zhang, et al., *Sci. Rep.*, **7**, 13856 (2017).
12. C. Sheridan, H. Kishimoto, R. K. Fuchs, et al., *Breast Cancer Res.*, **8** (5), 1 (2006).
13. T. Phillips, W. H. McBride, and F. Pajonk, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, **98** (24), 1777 (2006).
14. C. Lagadec, E. Vlasi, L. D. Donna, et al., *Breast Cancer Res.*, **12** (13), 1 (2010).
15. И. А. Замулаева, О. Н. Матчук, Е. И. Селиванова и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **54** (3), 256 (2014).
16. K. A. Churyukina, A. L. Zhuze, A. A. Ivanov, et al., *Biophysics*, **65** (1), 87 (2020).
17. F. De Bacco, P. Luraghi, E. Medico, et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, **103** (8), 645 (2011).
18. A. Kawamoto, T. Yokoe, K. Tanaka, et al., *Oncol. Rep.*, **27** (1), 51 (2012).
19. X. Zhang, X. Li, N. Zhang, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412** (1), 188 (2011).
20. S. Y. Lee, E. K. Jeong, M. K. Ju, et al., *Mol. Cancer*, **16**, Art. ID 10 (2017). DOI: 10.1186/s12943-016-0577-4
21. C. Lagadec, E. Vlasi, L. D. Donna, et al., *Stem Cells*, **30**, 833 (2012).
22. X. Gao, B. J. Sishc, C. B. Nelson, et al., *Front. Oncol.*, **9** (138), Art. ID 00138 (2016). DOI: 10.3389/fonc.2016.00138
23. F. Li, K. Zhuo, L. Gao, et al., *Oncol. Lett.*, **12**, 3059 (2016).
24. L. Sun and J. Fang, *Cell Mol. Life Sci.*, **73** (23), 4493 (2016).
25. S. Keyvani-Ghamsari, K. Khorsandi, A. Rasul, et al., *Clin. Epigenet.*, **13**, Art. ID 120 (2021). DOI: 10.1186/s13148-021-01107-4
26. E. Nowak and I. Bednarek, *Cells*, **10**, 3435 (2021).
27. Y. Yamada, H. Haga, and Y. Yamada, *Stem Cells Transl.*, **3** (10), 1182 (2014).
28. A. Ivanov, V. Koval, O. Susova, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25** (13), 2634 (2015).
29. N. A. Cherepanova, A. A. Ivanov, D. V. Maltseva, et al., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **26**, 295 (2011).
30. O. Y. Susova, A. A. Ivanov, S. M. Ruiz, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **75** (6), 695 (2010).
31. M. Darii, A. R. Rakhimova, V. N. Tashlitskii, et al., *Mol. Biol. (Moscow)*, **47** (2), 292 (2013).
32. К. А. Чурюкина, И. А. Замулаева, А. А. Иванов и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **57** (2), 136 (2017).
33. I. A. Zamulaeva, K. A. Churyukina, O. N. Matchuk, et al., *AIMS Biophysics*, **7** (4), 339 (2020).
34. V. S. Koval, A. F. Arutyunyan, and A. L. Zhuze, *Bioorg. Med. Chem.*, **26** (9), 2302 (2018).
35. V. S. Koval, A. F. Arutyunyan, V. I. Salyanov, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **28**, 115378 (2020).
36. P. G. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo, et al., *Med. Res. Rev.*, **24** (4), 475 (2004).
37. K. Mišković, M. Bujak, M. Baus, et al., *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **64** (4), 593 (2013).
38. K. S. Sainia, H., Hamidullaha, R. Ashrafb, et al., *Mol. Carcinogenesis*, **54** (4), 1266 (2016).
39. M. S. Nafie, K. Arafa, N. K. Sedky, et al., *Chem.-Biol. Interact.*, **324**, 109087 (2020).
40. G. S. Khan, A. Shah., Zia-ur-Rehman, et al., *J. Photochem. Photobiol. B*, **115**, 105 (2012).
41. R.-R. Begicevic and M. Falasca, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1 (2017).
42. J. Konge, F. Leteurtre, M. Goislard, et al., *Oncotarget*, **9** (34), 23531 (2018).
43. H. Fazilaty, L. Rago., K. K. Youssef, et al., *Nature Commun.*, **5115**, Art. ID 5115 (2019). DOI: 10.1038/s41467-019-13091-8
44. B. Dong, Z. Qiu, Y. Wu, *Front. Pharmacol.*, **11**, Art. ID 596239 (2020). DOI: 10.3389/fphar.2020.596239
45. M. Garg, *World J. Stem Cells*, **9** (8), 118 (2017).
46. S. Kotiyal and S. Bhattacharya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **453**, 112 (2014).
47. S. Tanabe, S. Quader, H. Cabral, et al., *Front. Pharmacol.*, **11**, Art. ID 00904 (2020). DOI: 10.3389/fphar.2020.00904
48. A. Kanamoto, I. Ninomiya, S. Harada, et al., *Int. J. Oncol.*, **49** (5), 1859 (2016).
49. T. Boulding, R. D. McCuaig, A. Tan, et al., *Sci. Rep.*, **8**, Art. ID 73 (2018). DOI: 10.1038/s41598-017-17913-x
50. S. Ambrosio, C. D. Sacca, and B. Majello, *Biocyim. Biophys. Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, **1860**, 905 (2017).
51. S. Zhang, Y. Gong, C. Li, et al., *Cell Proliferation*, **54** (2), Art. ID e12963 (2021). DOI: 10.1111/cpr.12963
52. H. M. Kwon, E. J. Kang, K. Kang, et al., *Oncotarget*, **8**, 89005 (2017).
53. G. Xue, Z. Ren., Y. Chen, et al., *Cancer Lett.*, **361** (1), 121 (2015). DOI: 10.1016/j.canlet.2015.02.046

Effects of DNA-Binding Ligands from Dimeric Bisbenzimidazoles Series DBA(*n*) and DBPA(*n*) in Combination with γ -Radiation on Epithelial-Mesenchymal Transition and Pool Size of MCF-7 Breast Cancer Stem Cells

K.A. Churiukina*, O.N. Matchuk*, **, A.D. Kaprin***, ****, *****, S.A. Ivanov*, *****, V.S. Koval*****, A.F. Arutyunyan*****, A.L. Zhuze*****, and I.A. Zamulaeva*, **

*A. Tsyb Medical Radiological Research Center — Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Marshala Zhykova 10, Obninsk, Kaluga region, 249031 Russia

**Joint Institute for Nuclear Research, ul. Joliot-Curie 6, Dubna, Moscow Region, 141980 Russia

***National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Koroliova 4, Obninsk, Kaluga Region, 249036 Russia

****P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, 2d Botkinskiy proezd 3, Moscow, 125284 Russia

*****Peoples' Friendship University of Russia, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

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

Radiation therapy is one of the main treatments for malignant neoplasms, including breast cancer. However, it is known, that radiation therapy can lead to an increase in the number of cancer stem cells, which are resistant to traditional antitumor effects, and are believed to be responsible for the development of recurrences and metastases. Therefore, the development of cancer stem cells elimination means is of considerable interest, especially in combination with ionizing radiation. The effects of single and combined exposure to new series of minor-groove DNA ligands — dimeric bisbenzimidazoles — DBA(*n*) and DBPA(*n*) (where *n* is the number of methylene groups between two bisbenzimidazole blocks) and γ -radiation on human Breast cancer cells were studied in our work for MCF-7 line in vitro. Compounds with maximum cytotoxic effect and cell binding were selected, and then the effects of the latter on the CD44⁺CD24^{−/low} cancer stem cells population and radiation-induced epithelial-mesenchymal transition were studied by the criterion of vimentin expression. An increase in the expression level of this protein and simultaneously in the relative number of cancer stem cells after a single exposure of γ -radiation at a dose of 4 Gy were shown. DBPA(1,4) in combination with irradiation blocked the radiation-induced vimentin expression and decreased the relative number of cancer stem cells by 1.7 and 4.1 times compared with irradiation ($p = 0.041$ and $p = 0.005$), respectively. At the same time, the absolute number of cancer stem cells decreased by 2.8 and 12.0 times compared to irradiation ($p = 0.029$ and $p = 0.004$), respectively. In contrast, DBA(5,7) by itself or in combination with γ -irradiation increased the level of vimentin expression and the same compounds when combined with irradiation increased the relative number of cancer stem cells by 3.1 and 3.6 times ($p = 0.006$ and $p = 0.005$), respectively, compared with irradiation. The absolute number of cancer stem cells increased by 2.2 and 1.5 times ($p = 0.017$ and $p = 0.032$), respectively. The data obtained show a close relationship between epithelial-mesenchymal transition and formation of the cancer stem cells pool after radiation exposure, and also indicate the prospects for further study of DBPA(1,4) as a means of cancer stem cells elimination under in vivo conditions.

Keywords: dimeric bisbenzimidazoles, cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, ionizing radiation, combined effect, flow cytometry, vimentin

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ГОРОХА (*Pisum sativum* L.) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2023 г. С.С. Тарасов*,[#], Е.К. Крутова*

*Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия,
пр. Гагарина, 97, Нижний Новгород, 603022, Россия

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

Поступила в редакцию 27.09.2021 г.

После доработки 21.07.2022 г.

Принята к публикации 20.08.2022 г.

Изучено влияние продолжительности ультразвукового воздействия (5, 10 и 20 мин) с интенсивностью 25 кВт/м² и частотой 26.1 кГц на уровень перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков, активность цистеиновых протеиназ и экспрессии гена цистеиновой протеиназы в прорастающих семенах гороха. Показано, что интенсивность в области локализации семян, т.е. непосредственно над центральным пьезопреобразователем, распределялась достаточно равномерно, но при этом носила диффузный характер. Наблюдалась разнонаправленная тенденция изменения исследуемых показателей в ответ на ультразвуковое воздействие. Уровень малонового диальдегида возрастал с увеличением времени воздействия. Повышенное содержание окисленных белков зафиксировано в прорастающих семенах гороха при десятиминутном действии ультразвука, тогда как при двадцатиминутном воздействии выявлено снижение уровня окислительной модификации белков. Активность цистеиновых протеиназ была выше в семенах гороха после пятиминутного воздействия ультразвуком, а содержание транскриптов иРНК возрастало во всех опытных образцах.

Ключевые слова: ультразвуковое воздействие, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов, цистеиновые протеиназы, прорастание семян.

DOI: 10.31857/S000630292303016X, EDN: FSPRQM

Прорастания семян – это ключевой этап роста и развития растений, который до конца еще не исследован. Важное значение на данном этапе принадлежит процессам катаболизма, в том числе, дыханию и гидролизу веществ, содержащихся в запасных тканях [1–3]. Ключевыми ферментами прорастания являются гидролазы, расщепляющие запасные вещества до мономеров, включающихся в общий метаболизм [4–6]. Одними из наиболее значимых ферментов данного класса для прорастания семян гороха являются цистеиновые протеиназы. По их активности можно судить об уровне катаболизма прорастающих семян.

Исследования влияния ультразвука на прорастание семян представляют как теоретический интерес, для понимания механизмов ответа расте-

ния на действия ультразвуковой волны, так и практический, дающий возможность оценки перспектив его применения в растениеводстве. В литературе имеются данные по влиянию ультразвука на морфофизиологические показатели прорастания различных растений [7–11]. Однако мало внимания уделено его воздействию на уровень окислительного гомеостаза и гидролиза запасного вещества при прорастании семян. Это формирует определенный пробел в понимании его комплексного физиологического действия.

Значительный интерес представляет изучение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [12, 13] и окислительной модификации белков (ОМБ) [14], свидетельствующих об окислительном гомеостазе, который является важным параметром оценки степени ультразвукового воздействия, как возможного модифицирующего фактора [15, 16].

Особый интерес в исследовании содержания окисленных метаболитов представляет определение продуктов ОМБ в прорастающих семенах го-

Сокращения: ПОЛ – перекисное окисление липидов, ОМБ – окислительная модификация белков, АФК – активные формы кислорода, СР – ген цистеиновой протеиназы, МДА – малоновый диальдегид.

гороха. С одной стороны, в литературе мало информации по вопросам оборота окисленных белков в растениях, с другой стороны, в связи с большим количеством белка, содержащегося в семенах бобовых, именно они чаще всего встречаются с активными формами кислорода (АФК) [17–19], и, как следствие, являются важными маркерами окислительного гомеостаза. Стоит так же отметить, что «сломанные», в том числе окисленные аминокислоты, вероятно, могут встраиваться в синтезируемый белок в процессе трансляции [20–22]. В частности, была показана возможность встраивать канаванин вместо аргинина с использованием белоксинтезирующего комплекса *E. coli* [23], алкилированного D-аланина – в пептидогликаны бактерий [24], а также способность мутантов *E. coli* включать алкильные группировки в молекулы белка за счет работы тиразил-тРНК-синтазы [25]. Однако процесс встраивания «сломанных» аминокислот – нечастое явление, так как система защиты создаваемых белков от бракованных аминокислот работает довольно хорошо.

Известно, что в настоящее время расшифровано множество геномов, в том числе и у растений (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), протеом же остается не изученным ни у одного организма. Немаловажное значение стоит уделять именно обороту окисленных белков и аминокислот, как одного из возможных факторов формирования протеома.

У гороха именно белки являются ключевыми запасными веществами, которые на стадии прорастания претерпевают существенный метаболизм [26–29], с этой точки зрения горох является удобной модельной культурой.

На основании сказанного целью работы явилось изучение влияния продолжительности ультразвукового воздействия на уровень ПОЛ, ОМБ, активность цистеиновой протеиназы и экспрессию ее гена (СР) в прорастающих семенах гороха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали семена гороха посевного (*Pisum sativum*), сорта «Альбумен». Семена обрабатывали ультразвуком через 24 ч после замачивания. Исследуемые семена общей массой 50 г помещали в центр ультразвуковой ванны UM-4 (LABIMEX, Польша), имеющей три пьезоэлектрических преобразователя, встроенных в центральную часть ее дна. Семена были размещены непосредственно на дне ванны одним слоем без применения каких-либо сосудов, их удерживали в центре с помощью пластиковых пластин, образовавших барьер по периферии центрального пьезопреобразователя высотой 2 см. Используемые в работе семена

были откалиброваны по массе и размеру и являлись морфологически идентичными. Ультразвуковая ванна имела следующие характеристики: частота – 26.1 кГц, характерная максимальная амплитуда акустического давления (p) – 250 ± 20 кПа, интенсивность излучения – 25 кВт/м^2 , объем – 4 л, размеры ванны – длина 260 мм, ширина 160 мм, глубина 120 мм. Для определения параметров воздействующего ультразвука использовали метод визуализации распределений интенсивностей в ультразвуковых пучках и кавитационных микропузырьков, генерируемых пьезопреобразователями, путем визуализации ультразвуковых полей с использованием красителей методом «краска/бумага» предложенным в работах [30, 31], в качестве красителя применяли 0.005%-й водный раствор метиленового синего, регистрируемой пластинкой служила белая офисная бумага размером 260×160 мм. Бумажную пластинку помещали непосредственно на дно ультразвуковой ванны, а также на расстоянии 2 и 10 см от него. Ультразвуковое воздействие на бумажную пластинку проводили в течение минуты. Семена находились в акустическом поле, образованном устойчивой структурой стоячих волн. Обработку проводили в водной среде объемом 3 л в течение 5, 10 и 20 мин, без термостатирования. Температура в течении 20 мин увеличивалась на 7°C (с 24°C до 31°C). Контролем служили одновременно замоченные, но не обработанные ультразвуком семена. По окончании обработки в семенах определяли уровень ПОЛ путем определения содержания малонового диальдегида (МДА), уровень ОМБ – путем определения производных 2,4-динитрофенилгидразина, активность тиоловой протеиназы и экспрессию ее гена. Гомогенизацию семян осуществляли в течении 30 мин после обработки ультразвуком целиком, в случае исследования экспрессии гена использовали только зародышевую ткань. Навески всех исследуемых групп в рамках применяемой методики имели равное количество семян. Содержание МДА определяли согласно методике, основанной на его способности реагировать с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенных производных [32]. Продукты ОМБ определяли по методике, основанной на способности окисленных белков взаимодействовать с 2,4-динитрофенилгидразином [33] с авторской модификацией, применимой к растительным объектам. Растительный материал массой 1 г растирали в форфоровой ступке с 9 мл фосфатного буфера (pH 7.2), полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 3000 g. К 0.1 мл супернатанта добавляли 1 мл 10 mM 2,4-динитрофенилгидразина, растворенного в 1 M HCl, инкубировали в течении 60 мин, по окончании инкубации добавляли 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты, затем центрифугировали 15 мин при 3000 g. Надосадочную жидкость

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для проведения ПЦР

№	Ген	Тип праймера	Последовательность 5'–3'	Номер NCBI	Температура отжига	Размер ампликона
1	CP	F:	ACATCACCTTGGGTGCTGAG	AJ278699.1	60.00°C	292 bp
		R:	CATGCACCACCTCAAATGCC		60.00°C	
2	Act	F:	AACCGGAATGGTTAAGGCTG	U81047.1	59.86°C	84 bp
		R:	AAGCGGAGCTTCAGTGAGAA		60.11°C	

сливали, осадок промывали трижды раствором этанол/ацетон в соотношении 1:1, далее осадок просушивали в течение 12 ч и ресуспендировали в 3 мл 8 М мочевины в закрытых пробирках на водяной бане. После полного растворения осадка пробирки охлаждали и измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре СФ-2000 (ЛОМО, Россия) при четырех длинах волн: 356 нм – соответствует алифатическим альдегид-динитрофенилгидразонам нейтрального характера, 370 нм – алифатическим альдегид-динитрофенилгидразонам основного характера, 430 нм – алифатическим кетон-динитрофенилгидразонам нейтрального характера и 530 нм – алифатическим кетон-динитрофенилгидразонам основного характера. Активность протеиназ определили по методике Ансона [34]. Экспрессию гена *CP* в прорастающих семенах определяли полуколичественно с помощью полимеразной цепной реакции по конечной точке с последующей визуализацией в агарозном геле [35]. Для этого 0.05 г растительного материала зародышевой ткани гомогенизировали с использованием набора «ExtractRNA» для выделения тотальной РНК («Евроген», Россия). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции ОТ-1 с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами («Синтол», Россия). В качестве референсного гена использовали ген актина. Подбор праймеров проводили по кодирующему участку гена в программе Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Полученные олигонуклеотиды представлены в табл. 1.

Количественную оценку ампликонов проводили путем анализа агарозного геля и выражали в условных (относительных) единицах [36].

Результаты обрабатывали статистически; рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартные отклонения (σ) с использованием программы Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показано пространственное распределение интенсивностей в ультразвуковом пучке, формируемом тремя пьезопреобразователями в ультразвуковой ванне, как в горизонтальном, так и в вертикальном сечении ультразвукового пучка. Данное распределение обусловлено сложной интерференционной картиной волн, формируемой как за счет расположения пьезопреобразователей (рис. 1), так и за счет отражения волн от стенок ванны. Так, на дне ванны области с наибольшей интенсивностью локализованы непосредственно над пьезопреобразователями, а также на двух участках между ними (рис. 1а), на периферии интенсивность распределялась в виде параллельных дорожек. На расстоянии 2 см от дна ванны было показано распределение интенсивностей над пьезопреобразователями (рис. 1б). На расстоянии 10 см наблюдалось более равномерное распределение интенсивности ультразвуковой волны по сравнению с предыдущими картинками распределения интенсивностей ультразвука (рис. 1в).

Пространственное распределение кавитационных микропузырьков отражает пространственное распределение интенсивностей в ультразвуковом пучке.

Стоит отметить, что интенсивности в области локализации семян, т.е. непосредственно над центральным пьезопреобразователем на дне и на 2 см выше распределялись достаточно равномерно. Таким образом, на прорастающие семена в достаточном количестве и равномерно оказывалось воздействие ультразвуком высокой интенсивности, сопровождающимся генерацией кавитационных микропузырьков, с изменением редокс-равновесия. Воздействие осуществлялось одновременно по трем механизмам: а) за счет механических колебаний в среде и объекте исследования, увеличения микротечений в среде и вокруг объекта воздействия; б) за счет теплового воздей-

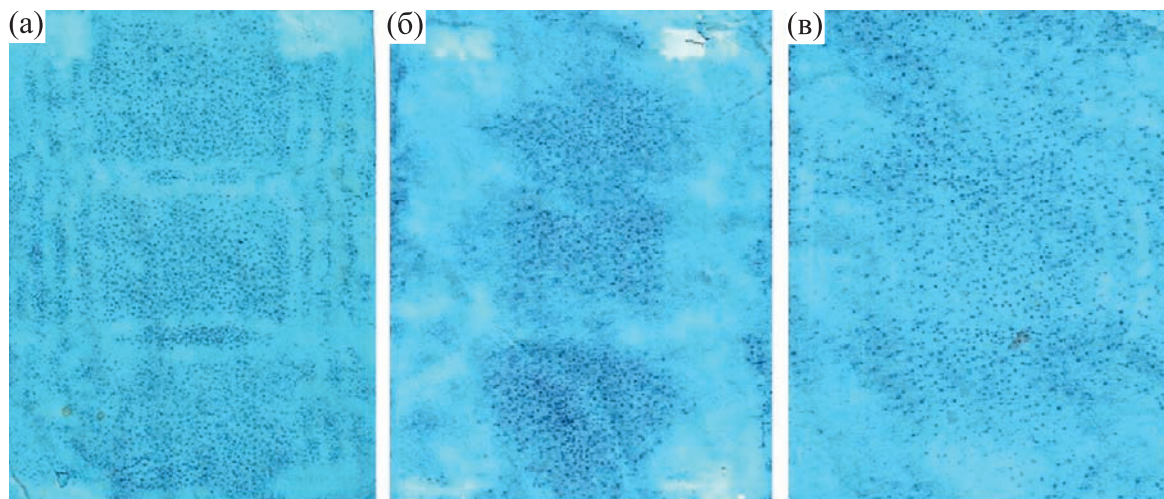


Рис. 1. Распределение интенсивностей ультразвуковой волны, зарегистрированных методом «краска/бумага», в ультразвуковой ванне УМ-4 в сечении пучка при средней интенсивности 25 кВт/м^2 и времени облучения 1 мин: на дне установки (а), на расстоянии 2 см (б) и 10 см (в) от пьезоэлектрических преобразователей.

ствия вследствие поглощения ультразвуковых волн; в) за счет интенсификации процессов массообмена вблизи колеблющихся кавитационных ми кропузырьков, возможных разрывов различного типа связей за счет кавитации, возможного кавитационного повреждения клеточных мембран и оболочек исследуемого объекта.

Было выявлено неоднозначное действие ультразвука на изучаемые показатели. Наблюдалось увеличение содержания МДА во всех прорастающих семенах, подверженных ультразвуковому воздействию, но существенное усиление процессов ПОЛ показано после 20-минутного воздей-

ствия ультразвуком, что проявилось в увеличении содержания МДА в несколько раз относительно контроля ($P \leq 0.05$) (рис. 2а).

Интересно отметить, что окисленные метаболиты белковой природы вели себя иначе, чем метаболиты липидной природы. Не было замечено статистически значимых отличий в суммарном содержании 2,4-динитрофенилгидразонов в образцах, на которые воздействовали ультразвуком в течение 5 мин ($P \geq 0.05$). Однако в прорастающих семенах, на которые действовали ультразвуком в течение 10 мин, наблюдалось увеличение содержания окисленных метаболитов, а в образ-

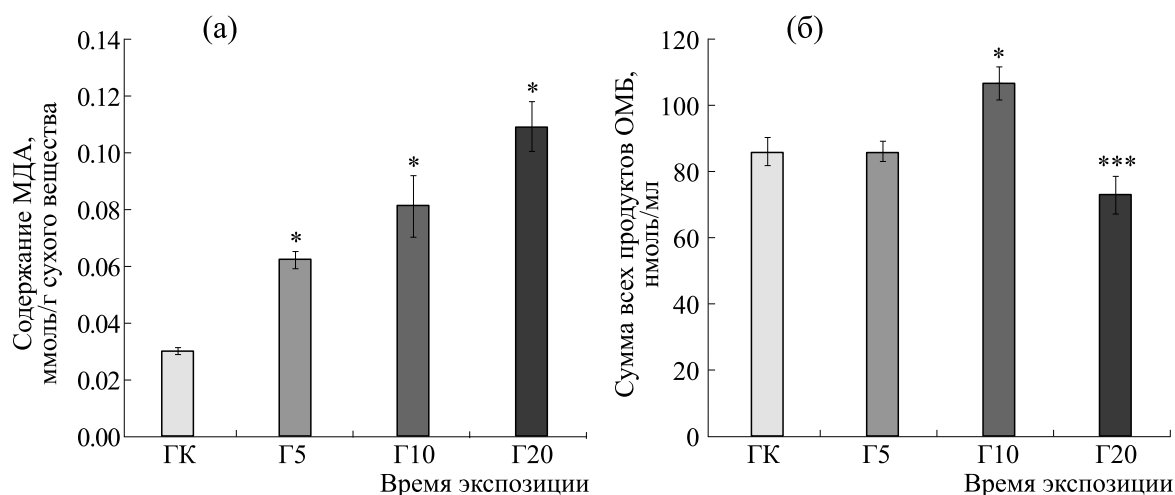


Рис. 2. Содержание МДА (а) и сумма всех продуктов ОМБ (б) в прорастающих семенах гороха в зависимости от продолжительности ультразвукового воздействия: ГК – контроль, Г5, Г10 и Г20 – прорастающие семена были подвержены ультразвуковому воздействию в течение 5, 10 и 20 мин соответственно; * – $p \leq 0.05$ относительно контроля по критерию Стьюдента; *** – $p \leq 0.05$ относительно предыдущей опытной группы по критерию Стьюдента.

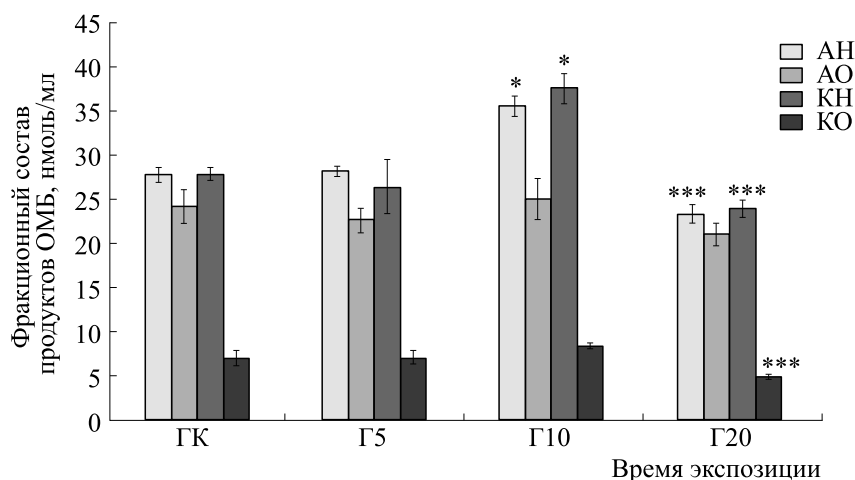


Рис. 3. Фракционный состав продуктов ОМБ 2,4-динитрофенилгидразонов в прорастающих семенах гороха в зависимости от продолжительности ультразвукового воздействия: АН — алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, АО — алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера, КН — алифатические кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, КО — алифатические кетон-динитрофенилгидразоны основного характера. Остальные обозначения как на рис. 2.

цах после 20-минутного ультразвукового воздействия, напротив, было зафиксировано снижение суммарного содержания 2,4-динитрофенилгидразонов ($P \leq 0.05$) (рис. 2б).

Резюмируя динамику содержания продуктов ПОЛ и ОБМ, можно отметить ее независимость относительно точек ультразвукового воздействия. Так, чем длительнее было действие ультразвука, тем больше накапливалось МДА в прорастающих семенах, а в случае с окисленными белками наблюдалось вначале накопление продуктов, а далее прослеживалась тенденция снижения количества продуктов. Фактически наблюдались более резкие колебания в содержании продукта ПОЛ по сравнению с продуктами ОМБ. Вероятно, это связано с большим содержанием белка в запасных тканях, которые слабо подвержены действию АФК на ранних этапах прорастания семян, а также большим содержанием ферментов белкового обмена, в том числе входящих в состав протеасом, которые, в свою очередь, участвуют в деградации окисленных белков [37–41]. Например, ряд авторов рассматривает протеолитический комплекс как вторичную антиоксидантную защиту, которая, по сути, регулирует оборот окисленных белков [14, 42].

На рис. 3 представлен фракционный состав исследуемых продуктов ОМБ. Отчетливо видно преобладание альдегид и кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера, при этом не наблюдается преобладание какого-либо из этих продуктов. Содержание же алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов основного характера ниже. Стоит так же отметить явный перевес в содержании альдегид-динитрофенилгид-

разонов по сравнению с кетон-динитрофенилгидразонами.

Важным показателем является не только общее количество карбонильных групп белков и их фракционный состав, но и соотношение первичных (альдегидных) и вторичных (кетонных) группировок [43]. По их соотношению можно судить о степени фрагментации и агрегации окисленных белков [44]. На рис. 4 показано соотношение первичных и вторичных маркеров ОМБ относительно общего содержания всех карбонильных производных белков. Как было сказано выше, во всех группах преобладают первичные маркеры ОМБ, при этом их максимальное количество зафиксировано в образцах подверженных 10-минутному ультразвуковому воздействию. Во всех остальных группах показано примерно равное соотношение первичных и вторичных маркеров ОМБ. Если рассматривать их соотношение в динамике, можно сказать, что при воздействии ультразвуком в течении 5 мин соотношение маркеров ОМБ не изменяется, 10-минутное ультразвуковое воздействие увеличивало долю первичных маркеров, а 20-минутное воздействие, напротив, приводило к повышению вторичных маркеров по сравнению с образцами после 10-минутного ультразвукового воздействия.

Для более глубокого понимания влияния времени ультразвукового воздействия на уровень окислительного гомеостаза прорастающих семян гороха были изучены некоторые детали оборота окисленных продуктов. Одним из механизмов безусловно является протеолиз запасного вещества семени, у бобовых растений, в том числе и у гороха, это белки, окисление которых было рас-

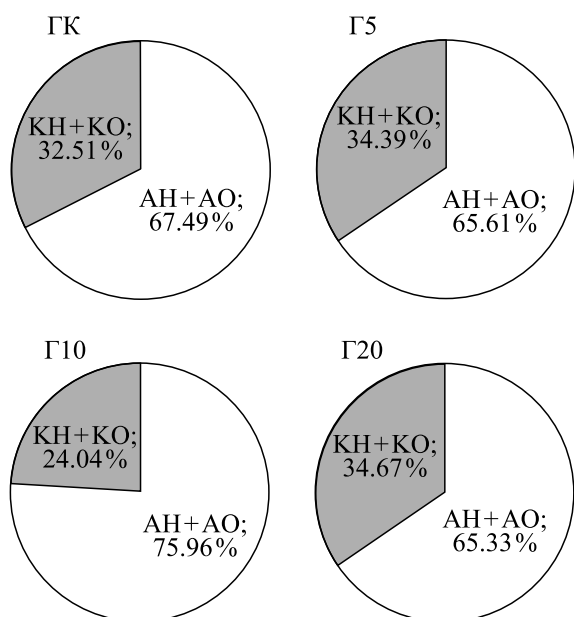


Рис. 4. Доля первичных и вторичных маркеров относительно общего содержания карбонильных производных белков. Обозначения как на рис. 2.

смотрено выше. Ключевыми ферментами, участвующими на начальных этапах прорастания семян растений, являются кислые протеиназы [45], в том числе цистеиновые протеиназы. Так как реакции карбонилирования белков — необратимый процесс, для нормальной жизнедеятельности клетка осуществляет их деградацию путем протеолиза [46].

Изучая активность данного фермента, мы выявили ее усиление в образцах, подверженных 5-минутному ультразвуковому воздействию, по-

сле чего активность начинает падать и становится существенно ниже контрольного значения (рис. 5а). По-видимому, схожим образом проходила и экспрессия гена *CP*. На рис 5б показана динамика накопления транскриптов иРНК данного гена. Стоит отметить существенное усиление транскрипции в образцах, подверженных 5-минутному ультразвуковому воздействию. В семенах, на которые воздействовали ультразвуком в течении 10 и 20 мин, содержание транскриптов не сильно отличается от образцов после 5-минутного действия ультразвуком. Это может свидетельствовать об отсутствии дозозависимости экспрессии данного гена, а также о стимулирующем эффекте ультразвукового воздействия интенсивностью 25 кВт/м² и частотой 26.1 кГц в течении 5–20 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обсуждая и интерпретируя полученные результаты, стоит выделить ряд ключевых аспектов, связанных с эффектом ультразвукового воздействия на живые объекты. В частности, это образование кавитационных микропузырьков, как в водном растворе, так и в биологических тканях, эффект генерации электродвижущей силы (соно-ЭДС) на мембранах клеток, тепловыделение в биологических тканях, обусловленное акустическими и механическими свойствами [30, 47] и влияние ультразвука на отдельные молекулы в водных растворах [48] с учетом особенностей используемого объекта исследований.

Так, известно, что в водной среде в результате соносенсibilизированных реакций образуются отрицательно заряженные кавитационные микропузырьки [49], в состав которых входят АФК

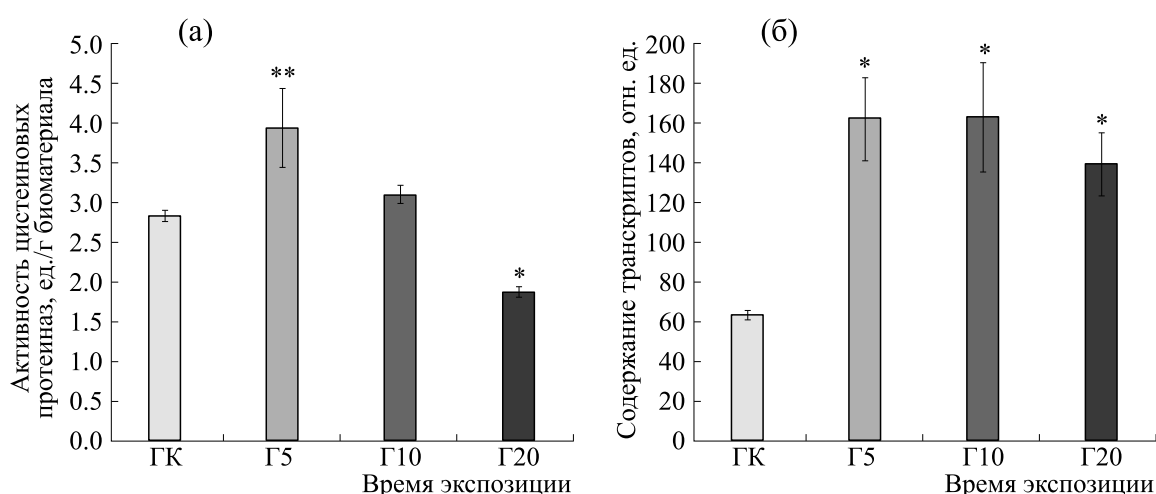


Рис. 5. Активность цистеиновых протеиназ (а) и экспрессия гена *CP* (б) в прорастающих семенах гороха в зависимости от продолжительности ультразвукового воздействия. ** — Достоверные различия в сравнении с контролем по критерию Крускала–Уоллиса, остальные обозначения как на рис. 1.

[48], а интенсивность их генерации, количество и природа будут обусловлены показателями ультразвука (мощностью, частотой), временем воздействия и природой раствора. Выявлена способность ультразвука усиливать мембранную проницаемость [50] и образовывать микротрещины в семенной коже [51], что может способствовать выходу продуктов гидролиза запасных веществ семян в водный раствор, с одной стороны и проникновение АФК, образовавшихся в результате ультразвуковой кавитации в воде, с другой стороны. Ряд работ показывает, что ароматические вещества способны усиливать образование АФК под действием ультразвука [48, 52], а, следовательно, можно сделать предположение о некой цепной сонохимической реакции в биосистемах, богатых ароматическими соединениями. В частности, при усиленном гидролизе белка в среду поступают ароматические аминокислоты, которые, по-видимому, могут являться катализаторами образования АФК, что, в свою очередь, способствует усилению свободнорадикальных процессов в водной среде, в которой находились прорастающие семена. В работах [30, 49] также было показано образование кавитационных микропузырьков в биологических тканях, что, безусловно, не могло не сказываться на процессах окисления биомолекул, в том числе исследуемых липидов и белков.

Таким образом, основными причинами усиления процессов ПОЛ и ОМБ в прорастающих семенах гороха вероятнее всего можно считать:

- усиление мембранной проницаемости, и образование микротрещин в семенной коже, что, по-видимому, усиливало мембранный транспорт в обоих направлениях, в том числе приводило к увеличению проникновения АФК, образовавшихся в водной среде в результате генерации кавитационных микропузырьков;

- выход ароматических соединений из семян в водную среду в результате образования микротрещин в семенной коже и усилении мембранной проницаемости, что способствовало увеличению степени генерации АФК, которые, в свою очередь, проникали внутрь тканей семян;

- механическое и тепловое воздействие на клеточные структуры семян, что могло приводить к нарушению функционирования электронно-протонного транспорта, в том числе митохондриальной электронно-транспортной цепи, что, в свою очередь, усиливало утечку электронов и образование АФК;

- образование кавитационных микропузырьков в тканях прорастающих семян гороха, компонентами которых являются АФК.

АФК, образовавшиеся в результате ультразвуковой кавитации, вероятнее всего участвуют в окислении биологических молекул, в том числе

исследуемых в работе липидов и белков [53–57], что объясняет усиление процессов ПОЛ и ОМБ в прорастающих семенах после ультразвукового воздействия. Однако в работе показано и снижение содержания исследуемых метаболитов (продуктов ОМБ). Известно, что ультразвуковое воздействие заранее окисленного белка способствовало увеличению степени его растворения [58], однако длительное воздействие ультразвука на неокисленный белок, напротив, способствовало его агрегации и снижало степень растворимости [59, 60]. Вероятнее всего, 5-минутное ультразвуковое воздействие только запускало процессы ОМБ, а его прерывание фактически не приводило к существенному изменению содержания продуктов ОМБ. Действие ультразвука на прорастающие семена гороха в течение 10 мин, возможно, в полной мере активировали свободнорадикальные процессы, что выражалось в увеличении первичных продуктов ОМБ (альдегидных группировок). Несмотря на то, что количество регистрируемых продуктов ОМБ при ультразвуковом воздействии в течение 20 мин уменьшалось, само воздействие, вероятнее всего, продолжало усиливать деструктивные процессы. Исходя из процентных соотношений первичных и вторичных продуктов ОМБ в прорастающих семенах после 20-минутного ультразвукового воздействия, которые приближались к контрольным значениям и процентным соотношениям продуктов ОМБ в прорастающих семенах, подвергнутых 10-минутному ультразвуковому воздействию (рис. 3), можно предположить, что происходило существенное увеличение вторичных продуктов (кетонных группировок), однако из-за того, что данных продуктов было много, они с высокой долей вероятности агрегировали между собой, образуя белковые конгломераты за счет формирования битиризиновых сшивок [61], S–S-сшивок и конъюгации с продуктами окисления, что в итоге затрудняло их фиксацию и визуально демонстрировало их снижение [14, 62].

Усиление активности цистеиновой протеиназы в образцах, подвергавшихся 5-минутному воздействию ультразвуком, можно объяснить увеличением общей доступности белкового субстрата для фермента. Последующее падение активности, вероятно, связано как с прямым действием ультразвука, так и с действием АФК на структуру фермента, что приводит к нарушению его конформации, а следовательно, существенно снижает как процесс образования фермент-субстратных комплексов, так и регуляцию работы молекулы фермента.

Усиление уровня экспрессии гена *CP* в прорастающих семенах при кратковременном воздействии на них ультразвуком согласуется с литературными данными. Например, было показано усиление экспрессии гена оксигеназы-1 в эндоте-

лиях при воздействии с частотой 1 МГц при интенсивности 0.3 Вт/см^2 в течение 20 с [63]. Возможной причиной активации экспрессии гена *CP* можно назвать снижение содержания низкомолекулярных антиоксидантов и увеличение концентрации АФК, которые генерируются за счет ультразвукового воздействия и являются сигнальными веществами для активации протеолитического комплекса [64]. Также известно, что увеличение содержания АФК характерно для стареющей клетки, а в ряде работ демонстрировалось усиление уровня экспрессии генов цистеиновых протеиназ в стареющих участках растений [65–67]. Таким образом, можно предположить, что данное явление наблюдается при увеличении содержания АФК, вызванном иными факторами, в том числе и ультразвуковым воздействием. Содержание транскриптов иРНК больше во всех опытных образцах. Однако об усилении экспрессии гена достоверно можно судить только в образцах, на которые действовали ультразвуком в течение 5 мин, так как в остальных объектах могут некоторое время сохраняться наработанные транскрипты, образованные в первые минуты действия ультразвуком. Это наталкивает на мысль об ингибирующем влиянии длительного воздействия ультразвука на процессы транскрипции. По видимому, этому способствуют дезактивация ферментов транскрипции, а также воздействие ультразвука на структуру ДНК через разрыв сахаро-фосфатного остова, что требует включения репарирующих механизмов, а следовательно, замедляется процесс транскрипции [68, 69]. Как было сказано ранее, увеличение содержания АФК в клетках по-видимому активирует протеолиз, но это происходит до определенного момента, после которого концентрация АФК достигает такого значения, при котором их разрушительное действие на структуры ферментов превалирует над их стимулирующим эффектом. Следовательно, одной из причин замедления накопления транскриптов в образцах, обработанных ультразвуком в течение 10 и 20 мин, можно считать действие АФК на структуру ДНК и ферменты транскрипции, вызывающее их окисление [70].

ВЫВОДЫ

1. Продолжительность ультразвукового воздействия неоднозначно повлияла на уровень окислительного гомеостаза прорастающих семян гороха. Было показано увеличение содержания МДА во всех опытных группах подверженных ультразвуковому воздействию. Содержание производных 2,4-динитрофенилгидразина статистически значимо не изменялось в прорастающих семенах, подверженных ультразвуковому воздействию в течение 5 мин, увеличивалось в образцах,

на которые воздействовали ультразвуком в течение 10 мин и снижалось в семенах, обработанных ультразвуком в течение 20 мин.

2. Активность цистеиновых протеиназ была выше контроля в образцах, на которые воздействовали ультразвуком 5 мин; в семенах, обработанных в течение 20 мин, активность данного фермента снижалась.

3. Содержание транскриптов иРНК было больше во всех опытных образцах, что может свидетельствовать об отсутствии дозозависимой экспрессии гена *CP*, а также о стимулирующем эффекте ультразвукового воздействия интенсивностью 25 кВт/м^2 и частотой 26.1 кГц в течение 5–20 мин на суточные прорастающие семена.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. H. J. Leveau and S. E. Lindow, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71** (5), 2365 (2005).
2. Ю. В. Сеницына, Я. В. Середнева, А. П. Веселов и В. С. Сухов, *Современные проблемы науки и образования*, № 6, 1374 (2014).
3. Ю. В. Сеницына, Л. Н. Олюнина, Е. К. Крутова и др., *Современные проблемы науки и образования*, № 6, 663 (2015).
4. C. Han and P. Yang, *Proteomics*, **15** (10), 1671 (2015).
5. S. Penfield, *Curr. Biol.*, **27** (17), 874 (2017).
6. H. Nonogaki, *J. Integr. Plant Biol.*, **61** (5), 541 (2019).
7. Q. Wang, G. Chen, H. Yersaiyiti, et al., *PLoS One*, **7** (10), 47204 (2012).
8. X. Liu, C. Zhao, Q. Liu, et al., *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, **29** (6), 1857 (2018).
9. A. C. Miano, *Food Res. Int.*, **106**, 928 (2018).
10. A. C. Miano and V. D. Sabadoti, *J. Food Sci.*, **84** (11), 3179 (2019).
11. J. Ding, J. Johnson, Y. Fang Chu, and H. Feng, *Food Chem.*, **283**, 239 (2019).
12. Ю. А. Владимиров и А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах* (Наука, М., 1972).
13. J. M. C. Gutteridge, *Clin. Chem.*, **41** (12), 1828 (2005).
14. Е. Е. Дубинина, *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток* (Медицинская пресса, СПб., 2006).
15. G. Noctor, C. Lelarge-Trouverie, and A. Mhamdi, *Phytochemistry*, **112**, 33 (2015).

16. M. A. Farooq, A. K. Niazi, J. Akhtar, et al., *Plant Physiol. Biochem.*, **141**, 353 (2019).
17. J. M. Gebichi, *Redox Rep.* **3** (2), 9 (1997).
18. M. Gracanin, C. L. Hawkins, D. I. Pattison, and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, **47** (1), 92 (2009).
19. C. L. Hawkins, P. E. Morgan, and M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, **46** (8), 965 (2009).
20. B. Wiltschi, *Fungal Genetics and Biology*, **89**, 137 (2016).
21. Q. Gan and Ch. Fan, *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*, **1861** (11), Part B., 3047 (2017).
22. J. T. Stieglitz, H. P. Kehoe, M. Lei, and J. A. Van Deventer, *ACS Synth. Biol.*, **7** (9), 2256 (2018).
23. E. G. Worst, M. P. Exner, A. De Simone, et al., *J. Vis. Exp.*, **114**, 54273 (2016).
24. M. S. Siegrist, S. Whiteside, J. C. Jewett, et al., *ACS Chem. Biol.* **8**, 500 (2013).
25. A. Deiters and P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 1521 (2005).
26. L. Tan, S. Chen, T. Wang, and S. Dai, *Proteomics*, **13** (12–13), 1850 (2013).
27. W. Q. Wang, S. J. Liu, S. Q. Song, and I. M. Møller, *Plant Physiol. Biochem.*, **86**, 1 (2015).
28. S. Penfield and D. R. MacGregor, *J. Exp. Bot.*, **68** (4), 819 (2017).
29. T. Steinbrecher and G. Leubner-Metzger, *J. Exp. Bot.*, **68** (4), 765 (2017).
30. Т. Н. Пашовкин, Дис. ... д-ра биол. наук (ИБК РАН, М., 1998).
31. Т. Н. Пашовкин и Г. В. Шильников, *Научное приборостроение*, **10** (3), 17 (2000).
32. И. Д. Стальная и Т. Г. Гаришвили, *Современные методы в биохимии* (Медицина, М., 1977).
33. Е. Е. Дубинина и др., *Вопр. мед. химии*, **41** (1), 24 (1995).
34. И. Ф. Александрова, А. П. Веселов и Ю. Р. Ефременко, *Физиол. растений*, **46** (1), 223 (1999).
35. A. B. Gál, J. W. Carnwath, et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, **18** (3), 365 (2006).
36. T. D. Schmittgen, B. A. Zakrajsek, et al., *Anal. Biochem.*, **285** (2), 194 (2000).
37. K. A. Wilson and A. T. Wilson, *J. Plant Physiol.*, **224–225**, 86 (2018).
38. M. Bourgeois, F. Jacquin, V. Savoie, et al., *Proteomics*, **9** (2), 254 (2009).
39. M. Bourgeois, F. Jacquin, F. Cassecuelle, et al., *Proteomics*, **11** (9), 1581 (2011).
40. Z. X. Lu, J. F. He, Y. C. Zhang, and D. J. Bing, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **60** (15), 2593 (2019).
41. P. Maharjan, J. Penny, D. L. Partington, and J. F. Panozzo, *J. Sci. Food Agric.*, **99** (12), 5409 (2019).
42. C. L. Hawkins and M. J. Davies, *J. Biol. Chem.*, **294** (51), 19683 (2019).
43. Ю. И. Губский и др., *Совр. пробл. токсикологии*, **8** (3), 20 (2005).
44. М. А. Фомина и Ю. В. Абаленихина, *Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации* (РиО РязГМУ, Рязань, 2014).
45. C. E. Salas, M. T. R. Gomes, M. Hernandez, and M. T. P. Lopes, *Phytochemistry*, **69** (12), 2263 (2008).
46. K. J. Davies, *Biochem. Soc. Trans.*, **21** (2), 346 (1993).
47. В. Б. Акопян и Ю. А. Ершов, *Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами* (Изд-во МГТУ, Москва, 2005).
48. W. Duco, V. Grosso, D. Zaccari, and A. T. Soltermann, *Methods*, **109**, 141 (2016).
49. T. N. Pashovkin, P. A. Grigoriev, A. P. Sarvazyan, and H. I. Hein, *Brit. J. Cancer*, **45**, 225 (1982).
50. Е. В. Мельникова, В. К. Утешев, Т. Н. Пашовкин и др., *Биофизика*, **50** (3), 500 (2005).
51. I. López-Ribera and C. M. Vicent, *Plant Methods*, **13** (31) (2017).
52. P. Riesz, D. Berdahl, and C. L. Christman, *Environ. Health Perspect.*, **64**, 233 (1985).
53. P. Riesz, D. Berdahl, and C. L. Christman, *Environ. Health Perspect.*, **64**, 233 (1985).
54. P. Riesz and T. Kondo, *Free Radic. Biol. Med.*, **13** (3), 247 (1992).
55. N. Murano, M. Ishizaki, S. Sato, et al., *Arch. Ophthalmol.*, **126** (6), 816 (2008).
56. K. Okada, N. Kudo, M. A. Hassan, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **16** (4), 512 (2009).
57. Q. A. Zhang, Y. Shen, X. H. Fan, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **27**, 96 (2015).
58. H. Cao, R. Sun, J. Shi, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **77**, 105685 (2021).
59. X. Deng, Y. Ma, Y. Lei, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **76**, 105659 (2021).
60. J. Su and A. Cavaco-Paulo, *Ultrason. Sonochem.*, **76**, 105653 (2021).
61. M. B. Feeney and C. Schöneich, *Antioxid. Redox Signal.*, **17** (11), 1571 (2012).
62. P. Kay, J. R. Wagner, H. Gagnon, et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **26** (9), 1333 (2013).
63. R. Ogawa, A. Watanabe, and A. Morii, *J. Med. Ultrason.*, **42** (4), 467 (2015).
64. K. Groten, C. Dutilleul, P. D. van Heerden, et al., *FEBS Lett.*, **580** (5), 1269 (2006).
65. I. V. Kardailsky and N. J. Brewin, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **9** (8), 689 (1996).
66. B. Belenghi, M. Salomon, and A. Levine, *J. Exp. Bot.*, **55** (398), 889 (2004).
67. S. Li, X. Yang, Y. Zhang, et al., *Ultrason. Sonochem.*, **31**, 20 (2016).
68. Y. Hoshino, T. Kawasaki, and Y. Okahata, *Biomacromolecules*, **7** (3), 682 (2006).
69. M. H. Ali, K. A. Al-Saad, and C. M. Ali, *Phys. Med.*, **30** (2), 221 (2014).
70. T. Kondo, C. M. Krishna, and P. Riesz, *Free Radic. Res. Commun.*, **6** (2–3), 109 (1989).

Oxidative Homeostasis in Germinating Pea Seeds (*Pisum sativum* L.) Depending on Ultrasonic Exposure Duration

S.S. Tarasov and E.K. Krutova

Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, prosp. Gagarina 97, Nizhny Novgorod, 603022 Russia

The effects of ultrasonic exposure durations (5, 10 and 20 min) with intensity of 25 kW/m² and the frequency of 26.1 kHz on the extent of lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, the activity of cysteine proteinases, and gene expression in germinating pea seeds were studied. It has been shown that the intensity in the area that had seeds planted (just over the central ultrasound generator) was rather uniformly distributed, but at the same time gave rise to diffuse reflection. A range of tendencies in changes of the indicators under study were seen after ultrasound exposure. The level of malonic dialdehyde increased with increasing duration of ultrasound exposure. This study revealed the increased amount of oxidized proteins in germinating pea seeds after a 10 min-exposure to ultrasound, and a decrease in the level of oxidative modification of proteins present in seeds subjected to ultrasound for a period of 20 min. The activity of cysteine proteinases was higher in pea seeds after a 5-min exposure to ultrasound, but the amount of mRNA transcripts increased in all experimental samples.

Keywords: ultrasonic action, oxidative modification of proteins, lipid peroxidation, cysteine proteinases, seed germination

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ПРОРОСТКОВ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ

© 2023 г. Л.А. Минасбекян*,#, И.А. Авагян*

*Научно-исследовательский институт биологии Ереванского государственного университета,
ул. А. Манукяна, 1, Ереван, 0025, Армения

#E-mail: minlia@ysu.am

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 23.03.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Исследовано влияния γ -излучения в дозах 50 Гр и 100 Гр на радиочувствительность клеточных ядер проростков семян мягкой карликовой пшеницы. Определены изменения биохимического состава ядерных фракций проростков облученных семян пшеницы под воздействием γ -излучения. Под действием ионизирующего излучения в растворимой ядерной фракции наблюдалось повышение общего содержания белка и нуклеиновых кислот, а в ядерной мембране — увеличение содержания ДНК и белка. Обнаружено также падение величины ζ -потенциала изолированных ядер проростков облученных семян в градиенте электростатического поля. Изменения в поверхностном заряде ядер ведут к нарушению их функциональной активности, поскольку поверхностный заряд ядер необходим для нормального функционирования и регулирования ядерно-цитоплазматического транспорта макромолекул. Воздействие излучения вызывает разрушение ионогенных групп молекул ядерной мембраны, в результате чего происходит уменьшение электроотрицательности ядер, что, в свою очередь, влечет за собой изменение функциональной активности ядра. Полученные результаты указывают на прямую зависимость изменений в электроотрицательности и в содержании ядерных фракций от дозы ионизирующего излучения. Можно заключить, что ионизирующее излучение в диапазоне от 50 до 100 Гр оказывает благоприятное воздействие на метаболическую и пролиферативную активность клеток мягкой пшеницы.

Ключевые слова: биохимический состав ядерной мембраны, биохимический состав растворимой ядерной фракции, проростки семян пшеницы, электроотрицательность, ζ -потенциал, γ -облучение.

DOI: 10.31857/S0006302923030171, EDN: FSROSQ

На сегодняшний день в сельском хозяйстве при предпосевной обработке для защиты семян от патогенов и стимулирования их всхожести и роста чаще всего используют различные химические препараты. Однако такая обработка ведет к изменению химического состава и продуктивности обрабатываемых культур, поэтому разрабатываются новые подходы с применением физических методов воздействия, такие как магнитное поле, микроволновое излучение, ультрафиолетовое излучение, «холодная» (низкотемпературная) плазма, ионизирующее излучение (ИИ), ультразвук, импульсное электрическое поле [1, 2]. Физические методы перспективны для предпосевного облучения семян, поскольку способны вызывать радиационный мутагенез. В то же время при

определенных дозах ИИ формируют эффект радиационного гормезиса [3, 4]. Вопрос безопасности их использования, предусматривающий нормы радиационной безопасности и использование определенных видов ионизирующих источников излучения (НРБ-99/2009) [5], а также подбора оптимальных доз облучения в каждом случае требует широкомасштабного исследования. К тому же недостаточный уровень знаний о биохимических и физических процессах, происходящих в семенах в результате их обработки, препятствует широкому использованию физических технологий.

Воздействие ИИ на живые организмы происходит в несколько последовательных этапов. Непосредственно при облучении семян, за доли секунды происходит поглощение энергии на физическом уровне, далее следуют разрывы химических связей, изменение свойств повре-

Сокращения: ИИ — ионизирующее излучение, ЭКП — электрокинетический потенциал, NLS — сигналы ядерной локализации (nuclear localization signals).

жденных молекул и химического состава клетки. Однако повреждения клеток на молекулярном уровне пока менее изучены и требуют детального исследования. Сравнительные исследования облучения цитоплазмы и ядра показали более высокую радиочувствительность ядра, что и явилось основанием для наших исследований: определение электроотрицательности изолированных ядер, а также исследования биохимических изменений ядерной мембраны и содержимого ядра. Очевидно, что для каждого организма существует определенный оптимальный уровень ζ -потенциала ядра в клетке, формирующийся благодаря поверхностному заряду ядра в среде. Для нормального функционирования ядерно-цитоплазматического транспорта в клетке электроотрицательность ядра имеет важное значение в реакции клетки и всего организма на действия разных факторов, как экзогенных, так и эндогенных, и определяется посредством измерения электрокинетического потенциала ядра в электростатическом поле [6–8].

Более того, под воздействием низких доз ИИ происходят изменения экспрессии более чем в 500 генах проростков риса и грецкого ореха [9, 10], что является адаптивной реакцией растений на малые дозы стресса. Под воздействием ИИ в растениях изменяется метаболизм углеводов и белков [11, 12], а в митохондриях и хлоропластах синтезируются активные формы кислорода, контролирующие экспрессию генов и активность систем антистресса [10, 13, 14]. Однако при высоких концентрациях молекулы активных форм кислорода сами могут являться источником генотоксического стресса для растительной клетки. Как результат такого воздействия, при низких дозах ИИ происходит подавление всех физиологических процессов и развития растения, определяющих скорость роста. Высокие дозы и длительное воздействие ИИ может негативно сказаться не только на интенсивность роста, но и привести к гибели растения [14, 15]. Таким образом, активные формы кислорода, синтезируемые в митохондриях и хлоропластах растительных клеток под действием облучения, играют не только сигнальную роль в клетке, воздействуя на биомолекулы, входящие в ее состав, но и модулируют поверхностный заряд ядерной мембраны.

Как известно, ядерная мембрана представляет собой двойную мембрану липидного бислоя, пронизанную насквозь крупными белковыми комплексами — так называемыми комплексами ядерных пор (nuclear pore complex — NPC), контролирующими избирательную проницаемость ядерно-цитоплазматического транспорта [16]. Сам комплекс состоит из более чем 30 видов белков, так называемых нуклеопоринов, богатых гидрофобными незаряженными фенилаланин-глициновыми повторами [16, 17]. Каждый ком-

плекс ядерных пор соединен с внутренней и внешней ядерными мембранами, образуя центральный канал с внешним диаметром 122 нм и внутренним диаметром 70 нм [18]. Разнообразные белки, факторы транскрипции, гистоны и регуляторы клеточного цикла, могут преодолеть этот барьер только при наличии сигнала ядерной локализации (nuclear localization signals — NLS). Сигналы ядерной локализации содержат на концах локусы положительно заряженных аминокислот, таких как аргинин, лизин, гистидин [18, 19], что делает их биодоступными для отрицательно заряженного ядра, и этот факт еще раз подтверждает важность электрического заряда на поверхности ядра для осуществления ядерно-цитоплазматического транспорта [20, 21].

Целью данного исследования было изучение воздействия γ -облучения на изменения электроотрицательности изолированных клеточных ядер проростков семян мягкой пшеницы, а также воздействия на биохимический состав фракций ядра: ядерную мембрану и растворимую ядерную фракцию. Обсуждается коррелятивная зависимость электрокинетического потенциала (ЭКП) ядер от изменений в биохимическом составе фракций ядра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обработка и проращивание семян. В качестве объекта исследований использованы семена мягкой пшеницы *Triticum aestivum* сорта Amby ($d_1D_2D_3$; $ch_{1r}Ch_{2r}$), содержащей гены гибридной карликовости и красного хлороза. Гибридную депрессивность пшеницы особенно трудно преодолеть в случаях сочетания сильных аллелей. По мнению некоторых авторов, наиболее действенным методом преодоления депрессии у сильно-некротических гибридов (F_1) является облучение радиоактивным изотопом кобальта (Co^{60}). Кобальт-60 является наиболее долгоживущим из радиоактивных изотопов кобальта и имеет важное практическое применение. Для получения экспериментальных семян пшеницы, воздушно-сухие семена подвергались одноразовому γ -излучению, которое было проведено в Институте физических исследований НАН РА на изотопном излучателе $K120.000\ Co^{60}$, с энергией кванта в 1.17 МэВ при мощности облучения 0.4 Гр/сек. Обработанные и контрольные семена замачивали на ночь, а затем проклюнувшиеся семена пересеивали в лотки и далее проращивали в термостате в течение последующих 72 ч.

Изолирование клеточных ядер. Ядра четырехсуточных проростков пшеницы выделяли по методу, описанному в работе [22], с некоторыми модификациями. Проростки семян пшеницы, замороженные в жидком азоте, измельчали фарфо-

ровой ступкой до получения тонкого порошка, добавляли 0.25 М сахарозы в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl, 25 мМ KCl, 15 мМ MgCl₂, pH 7.4 (ТКМ -буфер), далее фильтровали сквозь марлю и центрифугировали 10 мин при 9000 g на центрифуге 310 В (Mechanica Precyzyjna, Польша). Осажденные ядра повторно отмывали в ТКМ-буфере без сахарозы, в результате чего получали осадок очищенных неповрежденных ядер.

Получение ядерных фракций. Для разделения ядерных мембран полученные цельные ядра клеток проростков ресуспендировали в 10% сахарозе в 50 мМ Трис-НСl буфере, pH 7.4, содержащем: 1 мМ ДТТ, 1 мМ MgCl₂ и ингибитор протеаз. Далее добавляли ДНКазу-1 и РНКазу А (Serva, Германия), и инкубировали гомогенат 15 мин при 37°C, после чего центрифугировали 10 мин при 20000 g для разделения растворимой ядерной фракции (супернатанта) и фракции ядерных мембран (осадка). Осажденные ядерные мембраны далее отмывали двух-трехкратным ресуспендированием в ТКМ-буфере, содержащем 0.25 М сахарозу, с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 20000 g, как было описано ранее [22].

Определение общего растворимого белка во фракциях ядра проводили по методу Лоури, как описано в работе [23]. Щелочной виннокислый реагент (20 г карбоната натрия и 0.5 г тартрата натрия) растворяли в 1000 мл 0.1 N NaOH. 10 мкл образца белка добавляли к 5 мл щелочного медного реагента и оставляли на 15 мин при комнатной температуре. Сразу после этого 0.5 мл разбавленного реагента Фолина смешивали со смесью и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 30 мин. Оптическую плотность полученных образцов измеряли на спектрофотометре Genesys 10s (Thermo Scientific, США) при длине волны 750 нм.

Экстракцию и гидролиз нуклеиновых кислот для количественного определения проводили согласно методу, описанному в работе [23]. Количество РНК в гидролизованных образцах определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм, принимая коэффициент экстинкции $\epsilon = 0.025$, а ДНК – при той же длине волны, коэффициент экстинкции $\epsilon = 0.02$ (после предварительного кипячения в 0.5 н HClO₄). Измерения проводили на спектрофотометре Genesys 10s (Thermo Scientific, США).

Определение электроотрицательности ядер. Электрокинетический или ζ -потенциал определяется как средний электростатический потенциал, существующий в гидродинамической плоскости сдвига в коллоидных системах в межфазном двойном электрическом слое. Измерение ζ -потенциала в настоящее время является самым простым и доступным способом для характеристики

поверхности заряженных коллоидных частиц [24]. Электрокинетический потенциал ядер определяли по величине электрофоретической подвижности ядер с помощью микроэлектрофореза под микроскопом в градиенте электрического поля согласно методу, ранее описанному в работах [7, 22]. Изолированные неповрежденные ядра семян пшеницы суспендировали в ТКМ-буфере и заливали суспензию в горизонтальную камеру для микроэлектрофореза. Электрофорез проводили при напряжения 70–80 В и силе тока 10–15 мА. За движением ядер наблюдали под микроскопом «Биолам» (ЛОМО, Россия) в среднем слое суспензии на определенной глубине камеры, где исключаются электроосмотические явления из-за взаимодействия со стенками камеры. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Скорость движения ядер в градиенте электрического поля измеряли с помощью секундомера и сетки окуляр-микрометра [7]. В данном исследовании все ядра проростков пшеницы при всех использованных экспозициях имели отрицательный заряд, и перемещались в сторону анода. Значение ЭКП рассчитывали по формуле Смолуховского:

$$\text{ЭКП} = 4\pi\eta\omega/DE, \quad (1)$$

где η – коэффициент вязкости дисперсионной среды, ω – скорость движения ядер, D – диэлектрическая постоянная воды ($D = 81$), E – градиент напряжения приложенного электрического поля в электрофоретической камере. Размерность ЭКП – в вольтах (В). Для пересчета поверхностного заряда ядер использовали следующую формулу:

$$Q = \text{ЭКП} \cdot D \cdot r, \quad (2)$$

где r – радиус эукариотического ядра, равный 5 мкм. Изменения поверхностного заряда, соответственно, позволяют оценивать электроотрицательность ядер, которую мы выразили в процентах от контроля.

Статистический анализ. В таблицах и на графиках представлены средние арифметические значения из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки. Все вычисления средних значений и стандартные ошибки были рассчитаны с использованием Microsoft Office Excel. Статистическую значимость всех наблюдаемых различий между средними значениями полученных экспериментальных данных и контрольными значениями оценивали посредством критерия Стьюдента, который составлял 3.0–3.5 для значений в диаграммах, отмеченных звездочками. Уровень достоверности был принят за $p < 0.05$.

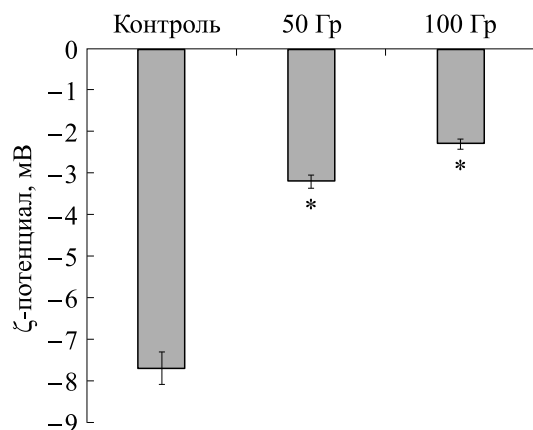


Рис. 1. Зависимость изменения электрокинетического потенциала ядер проростков семян от величины ионизирующего гамма-излучения. * — Изменения достоверны при $p < 0.05$.

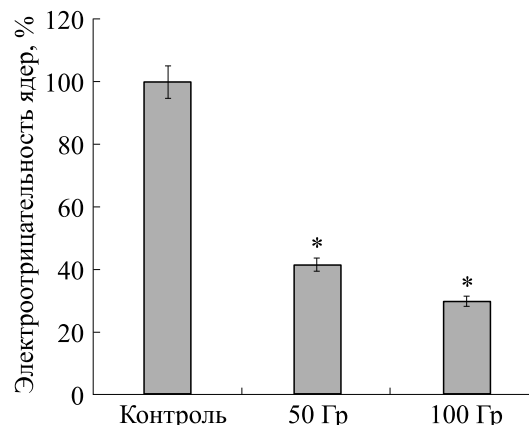


Рис. 2. Зависимость подавления электроотрицательности ядер проростков семян от величины ионизирующего гамма-излучения. * — Изменения достоверны при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Облучение растений ИИ, источником которого является ^{60}Co , широко используется в селекции растений для получения новых улучшенных сортов, устойчивых к различного рода стрессам и болезням. Особенно важно знать какие изменения вызывает такая обработка на молекулярном уровне растений, что может сказаться и на здоровье человека.

Тест на радиационную чувствительность семян пшеницы сорта Amby после гамма-излучения в 50 Гр и 100 Гр показал, что максимальный процент прорастания наблюдался у необлученных проростков контрольных семян [15, 25], что свидетельствует о глубоких изменениях на клеточном уровне. С этой целью нами проведены исследования воздействия γ -излучения радиоактивного изотопа ^{60}Co в дозе 50 Гр и 100 Гр на электроотрицательность ядер и на биохимический состав фракций ядра — ядерной оболочки и растворимой ядерной фракции.

Электроотрицательность ядра считается одним из информативных биофизических параметров его функциональной активности, которая измеряется посредством определения величины электрокинетического потенциала ядер [6, 7, 26]. Величину ЭКП очищенных ядер определяли измерением их электроподвижности в градиенте электростатического поля, посредством микроэлектрофореза, проводимого под микроскопом с секундомером [7]. Определение ЭКП может пролить свет на вопрос о влиянии γ -излучения на поверхностный заряд ядра, а также выявить взаимосвязь между электроотрицательностью ядер и изменениями в биохимическом составе ядерных фракций и функциональной активностью всей клетки.

Мы провели исследования воздействия ионизирующего излучения радиоактивным изотопом ^{60}Co в низких дозах (50 Гр и 100 Гр) на прорастание семян пшеницы, поскольку считается, что низкие дозы ионизирующего излучения индуцируют различные биологические эффекты, некоторые из которых оказываются благоприятными для роста и развития растений. В данном исследовании нами изучен поверхностный заряд ядер в зависимости от дозы облучения ИИ, посредством определения величины ЭКП ядер в градиенте электрического поля (рис. 1), который является важным определяющим параметром функционального состояния ядра. На основании полученных величин ЭКП были вычислены значения поверхностного заряда, который для всех ядер имел отрицательный знак. Данные о влиянии γ -излучения на электроотрицательность ядер проростков пшеницы представлены на рис. 2, где изменения значений электроотрицательности изолированных ядер клеток проростков пшеницы облученных семян, находятся в обратно пропорциональной зависимости от полученной дозы γ -излучения. Данные, приведенные на рис. 2, свидетельствуют об уменьшении электроотрицательности ядер под воздействием ИИ в зависимости от дозы облучения, что проявляется как падение электроподвижности ядер в градиенте электростатического поля. Так, воздействие в 50 Гр приводит к уменьшению абсолютной величины ζ -потенциала от -7.7 мВ до -3.2 мВ (рис. 1), то есть электроподвижность ядер уменьшается более чем в два раза. Соответственно уменьшается электроотрицательность поверхностного заряда, что, выраженное в процентах, составляет чуть более 40% от контроля (рис. 2). Сдвиги в величинах ЭКП ядер, изменение электроподвижности ядер в градиенте постоянного электрического поля

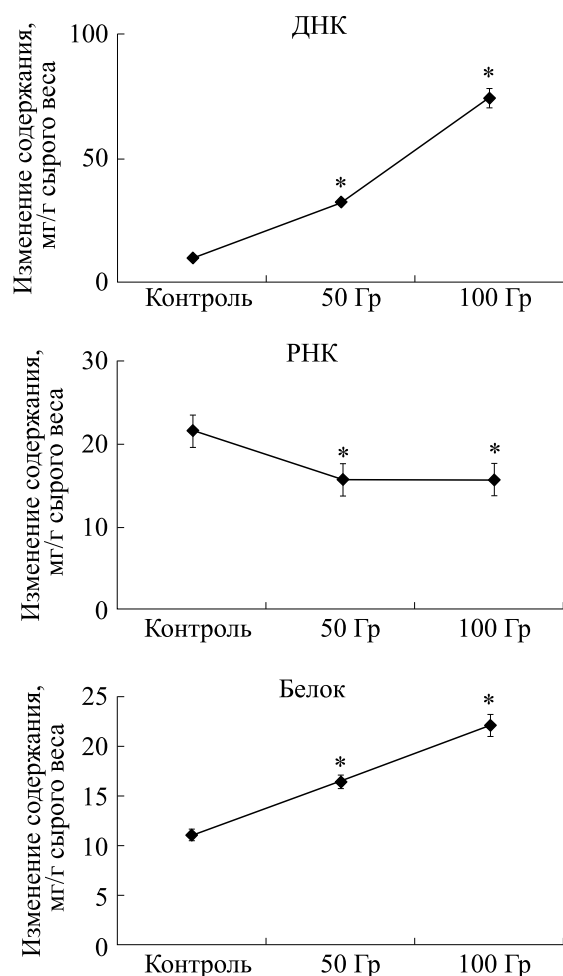


Рис. 3. Изменения содержания ДНК, РНК и белков в составе ядерной мембраны проростков в зависимости от дозы облучения семян (в мг/г сырого веса проростков). * — Изменения достоверны при $p < 0.05$.

могут быть связаны с изменением содержания ионогенных, заряд-формирующих молекул, таких как анионные фосфолипиды в составе двухслойной ядерной мембраны, и ассоциированные с ней белки и нуклеиновые кислоты. Описанные выше гидрофобные белки в составе ядерного порового комплекса нуклеопоринов, хотя и электронейтральны, однако под действием ИИ могут ионизироваться, принимая положительный заряд, и таким образом уменьшая отрицательную заряженность ядерной мембраны, обусловленной анионными фосфолипидами [7]. В свою очередь, уменьшение количества отрицательно заряженных молекул в составе ядерной мембраны неминуемо приводит к падению величины ЭКП ядер.

Облучение семян более высокой дозой γ -излучения в 100 Гр приводит к еще более низким значениям электроотрицательности, к падению электроподвижности ядер и соответственно к

уменьшению абсолютных значений ЭКП до 2.3 мВ, что составляет 29.9% от электроподвижности ядер из проростков контрольных семян мягкой пшеницы (см. рис. 1). В результате воздействия γ -излучения наблюдалось падение ЭКП более чем в 3.3 раза. Столь резкие изменения в электроотрицательности ядер и уменьшение величины ЭКП под воздействием ИИ могут приводить к достаточно резким изменениям в функционировании ядра, проницаемости ядерной мембраны, ее целостности и, наконец, изменений в содержании основных ее составляющих компонентов.

Изучение биохимического содержания фракций ядра клеток проростков, облученных γ -излучением (^{60}Co) семян мягкой пшеницы. Мы провели исследования воздействия ионизирующего излучения в дозах 50 Гр и 100 Гр на ранней стадии прорастания семян, поскольку на этой стадии прорастания семян низкие дозы ионизирующего излучения индуцируют различные биологические эффекты через повреждения ДНК и изменение ядерной активности [27]. С этой целью были проведены исследования воздействия γ -излучения радиоактивного изотопа ^{60}Co в дозе 50 Гр и 100 Гр на биохимический состав фракций ядра — ядерной оболочки и растворимой ядерной фракции.

В составе ядерной мембраны проростков семян мягкой пшеницы, в зависимости от дозы облучения, в наших исследованиях были зарегистрированы изменения в содержании нуклеиновых кислот и белков, данные которых представлены на рис. 3. В составе ядерной мембраны проростков семян пшеницы под воздействием облучения ИИ в дозе 50 Гр наблюдалось повышение содержания ДНК до 32.45 ± 0.19 мг/г в пересчете на сырой вес проростков относительно содержания 9.35 ± 0.32 мг/г в контрольных проростках семян пшеницы, т.е. содержание ДНК в составе ядерной мембраны увеличивается почти в 3.5 раза.

В составе ядерной мембраны при дозе облучения в 50 Гр наблюдалось увеличение также и в содержании белка, которое оказалось почти в полтора раза выше содержания такового в контрольных проростках.

Нами зафиксировано также относительное изменение в содержании РНК при этих же дозах облучения. Содержание РНК незначительно снижалось (с 21.70 ± 0.29 мг/г до 15.75 ± 0.18 мг/г в пересчете на сырой вес проростков мягкой пшеницы), как представлено на рис. 3. Зафиксированное увеличение содержания ДНК наряду с возрастанием содержания белка в составе ядерной мембраны свидетельствует об изменении структуры и увеличении плотности ядерной мембраны, а также об увеличении плотно упакован-

ного в белки гетерохроматина, прилегающего к внутреннему листку ядерной мембраны.

Необходимо отметить, что большинство исследований по изучению воздействия γ -излучения на растения сводились в основном к определению глобального содержания белков и макромолекул в клетке, однако исследования по воздействию излучения на компартменты ядра клеток и изменений в содержании ядра осуществляются впервые. Этот факт ограничивает наши возможности сравнения полученных результатов с литературными данными.

Повышение дозы γ -излучения до 100 Гр, приводит к еще более глубоким изменениям в структуре ядерной мембраны. При облучении семян в дозе 100 Гр содержание ДНК в ядерной мембране проростков превышает значение содержания ДНК в контрольных проростках более чем в семь раз, достигая величины в 74.25 ± 0.51 мг/г, как представлено на рис. 3. Содержание РНК при этом остается практически на уровне, соответствующем ядрам проростков семян, обработанных ИИ в дозе 50 Гр. При этой дозе облучения содержание белка также возрастает в два раза вследствие увеличения количества ферментов и компонентов ядер, интегрированных в ядерную мембрану. Возрастание содержания нуклеиновых кислот и белков в составе ядерной мембраны свидетельствуют о глубоких изменениях структуры ядерной мембраны, набухании ядер, а также об изменениях ее функциональной активности и проницаемости.

В составе растворимой ядерной фракции под действием γ -излучения мы также наблюдали изменения в зависимости от дозы облучения. На рис. 4 представлены данные о содержании нуклеиновых кислот и белков в растворимой ядерной фракции. Как свидетельствуют полученные нами данные, при воздействии γ -излучения дозой в 50 Гр было получено незначительное возрастание содержания РНК.

Согласно полученным данным, содержание ДНК в составе растворимой ядерной фракции незначительно уменьшилось при дозе облучения в 50 Гр (рис. 4), что свидетельствует о подавлении митотической и пролиферативной активности в клетках проростков облученных семян, а также подтверждается полученными нами ранее и имеющимися в литературе данными [27, 28]. Исходя из данных по проращению семян, облученных дозой в 50 Гр, эта доза оказалась стимулирующей для прироста массы проростков, несмотря на падение митотической активности [3,4]. Индукция роста растений может быть связана с активацией синтеза РНК и белка на ранних стадиях проращивания в ответ на стрессирующее воздействие. Общее содержание белка в составе растворимой ядерной фракции проростков семян пшеницы,

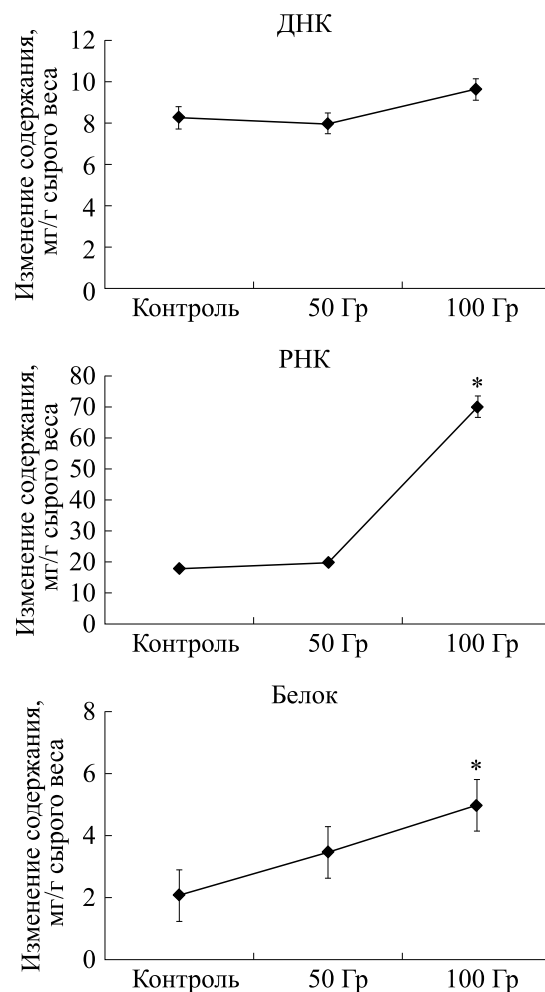


Рис. 4. Изменения содержания ДНК, РНК и белков в составе растворимой ядерной фракции проростков в зависимости от дозы облучения семян (в мг/г сырого веса проростков). * — Изменения достоверны при $p < 0.05$.

облученных в дозе 50 Гр, возрастало с 2.04 мг/г до 3.5 мг/г сырого веса проростков (см рис.4).

При обработке семян γ -излучением дозой 100 Гр в составе растворимой ядерной фракции увеличивается содержание ДНК с 8.25 мкг/мг до 9.62 мкг/мг, что, по-видимому, связано с нарушением митотического веретена делящихся клеток, со специфическими изменениями концентрации ключевых фитогормонов и паттернов экспрессии генов - факторов метаболизма.

Содержание ДНК в растворимой ядерной фракции незначительно повышается с 8.25 ± 0.31 мг/г до 9.62 ± 0.28 мг/г. Данные, демонстрирующие незначительное возрастание содержания ДНК в растворимой ядерной фракции (рис. 4), согласуются с ранее полученными нами цитогенетическими данными, указывающими на увеличение количества клеток с хромосомными

абберациями и понижением митотической способности клеток [28], а также имеет место амплификация некоторых генов.

Наряду с подавлением митотической активности клетки в содержании растворимой ядерной фракции наблюдалось резкое повышение содержания РНК с 17.85 ± 0.18 мг/г до 70.1 ± 0.22 мг/г, т.е. содержание РНК увеличилось приблизительно в три раза.

Также были получены данные об увеличении содержания белка в составе растворимой ядерной фракции с 2.04 ± 0.29 мг/г (референсные значения) до 5.2 ± 0.12 мг/г при облучении в дозе 100 Гр. В результате облучения было получено увеличение содержания белка в два с половиной раза, что является перспективным для получения высокобелковых сортов.

В результате воздействия γ -излучения в дозе 100 Гр незначительно изменяется содержание ДНК, происходит падение митотической активности, разрывы хромосом и хромосомные абберации, что приводит к подавлению роста. Однако для преодоления стресса клетке необходим синтез большого количества и-РНК для интенсификации синтеза белков *de novo*, для восполнения белков и ферментов, утративших активность в результате облучения, чем объясняются полученные нами данные резкого повышения в содержании РНК и белка в составе растворимой ядерной фракции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Неподвижность и многочисленные стрессы, с которыми сталкиваются растения в течение онтогенеза, привели к выработке механизмов адаптации растений к изменениям окружающей их среды. Растения лучше справляются со стрессом даже при высоких дозах облучения ИИ, используя механизмы репарации ДНК, антиоксидантные пути, изменение соотношения фенольных соединений и АБК/ГК [10, 11], которыми они обладают в большей степени, чем многие другие многоклеточные организмы [29]. Известно, что ионизирующее излучение способно выбивать электроны из атомов макромолекул и, таким образом, приводить к окислению биологически важных молекул и к возникновению активных форм кислорода, вовлеченных в цепные реакции, повреждающие клеточные мембраны, белки и ДНК [11, 14]. Эти высокоактивные сигнальные молекулы запускают реакции окислительного стресса, приводящие к изменениям структуры ядерной мембраны и ее проницаемости, после чего сигнальные молекулы ($O^{\cdot -}$, $NO^{\cdot -}$, $OH^{\cdot -}$) передаются к клеточному ядру [30], вызывая специфические изменения в метаболических путях, сопровождающиеся

модификацией экспрессии генов [12, 31]. В результате перечисленных выше процессов происходят изменения в физиологических и морфометрических параметрах растений [25], изменения в биохимическом составе клетки, возрастание синтеза белков и вторичных метаболитов, что приводит к полученным нами изменениям в содержании и функциональной активности ядра растительной клетки, а также подтверждается литературными данными [27, 32].

Исследуемые семена мягкой пшеницы сорта Amby ($d_1D_2D_3$; $ch_{1r}Ch_{2r}$), также как и мягкой пшеницы сорта Frisco ($D_1d_2D_3$; $ch_{1r}Ch_{2r}$), обладают гибридным красным хлорозом по идентичным генам, но депрессивностью по разным генам. Для преодоления гибридной депрессивности этих сортов ранее было применено облучение радиоактивным изотопом Co^{60} , что, однако не привело к положительным результатам [28]. В зависимости от дозы облучения ИИ (50–200 Гр) подавлялся рост в длину семисуточных проростков облученных семян мягкой пшеницы сортов Frisco и Amby по сравнению с контрольными [25, 28].

Согласно полученным данным, низкие дозы ИИ оказываются благоприятными для роста растений, что широко используется в сельском хозяйстве при предпосевной обработке семян [3]. Множеством исследований показана повышенная радиочувствительность делящихся клеток семян на ранних стадиях прорастания семян [29]. Наблюдаемые нами изменения в содержании белка в растворимой ядерной фракции проростков семян пшеницы при облучении в 50 Гр также свидетельствуют о том, что под воздействием ионизирующего излучения запускаются ферментативные системы, для которых необходим синтез белка *de novo*, что подтверждается также и литературными данными [14, 15]. В составе ядерной мембраны нами также наблюдалось увеличение содержания белка в ответ на облучение ИИ в дозе 50 Гр, что свидетельствует об интенсификации синтеза белков и ферментов, участвующих в запуске процессов регенерации и адаптации клеток, что также согласуется с литературными данными [11].

Ионизирующее излучение — один из немногих физических факторов, который может вызвать ряд повреждений, включая двухцепочечные разрывы ДНК, нарушение митотического веретена, амплификацию генов репарации, радиомаркеров и антиоксидантной системы [28, 31–33]. Соответственно, возрастание активности генов радиопротекторных белков, приводит к синтезу большого количества ферментов и белков, ассоции-

рованных с ядерной мембраной и необходимых клетке для преодоления стресса, что подтверждается полученными нами данными по возрастанию содержания белка и РНК с растворимой ядерной фракции (см. рис. 4).

С увеличением дозы γ -излучения до 100 Гр в составе растворимой ядерной фракции нами было получено незначительное увеличение содержания ДНК, которое связано, по-видимому, со специфическими изменениями паттернов экспрессии генов метаболизма [10] и амплификацией генов-радиомаркеров [32]. Известно, что ИИ вызывает двухцепочечные разрывы ДНК, что приводит к нарушению целостности генома и отражается на функциональной активности всей клетки [15].

В свою очередь, физиологическая активность клеток определяется функциональной активностью клеточного ядра и ядерно-цитоплазматического транспорта сквозь ядерную мембрану, что находится в прямо пропорциональной зависимости от поверхностного заряда ядра [20, 21, 23]. Облучение семян мягкой пшеницы в дозе 100 Гр приводит к уменьшению величины электроотрицательности изолированных ядер проростков семян пшеницы. В данном исследовании было получено многократное увеличение содержания ДНК в ядерной оболочке, что свидетельствует о возрастании гетерохроматиновых областей, прилегающих к внутреннему слою ядерной мембраны. Воздействие γ -излучения в дозах 100–300 Гр у трех различных сортов семян пшеницы *T. aestivum* L. оказывало специфичное воздействие в зависимости от дозы облучения и вида, вызывая множество аберрантных хромосом, раскручивание хромосом, нарушение экваториальной пластинки и т.д. [31]. Ранее нами также была показана зависимость между изменениями ЭКП ядер проростков пшеницы и повышением функциональной активности ядер проростков семян для трех видов пшениц в течение прорастания, а также было получено уменьшение электроотрицательности ядер и даже смены знака после обработки ферментами РНКазой и ДНКазой, которые обычно применяются для разрушения ядерной мембраны [23]. Следовательно, уменьшение абсолютной величины ЭКП под воздействием ИИ свидетельствует о падении электроотрицательности ядер проростков, разрушении ионогенных молекул на поверхности клеточного ядра, а также о глубоких нарушениях в функционировании ядра, изменении проницаемости ядерной оболочки вплоть до структурных нарушений в ядерной мембране и растворимой ядерной фракции. Так, если ранее ядерная оболочка рассматривалась только как барьер

для избирательной проницаемости в ядро, то теперь уже имеется достаточно доказательств того, что ядерная оболочка вместе с трансмембранными белками ядерной оболочки (nuclear envelope transmembrane proteins – NETs) и связанными с нею растворимыми белками участвует во множестве клеточных функций, включая организацию генома, ядерную миграцию, локализацию хроматина, регуляцию клеточного цикла и дифференциации клеток [34].

В то же время наши исследования показали, что, с одной стороны, происходит замедление роста семян в длину, а с другой стороны – наблюдается возрастание общего содержания ДНК и белка в ядерной мембране и в содержимом ядра, что приводит к падению электроотрицательности клеточных ядер в ответ на воздействие ИИ и, соответственно к резкому увеличению метаболической активности ядер. Несколько экспериментальных результатов показали, что пролиферативные клетки в целом деполяризованы, т.е. обладают трансмембранным отрицательным электрическим потенциалом V_m , который ниже, чем у непролиферативных клеток [35]. В то же время клетки имеют несколько механизмов регуляции электрического потенциала, в частности, это ионные каналы и насосы, взаимодействующие с внеклеточной средой, и щелевые контакты для связи с соседними клетками [36]. Возможно, регистрируемое нами падение электроотрицательности ядер в результате облучения ИИ происходит как результат увеличения пролиферации клеток и глубоких изменений в содержании ядра и ядерной мембраны.

В результате облучения семян ИИ в клетке увеличивается синтез белка, запускаются все возможные метаболические пути, используются все ресурсы клетки для преодоления стресса, для выживания и адаптации к новым условиям. Вопрос об уменьшении электроотрицательности ядер клеток открывает новые перспективы исследования электрических явлений в клетке, особенно проявляющиеся при действии высокоэнергетических полей.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования показали, что культивируемые пшеницы, обладая крупным, гексаплоидным геномом, достаточно устойчивы к воздействию ИИ в дозах от 50 до 100 Гр. В течение эволюции в растениях выработался эффективный механизм адаптации к физическим стрессовым факторам, используя механизмы репарации ДНК, антиоксидантные пути, а также изменение

соотношения фенольных соединений и АБК/ГК. Из полученных данных можно сделать вывод, что полученная извне энергия полностью расходуется на изменения экспрессии генома и увеличение метаболической и пролиферативной активности клеток, тем самым деполяризуя ядро и приводя к падению величины ζ -потенциала, к уменьшению электроотрицательности поверхности ядерной мембраны. Полученные изменения в составе растворимой ядерной фракции — возрастание содержания РНК и белков — объясняются интенсивным синтезом ферментов и амплификацией радиопротекторных генов, необходимых для преодоления стресса и выживания в изменяющихся условиях.

Таким образом, низкие дозы в пределах 50–100 Гр оказывают благоприятное воздействие на семена гексаплоидной мягкой пшеницы, вызывая возрастание метаболической и пролиферативной активности, изменения экспрессии генов и мутации. Именно эти дозы можно рекомендовать для обеззараживания и повышения метаболической активности культивируемых мягких пшениц. На сегодняшний день целенаправленный ИИ-индуцированный мутагенез является перспективной и передовой технологией в улучшении наиболее важных сельскохозяйственных культур в мире.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Wang, H. Ma, and Sh. Wang, *Food Sci. Technol. Res.*, **25** (4), 489 (2019).
2. A. M. Khaneghah, M. H. Moosavi, C. A. F. Oliveira, et al., *Food Chem. Toxicol.*, **143**, 111557 (2020).
3. P. Yu. Volkova, E. V. Bondarenko, and E. A. Kazakova, *Curr. Opin. Toxicol.*, **30**, 100334 (2022).
4. L. A. Minasbekyan, *Proc. YSU*, **56** (3) (2023).
5. НРБ-99/2009 — интернет ресурс: <https://files.stroyinf.ru/Data1/56/56325/index.htm>
6. L. J. Colwell, M. P. Brenner, and K. Ribbeck, *PLoS Comput. Biol.*, **6** (4), e1000747 (2010).
7. Л. А. Минасбекян и А. В. Неркаряян, *Биофизика*, **67** (6), 1131 (2022).
8. В. Г. Шахбазов, *Экологическая и биофизическая генетика: Избранные труды*, под ред. В. Чешко (Штрих, Харьков, 2001).
9. S. Kimura, J. Shibato, G. K. Agrawal, et al., *Rice Genet. Newsl.*, **24**, 52 (2008).
10. H. Liu, H. Li, G. Yang, et al., *Postharvest Biol. Technol.*, **172**, 111380 (2021).
11. R. S. Hanafy and S. A. Akladios, *J. Genetic Engineer. Biotechnol.*, **16**, 683 (2018).
12. G. Singh, P. Pal, M. Masand, et al., *Plant Physiol. Biochem.*, **148**, 90 (2020).
13. D. S. Kim, J. B. Kim, E. J. Goh, et al., *J. Plant Physiol.*, **168**, 1960 (2011).
14. K. Kawamura, F. Qi, and J. Kobayashi, *J. Rad. Res.*, **59** (2), ii91 (2018).
15. N. Caplin and N. Willey, *Front. Plant Sci.*, **9**, 847 (2018).
16. S. S. Patel, B. J. Belmont, J. M. Sante, and M. F. Rexach, *Cell*, **129**, 83 (2007).
17. P. Upla, S. J. Kim, M. P. Rout, and J. Fernandez-Martinez, *Structure*, **25**, 434 (2017).
18. J. Lu, T. Wu, B. Zhang, et al., *Cell Commun. Signal.*, **19**, 60 (2021).
19. Y. Ma, K. Poole, J. Goyette, and K. Gaus, *Front. Immunol.*, **8**, 1513 (2017).
20. S. Bhattacharjee, *J. Controlled Release*, **235**, 337 (2016).
21. X-J. Du, Ji-L. Wang, Sh. Iqbal, et al., *Biomater. Sci.*, **6**, 642 (2018).
22. L. A. Minasbekyan, Zh. V. Yavroyan, et al., *Russ. J. Plant Physiol.*, **55** (3), 412 (2008).
23. L. A. Minasbekyan, S. A. Gonyan, M. A. Parsadanyan, and P. O. Vardevanyan, *Russ. J. Plant Physiol.*, **49** (2), 250 (2002).
24. А. Г. Варехов, *Научное приборостроение*, **27** (2), 21 (2017).
25. L. A. Minasbekyan and I. A. Avagyan, *Proc. YSU*, **55** (2), 165 (2021).
26. E. von Well, A. Fossey, and M. Booyse, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, **11**, 75 (2018).
27. E. von Well, M. Booyse, and A. Fossey, *Protoplasma*, **11**, 75 (2021).
28. R. R. Sadoyan and L. A. Minasbekyan, *Ann. Agrar. Sci.*, **8** (2), 32 (2010).
29. A. Majeed, Z. Muhammad, R. Ullah, and H. Ali, *Pak. J. Bot.*, **50** (6), 2449 (2018).
30. P. M. Mullineaux, M. Exposito-Rodriguez, P. P. Laisue, et al., *Phil. Trans. R. Soc. B*, **375**, 20190405 (2020).
31. S. Oney-Birol and A. Balkan, *Pak. J. Bot.*, **51** (3), 887 (2019).
32. J. E. Hwang, S. G. Hwang, S. H. Kim, et al., *Physiol. Plant.*, **150**, 604 (2014).
33. Y. Matsumoto, S. Imamichi, M. Fukuchi, et al., In: *New Research Directions in DNA Repair*, Ed. by C. Chen (InTech, 2013).
34. J. A. Talamas and M. Capelson, *Front. Genet.*, **6**, 95 (2015).
35. J. Carvalho, *Sci. Rep.*, **12** (9), 206 (2022).
36. J. L. Whited and M. Levin, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **57**, 61 (2019).

Effects of Ionizing Radiation on Radio Sensitivity of Cell Nuclei of Wheat Seedlings**Minasbekyan* and I.A. Avagyan*****Yerevan State University, Research Institute of Biology, ul. A. Manukyan 1, Yerevan, 0025 Armenia*

Effects of the 50 Gy and 100 Gy doses of γ -irradiation on radiosensitivity of cell nuclei of soft dwarf wheat seedlings were studied. Changes in the biochemical composition of the nuclear fractions of seedlings of wheat seeds exposed to γ -irradiation were determined. After exposure to ionizing radiation, total protein and nucleic acids levels appeared to be greater in the soluble nuclear fraction and the nuclear membrane-associated DNA content and proteins increased. It was also found that the value of the ζ -potential of isolated nuclei of seedlings of irradiated seeds decreased in a static electric field. Changes in the surface charge of the nucleus lead to a violation of its functional activity, since the surface charge of the nuclei is necessary for the normal functioning and regulation of the nuclear-cytoplasmic transport of macromolecules. Exposure to radiation causes destruction of ionogenic groups of molecules of the nuclear membrane, leading to a decrease in the electronegativity of the nuclei, which, in turn, entails a change in the functional activity of the nucleus. The results obtained show that changes in electronegativity and in the content of nuclear fractions are directly dependent on the dose of ionizing radiation. It can be concluded that γ -irradiation in a range from 50 to 100 Gy had beneficial effects on metabolic and proliferative activities of soft wheat cells.

Keywords: the biochemical composition of the nuclear membrane, the biochemical composition of the soluble nuclear fraction, wheat seedlings, electronegativity, ζ -potential, γ -irradiation

ДИНАМИКА БИОФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЕЛАГИАЛИ СЕВЕРНОЙ ЧАСТИ ЧЕРНОГО МОРЯ В ПЕРВЫХ ДЕКАДАХ XXI ВЕКА

© 2023 г. С.А. Пионтковский*, #, И.М. Серикова**, И.А. Минский**,
Ю.А. Загородняя**, В.В. Суслин***, И.В. Ковалева**

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

**ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»,
просп. Нахимова, 2, Севастополь, 299011, Россия

***ФИЦ «Морской гидрофизический институт РАН», ул. Капитанская, 2, Севастополь, 299002, Россия

#E-mail: spiontkovski@mail.ru

Поступила в редакцию 22.03.2023 г.

После доработки 10.04.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Измерения параметров скорости ветра, температуры поверхности моря, концентрации хлорофилла-а (со спутников MODIS-Aqua/Terra), интенсивности биолюминесценции и биомассы зоопланктона (с борта научно-исследовательского судна), величин первичной продукции, индексов аномалий атмосферного давления и массопереноса вод (расчеты по модели) использованы для оценки современного состояния структуры пелагической экосистемы и ее функциональных характеристик. Показано, что за прошедшие два десятилетия (2000–2020 гг.), после экологических катаклизмов 1990-х годов, связанных с эвтрофикацией и трофическим прессом планктонных видов-вселенцев, экосистема открытых вод северной части Черного моря вступила в фазу относительной стабильности своей структуры и функционирования. Для этой фазы характерно отсутствие трендов межгодовой изменчивости ключевых параметров ее идентифицирующих. В более широком (глобальном) контексте обсуждается проблема региональных различий многолетних трендов физических и биологических параметров.

Ключевые слова: Черное море, хлорофилл-а, зоопланктон, биолюминесценция, планктон.

DOI: 10.31857/S0006302923030183, EDN: FSZQBB

Свойства многих биофизических характеристик пелагиали Черного моря предопределены влиянием на них биомассы и численности планктона. История его исследований уходит в описательный период начала 19 века, в котором появились первые заметки о морской фауне и флоре с описанием видов и их сезонной динамики. В дальнейшем эти сведения были дополнены количественными исследованиями пространственно-временной изменчивости численности, биомассы и биологической продуктивности планктонных сообществ в прибрежных и открытых районах [1]. В странах черноморского бассейна появились программы многолетнего сбора и обработки планктонных проб, что с годами привело к выявлению региональной многолетней изменчивости

структурных и функциональных характеристик пелагических экосистем [2, 3]. Эти оценки были и остаются экологически важными, поскольку позволяют учесть пространственную неоднородность динамических процессов, которые определяют особенности многолетней изменчивости характеристик в регионах.

Прибрежные воды, Основное черноморское течение (ОЧТ) и крупномасштабные циклонические круговороты (западный и восточный, формируемые этим течением), являются биотопами планктонных сообществ подверженных многолетней изменчивости, обусловленной физико-химическими, биологическими и антропогенными факторами [4]. На масштабах сезонной изменчивости (амплитуды которой высоки в умеренных широтах), физическая динамика вод имеет существенные различия по периметру ОЧТ. Здесь выделяется северная часть моря, где ОЧТ демонстрирует сильные сезонные колебания таких структурных характеристик и динамических процессов, как температура поверхности моря, ин-

Сокращения: ОЧТ — Основное черноморское течение, НИС — научно-исследовательское судно, БП — биолюминесцентный потенциал, NAO — индекс Северо-атлантического колебания (North Atlantic Oscillation), EAWR — Восточно-атлантический/западно-российский индекс (East Atlantic/West Russia index).

Таблица 1. Общая характеристика параметров, типов измерений и источников данных

Параметры	Типы измерений	Источники данных
Индексы атмосферных аномалий: NAO, EAWR		www.cpc.ncep.noaa.gov
Напряжение трения ветра о водную поверхность (зональная и меридианальная составляющие), $\text{н}\cdot\text{м}^{-2}$	Дистанционные измерения (MERRA-2 /M2TMNXOCN v.5.12.4)	https://giovanni.gsfc.nasa.gov/giovanni/
Скорость ветра, $\text{м}\cdot\text{с}^{-1}$	Дистанционные измерения (MERRA-2 /M2TMNXOCN v.5.12.4)	https://giovanni.gsfc.nasa.gov/giovanni/
Температура поверхности моря, $^{\circ}\text{C}$	Дистанционные измерения (MODIS-Aqua)	https://giovanni.gsfc.nasa.gov/giovanni/
Массоперенос в слое 0–200 м, св	Результаты расчета по модели NEMO v.3.6	[12]
Концентрация хлорофилла- <i>a</i> , $\text{мг}\cdot\text{м}^{-3}$	Дистанционные измерения (MODIS-Aqua/Terra)	https://giovanni.gsfc.nasa.gov/giovanni/
Первичная продукция, $\text{мг С}\cdot\text{м}^{-3}\cdot\text{сутки}^{-1}$	Расчеты по данным дистанционных измерений	[11]
Биолюминесцентный потенциал, $10^{-8} \text{ Вт}\cdot\text{с}^{-2}\cdot\text{Д}^{-1}$	Зондирования в слое 0–50 м	Архивные материалы ИнБЮМ
Биомасса кормового зоопланктона, $\text{мг}\cdot\text{м}^{-3}$	Ловы в слое 0–100 м сетью Джели	Архивные материалы ИнБЮМ

тенсивность меандрирования геосторифических течений, количество и время существования синоптических вихрей, интенсивность обменных процессов (т.е. массопереноса) между прибрежными и открытыми водами [5, 6].

Исследованию сезонной динамики посвящено много работ, тогда как понимание многолетней изменчивости физических и биологических характеристик и их взаимосвязи заметно отстает. В связи с этим нашей целью было выявление трендов межгодовой изменчивости структурных и функциональных характеристик планктонного сообщества в северной [центральной] части моря. В первую очередь, нас интересовали тренды за последние двадцать лет, поскольку процессы, происходившие в предыдущие десятилетия, были освещены в ряде работ [1, 7–10 и др.]. В исходной рабочей гипотезе мы предположили, что тренды концентрации хлорофилла-*a* (индикатора биомассы фитопланктона), биолюминесценции и биомассы зоопланктона будут отрицательными в глубоководной части моря, поскольку их общая трофодинамическая основа – первичная продукция – показала уменьшение в 1998–2015 гг. [11].

МЕТОДЫ

При анализе межгодовых трендов двухтысячных годов (2000–2020 гг.) были использованы дистанционные измерения (со спутников MODIS-Aqua/Terra), контактные измерения (с борта научно-исследовательского судна (НИС) «Профес-

сор Водяницкий») и расчеты по моделям десяти параметров, характеризующих структуру пелагической экосистемы, ее функциональные характеристики и, в частности, биотоп планктонного сообщества (табл. 1).

Дистанционные измерения параметров поля ветра над поверхностью моря (на высоте 10 м) загружены из базы данных MERRA-2 для исследуемого региона. В отношении перечисленных биологических параметров следует отметить, что концентрация хлорофилла-*a* (как индикатора биомассы фитопланктона) и биомасса зоопланктона относятся к характеристикам структуры, а первичная продукция и биолюминесценция характеризуют функциональные свойства планктонного сообщества. Так, биолюминесцентный потенциал имеет двойственную природу, с одной стороны он является индикатором численности биолюминесцирующих организмов, прежде всего фитопланктона доминирующего в интегральной механически стимулированной биолюминесценции в Черном море, а с другой – индикатором функционального (физиологического) состояния этих организмов. Известно, что параметры биолюминесценции, на организменном уровне, зависят от температуры, солености, нефтяного загрязнения и других факторов среды [14, 15].

Чистую первичную продукцию фитопланктона в эвфотическом слое рассчитывали по изложенному ранее алгоритму [16], в котором ряд переменных (температура поверхностного слоя, фотосинтетически активная радиация, концен-

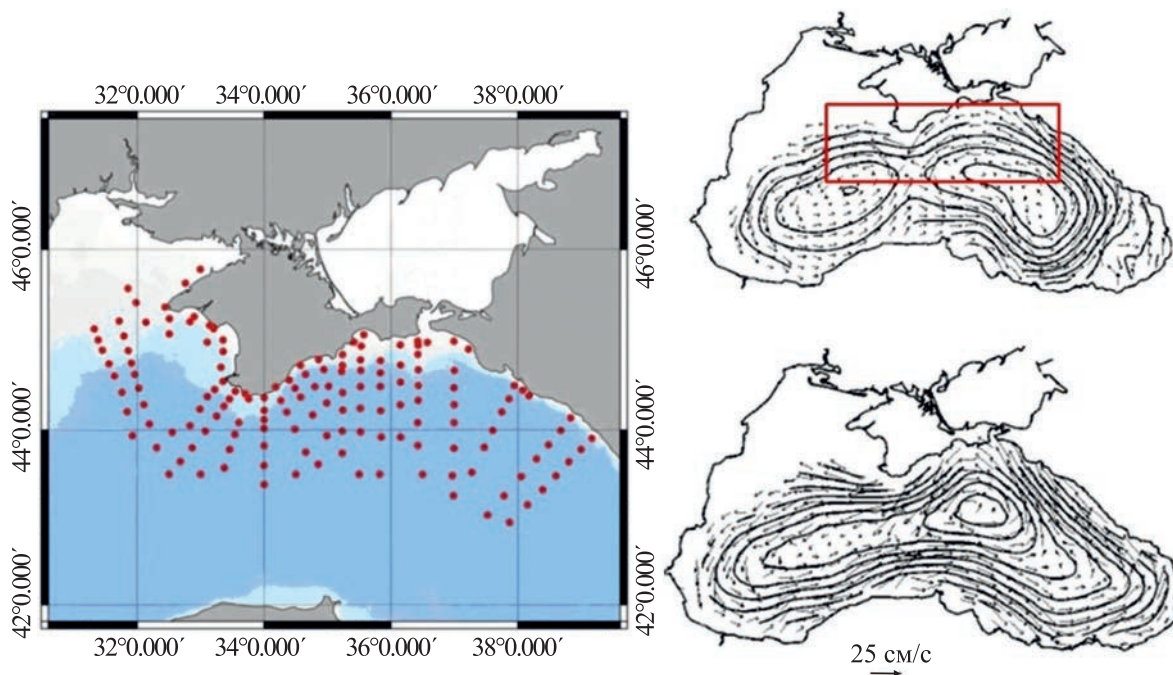


Рис. 1. Стандартная сетка океанографических станций, сформированная экспедициями НИС «Профессор Водяницкий» в 2010–2020 гг. (слева) и среднемесячная динамическая топография поверхности моря (справа сверху – в августе, справа внизу – в феврале) относительно 300 дб по данным TS-реанализа [13]. Прямоугольник на схеме оконтуривает район, для которого были построены пространственно усредненные месячные временные серии исследуемых характеристик пелагической экосистемы.

трация хлорофилла-*a*) были получены на основе дистанционных измерений (с MODIS-Aqua/Terra [17]).

Географические контуры района исследований соответствуют многолетней сетке океанографических станций, сформированной в экспедициях НИС «Профессор Водяницкий» (рис. 1).

Временная серия среднемесячных величин поверхностной температуры (осредненной для прямоугольника с координатами, указанными на рис. 1, была построена по данным дистанционных измерений параметров восходящего излучения спектрометрическим MODIS-Aqua на длинах волн 488, 531 и 547 нм. Восстановленная по этим данным временная серия среднемесячных значений концентрации хлорофилла-*a* (осредненных для прямоугольника с координатами на рис. 1) проходила коррекцию для разделения фракций хлорофилла и растворенного окрашенного вещества [17].

Измерения интенсивности биолюминесценции планктонного сообщества (биолюминесцентного потенциала – БП) выполнены с борта судна в летний период. Биолюминесцентный потенциал характеризует максимальную энергию высвечивания организмов:

$$БП = \int B(t)dt,$$

где $B(t)$ – интенсивность эмиссии света во время биолюминесцентной вспышки (Δt) [15]. Для измерений БП с борта судна использовали погружной приборный комплекс «Сальпа-М» (НПП «Аквастандарт-юг», Севастополь, Россия). Прибор позволяет проводить синхронные измерения биолюминесцентного потенциала механически стимулированной светимости планктонных организмов (в диапазоне 10^{-13} – 10^{-8} Вт·см $^{-2}$ ·л $^{-1}$ с точностью $\pm 10\%$), а также гидростатического давления, температуры, электропроводности, мутности и фотосинтетически активной радиации в режиме вертикального зондирования. Дискретность измерений комплексом при его погружении со скоростью $1.2 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$, составляет 0.25 м. Методика работы с прибором и его характеристики более детально описаны в соответствующих источниках и техническом руководстве производителя ([14, 15]; <http://ecodevice.com.ru/ecodevice-catalogue/complex-salpa-gbf>).

Биомассу зоопланктона вычисляли по результатам камеральной обработки проб в лаборатории. Во всех экспедициях использовали планктонную сеть Джеди с диаметром входного отверстия 38 см, оснащенную ситом с размером ячеек 140 мкм. На станциях в глубоководной части моря (с глубинами более 200 м) тотальные обловы выполняли до границы сероводородной зоны,

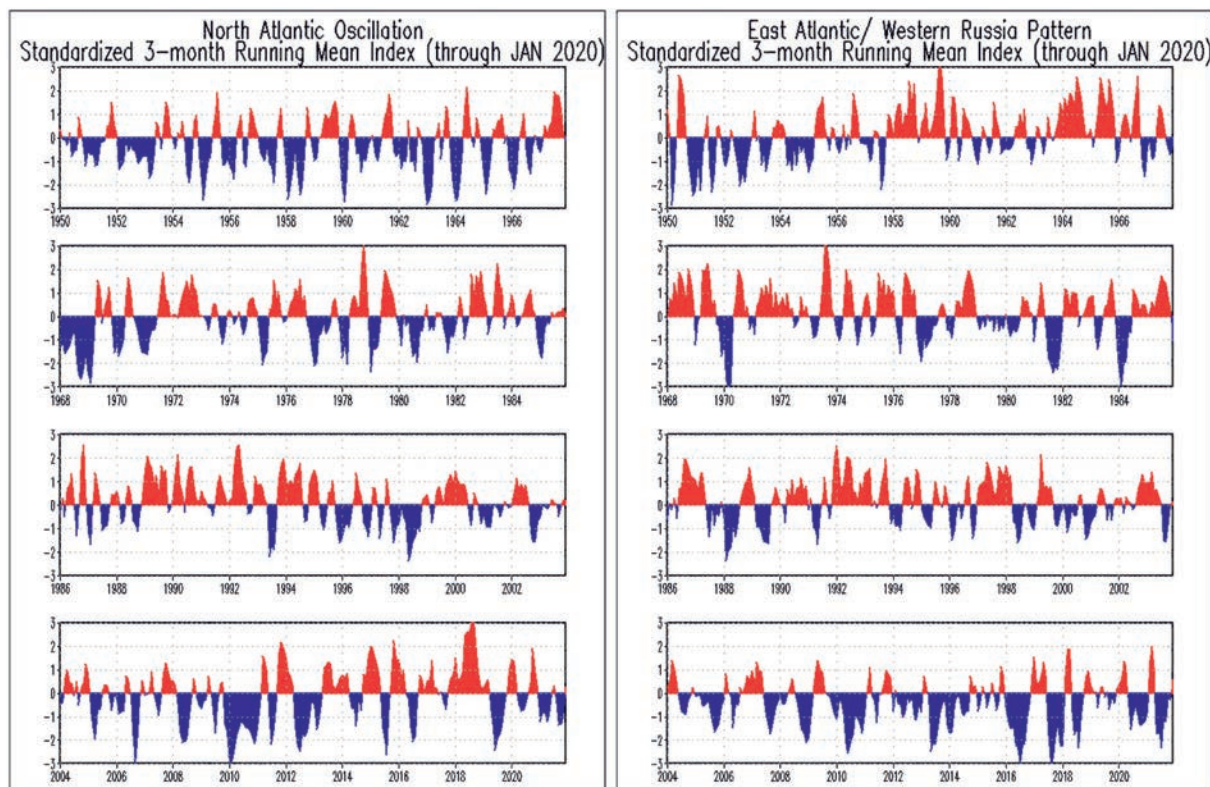


Рис. 2. Межгодовая изменчивость индекса NAO (а), и индекса EAWR (б) (https://www.cpc.ncep.noaa.gov/data/teledoc/eawruss_ts.shtml).

определяемой по изопикне $\delta_t = 16.2$ усл. ед. по данным вертикальных зондирований приборным комплексом SBE 911 Plus (Sea-Bird Electronics Inc., США). Фиксированные 4%-м формалином пробы зоопланктона обрабатывали в лаборатории стандартным счетно-порционным методом [18]. Определяли таксономический состав, возрастные стадии и размеры гидробионтов. Для перехода от размерных характеристик особей к единицам биомассы, использовали известные для черноморских видов размерно-массовые соотношения [19, 20].

В статистической обработке данных использованы программные продукты Statistica v.9 и PAST v.13. В частности, для проверки статистической значимости наличия или отсутствия монотонного многолетнего тренда во временных сериях параметров использовали непараметрический критерий Мэна–Кендалла применяемый при анализе временных серий в гидрофизике и гидрометеорологии [21]. В этом тесте параметр « Z » следует нормальному распределению с $E(Z) = 0$, $V(Z) = 1$. Нулевая гипотеза H_0 (о статистической незначимости тренда) отвергается при абсолютном значении $Z > Z_{1-a/2}$, где a – принятый уровень значимости (в нашем случае $a = 0.05$). Таким образом, при p -значении теста ниже принятого

уровня значимости во временной серии присутствует монотонный тренд.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Межгодовая изменчивость процессов на границе раздела атмосферы и океана имеет как прямое, так и опосредованное влияние на характеристики пелагических экосистем. Так, градиент атмосферного давления над северной Атлантикой и восточной частью России и его межгодовая изменчивость отражаются на пространственно-временных характеристиках поля ветра над акваторией Черного моря. Эти изменения трансформируются в изменения геострофических течений и термогалинной структуры вод и, в конечном итоге, в изменчивость структурных характеристик планктонных сообществ.

Крупномасштабные аномалии атмосферного давления принято характеризовать соответствующими индексами (рис. 2). Для черноморского региона наиболее часто используют два из них [4]; так, индекс Северо-атлантического колебания цитируемый в иностранной литературе как North Atlantic Oscillation (NAO), является доминирующей составляющей климатического масштаба в регионе и модулируется градиентом атмосферно-

го давления над северной Атлантикой. Чередование положительной или отрицательной фаз отражается на состоянии климата (например, холодных сухих или теплых дождливых зимах) над северной Америкой и восточной Европой. Приведенные на рис. 2 временные серии показывают, что периоды затяжных положительных или отрицательных фаз могут длиться около двух десятков лет (как это было с отрицательной фазой в 1950–1978 гг.). В этом плане двухтысячные годы характеризуются преобладанием отрицательной фазы NAO.

Восточно-атлантический/западно-российский индекс (цитируемый в иностранной литературе как East Atlantic/West Russia index EAWR), модулируется градиентом атмосферного давления над восточной частью североамериканского континента и восточной Европой. Как и NAO, этот индекс указывает на стабильное преобладание отрицательной фазы в двухтысячных годах. При этом отрицательная фаза EAWR сопровождается температурами воздуха выше нормы в восточной части России [22].

В аспекте опосредованного влияния на пелагические экосистемы характеристики поля ветра относят к экологически важным, поскольку они определяют интенсивность и направленность геострофических течений. В качестве примера, на рис. 3 приведены зональная и меридиональная составляющие напряжения трения ветра о водную поверхность.

Показаны временные серии построенные с месячным осреднением. Визуально, они свидетельствуют об отсутствии тренда межгодовой изменчивости в 2002–2020 гг. Это же подтверждается статистическим тестом Мэна–Кендалла (зональная составляющая: $S = -1160$, $Z = 1.01$, $p = 0.31$; меридиональная составляющая: $S = -560$, $Z = 0.49$, $p = 0.63$).

Над северной частью Черного моря преобладают ветры северного направления [23]. Межгодовую изменчивость скорости ветра анализировали по данным дистанционных измерений (рис. 4). Статистический анализ временных серий показал отсутствие тренда в многолетней изменчивости скорости ветра в 2002–2020 гг. ($S = -51$, $Z = 0.44$, $p = 0.66$).

Характеристики поля ветра модулируют геострофические течения, среди которых ОЧТ является самым энергоемким биотопом пелагической экосистемы (рис. 1 и 4). Своим пространственным положением течение идентифицируется над глубинами от 400 до 1800 м [24], при средней ширине потока около 75 км и средней скорости около $0.2 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$ у поверхности [13]. ОЧТ значительно меандрирует на масштабах межгодовой изменчивости и завершает свой цикл массопереноса (по периметру моря) за 90–180 суток [24]. Схемы ди-

намической топографии (приведенные в качестве примера для августа и февраля) показывают, что ОЧТ проявляется в поле динамических высот всесезонно.

Одним из важных экологических последствий меандрирования потока ОЧТ является поперечный массоперенос вод от шельфа в мористую часть и в обратном направлении, который перераспределяет биомассу планктона также приобретающую поперечный градиент от высоких величин на шельфе к меньшим – в мористой части. Оценки многолетней изменчивости поперечного массопереноса вод получены в рамках трехмерной циркуляционной модели NEMO v.3.6, имеющей 61 вертикальный слой, с зональным и меридиональным пространственным разрешением 3 км (рис. 5). Величины поперечного массопереноса (как крупномасштабного, так и с учетом вклада мезомасштабных вихрей) показали отсутствие тренда, т.е. его относительную стабильность (в частности, в аспекте многолетней динамики биотопа эпипелагического сообщества; тест Мэна–Кендалла для слоя 0–200 м: $S = 110$, $Z = 1.33$, $p = 0.18$). В районе наших исследований эпизоды регионального поперечного массопереноса очевидны на картах пространственного распределения концентрации хлорофилла-*a* (рис. 4).

Данные о межгодовой изменчивости поверхностной температуры моря представлены на рис. 6. Статистический анализ временных серий показал отсутствие тренда в многолетней изменчивости этого параметра в 2002–2020 гг. ($S = 1328$, $Z = 1.21$, $p = 0.23$).

В многолетних временных сериях данных по осредненной по месяцам биомассе хлорофилла-*a* тенденция межгодовой изменчивости мало заметна на фоне сезонной, которая является основной составляющей ее динамики в бореальных областях (рис. 6). Нижние экстремумы сезонных циклов хлорофилла-*a* на рис. 6 приходятся на летние месяцы (т.е. на периоды хорошо выраженной вертикальной плотностной стратификации эвфотического слоя), а верхние экстремумы соответствуют зимним месяцам, среди которых 84% пиков приходится на декабрь. При устраненной сезонной компоненте данные по межгодовой изменчивости концентрации хлорофилла-*a* также показали отсутствие многолетнего тренда ($S = 112$, $Z = 0.1$, $p = 0.92$).

При анализе межгодовой изменчивости биолюминесцентного потенциала использованы материалы батифотометрических зондирований, полученные за прошедшие 10 лет, преимущественно в летнее время, при этом в отдельные годы экспедиции на НИС «Профессор Водяницкий» не проводились по техническим причинам. Основной вклад в биолюминесценцию эвфотического слоя вносят динофитовые водоросли

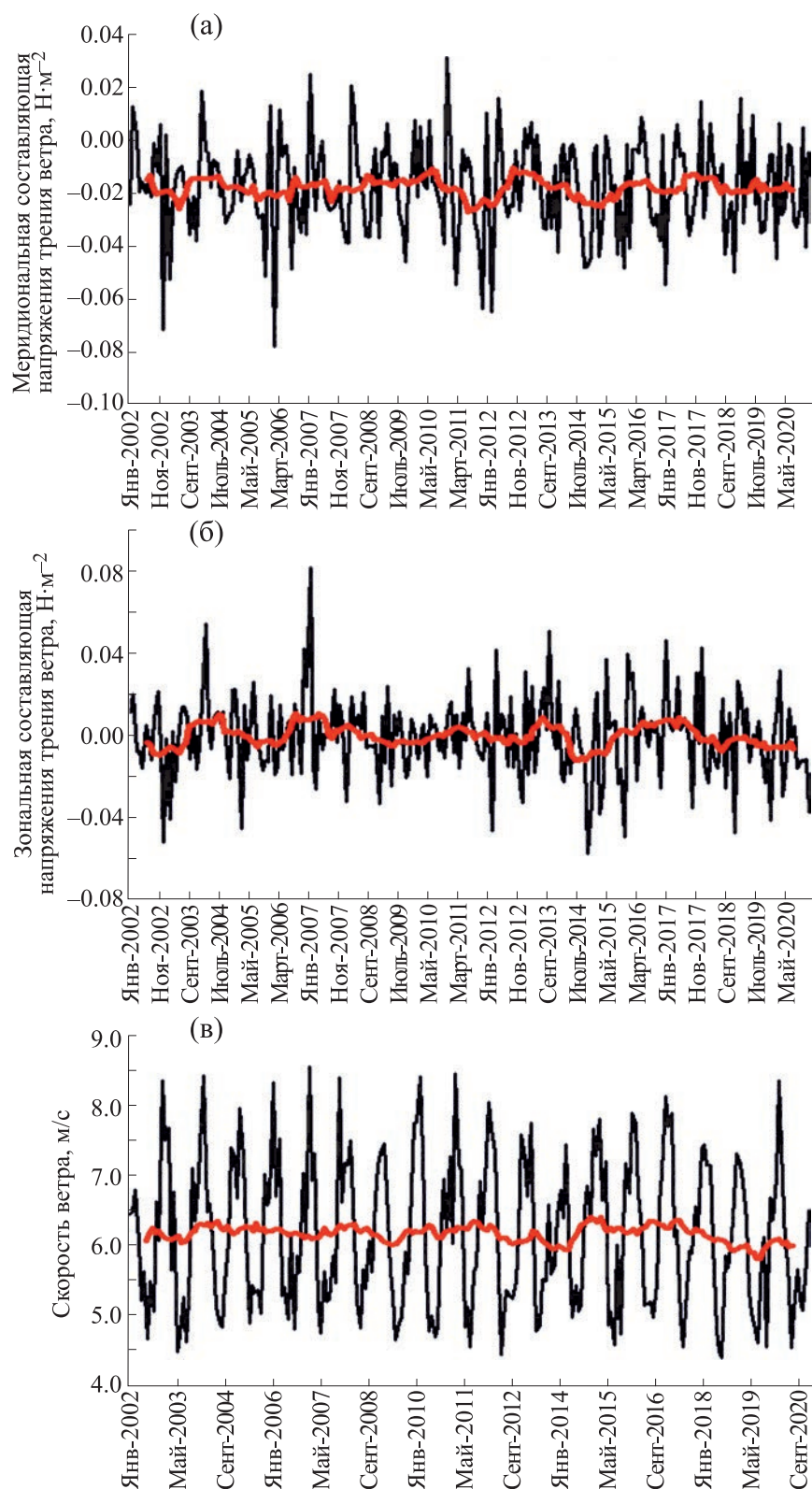


Рис. 3. Многолетняя изменчивость поля ветра в указанном на рис. 1 координатном пространстве: (а) — меридиональная и (б) — зональная составляющие напряжения трения ветра; (в) — скорость ветра. Кривая тренда характеризует тренд, полученный методом скользящей средней с окном в 12 месяцев.

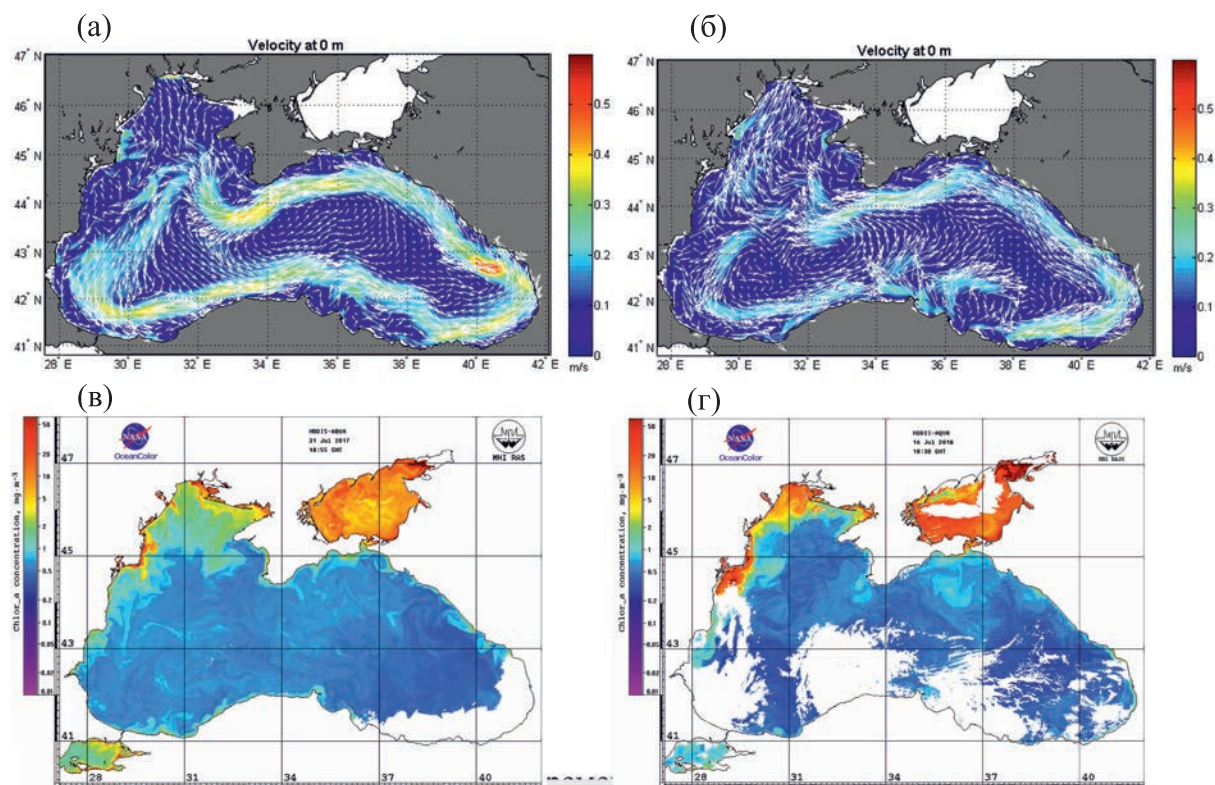


Рис. 4. Некоторые пространственно-временные характеристики биотопа пелагической экосистемы: направление и скорость геострофических течений в поверхностном слое: (а) — в декабре 2020 г., (б) — в июле 2020 г. (<https://deko-sim.ims.mtu.edu.tr/BlackSeaModels/BlackSeaModels.shtml>); эпизоды распределения концентрации хлорофилла-а демонстрирующие поперечный массоперенос между шельфом и мористой частью: (в) — 31.07.2017 г., (г) — 16.07.2020 г.

представленные 42 видами с выявленной светимостью [25], среди которых наиболее интенсивным свечением обладает *Noctiluca scintillans* (Macartney) Kofoed & Swezy. Остальные виды светятся в 4–50 раз слабее, однако в связи с массовым развитием вносят основной вклад в суммарный эффект свечения (т.е. БП). Статистический анализ имеющихся измерений БП показал отсутствие тренда межгодовой изменчивости по среднегодовым данным (рис. 7; $S = -10$, $Z = 0.31$, $p = 0.18$).

Анализ межгодовой изменчивости биомассы зоопланктона основан на измерениях, выполненных в летнее время, поскольку поле биолюминесценции анализировали только по данным летних сборов. В этот период пробы зоопланктона в отдельные годы не отбирали, тем не менее, однотипные измерения биомассы зоопланктона в рейсах НИС «Профессор Водяницкий» охватили период 2010–2021 гг. (рис. 8).

Желательные формы (медузы и гребневики) при обработке проб зоопланктона не учитывались. Основу его биомассы составлял так называемый кормовой зоопланктон (который является основой пищевого рациона мелких пелагических рыб). Статистический анализ показал отсутствие

тренда межгодовой изменчивости биомассы ($S = 10$, $p = 0.18$). В пробах, собранных в открытой части моря (за пределами 200-метровых глубин), две таксономические группы — копеподы и сагитты — составляли около 90% общей биомассы кормового зоопланктона.

Определенный интерес представляет собой многолетняя изменчивость структурно-функциональных соотношений, среди которых, одним из важных является отношение первичной продукции к биомассе кормового зоопланктона (Пп/Бз). Его интерпретируют как скорость оборота первичной продукции через зоопланктон [26, 27]. Оценке этого соотношения предшествовал расчет величин первичной продукции, который показал наличие двух периодов в ее многолетней динамике (рис. 8). Для первого периода (2002–2013 гг.), характерен монотонный ниспадающий тренд ($S = 39$, $Z = 2.96$, $p = 0.003$), для второго — стабилизация месячных колебаний первичной продукции и исчезновение ниспадающего тренда ($S = 11$, $p = 0.09$). Стабилизация первичной продукции приходится на 2014–2020-е годы. Большей частью этот период стабильности первичной продукции охватывает то время, в течение которого биомасса зоопланкто-

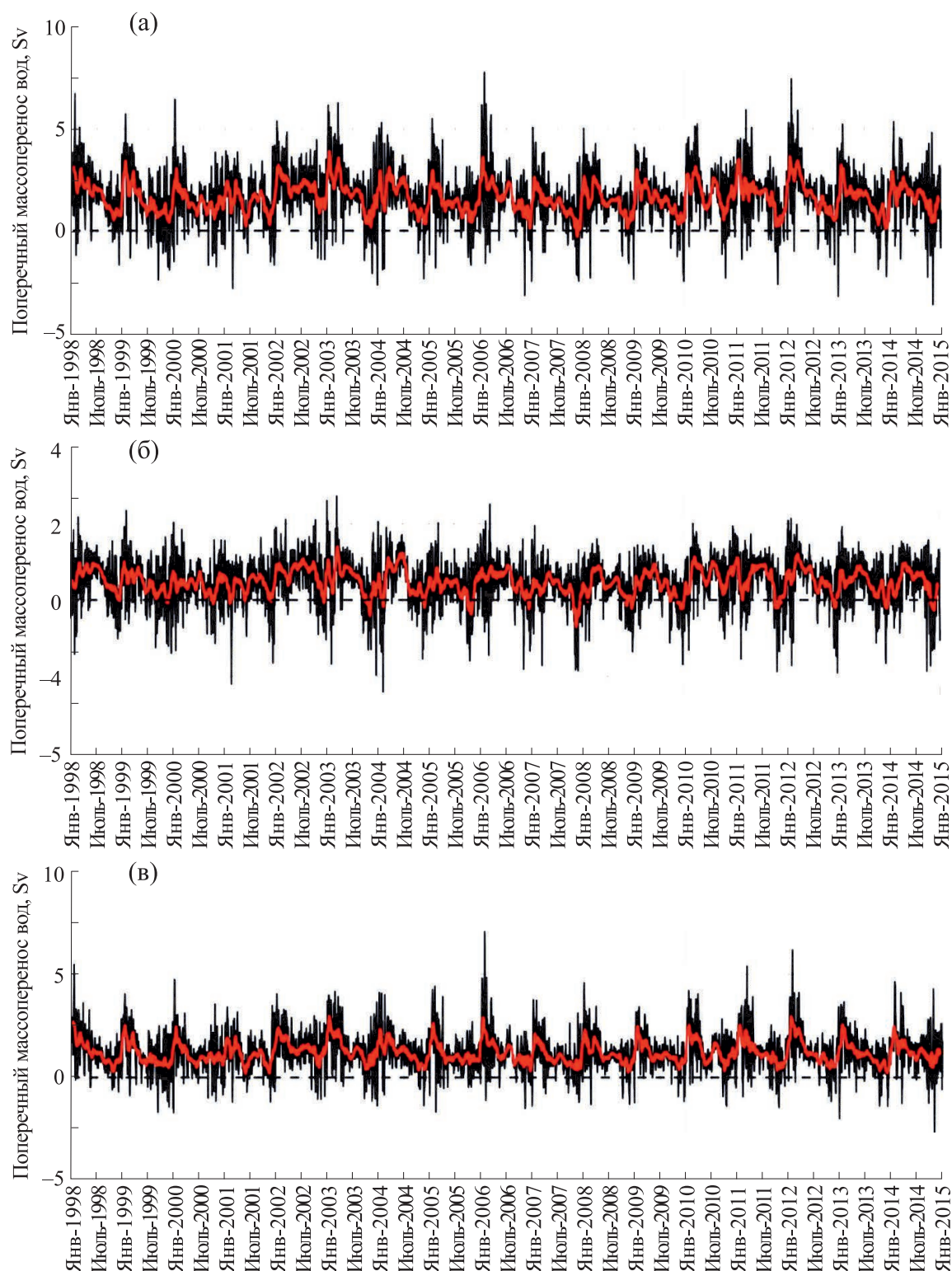


Рис. 5. Поперечный массоперенос вод (в свердрупах — Sv) в масштабе Черного моря. Положительные значения соответствуют массопереносу в направлении от шельфа в мористую часть, в слоях: (а) — 0–200 м, (б) — 0–50 м, (в) — 50–200 м. Серая кривая характеризует тренд, полученный методом скользящей средней с окном в 30 суток [12].

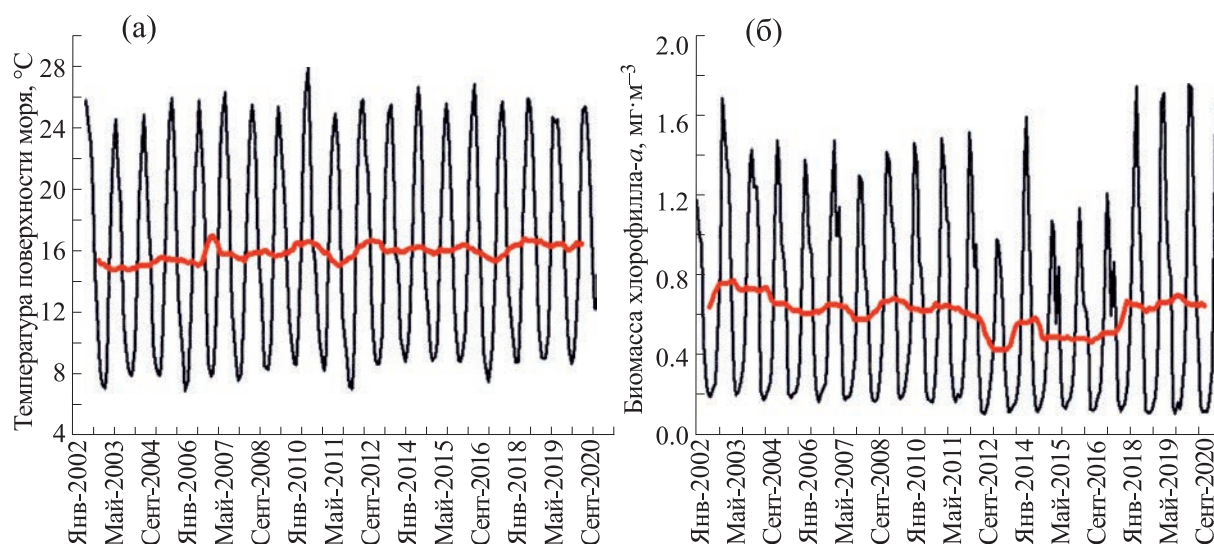


Рис. 6. Многолетняя изменчивость температуры поверхности моря (в °C) и биомассы хлорофилла-а (в $\text{мг}\cdot\text{м}^{-3}$) в указанном на рис. 1 координатном пространстве. Кривая тренда получена методом скользящей средней с окном в 12 месяцев.

на также достаточно постоянна (рис. 8). Расчет соотношения Пп/Бз (в единицах углерода) показал, что за прошедшее десятилетие (2010–2020 гг.), величина соотношения существенно не изменилась ($S = -6$, $p = 0.27$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты статистического анализа данных, представленных на рис. 3–8, показали отсутствие многолетних трендов, что можно считать характерным свойством состояния пелагической эко-

системы в начале XXI века в указанном регионе. С одной стороны, такая «фаза стабильности» может быть фрагментом нерегулярного характера динамических процессов в Черном море на масштабах межгодовой и декадной изменчивости, который был отмечен рядом исследователей [28–30]. С другой стороны, стабильность поперечного массопереноса вод (рис. 5) можно рассматривать как важную составляющую стабилизации многолетней изменчивости биомассы в эпипелагической экосистеме (рис. 7 и 9) в районах взаимодействия открытых и шельфовых вод. В крупномас-

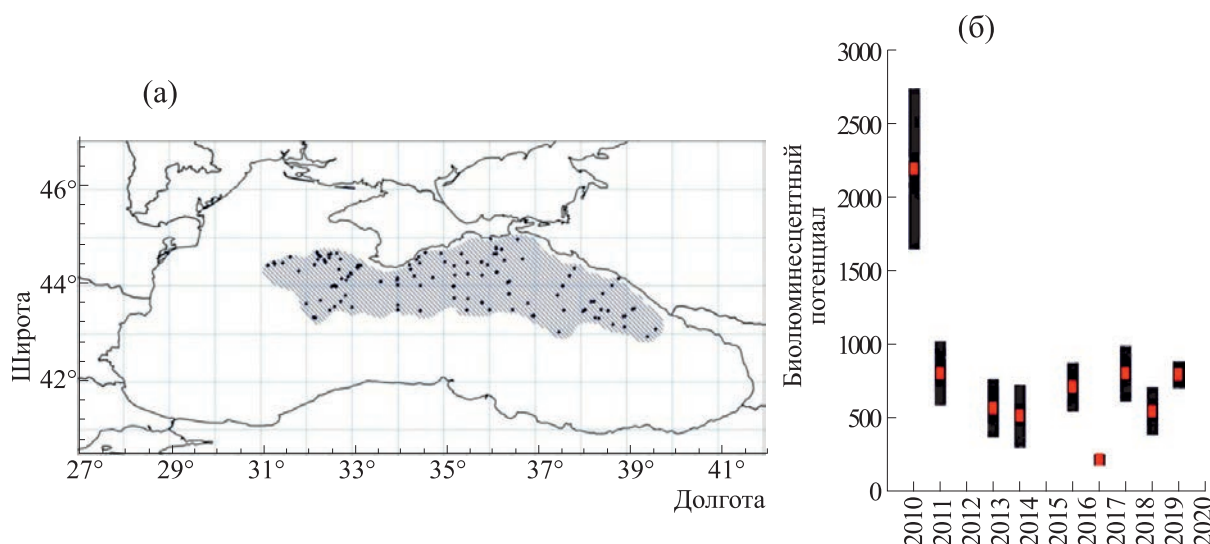


Рис. 7. Карта станций с батифотометрическими зондированиями (а), и осредненная для региона многолетняя изменчивость биолуминесцентного потенциала в слое 0–50 м (б). На рис. (б) серыми квадратами указаны средние величины, а вертикальными столбиками – 95%-е доверительные интервалы.

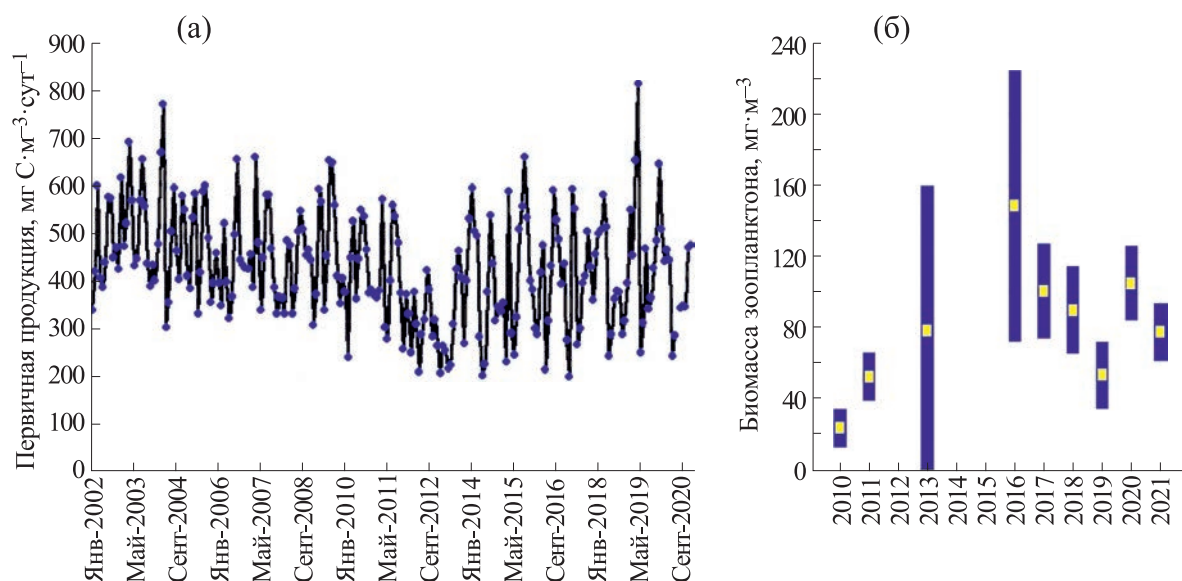


Рис. 8. Многолетняя изменчивость первичной продукции в эвфотическом слое в $\text{мг C} \cdot \text{м}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$ (а) и биомассы зоопланктона в $\text{мг} \cdot \text{м}^{-3}$ (б) в открытых водах Черного моря в указанном на рис. 1 координатном пространстве. На рис. (б) серыми квадратами указаны средние величины, а вертикальными столбиками — 95%-е доверительные интервалы.

штабных круговоротах (западном и восточном), феномен поперечного массопереноса утрачивает свое влияние. Отсюда следует, что межгодовые тренды могут регионально различаться.

Для девяностых годов XX века (предыдущей фазы состояния) были характерны значительные изменения пелагической экосистемы северной части Черного моря; в частности, это касается видового состава, трофического пресса видов-вселенцев и антропогенной эвтрофикации [31, 32].

Как отмечено выше, при анализе многолетних трендов по отдельным регионам выявляется феномен их пространственной неоднородности, т.е. эти тренды могут качественно различаться — быть отрицательными, положительными либо «нулевыми». Наиболее масштабно это было показано на примере концентрации хлорофилла-*a* в мировом океане (https://marine.copernicus.eu/sites/default/files/wp-content/uploads/2020/02/GLOBAL_OMI_HEALTH_OceanColour_trend-hq.png). Выявленная нами фаза стабильности экосистемы также региональна, по характеру трендов. Проблема региональности климатической изменчивости гидрофизических характеристик Черного моря обсуждалась в литературе (см. [5] и др. работы).

В масштабах всего черноморского бассейна, наблюдается положительный тренд аномалий температуры поверхности (https://marine.copernicus.eu/access-data/ocean-monitoring-indicators/black-sea-surface-temperature-time-series-and-trend) и отрицательный тренд концентрации хлорофилла-*a* (https://marine.copernicus.eu/access-data/ocean-monitoring-indicators/black-sea-chlorophyll-

time-series-and-trend-observations). При этом в более обширной, чем исследованная нами акватория, глубоководной части моря статистически значимый тренд концентрации хлорофилла-*a* не выявлен за 18-летний период спутникового мониторинга (1998–2015 гг.) [11].

В структуре пелагической экосистемы Черного моря средний трофический уровень (зоопланктон) находится под воздействием мелких пелагических рыб среди которых хамса и шпрот доминируют по биомассе, и уловы которых могли бы служить (приблизительно) индикаторами этой наличной биомассы. Однако колебания последней обусловлены не столько природными факторами, сколько мощным антропогенным воздействием — хищническим промыслом [33] такого ресурса, как хамса, которая составляет около 75% всего рыбного промысла в исследованном регионе. Отсюда можно предположить, что интенсивное изъятие снижает трофический пресс мелких пелагических рыб на планктонное сообщество, и это наряду с другими факторами способствует формированию стабилизирующего эффекта в многолетней динамике биомассы зоопланктона (рис. 9).

В целом же современная экологическая ситуация, наблюдаемая в масштабах глубоководной части Черного моря, интересна в аспекте оценки устойчивости пелагической экосистемы: если многолетняя температура в поверхностных слоях растет, наряду с ростом теплозапаса во всем эвфотическом слое и солёности [34], плотностная (термогалинная) стратификация эвфотического слоя усиливается, концентрация кислорода в

аэробных слоях [35] и первичная продукция в поверхностном слое [11] снижаются, а биомасса продуцентов (т.е. фитопланктона) и консументов первого порядка (мезозоопланктона) достаточно постоянны (рис. 8), то где во времени находится тот порог, после которого наступят заметные изменения в структуре пелагического планктонно-го сообщества?

Нами показано, что в первых декадах XXI века в северной части моря эта структура находится в фазе относительной стабильности. Интересно, что при этом, биотоп планктонного сообщества (ОЧТ) подвержен значительным (30-процентным) межгодовым пульсациям скорости геострофического течения (т.е. скорости зонального массопереноса) на фоне возрастания этой скорости ($0.1 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$ за десятилетие), в 1993–2019 гг. [36].

ВЫВОДЫ

За прошедшие два десятилетия XXI века (2000–2020 гг.) после экологических катаклизмов 90-х годов прошлого столетия, связанных с эвтрофикацией и трофическим прессом планктонных вселенцев, пелагическая экосистема открытых вод северной части Черного моря вступила в фазу относительной стабильности своей структуры. Для этой фазы характерно отсутствие трендов межгодовой изменчивости по ряду ключевых структурных параметров ее идентифицирующих: биомассе фитопланктона, (оцененной по концентрации хлорофилла-*a*) и биомассе зоопланктона.

Поскольку в сложных системах структура предопределяет функцию, относительная стабильность биомассы предопределила отсутствие многолетних трендов в процессах, характеризующих функциональные свойства экосистемы, в частности, в первичной продукции, интенсивности биолюминесценции (биолюминесцентного потенциала планктонного сообщества), а также стабильность ключевых структурно-функциональных соотношений (таких как отношение первичной продукции к биомассе кормового зоопланктона).

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть исследований была выполнена в Центре коллективного пользования НИС «Проф. Водяницкий» Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН».

Авторы благодарны Anil Akpınar (Middle East Technical University, Turkey), выполнившему расчеты и предоставившему данные по массопереносу вод.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00007) и в рамках государственных заданий ФИЦ ИнБЮМ № 121040600178-6 «Структурно-функциональная организация, продуктивность и устойчивость морских пелагических экосистем» и № 121030100028-0 «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана», № 121041400077-1 «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом», а также ФИЦ МГИ FNNN-2021-0003 «Развитие методов оперативной океанологии на основе междисциплинарных исследований процессов формирования и эволюции морской среды и математического моделирования с привлечением данных дистанционных и контактных измерений».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Основы биологической продуктивности Черного моря (Наукова думка, Киев, 1979).
2. EMBLAS. *National Pilot Monitoring and Joint Open Sea Surveys in Georgia, Russian Federation and Ukraine, 2016. Final Scientific Report*, Ed. by Slobodnik et al. (EU, UNDP, 2017).
3. *State of the Environment of the Black Sea (2009-2014/5). Publications of the Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution BSC* (Istanbul, Turkey 2019).
4. T. Oguz, J. W. Dippner, and Z. Kaymaz, J. Marine Systems, **60**, 3–4 (2006).
5. Ю. В. Артамонов, Е. А. Скрипалева и А. В. Федирко, Метеорология и гидрология, **2** (2017).
6. А. А. Кубряков и С. В. Станичный, Океанология, **55**, 1 (2015).
7. A. V. Kovalev and S. A. Piontkovski, J. Plankton Res., **20**, 7 (1988).
8. A. Kovalev, U. Niermann, V. Melnikov, et al., in *Ecosystem Modeling as a Management Tool for the Black Sea*, Ed. by L. I. Ivanov and T. Oguz (Kluwer Acad. Publ., 1998), vol. 1.
9. O. A. Yunev, V. I. Vedernikov, O. Basturk, et al., Marine Ecol. Progr. Ser., **230**, 11 (2002).

10. O. A. Yunev, J. Carstensen, S. Moncheva, et al., *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **74** (2007).
11. И. В. Ковалева, З. З. Финенко и В. В. Суслин, *Фундаментальная и прикладная гидрофизика*, **15**, 4 (2022).
12. A. Akpınar, E. Sadighrad, B. A. Fach, et al., *Remote Sensing*, **14** (2022).
13. В. Н. Белокопытов, Дис. ... д-ра геогр. наук (Морск. гидрофиз. инст., Севастополь, 2017).
14. Ю. Н. Токарев, *Основы биофизической экологии гидробионтов* («Экоси-Гидрофизика», Севастополь, 2003).
15. В. Н. Токарев, П. В. Евстигнеев и О. В. Машукова, *Планктонные биолуминесцентные мирового океана: видовое разнообразие, характеристики светового излучения в норме и при антропогенном воздействии* (Симферополь, 2016).
16. И. В. Ковалёва и В. В. Суслин, *Морской гидрофиз. журн.*, **38**, 4 (2022).
17. V. V. Suslin, and T. Ya. Churilova, *Int. J. Remote Sensing*, **37**, 18 (2016).
18. *Методика определения качественного и количественного состава зоопланктона* (Севастополь, СТП ИМБИ 020-2016, 2016).
19. Т. С. Петипа, *Труды Севастопольской биологич. станции*, **9** (1957).
20. Л. Л. Численко *Номограммы для определения веса водных организмов по размерам и форме тела (морской мезобентос и планктон)* (Наука, Ленинградское отделение, Л., 1968).
21. F. Wang, W. Shao, H. Yu, et al., *Front. Earth Sci.*, **8**, 14 (2020). DOI: 10.3389/feart.2020
22. A. G. Barnston and R. E. Livezey, *Monthly Weather Rev.*, **115** (1987).
23. В. А. Иванов и В. Н. Белокопытов, *Океанография Черного моря* (Морской гидрофизический институт, Севастополь, 2011).
24. P.-M. Poulain, R. Barbanti, S. Motyzhev, et al., *Deep-Sea Research I*, **52** (2005).
25. Э. П. Битюков, П. В. Евстигнеев и Ю. Н. Токарев, *Гидробиологич. журн.*, **29**, 4 (1993).
26. М. Е. Виноградов и Э. Л. Шушкина, *Функционирование планктонных сообществ эпипелагиали океана* (Наука, М., 1987).
27. Г. В. Зуев и С. А. Пионтковский, в сб. *Продуктивность экваториальной Атлантики*, под ред. Г. В. Зуева (Наукова думка, Киев, 1990).
28. A. I. Ginzburg, A. G. Kostianoy, and N. A. Sheremet, *J. Marine Systems*, **52** (2004).
29. T. Oguz, T. Cokacar, P. Malanotte-Rizzoli, et al., *Global Biogeochem. Cycles*, **17**, 3 (2003).
30. A. G. Zatsepin, N. N. Golenko, A. O. Korzh, et al., *Oceanology*, **47** (2007).
31. О. А. Юнев, С. К. Коновалов и В. Великова, *Антропогенная эвтрофикация в пелагической зоне Черного моря: долговременные тренды, механизмы, последствия* (ГЕОС, М., 2019).
32. T. Shiganova, E. Musaeva, E. Arashkevich, et al., *State of environmental Report 2001-2006/7. Corpus ID: 202591576, Chapter 6. The state of zooplankton. Environmental Science* (2012).
33. В. С. Латун, в сб.: *Устойчивость и эволюция океанологических характеристик экосистемы Черного моря*, под ред. В. Н. Еремеева и С. К. Коновалова (Морской гидрофизич. институт, Севастополь, 2012).
34. L. Lima, S. A. Ciliberti, A. Aydogdu, et al., *Front. Marine Sci.*, **8**, 710973 (2021).
35. А. В. Масевич и С. К. Коновалов, *Морской гидрофизич. журн.*, **38**, 1 (2022).
36. E. Peneva., E. Stanev, S. Ciliberti, et al., *J. Operational Oceanography*, **14** (sup. 1) (2021).

The Dynamics of Biophysical Characteristics of the Northern Black Sea Pelagic Ecosystem in the First Decades of the XXI Century

S.A. Piontkovski*, I.M. Serikova**, I.M. Minsky**, Yu.A. Zagorodnyaya**,
V.V. Suslin***, and I.V. Kovaleva**

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

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

***Marine Hydrophysical Institute, Russian Academy of Sciences, 2 Kapitanskaya ul. 2, Sevastopol, 299002 Russia

Wind speed, sea surface temperature chlorophyll-a concentration (satellite data such MODIS-Aqua/Terra), bioluminescence intensity and zooplankton biomass (data from the research vessel), the value of fish traded, the indices of lower-than-normal atmospheric pressure and water mass transfer (model calculations) are the factors used to estimate a modern state of the pelagic ecosystem and its functional characteristics. It has been shown that, in the last two decades (2000–2020), after natural cataclysms associated with eutrophication and trophic stress of invasive plankton species in the 1990s, the ecosystem of the open areas in the northern portion of the Black sea has reached a state of relative stability in its structure and functioning. This state is characterized by the absence of changes in the interannual variability of the factors particular for it. Concepts are discussed which concern regional differences in physical factors and biological interactions over many years.

Keywords: Black Sea, chlorophyll-a, zooplankton, bioluminescence, plankton

МЕТОД ДЕКАРТОВА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОГРАММИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ ГЛАЗА МУШКИ ДРОЗОФИЛЫ

© 2023 г. Н.А. Данилов*, К.Н. Козлов*, С.Ю. Суркова*^{*,#}, М.Г. Самсонова*

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

#E-mail: surkova_syu@spbstu.ru

Поступила в редакцию 16.12.2022 г.

После доработки 16.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Методы автоматического выделения признаков привлекают все большее внимание при решении современных задач обработки изображений. Конфокальные изображения однослойного эпителия развивающегося глаза плодовой мушки дрозофилы представляют собой удобную модельную систему для разработки методов выделения сложных признаков. Целью данной работы было применение метода декартова генетического программирования для выявления границ омматидиев – светочувствительных единиц будущего глаза. Использование декартова генетического программирования для анализа картин экспрессии маркера Fasciclin III показало хорошие результаты. Это дает интересные перспективы для дальнейшего применения этой технологии с целью автоматического анализа изображений, полученных с помощью конфокальной микроскопии.

Ключевые слова: обработка изображений, метод декартова генетического программирования, глазной диск, дрозофила

DOI: 10.31857/S0006302923030195, EDN: FTCIPG

Обработка изображений эпителиальных слоев имеет ключевое значение для научных исследований и неинвазивных методов диагностики в медицине [1]. Важную роль играет точность выявления границ клеток эпителия для количественного определения уровней экспрессии генов в каждой клетке.

Удобной модельной системой для разработки методов сегментации изображений эпителиальных тканей является однослойный эпителий развивающегося глаза плодовой мушки дрозофилы (глазного диска) [2]. Эта структура формируется у личинок третьего возраста и включает две зоны. Зона пролиферации состоит из недифференцированных клеток, а зона дифференцировки представляет собой сетчатую структуру омматидиев – презумптивных светочувствительных единиц будущего глаза [3, 4]. Дифференцировка осуществ-

ляется путем прохождения морфогенетической борозды в постериорно-антериорном направлении глазного диска [5–7]. Особенности данной системы является гетерогенность форм и размеров клеток, а также их взаимного расположения. Помимо этого, однослойный эпителий глазного диска образует выпуклость, что приводит к загибам и деформациям клеточного слоя на препаратах. При получении трехмерного набора оптических срезов на конфокальном микроскопе это проявляется в искажении реальной клеточной структуры. Такие особенности этой ткани позволяют разрабатывать методы, корректирующие дефекты биологических образцов и применимые для сегментации изображений сложных объектов.

Целью данной работы было применение метода декартова генетического программирования (ДГП) для обработки изображений с целью выявления границ омматидиев в зоне дифференци-

Сокращение: ДГП – декартово генетическое программирование.

ровки глазного диска. Так как каждый омматидий состоит из клеток-предшественников фоторецепторов, при флуоресцентном окрашивании границы индивидуальных клеток мешают выявлению границ всего омматидия.

Выделение признаков является важной темой в машинном обучении и становится ключевой задачей при работе с необработанными многомерными данными, которые не имеют четко определенных признаков [8–10]. Ручная идентификация в таких случаях часто невозможна, поскольку требует больших объемов ручного труда, времени, а также знаний в предметной области [11, 12]. Современные методы автоматического выделения признаков привлекают все большее внимание при решении современных задач обработки изображений. Большинство таких методов реализовано в виде многоуровневых нейронных сетей. Однако рассматриваемый в данной работе метод ДГП имеет два важных преимущества: 1) часто не требует больших обучающих наборов для изучения конкурентных моделей; 2) как правило, устойчив к зашумленным данным. Принцип метода базируется на предположении о том, что наиболее значимые высокоуровневые признаки могут быть закодированы композицией простейших функций. Метод ДГП был впервые предложен в 1998 г. для создания электрических схем [13]. В последнее время он получил широкое распространение для обработки изображений. В литературе описано всего несколько примеров применения ДГП для выделения признаков из двумерных изображений, где высокоуровневые признаки выделяют напрямую из низкоуровневых [10, 14–16]. В данной работе метод ДГП впервые реализован для обработки изображений развивающегося глаза, что дает интересные перспективы для дальнейшего применения этой технологии для автоматического анализа конфокальных изображений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Исходные данные представляют собой трехмерные наборы изображений, полученных с помощью конфокального микроскопа [2] и имеющих размер 2048×2048 пикселей.

Флуоресцентное окрашивание белка Fasciclin III, являющегося маркером латеральных клеточных стенок [17], проводили у личинок *Drosophila melanogaster* третьего возраста методом непрямой

иммунофлуоресценции с помощью первичных антител anti-Fasciclin III (Developmental Studies Hybridoma Bank, NIH, США) и вторичных антител Alexa Fluor 405 (Invitrogen, США) [2].

ПОСТРОЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ МОДЕЛИ

Большинство данных высокой размерности, встречающихся в природе, демонстрирует корреляцию между признаками низкого уровня, выражаемыми дополнительными измерениями. Положение пикселей относительно друг друга в матрице изображения чрезвычайно важно для выражения соответствующих высокоуровневых характеристик.

В работе [10] был предложен метод для извлечения признаков из двумерных изображений на основе значений и взаимном расположении пикселей. С помощью ДГП создается модель в виде аналитической функции f такой, что для пикселя p с координатами $(c1, c2)$ в изображении $f(c1, c2) = p$. Модель представляется в виде дерева:

- с нетерминальными символами – алгебраические операции (+, −, ×, безопасное деление, Min и Max) и тригонометрические операции (sin и cos);

- с терминальными символами – переменные (координаты $c1, c2$) и десятичные константы в интервале $(-1; 1)$.

Свойство непрерывности аналитической функции устанавливает отношения между соседними низкоуровневыми функциями (пикселями). Однако поскольку безопасное деление, Min и Max вносят разрыв, модели также могут кодировать пространственные отношения, которые трудно смоделировать в одной непрерывной функции.

ПАРАМЕТРИЗАЦИЯ МОДЕЛИ

Ключевой проблемой использования пространственной информации для выделения признаков является их изменчивость в изображениях, которые представляют одну и ту же концепцию. Например, при классификации рукописных цифр «1» (с засечками) или «|» (ровный штрих без засечек, аналог латинской строчной буквы l [эл] или прописной I [ай]) являются двумя популярными стилями написания одного и того же числа. У этих стилей разные, хотя и похожие пространственные отношения.

Одна и та же функция не может выводить разные значения пикселей для одной и той же координаты и, следовательно, не может кодировать оба стиля. Для решения этой задачи функция

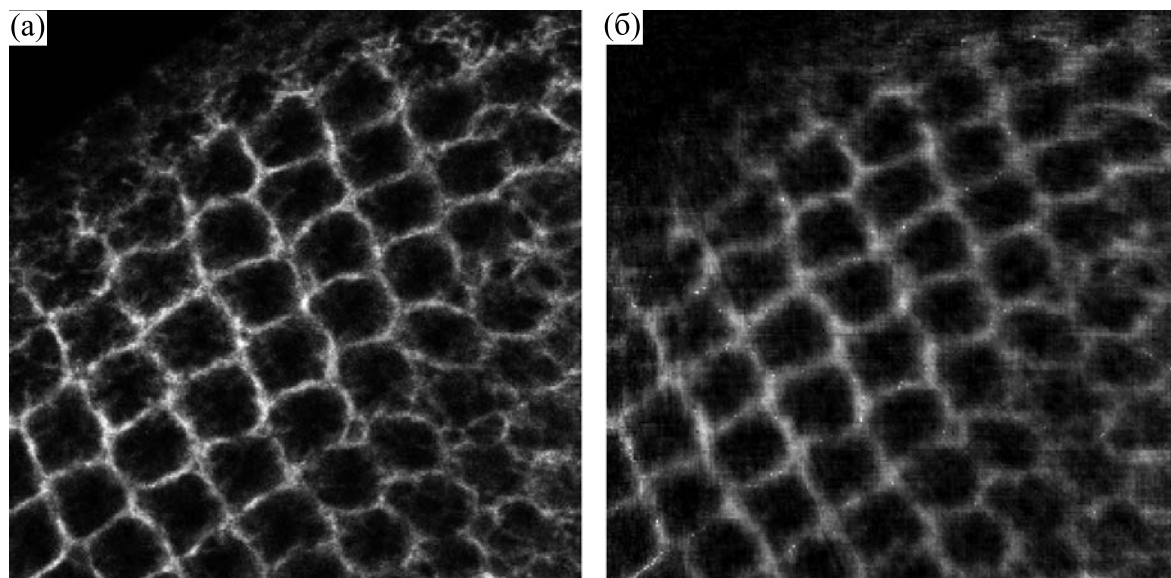


Рис. 1. (а) — Исходное конфокальное изображение участка области дифференцировки глазного диска дрозофилы, окрашенное маркером на Fasciclin III. Светочувствительные единицы (омматидии) представляют собой сетчатую структуру. Частичное окрашивание клеток-предшественников фоторецепторов внутри каждого омматидия создает сложности при выявлении границ омматидиев. (б) — Изображение, восстановленное в течение 6000 внешних итераций.

модели f представляется в виде линейной комбинации нескольких созданных ДГП-моделей, называемых частичными, каждая из которых фокусируется на определенном высокоуровневом признаке в изображении. Параметры линейной комбинации подбираются для наилучшего описания конкретного изображения.

Критерием приспособленности модели является среднеквадратическая ошибка, т. е. средний квадрат разности между предсказанным и фактическим значением пикселя. Таким образом, на начальном этапе вычислений метод фокусируется на тех элементах изображения, которые приводят к большим ошибкам. Каждая следующая частичная модель описывает разность исходного изображения и комбинации предыдущих моделей, таким образом, следующая итерация будет сосредоточена на характеристиках изображений, которые на предыдущей итерации не были хорошо аппроксимированы. Чем ниже среднеквадратическая ошибка, тем лучше приспособлена модель.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГРАНИЦ ОММАТИДИЕВ

Разработанный подход был применен к имеющимся изображениям паттернов экспрессии Fasciclin III в развивающемся глазе дрозофилы. В результате построения линейной комбинации 6000 частичных моделей были получены сглаженные

изображения с незначительными артефактами на полностью черном фоне (рис. 1). При этом исключение из линейной комбинации части моделей дало возможность более четко выделить черты, необходимые для дальнейшей обработки.

Наиболее интересными оказались результаты при исключении первых 500 и 1000 частичных моделей (рис. 2). Благодаря использованию аналитической функции модели для определения границ был применен метод вычисления модуля градиента с помощью конечных разностей с шагом 10^{-3} , подобранным опытным путем. Границы, выявленные с помощью вычисления модуля градиента, представлены на рис. 3.

Далее к восстановленному изображению и изображению с границами применялось выравнивание гистограммы, несколько морфологических операций, сглаживание медианным фильтром и преобразование водораздела как ключевой метод сегментации. Перебирая различные комбинации восстановленного изображения и его границ (вычисленным по одному и тому же изображению), можно добиться лучшего качества выявления границ. На изображениях на рис. 4 показаны различные комбинации восстановленного изображения и изображения с границами. Наилучшее качество выделения границ омматидиев демонстрирует изображение, представленное на рис. 4г, восстановленное по 500–6000 моделям с

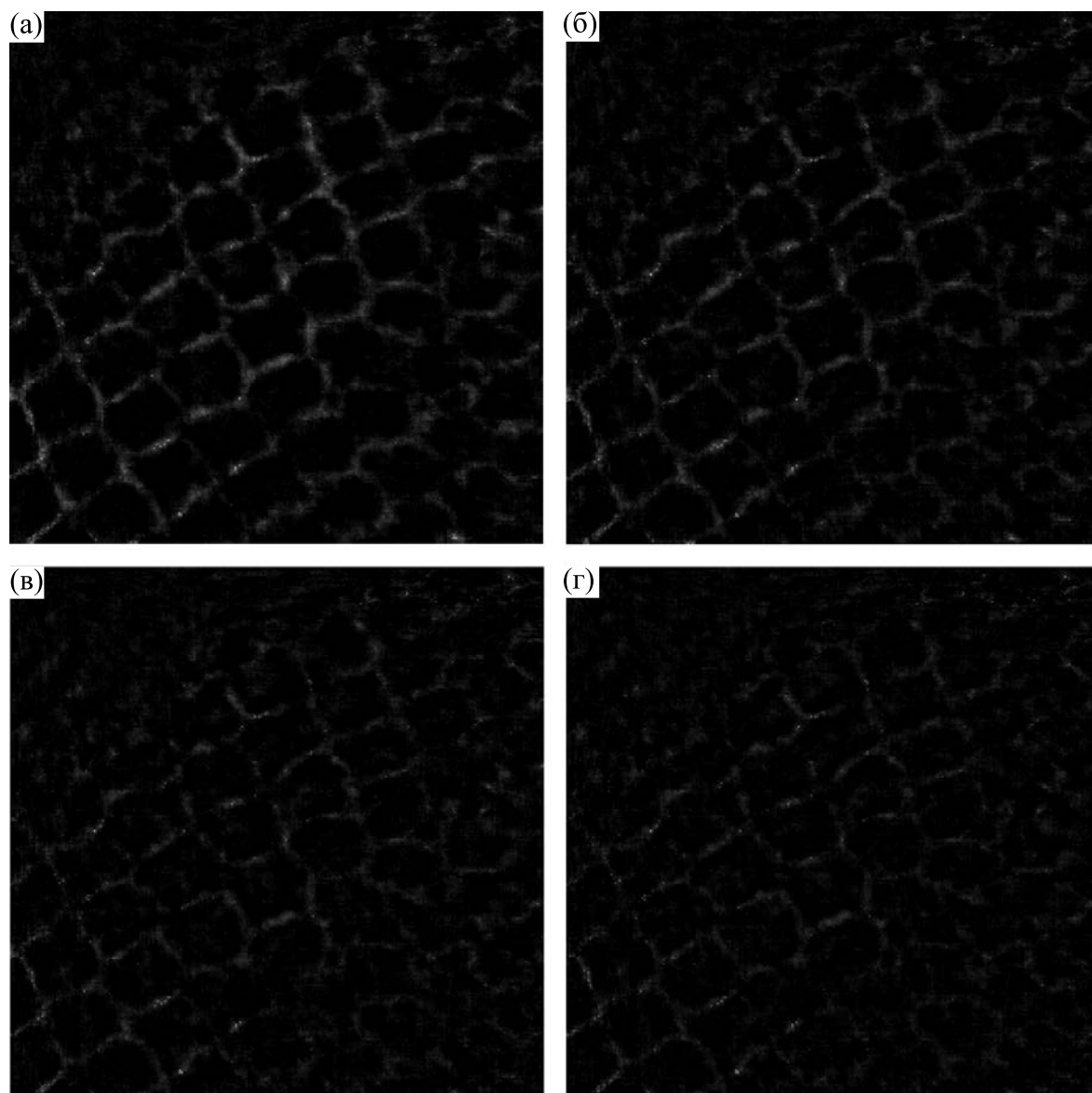


Рис. 2. Изображения, получаемые в результате исключения ранних частичных моделей: (а) — при исключении первых 500 моделей, (б) — при исключении первых 1000 моделей, (в) — при исключении первых 1500 моделей, (г) — при исключении первых 2000 моделей.

модулем градиента по 500–6000 моделям. Черные области по контуру изображения образуются из-за частичного обрезания объектов на краях, чего не происходит при анализе изображений всей области дифференцировки глазного диска.

ПРОГРАММНАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ МЕТОДА

Метод был реализован на языке программирования Си с использованием свободно доступной программы алгоритма ДГП с открытым исход-

ным кодом (<https://www.cgplibrary.co.uk/files2/About-txt.html>). Были реализованы методы чтения и предобработки исходных данных, возможность распараллеливания циклов, а также методы, реализующие непосредственно восстановление изображений (<https://github.com/Dannikk/Genetic-programming-feature-learning>). Для поиска границ была использована ранее разработанная авторами программа ProStack [18] (<https://sourceforge.net/projects/prostack/>).

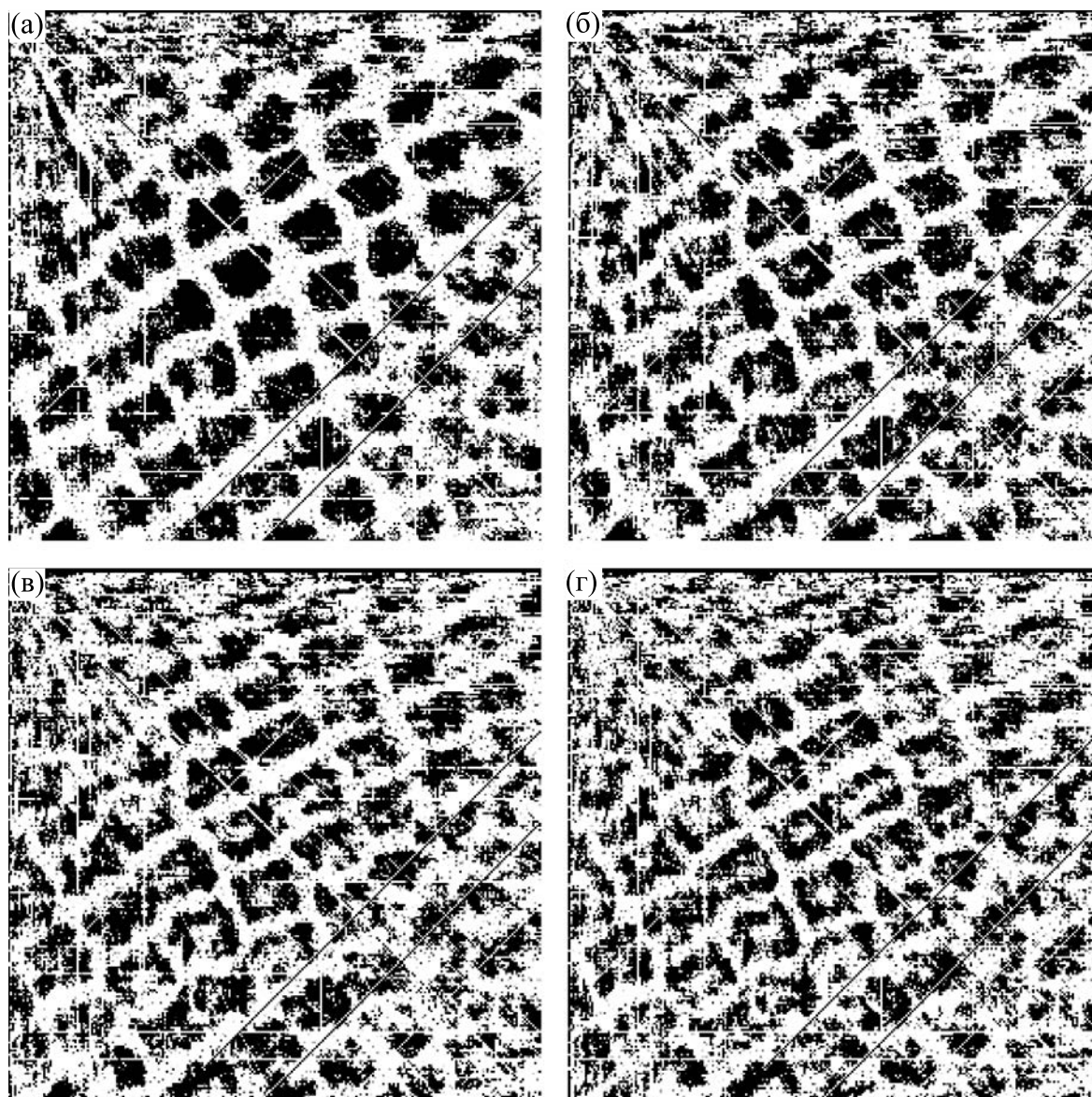


Рис. 3. Границы на изображении, получаемые в результате исключения ранних частичных моделей: (а) — при исключении первых 250 моделей; (б) — при исключении первых 500 моделей; (в) — при исключении первых 750 моделей; (г) — при исключении первых 1000 моделей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе разработан, реализован и применен к анализу конфокальных изображений метод, использующий парадигму ДГП. Метод успешно решает задачу выделения таких признаков, как границы омматидиев, на изображениях развивающегося глаза дрозофилы, окрашенных маркером на Fasciclin III. Улучшение качества обработки достигается путем отбрасывания первых частичных моделей в процессе восстановления изображений. Это позволяет добиться одновре-

менно сглаживания внутренних областей омматидиев и повышения контраста их границ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-01047-а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

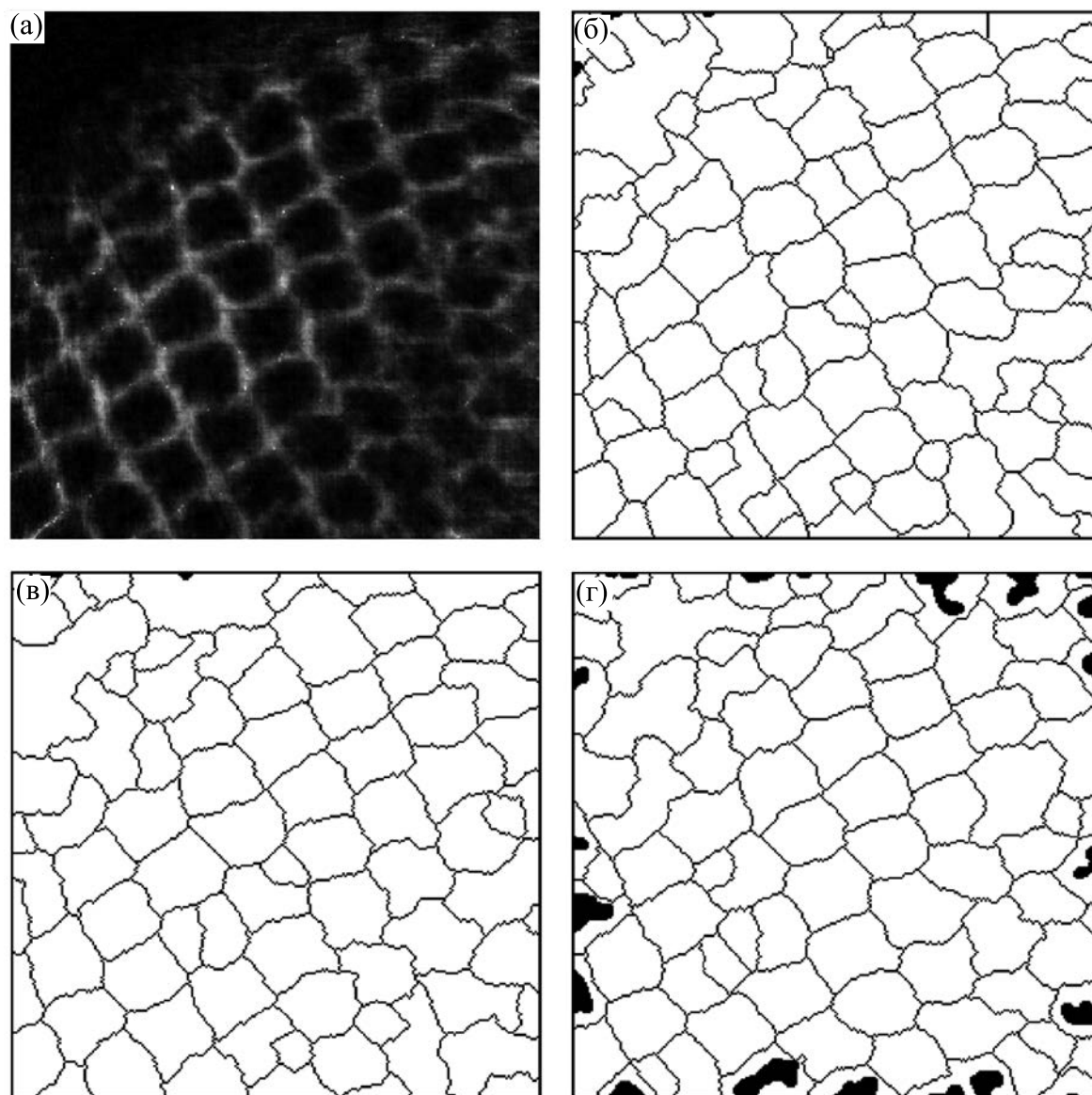


Рис. 4. Границы на изображении, получаемые в результате исключения ранних частичных моделей: (а) — восстановленное изображение; (б) — изображение восстановлено по 6000 моделей, модуль градиента по 250–6000 моделям; (в) — изображение восстановлено по 6000 моделей, модуль градиента по 500–6000 моделям; (г) — изображение восстановлено по 500–6000 моделям, модуль градиента по 500–6000 моделям.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. А. Русанова, в сб. матер. Всероссийской школы-семинара (Саратов, 01 октября 2018 г.), под ред. Д. А. Усанова (Изд-во «Саратовский источник», Саратов, 2018), сс. 78–81.
2. К. Н. Козлов, Е. В. Голубкова, Л. А. Мамон и др., *Биофизика*, 67, 283 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922020119
3. J. P. Kumar, *Devel. Dynamics*, **241**, 136 (2012). DOI: 10.1002/dvdy.23707
4. S. Surkova, J. Görne, S. Nuzhdin, et al., *Devel. Biol.*, **476**, 41 (2021). DOI: 10.1016/j.ydbio.2021.03.005.
5. J. Y. Roignant and J. E. Treisman, *Int. J. Devel. Biol.*, **53**, 795 (2009). DOI: 10.1387/ijdb.072483jr
6. J. E. Treisman, *Wiley Interdisc. Rev. Devel. Biol.*, **2**, 545 (2013). DOI: 10.1002/wdev.100

7. S. Ali, S. A. Signor, K. Kozlov, et al., *Evolution & Development*, **21**, 157 (2019). DOI: 10.1111/ede.12283
8. L. Liu, L. Shao and X. Li, *Inf. Sci.*, **316**, 567 (2015). DOI: 10.1016/j.ins.2014.06.030
9. A. Lensen, H. Al-Sahaf, M. Zhang, et al., in *EuroGP 2016. LNCS*, Ed. by M. I. Heywood, J. McDermott, M. Castelli et al. (Springer, Cham, 2016), v. 9594, pp. 51–67. DOI: 10.1007/978-3-319-30668-1_4
10. S. Ruberto, V. Terragni, and J. Moore, in *Parallel Problem Solving from Nature. Lecture Notes in Computer Science Image Feature Learning with Genetic Programming* (Springer, Cham, 2020), pp. 63–78. DOI: 10.1007/978-3-030-58115-2_5
11. C. B. Perez and G. Olague, *Intell. Data Anal.*, **17**, 561 (2013). DOI: 10.3233/IDA-130594
12. W. A. Albukhanajer and J. A. Briffa, *IEEE Trans. Cybern.*, **45**, 1757 (2015). DOI: 10.1109/TCYB.2014.2360074
13. J. F. Miller, P. Thomson, and T.C. Fogarty, in *Genetic Algorithms and Evolution Strategies in Engineering and Computer Science: Recent Advancements and Industrial Applications*, Ed. by D. Quagliarella, J. Periaux, C. Poloni, and G. Winter (Wiley, 1998), pp. 105–131.
14. M. A. Kramer, *AIChE J.* **37**, 233 (1991). DOI: 10.1002/aic.690370209
15. A. Makhzani and B. J. Frey, in *Advances in Neural Information Processing Systems*, Ed. by C. Cortes, N. Lawrence, D. Lee, et al. (2015), pp. 2791–2799
16. P. Vincent, H. Larochelle, Y. Bengio, et al., in *Proc. Int. Conf. on Machine Learning, ICML 2008* (2008), pp. 1096–1103. DOI: 10.1145/1390156.1390294
17. P. M. Snow, A. J. Bieber, and C. S. Goodman, *Cell*, **59**, 313 (1989). DOI: 10.1016/0092-8674(89)90293-6
18. K. Kozlov, A. Pisarev, J. Kaandorp, et al., in *Abstr. Book of the 9th Int. Conf. Syst. Biol.* (Goteborg, 2008), p. 191.

Cartesian Genetic Programming for Image Analysis of the Developing Drosophila Eye

N.A. Danilov*, K.N. Kozlov*, S.Y. Surkova*, and M.G. Samsonova*

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

Automatic feature extraction methods have gained increasing attention in modern image processing. The confocal images of the single-layered epithelium of the developing Drosophila eye may form an excellent model system to develop methods for complex feature extraction. The aim of this work was to explore Cartesian genetic programming for determination of the boundaries of ommatidia, the light-sensitive units in the presumptive eye region. Application of Cartesian genetic programming for the analysis of Fasciclin III expression has shown good results. This opens interesting perspectives for further use of this technology in the automatic analysis of confocal images.

Keywords: image analysis, Cartesian genetic programming, eye disc, Drosophila

УДК 534.22, 612.2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ЗВУКА В ПАРЕНХИМЕ ЛЕГКИХ У КРОЛИКОВ

© 2023 г. В.И. Кезик*,#, С.П. Драган*, А.Э. Сулейманов*

*ГНЦ РФ «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна»,
Живописная ул., 46, Москва, 123098, Россия

#E-mail: vladimirik57@mail.ru

Поступила в редакцию 25.08.2022 г.

После доработки 25.08.2022 г.

Принята к публикации 10.04.2023 г.

Цель исследования состояла в разработке экспериментально-теоретического метода определения скорости звука в паренхиме легких. Метод основан на измерении импедансных характеристик резонатора Гельмгольца, в полость которого помещаются исследуемые легкие. Входной импеданс резонатора Гельмгольца соответствует параллельному соединению импеданса легких и отдельно резонатора. Для измерения резонансной частоты и входной импедансной характеристики резонатора с легкими используется модифицированный метод двух микрофонов. Установка состояла из громкоговорителя, волновода, двух измерительных микрофонов, импедансного окончания с соединительной трубкой для подключения резонатора Гельмгольца с заданными геометрическими характеристиками. При внесении легких в объем резонатора Гельмгольца, частота увеличивается, но не пропорционально уменьшению объема, что свидетельствует о аномально низкой скорости звука в паренхиме легких. Разница между расчетной и измеренной резонансной частотой используется для определения скорости звука в паренхиме легких. Измерения проведены на воздушных и спавшихся легких восьми условно здоровых кроликов. Рассмотрены два варианта прохождения звука в паренхиме легких, соответствующих изотермическому и адиабатическому процессам. Результаты измерений и расчета свидетельствуют о том, что скорость звука в паренхиме легких условно здорового кролика составляет 21–22 м/с, что соответствует современным теоретическим представлениям.

Ключевые слова: импеданс легких, двухмикрофонный метод, резонансные частоты, скорость звука в легких, адиабатический процесс, изотермический процесс, показатель теплообмена в легких.

DOI: 10.31857/S0006302923030201, EDN: FTCVLN

При проведении медико-биологических исследований по оценке действия вредных или опасных физических факторов неионизирующей природы необходимо использовать комплекс экспресс-методов для диагностики состояния биообъектов. Методы диагностики состояния биообъекта должны соответствовать требованиям чувствительности и специфичности. Для оценки безопасности диагностический метод должен обладать высокой специфичностью, т.е. не давать ложноположительных результатов при отсутствии повреждений. А для оценки эффективности воздействия диагностический метод должен обладать высокой чувствительностью, т.е. давать правильный результат. Правильность оценивается путем сопоставления с результатами другого метода исследования, принятого в качестве «золотого стандарта» — патологоанатомического исследования совместно с результатами гистологического анализа. Также для сравнения используют лучевые методы. При этом данные

метода «золотого стандарта» являются критерием установления факта наличия или отсутствия повреждений. Однако если в качестве мишени воздействия служат легкие, то методы патологоанатомического исследования не всегда достаточно информативны. Особенно наглядно это проявляется, если в качестве реакции организма биообъекта на опасное воздействие в легких образуются отеки, ателектазы или формируется эмфизематозность. Для градации оценки состояния необходимо использовать количественные показатели наблюдаемых патологических изменений в легких, которые могут наблюдаться как на поверхности, так и в паренхиме, чего с достаточной степенью точности добиться патологоанатомическими методами исследования не всегда возможно.

Диагностическое оборудование, основанное на лучевых методах, позволяет получать количественные оценки наблюдаемых повреждений, но оно может быть использовано только в стацио-

нарных условиях, а в полигонных исследованиях оно, как правило, не доступно.

Следует отметить, что в медицинской практике, в настоящее время, нет оптимальных методов диагностики, которые обладают и высокой чувствительностью, и специфичностью. Повышение чувствительности приводит к снижению специфичности и наоборот. Поэтому развитие новых экспресс-методов диагностики является актуальной задачей медико-биологических исследований в части оценки безопасности или эффективности воздействия вредных или опасных физических факторов неионизирующей природы.

Для количественной оценки структурных изменений в паренхиме легких при диагностике состояния организма предлагается использовать акустический метод. По изменению скорости распространения звука в легких можно судить об образовании неоднородностей в паренхиме. Это интегральный показатель, характеризующий наличие или отсутствие структурных изменений в легких и, в совокупности с другими методами диагностики, может быть использован для оценки безопасности или эффективности воздействия.

Целью настоящего исследования было экспериментальным путем апробировать новый метод определения скорости звука в паренхиме легких кроликов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

При размещении в полости резонатора Гельмгольца твердых или жидких тел, которые можно считать несжимаемыми по сравнению с воздухом (жидкие среды, твердые тела различной формы), резонансная частота увеличивается в зависимости от изменяющегося объема воздуха в полости. Частота резонанса определяется достаточно точно, и известны методики определения объема помещаемых в полость резонатора жидких или твердых тел [1].

Объем помещаемых в полость резонатора тел определяют по формуле:

$$V = V_0 \left[1 - \left(\frac{f_0}{f_V} \right)^2 \right], \quad (1)$$

где V_0 — исходный объем полости резонатора, f_0 — наблюдаемая частота резонанса при исходном объеме, f_V — наблюдаемая частота резонанса после помещения в резонатор Гельмгольца тела объемом V .

Выражение (1) является следствием формулы для определения резонансной частоты резонатора Гельмгольца [2] при неизменных параметрах горла резонатора:

$$f_0 = \frac{c}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{V_0}}, \quad (2)$$

где $K=S_0/h_0$ — проводимость горла резонатора, S_0 — площадь горла резонатора, h_0 — длина горла резонатора, c — скорость звука в воздушной среде.

Определим, насколько меняется резонансная частота резонатора Гельмгольца в результате помещения в полость резонатора извлеченных из грудной клетки кролика легких с различной степенью наполнения воздухом (спавшихся или воздушных). При этом учтем, что легкие сжимаемы и обладают конечным импедансом.

Механический импеданс входного отверстия (площади S_0) в объем V_{00} , за которым включен (на площади S_L) импеданс легких Z_{SL} (здесь принимается, что $\lambda \gg (V_{00})^{1/3}$) может быть вычислен по формуле, выражающей параллельное соединение импедансов Z_V и Z_{L0} [2]:

$$Z_{S0} = \frac{Z_V \cdot Z_{L0}}{Z_V + Z_{L0}}. \quad (3)$$

Здесь $Z_V = -i \frac{\rho c^2 S_0^2}{V_{00} \omega}$ — механический импеданс входного отверстия (площади S_0) в объем $V_{00} = V_0 - V_L$, V_0 — исходный объем полости резонатора, V_L — объем легких, c — скорость звука в воздушной среде, $Z_{L0} = Z_{SL} \frac{S_0^2}{S_L^2}$ — трансформированный с площади S_L на площадь S_0 механический импеданс легких Z_{SL} .

Пренебрегая потерями на трение, механический импеданс легких Z_{SL} можно представить как входной импеданс четвертьволнового акустического резонатора сечения S_L и глубины H_L , заполненного звукопроводящей средой с параметрами ρ_L (плотность легких), c_L (скорость звука в легких), k_L (волновое число), и записать его в следующем виде [2]:

$$Z_{SL} = -i S_L \rho_L c_L \operatorname{ctg}(k_L H_L). \quad (4)$$

Если к входному отверстию (площади S_0) в объем V_{00} присоединить трубку (горло резонатора) длиной h_0 и с той же площадью внутреннего поперечного сечения S_0 , то выражение для входного механического импеданса резонатора может быть записано в виде:

$$Z_{\Sigma} = R_0 + i m_0 \omega + Z_{S0}, \quad (5)$$

где R_0 — сопротивление движению воздуха в горле резонатора, $m_0 = \rho h_0 S_0$ — масса воздушной пробки в горле резонатора (ρ — плотность воздуха), ω — циклическая частота.

Выражение (5) представляет собой зависимость входного механического импеданса резонатора от частоты. На частоте резонанса мнимая часть комплексной величины Z_{Σ} равняется нулю (график зависимости реактивной компоненты импеданса – функции $\text{Im}[Z_{\Sigma}(\omega)]$ от ω – пересекает ось абсцисс, изменяясь от отрицательных значений к положительным). Для вычисления резонансной частоты требуется решить уравнение:

$$\text{Im}[Z_{\Sigma}(\omega)] = m_0\omega + \text{Im}[Z_{S0}(\omega)] = 0.$$

Это уравнение в результате преобразований сводится к виду:

$$m_0\omega - \frac{A(\omega)B(\omega)}{A(\omega) + B(\omega)} = 0, \quad (6)$$

где

$$A(\omega) = \frac{\rho c^2 S_0^2}{V_{00}\omega}, \quad B(\omega) = \frac{S_0^2}{S_L} \rho_L c_L \text{ctg}\left(\frac{\omega}{c_L} H_L\right). \quad (7)$$

Уравнение (6) является трансцендентным и решается современными вычислительными средствами, например, с помощью программы Mathcad или средствами Microsoft Excel. Здесь следует отметить, что c – это скорость звука в воздушной среде, а c_L – скорость звука в паренхиме легких.

В наших исследованиях, для измерения импедансных характеристик различных образцов используется модифицированный метод двух микрофонов [3, 4]. В результате измерений экспериментально определяются активная $R1$ и реактивная $Y1$ компоненты безразмерного удельного акустического импеданса в плоскости окончания акустического интерферометра, где находится исследуемый образец (в данном случае вход в резонатор). Эти параметры ($R1$ и $Y1$) определяются для каждой частоты f_i заданного частотного диапазона. Преобразуем механический импеданс в безразмерный удельный импеданс. Для этого нужно осуществить трансформацию механического импеданса от площади отверстия горла резонатора S_0 к площади сечения трубы интерферометра S , перейти к удельному акустическому импедансу и нормировать его к ρc (ρ – плотность воздушной среды, c – скорость звука в воздухе); тогда уравнение входного импеданса резонатора с размещенными в нем легкими можно записать в виде:

$$Z1 = R1 + iY1 = \frac{SZ_{\Sigma}}{\rho c S_0^2}. \quad (8)$$

Реактивная компонента $Y1$ может быть определена (см. формулы (5) и (6)) следующим образом:

$$Y1(\omega) = \frac{S}{\rho c S_0^2} \left[m_0\omega - \frac{A(\omega)B(\omega)}{A(\omega) + B(\omega)} \right]. \quad (9)$$

Уравнение (9) служит основой для определения скорости распространения звука в паренхиме легких при размещении их в резонаторе. Равенство нулю выражения в квадратных скобках уравнения (9) соответствует условию резонанса. Используя выражение (9), численными методами определяют скорость распространения звука в паренхиме легких (c_L из выражений (6) и (7)), при которой соблюдается равенство расчетной и измеренной резонансной частоты резонатора с легкими.

Далее необходимо определить, насколько расчетные значения скорости звука в паренхиме легких соответствуют современным теоретическим представлениям. Для этого учтем, что скорость распространения звука в среде может подчиняться изотермическому или адиабатическому закону.

Учитывая, что легкие кролика являются сжимаемыми, необходимо определить их акустические свойства. Для описания акустических свойств паренхимы использовано приближение двухфазной газожидкостной сплошной среды, состоящей из смеси воздушных пузырьков-альвеол и окружающей их жидкости или тканей, подобных жидкости [5, 6].

Скорость звука в паренхиме c_L определяется параметрами плотности и объемной упругости:

$$c_L = \sqrt{\frac{E_L}{\rho_L}}, \quad (10)$$

где E_L – модуль объемной упругости паренхимы легких, ρ_L – плотность паренхимы легких.

Плотность ρ_L паренхимы определяется прямыми измерениями объема V_L (используя закон Архимеда) и массы M_L легких ($\rho_L = \frac{M_L}{V_L}$) [7]. Из этих измерений может быть найдено значение объемной доли газовой фазы h :

$$h = \frac{V_{La}}{V_L} = \frac{V_L - V_{Lt}}{V_L} = \frac{1}{V_L} \left(V_L - \frac{M_L}{\rho_t} \right) = 1 - \frac{\rho_L}{\rho_t}, \quad (11)$$

где V_{La} – объем воздуха, содержащегося в легких, V_{Lt} – объем тканей, содержащихся в легких, ρ_t – плотность ткани, из которой состоят легкие (плотность легочной ткани). Значение ρ_t принимается равным 1000 кг/м^3 для обескровленных легких [8]. Доля газовой фазы воздушных и спавшихся легких у обследованных кроликов составляла $0.394\text{--}0.617$.

Модуль объемной упругости паренхимы легких определяется упругостью газовой (воздушной) фазы и объемной долей этой фазы h [9]:

$$E_L = \frac{E_a}{h}. \quad (12)$$

Модуль объемной упругости воздуха для политропического процесса запишем в виде [2, 9]:

$$E_a = kP_0 = \frac{k}{\gamma} \rho c^2, \quad (13)$$

где k — показатель политропы, P_0 — постоянное давление в газе (атмосферное давление), ρ — плотность воздуха, γ — показатель адиабаты для воздуха ($\gamma = 1.4$), c — адиабатическая скорость звука в воздухе.

Подставляя E_L из формул (12) и (13) в формулу (10) и учитывая формулу (11), определяем скорость звука в паренхиме легких:

$$c_L = c \sqrt{\frac{k}{\gamma} \cdot \frac{\rho}{h\rho_L}} = c \sqrt{\frac{k}{\gamma} \cdot \frac{\rho}{h(1-h)\rho_i}}. \quad (14)$$

Волновое число для звука с частотой ω , распространяющегося в паренхиме легких:

$$k_L = \frac{\omega}{c_L}. \quad (15)$$

Показатель политропы k меняется от 1.0 до 1.4 в зависимости от интенсивности теплообмена между воздухом в пузырьке и его стенками. Если при действующей частоте колебаний давления воздуха f в каждый момент времени температура воздуха равна температуре стенок альвеол (интенсивный теплообмен), газовый процесс можно считать изотермическим ($k = 1$). В другом предельном случае, когда теплообмен отсутствует, газовый процесс является адиабатическим ($k = \gamma = 1.4$). Очевидно, что существуют и промежуточные ситуации, зависящие от частоты f и размера пузырьков-альвеол, когда теплообмен происходит, но не является полным. В этом случае k принимает значение от 1.0 до 1.4.

Имеется достаточно много работ, свидетельствующих о том, что в паренхиме легких на звуковых частотах реализуется именно изотермический газовый процесс [9]. Подтверждают это положение и многочисленные работы, посвященные процессам распространения звука в пенах [10–12]. В частности, в работе [12] представлены данные об измерениях скорости и поглоще-

ния звука в пенах с помощью импедансной трубы фирмы Brüel & Kjær (Дания). Плотность пены изменялась в диапазоне от 30 до 300 кг/м³, что соответствовало изменению h от 0.7 до 0.97. Измерения проводили в частотном диапазоне от 500 Гц до 6 кГц. Было установлено, что скорость звука в жидких пенах не зависит от частоты и распределения пузырьков по размерам и очень хорошо описывается изотермическим законом, предложенным в работе [13] и фактически совпадающим с формулой (14) при $k = 1$. Такие же выводы были сделаны в работе [14] по результатам экспериментов с различными газами. В наших расчетах использовалось значение скорости звука в паренхиме легких, вычисленное по формуле (14) для изотермического c_{Li} ($k = 1.0$), и для адиабатического процесса c_{La} ($k = 1.4$).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментального исследования скорости звука в паренхиме легких кроликов изготовлено специальное устройство. Устройство реализует прямое измерение акустического импеданса модифицированным методом двух микрофонов с использованием интерферометра [3, 4, 15–17]. Интерферометр представляет собой излучатель, к которому подсоединен концентратор звука (рупор), а с другой стороны рупора закреплен волновод постоянного диаметра, на боковой поверхности которого установлены измерительные микрофоны. В качестве излучателя использовали громкоговоритель, заключенный в герметичный короб. К окончанию волновода пристыковывали резонатор Гельмгольца в виде стеклянной банки заданного объема с герметичной крышкой, в которую помещали объект исследования — легкие кроликов.

При помощи двух стандартных микрофонов, установленных стационарно на боковой поверхности волновода, на каждой частоте измеряли уровни звукового давления P_1 и P_2 в двух точках и разность фаз φ_{12} между колебаниями давления в этих точках. По этим данным для каждой частоты рассчитывали значения модуля и аргумента комплексного коэффициента отражения ($\bar{r} = re^{i\theta}$):

$$r = \frac{\sqrt{(N^2 - 1)^2 + 4N^2(\cos^2 kL + \cos^2 \varphi_{12}) - 4N(N^2 + 1)\cos \varphi_{12} \cdot \cos kL}}{N^2 + 1 - 2N \cos(kL + \varphi_{12})},$$

$$\theta = 2kl_2 + \arctg \left[\frac{2N \sin kL (N \cos kL - \cos \varphi_{12})}{N^2 - 1 - 2N \cos kL (N \cos kL - \cos \varphi_{12})} \right],$$

где r — модуль комплексного коэффициента отражения $\bar{r}$, θ — аргумент комплексного коэффициента, k — волновое число, φ_{12} — разность фаз сигналов, регистрируемых с двух микрофонов, L — расстояние между микрофонами, $N = P_1/P_2$ — отношение амплитуд давления, измеренных в двух точках волновода.

Коэффициент поглощения α вычисляли по формуле:

$$\alpha = 1 - r^2.$$

По величинам модуля коэффициента отражения (r) и его аргумента (θ) рассчитывали компоненты безразмерного удельного акустического импеданса резонатора $Z_1 = R_1 + iY_1$ для каждой частоты:

$$R_1 = \frac{1 - r^2}{1 + r^2 - 2r \cdot \cos \theta}, \quad Y_1 = \frac{2r \sin \theta}{1 + r^2 - 2r \cdot \cos \theta}, \quad (16)$$

где l_2 — расстояние от первого микрофона до перфорированной панели, т.е. до входа в резонатор.

Экспериментально определяли активную (R_1) и реактивную (Y_1) компоненту безразмерного удельного акустического импеданса подсоединенного к волноводу резонатора с легкими кролика на каждой частоте заданного диапазона. Резонансная частота резонатора (частота, при которой упругое и инерционное сопротивления равны, а общее сопротивление равно фрикционному сопротивлению) определялась точкой пересечения кривой Y_1 с осью частот. Таким образом, с высокой точностью определяли резонансную частоту резонатора с легкими кролика в диапазоне частот от 80 Гц до 110 Гц. Резонансная частота полого резонатора составила 92.5 Гц.

Экспериментальные исследования выполнили на восьми кроликах — половозрелых самцах, массой 3.0–3.5 кг, породы «Советская шиншилла».

Подготовку животных к измерениям проводили следующим образом. Сначала производили неполную декаптацию, пересекая шейный отдел позвоночника на уровне третьего-четвертого

позвонка с сохранением целостности трахеи. При этом пересекали магистральные сосуды шейного отдела позвоночника и умерщвляли животное. После этого извлекали легкие кролика с пережатой трахеей (чтобы легкие не спалились), измеряли их вес, объем [7] и помещали в подсоединенный к волноводу резонатор. Затем аналогичную процедуру выполняли с открытой трахеей, т.е. на спавшихся легких.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате измерений акустических характеристик резонатора с легкими кролика и полой емкостью определены значения параметров компонент импеданса (Y_1 , R_1). Измерения проводили в частотном диапазоне от 80 до 110 Гц с шагом 10 Гц. На рис. 1 представлены экспериментально зарегистрированные частотно-зависимые графики реактанса (Y_1) полой емкости ($Y_{10\text{эксп}}$) и резонатора с воздушными легкими кролика № 1 ($Y_{1\text{эксп}}$). График зависимости $Y_{1\text{эксп}}$ смещен по частоте вправо, т.е. резонансная частота увеличена, по сравнению с полой емкостью. На рис. 2 представлены графики теоретических частотных зависимостей реактанса полого резонатора (Y_{10}), резонатора с размещенными легкими (Y_{100} — здесь считаем их твердым телом) и резонатора с размещенными сжимаемыми легкими (Y_{1i} — расчет произведен в предположении изотермичности процесса, Y_{1a} — расчет произведен для адиабатического процесса). Для расчета использованы данные измерений объема и массы воздушных легких кролика №1. Расчет реактанса сжимаемых легких — т.е. реактивной компоненты Y_1 произведен с использованием выражения (9). При этом скорость звука в паренхиме легких (c_L) рассчитывали при помощи выражения (14) для изотермического процесса (Y_{1i} , $k = 1.0$) и для адиабатического процесса (Y_{1a} , $k = 1.4$).

Реактансы исходного, полого резонатора объемом V_0 и резонатора объемом V_{00} (моделируется ситуация, когда помещаемые в резонатор легкие

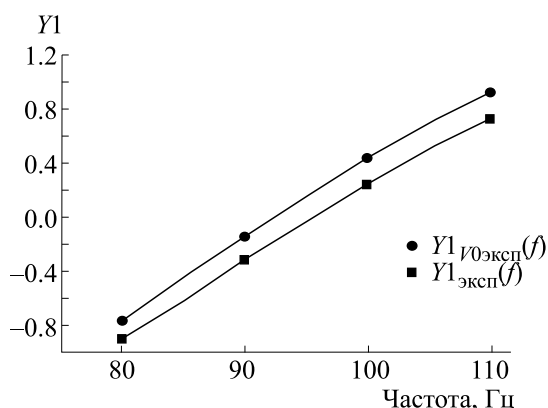


Рис. 1. Экспериментально зарегистрированные графики зависимости реактанса полой емкости резонатора ($Y_{10\text{эксп}}$) и резонатора с воздушными легкими кролика № 1 ($Y_{1\text{эксп}}$).

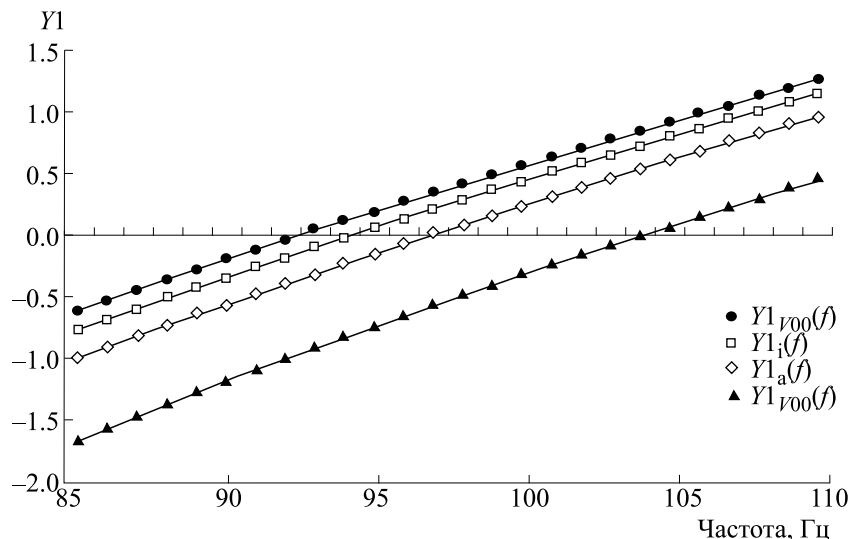


Рис. 2. Экспериментально зарегистрированные графики зависимости реактанса полой емкости резонатора ($Y1_{V0эксп}$) и резонатора с воздушными легкими ($Y1_{эксп}$) кролика № 1.

представляют собой твердое тело) определяются по формулам:

$$Y1_{V_0}(\omega) = \frac{S}{\rho c S_0^2} \left(m_0 \omega - \frac{\rho c^2 S_0^2}{V_0 \omega} \right). \quad (17)$$

$$Y1_{V_{00}}(\omega) = \frac{S}{\rho c S_0^2} \left(m_0 \omega - \frac{\rho c^2 S_0^2}{V_{00} \omega} \right). \quad (18)$$

В расчетах использовали следующие значения параметров:

- скорость звука в воздухе (адиабатическая) $c = 340$ м/с;
- плотность воздуха $\rho = 1.205$ кг/м³;
- плотность тканей, составляющих легкие $\rho_t = 1000$ кг/м³;
- показатель адиабаты для воздуха $\gamma = 1.4$;
- объем полой емкости резонатора $V_0 = 115$ мл;
- длина горла резонатора $h_0 = 5$ см;
- площадь поперечного сечения горла резонатора $S_0 = 1.6809 \cdot 10^{-5}$ м²;
- площадь поперечного сечения трубы интерферометра $S = 7.0686 \cdot 10^{-4}$ м²;
- приведенный диаметр легких $d_L = 5$ см; приведенная площадь легких $S_L = \pi d_L^2 / 4$;
- приведенная толщина слоя легких (H_L) рассчитывалась как отношение объема к площади легких $H_L = V_L / S_L$;
- резонансная частота полой емкости $f_{V0} = 92.5$ Гц.

Экспериментальные и расчетные данные частотной зависимости реактанса полой емкости совпадают, что достигается подбором параметров горла резонатора. Следует отметить, что конструктивные параметры горла резонатора в экспериментах не изменялись, поэтому были введены значения эффективного диаметра и длины горла, при которых теоретические величины резонансных частот совпадают с экспериментально зарегистрированными. Эти параметры горла используются для всех дальнейших расчетов. Резонансная частота полой емкости равна 92.5 Гц. Приведем здесь данные, полученные для воздушных легких кролика № 1. Расчетная резонансная частота полости с твердым телом составляет 104.2 Гц, а измеренная фактическая частота полости с воздушными легкими равна 95.7 Гц. Расчетные значения резонансной частоты для условий изотермического или адиабатического процессов равны 94.3 и 96.9 Гц соответственно. Таким образом, при распространении звука в паренхиме легких происходит неполный теплообмен, т.е. он носит промежуточный характер, принимает значения от 1.0 до 1.4 и его можно количественно оценить показателем политропы в соответствии с выражением (15).

В табл. 1 представлены результаты измерений массы и объема воздушных и спавшихся легких кроликов, которые затем использованы для расчета скорости звука в паренхиме легких и показателя политропы.

Результаты измеренной резонансной частоты резонатора с легкими ($f_{0эксп}$) и их расчетные значения для изотермического и адиабатического процесса распространения звука в легких (f_{0i} и

Таблица 1. Параметры воздушных и спавшихся легких кроликов

№ живот-ного	Масса легких (M_L), г	Объем воздушных легких (V_L), мл	Плотность воздушных легких (ρ_L), г/мл	Объемная доля газовой фазы воздушных легких (h)	Объем спавшихся легких (V_L), мл	Плотность спавшихся легких (ρ_L), г/мл	Объемная доля газовой фазы спавшихся легких (h)
1	10.62	24.28	0.437	0.563	19.06	0.557	0.443
2	9.66	25.24	0.383	0.617	18.5	0.522	0.478
3	8.84	21.26	0.416	0.584	15.96	0.554	0.446
4	9.54	17.02	0.561	0.439	16.36	0.583	0.417
5	10.8	23.82	0.453	0.547	17.98	0.601	0.399
6	9.78	17.82	0.549	0.451	16.14	0.606	0.394
7	10.04	18.44	0.544	0.456	17.96	0.559	0.441
8	9.68	19.58	0.494	0.506	18.24	0.531	0.469

$f\theta_a$) приведены во 2-м, 3-м и 4-м столбцах табл. 2 и 3 соответственно. В табл. 2 и 3 приведены также рассчитанные значения изотермической (столбцы 6) и адиабатической скорости звука в паренхи-

ме легких (столбцы 7). В столбцах 5 для справки приведены рассчитанные значения частоты резонанса в предположении жестких легких ($f\theta_{v00}$). В столбцах 8 представлены истинные значения ско-

Таблица 2. Экспериментальные и теоретические значения параметров воздушных легких кроликов

№ жи-вот-ного	Резонансная частота для воздушных легких, эксперимент ($f\theta_{\text{эксп}}$), Гц	Резонансная частота для воздушных легких изотермической, расчет ($f\theta_i$), Гц	Резонансная частота для воздушных легких адиабатической, расчет ($f\theta_a$), Гц	Резонансная частота для воздушных легких жестких, расчет ($f\theta_{v00}$), Гц	Скорость звука в легких изотермическая (c_{Li}), м/с	Скорость звука в легких адиабатическая (c_{La}), м/с	Скорость звука в легких подобранная (c_L), м/с	Показатель политропы (k)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	95.7	94.3	96.9	104.2	20.1	23.8	21.9	1.19
2	94.7	93.5	96.4	104.7	20.5	24.3	21.8	1.13
3	95.3	93.9	96.2	102.5	20.2	24.0	22.4	1.23
4	96.0	95.2	96.6	100.2	20.1	23.8	22.2	1.22
5	95.3	94.5	97.0	103.9	20.0	23.7	21.0	1.10
6	96.1	95.2	96.7	100.6	20.1	23.7	22.1	1.21
7	95.9	95.2	96.8	101.0	20.0	23.7	21.5	1.15
8	95.5	94.7	96.6	101.6	20.0	23.6	21.2	1.13

Таблица 3. Экспериментальные и теоретические значения параметров спавшихся легких кроликов

№ животного	Резонансная частота для спавшихся легких, эксперимент ($f_{0_{\text{эксп}}}$), Гц	Резонансная частота для спавшихся легких изотермическая, расчет (f_{0_i}), Гц	Резонансная частота для спавшихся легких адиабатическая, расчет (f_{0_a}), Гц	Резонансная частота для спавшихся легких жестких, расчет ($f_{0_{v00}}$), Гц	Скорость звука в легких изотермическая (c_{Li}), м/с	Скорость звука в легких адиабатическая (c_{La}), м/с	Скорость звука в легких подобранная (c_L), м/с	Показатель политропы (k)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	96.2	95.4	97.0	101.3	20.1	23.8	21.6	1.16
2	95.8	94.9	96.6	101.0	20.0	23.6	21.7	1.18
3	95.9	94.9	96.3	99.7	20.1	23.7	22.5	1.25
4	95.9	95.3	96.6	99.9	20.2	23.9	21.7	1.15
5	96.3	95.8	97.1	100.7	20.4	24.1	21.6	1.12
6	96.6	95.5	96.7	99.8	20.4	24.2	24.0	1.38
7	96.4	95.3	96.8	100.7	20.1	23.8	22.6	1.27
8	95.7	95.0	96.6	100.9	20.0	23.7	21.3	1.14

рости звука в паренхиме легких кроликов соответствующие измеренным резонансным частотам.

Результаты измерений для воздушных и спавшихся легких кроликов достаточно близки между собой как по показателю скорости, так и показателю теплообмена (показателю политропы). Результаты измерений и расчетов скорости звука в паренхиме легких свидетельствуют, что экспериментальные данные находятся внутри диапазона между расчетными изотермическими и адиабатическими значениями скорости. Регистрируемые значения резонансной частоты ($f_{0_{\text{эксп}}}$) также занимают промежуточное положение между рассчитанными значениями этой величины в предположении изотермического и адиабатического газового закона, реализующегося в паренхиме легких. Это означает, что теплообмен между воздухом в альвеолах и стенками альвеол в определенной степени происходит. По величине показателя политропы можно судить об интенсивности теплообмена в легких.

Для выявления возможностей метода в части оценки действия вредных или опасных физических факторов неионизирующей природы, в табл. 4 представлены статистические характеристики определяемых параметров легких. Ранее

нами для оценки состояния легких в условиях полигона использовался метод, основанный на измерениях массы и объема [7]. Этот метод обладает определенной специфичностью, но низкой чувствительностью в связи с большим разбросом определяемых параметров. Так коэффициенты вариации (соотношение стандартного отклонения к средней величине по группе) принимали высокие значения (более 10%), что не позволяло выявить статистически значимые изменения в группе. В предлагаемом методе значения скорости и показатель политропы имеют существенно меньший разброс, а коэффициент вариации по скорости не превышает 4%. Коэффициент вариации показателя политропы составляет от 4.2% до 7.3%.

Таким образом, новый экспериментально-теоретический метод позволяет с минимальной погрешностью определить скорость звука в паренхиме воздушных или спавшихся легких и определить интенсивность теплообмена в легких при прохождении звука. Это обстоятельство позволит количественным образом оценить образование отеков, ателектазов или эмфизематозности в легких биологических объектов при воздействии вредных или опасных физических факторов неионизирующей природы.

Таблица 4. Статистические характеристики параметров легких

Показатель	Среднее значение	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации
Масса легких (M_L), г	9.87	0.62	6.3%
Объем воздушных легких (V_L), мл	20.93	3.19	15.2%
Плотность воздушных легких (ρ_L), г/мл	0.48	0.07	14.0%
Объемная доля газовой фазы воздушных легких (h)	0.52	0.07	12.9%
Объем спавшихся легких (V_L), мл	17.53	1.19	6.8%
Плотность спавшихся легких (ρ_L), г/мл	0.56	0.03	5.4%
Объемная доля газовой фазы спавшихся легких (h)	0.44	0.03	7.0%
Резонансная частота при размещении воздушных легких, эксперимент ($f_{0_эксп}$), Гц	95.6	0.46	0.5%
Скорость звука в воздушных легких (c_L), м/с	21.8	0.49	2.3%
Показатель политропы воздушных легких (k)	1.17	0.05	4.2%
Резонансная частота при размещении спавшихся легких, эксперимент ($f_{0_эксп}$), Гц	96.1	0.32	0.3%
Скорость звука в спавшихся легких (c_L), м/с	22.13	0.88	4.0%
Показатель политропы спавшихся легких (k)	1.21	0.09	7.3%

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными осуществляли согласно протоколу исследований в полном соответствии с требованиями Женевской конвенции «Международные принципы биомедицинских исследований с использованием животных» (1985 г.) и Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (2000 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. S. Webster and C. E. Davies, *Sensors*, **10**, 10663 (2010).
2. С. Н. Ржевкин, *Курс лекций по теории звука* (Изд-во Московского университета, М., 1960).
3. И. В. Лебедева и С. П. Драган, *Измерительная техника*, № 6, 52 (1988).
4. С. П. Драган, В. И. Кезик и А. В. Богомолов, *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 2, 181 (2022).
5. D. A. Rice, *J. Appl. Physiol.*, **54** (1), 304 (1983).
6. D. A. Rice, in *ILSA Proc.* (Lexington, 1986), p. 13.
7. В. А. Ивашин, В. И. Кезик и В. П. Соловьев, *Саратовский науч.-мед. журн.*, **13** (4), 907 (2017).
8. *Человек. Медико-биологические данные* (Медицина, М., 1977).
9. А. И. Дьяченко и А. Н. Михайловская, *Труды ИОФАН*, 68, 136 (2012).
10. В. В. Замашиков и Н. А. Какуткина, *Акустич. журн.*, **37** (3), 484 (1991).
11. Б. Е. Гельфанд, А. В. Губанов и Е. Н. Тимофеев, *Физика горения и взрыва*, № 4, 129 (1981).
12. J. Pierre, R.-M. Guillermic, F. Elias, et al., *Eur. Phys. J.*, **36**, 113 (2013).
13. A. B. Wood, *A Textbook of sound* (London, 1946).
14. J. Pierre, C. Gaulon, C. Derec, et al., *Investigating the origin of acoustic attenuation in liquid foams*, HAL Id: hal-0153666 (2017).
15. А. В. Богомолов и С. П. Драган, *Докл. РАН*, **464** (5), 623 (2015).
16. А. В. Богомолов, С. П. Драган и Г. Г. Ерофеев, *Докл. РАН*, **487** (1), 97 (2019).
17. С. П. Драган, А. В. Богомолов и В. И. Кезик, *Рос. журн. биомеханики*, **24** (2), 187 (2020).

Experimental and Theoretical Determination of the Speed of Sound in Lung Parenchyma of Rabbits

V.I. Kezik, S.P. Dragan, and A.E. Suleymanov

*State Research Centre of the Russian Federation "Burnasyan Federal Medical Biophysical Center"
Jivopisnaya ul. 46, Moscow, 123098 Russia*

The purpose of the study was to develop an experimental-theoretical method for determining the speed of sound in the lung parenchyma. The method is based on the measurement of the characteristics of the impedance of the Helmholtz resonator, that contains lungs under study. The input impedance of the Helmholtz resonator corresponds to the parallel connection of the lung impedance and a resonator. The modified two-microphone method is used to measure the resonant frequency and input impedance response of the product of the resonator chamber volume (lungs). The experimental system consisted of a loud speaker, a wave guide, two microphones for the measurement, and the end impedance node in the form of a connecting tube extended to the inside of the Helmholtz resonator with specified geometric characteristics. When the lungs are added to the Helmholtz resonator, the frequency increases, but not linearly with the decrease in their volume, indicating that the speed of sound is abnormal low in the lung parenchyma. The difference between the calculated and measured resonant frequencies is used to determine the speed of sound in the lung parenchyma. The measurements were carried out on air and collapsed lungs of 8 apparently healthy rabbits. Two variants of sound transmission in the lung parenchyma, corresponding to isothermal and adiabatic processes, are considered. The results of measurement and calculation demonstrate that the speed of sound in the lung parenchyma of an apparently healthy rabbit is 21–22 m/s, what is in accord with modern theoretical concepts.

Keywords: lung impedance, two-microphone method, resonant frequencies, sound speed in the lungs, adiabatic process, isothermal process, heat transfer index in the lung.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

© 2023 г. Д.Б. Корман*, Л.А. Островская*^{*,#}, Н.В. Блюхтерова*, В.А. Рыкова*, М.М. Фомина*

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

[#]E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 09.03.2023 г.

После доработки 09.03.2023 г.

Принята к публикации 15.03.2023 г.

В обзоре обобщены экспериментальные данные, связанные с изучением возможностей использования нанотехнологий для целей лекарственной терапии злокачественных опухолей.

Ключевые слова: наночастицы, липосомы, полимеры, мицеллы, дендримеры, цитотоксичность, противоопухолевая активность, клеточные культуры опухолей, перевиваемые опухоли.

DOI: 10.31857/S0006302923030213, EDN: FTEQLV

В последнее десятилетие внимание исследователей, работающих над созданием лекарственных препаратов, привлекают возможности, появившиеся в результате развития нанотехнологий, которые позволяют получать вещества в виде наночастиц (НЧ).

Наночастицы — это изолированные твердофазные объекты, имеющие отчетливо выраженные границы с окружающей средой, размеры которых во всех трех измерениях соответствуют 1–100 нм. Следует однако отметить, что не все НЧ, используемые в медицинских целях, соответствуют общепринятому определению размера НЧ, что, тем не менее, не обязательно влияет на их функциональность в медицинских приложениях. Относительно большие (размер >100 нм) НЧ могут потребоваться для загрузки достаточного количества лекарственного средства в НЧ.

Привлекательность использования НЧ в медицине обусловлена их уникальными особенностями, в первую очередь, наличием большой функциональной поверхности, т.е. высоким отношением поверхности к массе. Это позволяет НЧ адсорбировать и переносить другие соединения, в том числе лекарственные субстанции, то

есть выступать в роли носителя лекарственного средства (лекарственной формы).

Применение противоопухолевых препаратов (ПП) в форме наноразмерных структур может иметь существенные преимущества перед стандартными лекарственными формами, что обусловлено следующими факторами:

- улучшение растворимости в водных средах (многие ПП мало или плохо растворимы, что ограничивает и затрудняет их практическое использование);
- более высокая биодоступность;
- пролонгирование циркуляции в кровотоке;
- увеличение содержания активного агента в опухолевой клетке вследствие эффекта повышенной проницаемости и удерживания НЧ (EPR — enhanced permeation and retention);
- направленная доставка к опухоли за счет возможности прикрепления специфических лигандов;
- уменьшение токсичности лекарственной субстанции [2–6].

Использование возможностей нанотехнологий для целей лекарственной терапии злокачественных опухолей может идти по двум направлениям [7]:

- производство на наноуровне самого лекарственного средства, функционирующего как собственный «носитель» (carrier-free) [1, 2];
- создание специальных, «инженерных» НЧ в качестве носителя.

Сокращения: НЧ — наночастицы, ПП — противоопухолевые препараты, EPR — повышенная проницаемость и удерживание наночастиц (enhanced permeation and retention), РМЖ — рак молочной железы человека, НСН — наноструктурированные носители, ТЧЛ — термочувствительные липосомы, НТ-ТЧЛ — низкотемпературные термочувствительные липосомы, PLGA — сополимер полимолочной и гликолевой кислот, РАМАМ — полиамидамины.

НАНОЧАСТИЦЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ

Одно из направлений разработки новых лекарственных форм медикаментозных препаратов предполагает получение и изучение активных субстанций не в обычной молекулярной форме, а в форме НЧ — наноразмерных скоплений действующих молекул. Преимуществами такой формы считают высокую загрузку действующего агента (может достигать 100%), отсутствие потенциальной токсичности, которая может быть индуцирована материалом носителя, возможность модификации НЧ для направленной доставки ПП к мишени, возможность получения в одной НЧ нескольких активных агентов [5, 8, 9].

Многочисленные методы получения НЧ лекарственных субстанций делят на две основные группы: подход «снизу-вверх» и подход «сверху-вниз».

Первый, называемый также «конструктивным» методом, подразумевает сборку НЧ из отдельных молекул и атомов.

Второй подход, известный как «деструктивный» метод, основан на разбиении или разложении крупных объектов на мелкие единицы, которые затем превращаются в НЧ. Для этого используют такие методы, как механическое фрезерование, нанолитография, химическое травление, лазерная абляция, распыление, электровзрыв и термическое разложение. Изменяя условия проведения этих процессов можно регулировать такие параметры НЧ как размер, форму, заряд, характер поверхности [2, 9].

Получение НЧ активных субстанций может осуществляться в результате самостоятельной наносборки молекул этих веществ, при этом возможна самосборка НЧ, содержащих один или два-три препарата. В водном растворе молекулы некоторых лекарственных средств выпадают в осадок, при этом происходит спонтанная агрегация молекул с образованием НЧ. Однако большинство ПП не обладают способностью к самосборке и получение НЧ этих веществ требует специальных методов [5, 9].

Наносборка препаратов в основном обусловлена не ковалентными взаимодействиями между молекулами лекарственного средства или лекарственного средства и молекулами воды за счет функциональных групп в химической структуре противоопухолевых субстанций. Например, алифатические группы ведут к гидрофобным взаимодействиям, ионные группы обладают электростатической активностью, гидроксильные или карбоксильные группы взаимодействуют с помощью водородных связей. Наносборка возможна в

результате межмолекулярного пи-стейкинга [5, 10, 11].

Одним из наиболее часто применяемых методов получения НЧ, содержащих ПП, является метод одноступенчатой нанопреципитации, преимуществами которого считается возможность получать НЧ с высоким содержанием действующего агента, легкость и воспроизводимость метода, возможность контроля качества и масштабирования метода. С помощью этого метода получены НЧ нескольких веществ с противоопухолевой активностью (паклитаксел, куркумин, иммунотерапевтический препарат BMS-202 — ингибитор комплекса PD-1/PD-L1 и другие).

В опытах *in vitro* и *in vivo* показаны преимущества этих НЧ по сравнению с «чистыми» препаратами [5, 12–14].

Описан метод получения НЧ с помощью ледяного шаблона, основанный на уникальном свойстве льда, заключающемся в том, что границы зерен льда содержат подвижные молекулы воды, ведущие себя как жидкость. В результате ледяной шаблон эквивалентен специальному водному раствору.

Основные этапы такого метода наносборки включают капельное введение раствора вещества в ледяной шаблон и быстрое выпаривание растворителя с помощью сухого воздуха, в результате чего вокруг зерен льда образуются НЧ, выделяющиеся после плавления льда. Регулируя условия выполнения метода можно получать НЧ разного размера. С помощью этого метода были получены НЧ камптотецина, паклитаксела, 6-меркаптопурина, метотрексата и некоторых других цитостатиков, размерами ~ 50–90 нм, с содержанием препаратов 90–97%. Подобным способом возможно также получение двойных и тройных наносборок. При этом важное значение имеет подбор оптимальных молярных соотношений «чистых» веществ [5, 15].

Тройные НЧ в форме стержня, содержащие одновременно камптотексин, трастузумаб и доксорубин, получены путем сочетания методов диффузии растворителя (получаются НЧ камптотецина), физической абсорбции (покрытие НЧ камптотецина трастузумабом) и совместной инкубации этих НЧ с доксорубицином (включение доксорубина в корону трастузумаба вокруг НЧ камптотецина) [5, 16].

Сообщается о получении НЧ, содержащих три гидрофобных ПП — метотрексат, 10-гидроксикамптотексин и паклитаксел — методом обмена растворителями. Вначале препараты смешивали в молярном отношении 1 : 1 : 1, затем их растворяли в диметилсульфоксиде, образуя гибридный раствор трех препаратов. После введения гибридного

ного раствора в деионизированную воду молекулы препаратов агрегируют и выпадают в осадок с образованием мультитекарственных НЧ в форме стержней. На клетках рака молочной железы человека (РМЖ) линии MCF-7, в том числе резистентных к доксорубину, показано синергетическое усиление цитотоксического эффекта [17].

Двойные и тройные наносборки ПП могут обладать более высокой активностью по сравнению с применением этих же ПП в обычной молекулярной форме [18, 19]. Например, наносборка 10-гидроксикампитедина и доксорубина оказалась эффективной в отношении клеток MCF-7, рефрактерных к этим препаратам [18], наносборка гифитиниба и трипептида торосерватида (ингибитор гистондеацетилазы) более эффективно подавляла рост клеток аденокарциномы легких линии A549, чем эти препараты, примененные в традиционной форме [20].

Наносборка доксорубина и берберина (алкалоид, обладающий антиметастатической активностью) оказывала выраженное цитостатическое действие *in vitro* на клетки гепатокарциномы HepG2, тормозила *in vivo* рост гепатомы H22 мышей [19], ингибировала рост опухоли и метастазирование в легкие перевиваемого РМЖ 4Т1 мышей [21].

На клетках РМЖ линии BT-474 показано, что после интернализации тройной наносборки трастузаума, камптотецина и доксорубина, трастузаумаб локализуется в плазматической мембране, камптотетин в перинуклеарной области, а доксорубин в ядре. Таким образом, наносборка обеспечивает одновременное воздействие на три разные внутриклеточные мишени. Наносборка этих ПП оказала более выраженный цитотоксический эффект по сравнению с их применением отдельно. Следует отметить, что синергетический эффект отмечался на клетках РМЖ с гиперэкспрессией Her2 и не регистрировался на клетках трижды негативного РМЖ линии MDA-MB-231, что, очевидно, обусловлено наличием в тройной наносборке трастузаума, обеспечивающего, помимо цитостатического эффекта, направленную доставку НЧ к клеткам [16].

Методом обмена растворителями была реализована самосборка сферических НЧ, содержащих метотрексат и урсоловую кислоту (лиганд для рецепторов фолатов). Загрузка препаратов в НЧ составила 91.7 и 96.9% соответственно. НЧ обладали более высокой растворимостью в воде по сравнению со свободными препаратами, синергетическим цитотоксическим эффектом на клетках A549 и MCF-7 и противоопухолевым эффектом на ксенографтах этих опухолей, при этом эффект был более значительным на клетках MCF-7 по

сравнению с клетками A549, что связывают с гиперэкспрессией рецепторов фолатов на клетках MCF-7 [22].

Еще одним методом получения НЧ «чистого» лекарственного средства является получение нанокристаллов, полностью состоящих из лекарственного средства и покрытых модификатором поверхности для придания физической стабильности. Наиболее целесообразно получение нанокристаллов для плохо растворимых препаратов, которые в обычной форме не могут полностью раскрыть свой потенциал. Подсчитано, что ~ 40% лекарств, представленных на фармацевтическом рынке, и 70% соединений, проходящих изучение, практически нерастворимы в воде [23, 24].

Разработано несколько технологий получения нанокристаллов методом «сверху-вниз» лекарственных субстанций — измельчение жемчужными мельницами, гомогенизация под высоким давлением, процесс осаждения и ряд других методов. Получаемые нанокристаллы пригодны как для перорального приема (нанокристаллы легко проникают через слизистую кишечника), так и для парентерального введения в виде суспензий. С использованием этих технологий разработаны лекарственные формы в виде нанокристаллов более 40 известных лекарственных препаратов, которые уже применяются для лечения разных заболеваний. ПП в форме нанокристаллов в клинике пока не применяются [4, 11, 25–28].

В качестве еще одного способа получения наноразмерных ПП предлагается получать конъюгаты «препарат–препарат». Считается, что такое «пролекарство» объединяет преимущества малых молекул и НЧ, образующихся в результате супрамолекулярной самосборки препаратов, и имеющих однородную сферическую форму, четко определенную структуру, высокую степень загрузки лекарств в НЧ и регулируемое высвобождение препаратов. На экспериментальных моделях показано преимущество подобных «пролекарств» в комбинированной терапии опухолей по сравнению с традиционным совместным применением препаратов [18, 29–31].

Разработан амфифильный конъюгат гидрофобного дазатиниба и гидрофильного производного цисплатина, соединенных эфирной связью. В водном растворе эти конъюгаты самособирались в стабильные НЧ диаметром 100 нм. После попадания в клетку в результате гидролиза эфирной связи конъюгаты распадались, высвобождая дазатиниб и цисплатину. Цитотоксичность этого конъюгата показана на клетках HepG2, а противоопухолевая активность на трансплантатах гепатомы H22 [31].

Аналогичные результаты зарегистрированы для конъюгатов «доксорибуцин—куркумин» [29, 32], «доксорибуцин—10-гидроксикамптотетин» [18], «доксорибуцин—дазатиниб» [30].

Предложено загружать НЧ лекарственной субстанции в термочувствительные гидрогели, в которых могут происходить золь-гелевые фазовые изменения при изменении температуры окружающей среды. При низкой температуре гидрогель представляет собой жидкий коллоид, который можно применять локально; при температуре, близкой к температуре человеческого тела, гидрогель становится полутвердым с определенной адгезией. Нагрузка гидрогеля ПП не требует сшивающих агентов, органических растворителей или химического синтеза и происходит путем смешивания гидрогелей с лекарственным средством. Предлагается использовать гидрогели с загруженными в них НЧ ПП для локального применения с целью профилактики рецидивов опухоли после хирургического удаления и лечения поверхностных неоперабельных опухолей. Предполагается, что такая лекарственная форма обеспечивает длительный контакт опухолевых клеток с ПП при непрерывном его высвобождении из гидрогеля [11].

Весьма успешным оказалось применение паклитаксела в виде оригинальной лекарственной формы, в которой нанокристаллы паклитаксела были загружены в гидрогель, построенный из трех термочувствительных гелей. Использованная композиция включала три геля — полксамер 407, полксамер 188 и карбомер 974Р — и имела строение трехмерной сетчатой структуры, образующейся в результате взаимодействия карбоксильной группы карбомера с эфирной связью полксамера. Установлена отчетливая зависимость цитотоксичности препарата от длительности экспозиции. Местное применение НЧ паклитаксела в гидрогеле полностью предотвратило развитие рецидива после нерадикального удаления РМЖ 4Т1 мышей, тогда как при применении стандартного паклитаксела в гидрогеле рецидив опухоли зарегистрирован в 90% случаев [11].

Особый интерес представляет получение в виде НЧ новых агентов, которые обладают антипролиферативной активностью по данным исследований *in vitro*, но не могут быть исследованы *in vivo* и бесперспективны для клинического изучения из-за очень низкой растворимости в воде. Примером может служить растительный продукт урсоловая кислота, нерастворимая в воде. Показано, что НЧ урсоловой кислоты, полученные путем самосборки, способны ингибировать рост опухолей *in vivo* [19].

Подводя итог имеющимся результатам по этому направлению создания наноразмерных ПП, следует констатировать, что, несмотря на значительный прогресс в разработке и исследовании таких препаратов, и их несомненную перспективность с точки зрения возможностей практического применения, до перехода к клиническим испытаниям предстоит еще длительный процесс исследовательской работы [9].

НАНОЧАСТИЦЫ КАК НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Данное направление исследований фактически связано с разработкой с помощью нанотехнологий новых типов лекарственных форм, принципиально отличающихся от традиционных, в которых низкомолекулярное действующее вещество вводится в организм в виде раствора, суспензии, порошка, экстракта и прочих форм.

Предполагается, что создание наноразмерных лекарственных форм ПП («инженерные» НЧ), играющих роль определенных «контейнеров» для адресной доставки действующих агентов, может улучшить терапевтические свойства ПП как в результате усиления эффективности за счет направленного (таргетного) транспорта препарата к опухолевой клетке-мишени, лучшего проникновения в клетку и создания в ней более высокой концентрации действующего агента, так и за счет снижения токсичности из-за повышения селективности действия лекарственного средства. Важное значение придается возможности введения в организм плохо растворимых препаратов.

Интенсивные исследования в данном направлении подтверждают реальность этих предположений. Ряд ПП в виде наноструктурированных лекарственных форм уже введены в клиническую практику. В то же время в настоящее время общепризнано, что пока ключевым преимуществом нанопрепаратов является уменьшение побочных явлений, а не повышение эффективности по сравнению с традиционными формами применения этих лекарств [33].

В качестве наноносителей лекарственных препаратов, используют специально синтезированные НЧ органической и неорганической природы (оксиды железа, углерода, фосфаты кальция и другие). В настоящем обзоре рассматриваются НЧ первого типа.

По некоторым оценкам взрыв исследований в области доставки лекарств, связанных с НЧ, опередил исследования генной терапии и терапии на основе эмбриональных стволовых клеток [34]. С 1960 года опубликовано более 59000 оригинальных исследовательских работ по разработке, изу-

чению и использованию наноструктурированных форм лекарственных препаратов [33].

Различают три стратегии нацеливания (таргетинга) НЧ к опухоли [23, 34–36].

Пассивное таргетирование подразумевает селективное накопление НЧ диаметром до 250 нм в опухоли в результате аномального строения эндотелия сосудов опухоли, характеризующегося большими порами, а также их длительное сохранение в опухоли (EPR-эффект, характерный для опухолей). В результате достигается длительная высокая интрацеллюлярная концентрация действующего вещества. Для эффективного пассивного таргетинга необходимо также длительное циркулирование НЧ в кровотоке [3].

Активное таргетирование реализуется в результате модификации НЧ функциональными векторными молекулами, специфически связывающимися с опухолевыми клетками.

Триггерное высвобождение подразумевает пространственно-временное контролируемое высвобождение в опухоли активной субстанции из наноносителя под действием различных эндогенных и экзогенных факторов [23, 34–36].

Состав «инженерных» НЧ может быть различным. Исходные материалы могут иметь биологическое происхождение или быть синтетическими. При создании НЧ биологической природы используются в основном фосфолипиды, липиды, молочная кислота, декстран, хитозан. При разработке синтетических НЧ применяются в первую очередь различные полимеры, имеющие большие возможности для варьирования химического состава НЧ.

Эффективность применения наночастиц (НЧ) во многом зависит от физических и химических свойств наноносителей, таких как размер и химические свойства поверхности НЧ. Известно, что НЧ, имеющие размер менее 5 нм, быстро выводятся почками, а НЧ размером более 200 нм быстро поглощаются макрофагами [1, 2, 33, 35–37].

Основные типы НЧ, для которых доказана эффективность использования в качестве наноразмерных носителей ПП, представлены в табл. 1.

Использование наноносителей способствует улучшению фармакокинетики лекарств, повышает селективность доставки действующего агента к опухоли, увеличивает концентрацию действующих агентов в месте опухоли и, тем самым, повышает терапевтическую эффективность.

Однако загрузка активных агентов в наноструктурах доставки довольно низкая, так как носители обычно являются основной частью этой лекарственной формы с весом, намного превышающим вес субстанции (как правило, более 80%).

Носители лекарств, как правило, инертны, но их присутствие может увеличить системную токсичность лекарства, а продукты их деградации могут создать дополнительную нагрузку на организм [5, 17].

Главной причиной неэффективной доставки ПП с помощью наночастиц считается захват НЧ фагоцитарной системой, состоящей из моноцитов и макрофагов, которые избирательно захватывают любые НЧ и накапливают их в разных органах (печень, селезенка, легкие) в различных пропорциях в зависимости от размера НЧ, формы поверхности, заряда.

Для уменьшения этого эффекта часто используется пегелирование НЧ, то есть сопряжение с ними цепей полиэтиленгликоля. Были предприняты попытки преодолеть эти проблемы, стабилизируя частицы стерически, а не электростатически, покрывая наночастицы клеточными мембранами, извлеченными из эритроцитов или лейкоцитов, или белками, конъюгируя их с экзосомами и прочими биоматериалами [34, 36, 38].

С момента регистрации Агентством Министерства здравоохранения и социальных служб США в 1995 г. первого наноструктурированного ПП доксила (липосомальной пегелированной формы доксорубина) для практического применения было разрешено более 10 стандартных ПП в наноструктурированных лекарственных формах (табл. 2) [34, 39, 40].

Следует заметить, что клинический опыт показал, что наиболее широко применяемые нанопрепараты доксил и абраксан, представляющий собой конъюгат паклитаксела с альбумином (зарегистрирован в 2005 г.), не привели к значительному повышению эффективности лечения, хотя терапевтический индекс препаратов улучшился [34].

Надо признать, что использование наноструктурированных носителей (НСН) известных ПП хотя и может в определенной степени улучшить результаты лечения, но вряд ли способно привести к принципиально новому эффекту, поскольку действие ПП, доставленного в опухоль с помощью НСН, в конечном итоге по-прежнему обусловлено взаимодействием исходных активных молекул с соответствующими молекулярными мишенями, ведущему к гибели опухолевой клетки.

На клинических испытаниях находится около 40 различных наноструктурированных ПП, в которых в различные наноносители инкорпорированы разные известные и вновь разрабатываемые ПП [39].

В качестве НСН ПП используют липосомы, солидные липидные частицы, конъюгаты «поли-

Таблица 1. Основные типы наноносителей противоопухолевых препаратов [4]

Тип наноразмерного носителя	Описание	Особенности действия
Липосомы	Синтетические везикулы, образованные из липидных бислоев, которые делятся на две группы: одноламеллярные и многослойные, способные переносить одновременно как водорастворимые, так и липидорастворимые препараты	Пассивное нацеливание на клетку за счет EPR-эффекта. Высокоэффективная доставка различных препаратов : микромолекул (лекарственные субстанции) и макромолекул (белки, ферменты, гормоны, ДНК). Снижение токсичности препаратов
Полимерные наночастицы	Могут быть получены в виде наносфер или нанокапсул различными методами — нано-преципитация, двойное эмульгирование, полимерное покрытие, эмульгирование, диффузия	Могут вводиться парентерально путем инфузии, различных типов инъекций и перорально. Настраиваемые характеристики. Способность переносить многофункциональные агенты. Улучшенная термодинамическая стабильность. Глубокое проникновение в клетки и ткани
Мицеллы	Сферические амфифильные сополимерные наночастицы, образованные супрамолекулярной сборкой. Имеют структуру «ядро—оболочка» с гидрофобной внутренней частью, отделенной от водной наружной	Высокий уровень загрузки препаратов. Хорошая стабильность в кровотоке. Длительное время циркуляции. Низкое количество побочных эффектов
Дендримеры	Синтетические древовидные макромолекулы, имеющие 3D монодисперсную структуру с ответвлениями, протянутыми от центральной молекулы, имеющие предсказуемый размер по номеру генерации	Определенный, прогнозируемый молекулярный вес. Однородность по форме. Способность высокой загрузки препарата (свойство захвата «хозяин—гость»). Чрезвычайно низкая полидисперсность

мер—лекарственное средство», «белок—лекарственное средство», дендримеры, полимерные мицеллы (блок-сополимерные мицеллы); нанокристаллы, наносuspensions, наноэмульсии и другие материалы. Многие НСН могут инкапсулировать как одну лекарственную субстанцию, так и несколько агентов, и одновременно доставлять их в раковые клетки, что можно расценивать как новый подход к комбинированной терапии рака [17, 37].

Так, например, сообщается о разработке липосомального носителя, в который были включены паклитаксел и ресвератрол. Показано в опытах с ксенографтами РМЖ MCF-7, чувствительными и резистентными к доксорубину, что эффективность липосом с двумя препаратами была существенно выше эффективности липосом, включающих эти препараты по отдельности, как для чувствительных, так и для резистентных опухолей [41].

Липосомы — сферические липидные везикулы, состоящие из мембраны, построенной из фосфолипидного бислоя, и водного ядра — являются одним из наиболее распространенных типов НСН, используемых для доставки лекарственных средств.

Важной особенностью липосом является способность служить носителем как гидрофильных, так и гидрофобных препаратов — гидрофильные препараты могут быть инкапсулированы в ядро липосом, а гидрофобные — в липидную мембрану. Амфифильные препараты могут локализоваться как в водном ядре, так и в мембранах [37].

Для получения липосом наиболее часто используется тонкослойный метод гидратации (метод Бангама), основными этапами которого являются растворение липидов в органической фазе, удаление органического растворителя с образованием липидной пленки, которую диспергируют в водной среде, содержащей препарат. При энер-

гичном перемешивании образуются сферические структуры — липосомы, в ядре которых оказывается препарат [6].

Инкапсуляция ПП внутрь липосом увеличивает время циркуляции его в кровотоке после внутривенного введения и увеличивает селективность попадания в опухоль вследствие эффекта EPR. При этом следует отметить, что экстравазация липосом с препаратом является процессом, ограничивающим скорость попадания ПП в опухоль, в связи с чем для обеспечения достаточно высокой концентрации препарата в опухоли липосомы с препаратом должны длительно циркулировать в кровотоке. Однако за это время значительное число липосом элиминируется клетками ретикуло-эндотелиальной системы и поэтому лишь часть введенного препарата оказывается в опухоли. Например, при введении доксила в опухоль накапливается менее 10% введенной дозы [42].

На эффективность доставки липосомальных ПП влияют характеристики липосом (размер, пластинчатость, поверхностный заряд, текучесть мембраны и другие факторы), которые могут быть модифицированы варьированием состава липидной композиции и/или способа ее получения.

Модификация поверхностей липосом различными функциональными лигандами, например, полиэтиленгликолем, уменьшает взаимодействие между поверхностью липосом и компонентами крови, что обеспечивает более длительное пребывание липосом в кровотоке. Поверхностная модификация липосом специфическими лигандами усиливает активное таргетирование препарата. Поскольку в качестве основных компонентов липосомальной мембраны используются природные молекулы, такие как фосфолипиды и холестерин, липосомы обычно классифицируются как биосовместимые [33, 42].

Примером таргетной доставки липосом могут, например, быть липосомы, в ядро которых инкорпорированы доксорубин или паклитаксел, а поверхность модифицирована трастузумабом — моноклональным антителом к рецептору эпидермального фактора роста (HER2), гиперэкспрессия которого характерна для ряда опухолей. В предклинических исследованиях показано, что при HER2-положительном РМЖ эти НЧ более эффективны и менее токсичны по сравнению с применением этих ПП в стандартной лекарственной форме [2].

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, практически все НСН ПП, разрешенные для

практического применения, представляют собой липосомы. Значительное число новых липосомальных ПП находятся на разных этапах доклинического и клинического изучения.

Ведутся исследования по разработке липосом со встроенными в липидный бислой веществами, которые выступают в роли молекулярных переключателей, реагирующих на внутриопухолевые (рН, температура, ферменты, ионы) или внешние (тепло, свет, ультразвук, магнитные поля и др.) стимулы. В результате этих воздействий происходит изменение конформации молекулярного переключателя, что приводит к разрыву липидного бислоя и высвобождению инкапсулированного вещества. Одним из преимуществ такой системы доставки считается возможность повысить селективность доставки лекарственного агента в опухоль и увеличить его внутриопухолевую концентрацию за счет высвобождения препарата уже в сосудистой сети опухоли, что ведет к быстрому и более значительному попаданию препарата в опухолевую клетку и увеличению глубины его проникновения в опухоль [4, 33, 42–44].

Большое внимание уделяется разработке термочувствительных липосом (ТЧЛ), свойства которых меняются при нагревании. При температуре фазового перехода структура липидного бислоя таких липосом из твердой гелевой фазы переходит в жидкокристаллическую и мембрана становится более проницаема для воды и гидрофильных препаратов [33].

В большинстве ТЧЛ в качестве основного компонента используется 1,2-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, температура фазового перехода для которого составляет 41.4°C. Варьировать эту температуру можно, смешивая данный фосфолипид с другими фосфолипидами; состав смешиваемых фосфолипидов будет определять температуру фазового перехода мембраны липосомы. Помимо фосфолипидной композиции, высвобождение лекарственного средства из ТЧЛ в некоторой степени зависит от инкапсулированной молекулы лекарственного средства, размера липосомы, способа создания в опухоли гипертермии.

ТЧЛ могут быть получены включением в липидный бислой термочувствительных полимеров. Показана, в частности, высокая цитотоксичность паклитаксела, включенного в такие липосомы [45].

Преимуществом ТЧЛ перед обычными считается быстрое внутрисосудистое высвобождение ПП под действием гипертермии в отличие от интерстициального высвобождения из традицион-

Таблица 2. Наноструктурированные противоопухолевые препараты, разрешенные для практического применения [34, 39, 40]

Наименование лекарственной формы препарата	Препарат	Наноноситель активного препарата	Показания к применению
Doxil/Kelix	Доксорубицин	Пегелированные липосомы	РМЖ, рак, яичников, меланома
DaunoXome	Даунорубомицин	Липосомы	Саркома Капоши
Myocet	Доксорубицин	Липосомы	РМЖ
Lipusu	Паклитаксел	Липосомы	РМЖ, немелкоклеточный рак легкого
AbraXane	Паклитаксел	Конъюгат с альбумином	РМЖ, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого
Genexol-PM	Паклитаксел	Полимерные мицеллы	Немелкоклеточный рак легкого
MEPACT	Мифамуртид	Липосомы	Остеосаркома
Marqibo	Винкристин	Липосомы	Острый лимфобластный лейкоз
PICN	Паклитаксел	Полимер/липидные наночастицы	РМЖ
Onivyde (MM-398)	Иринотекан	Пегелированные липосомы	Рак поджелудочной железы
VYXEOS	Циторабин/даунорубицин	Липосомы	Острый миелобластный лейкоз
Paclical	Паклитаксел	Полимерные мицеллы	Рак яичников
DHP107	Паклитаксел	Липидные наночастицы	Рак желудка
Nanoxel	Паклитаксел	Полимерные мицеллы	РМЖ, рак яичников
Depocyt	Цитарабин	Липосомы	Острый нелимфоцитарный лейкоз, менингеальный лейкоз, лимфоматозный менингит
Lipoplatin	Цисплатин	Липосомы	Рак поджелудочной железы, аденокарцинома легких
CPX-351	Дауномицин/циторабин	Липосомы	Острый миелобластный лейкоз

ных липосом. В результате создаются высокие внутрисосудистые концентрации ПП, что ведет к усилению проникновения ПП в клетку, так как при этом удается избежать ограничений, обусловленных гетерогенностью сосудистой сети опухоли и, тем самым, ограничения в реализации эффекта EPR [33, 43].

Влияние инкапсуляции в ТЧЛ разных композиций исследовано для ряда ПП — доксорубина, гемцитабина, паклитаксела, цисплатины, оксалиплатина, метотрексата, идарубина [7, 33, 42, 46].

Например, внутривенное введение мышам с ксенографтами гиподарингиального рака человека линии FaDu ТЧЛ с доксорубином после

предварительного локального нагревания опухоли до 40–42°C привело к увеличению содержания доксорубина в опухоли в 30 раз по сравнению с применением свободного доксорубина и в 3–5 раз по сравнению со стандартной липосомальной формой доксорубина (доксилон). Это коррелировало со значительным увеличением эффекта. О роли нагревания свидетельствовали результаты экспериментов с фибросаркомой крыс, в которых показано, что эффективность введения ТЧЛ с доксорубином после гипертермии в два раза превосходила эффективность при введении ТЧЛ до нагревания [43]. При сочетании гипертермии с введением ТЧЛ с гемцитабином эффект был достоверно больше, чем при применении липосомального гемцитабина без гипертермии [47].

ПП, включенные в ТЧЛ, быстро выделяются из них. Например, при нагревании высокосфокусированным ультразвуком при температуре $\sim 42^\circ\text{C}$ ТЧЛ, с мембраной которых был связан SN-38, а в ядро инкапсулирован карбоплатин, цитостатики выделялись менее чем за 3 мин [40]).

Определенным ограничением для практического использования ТЧЛ является необходимость применения довольно высоких температур ($\geq 40^\circ\text{C}$), что обусловило попытки разработать низкотемпературные термочувствительные липосомы (НТ-ТЧЛ), работающие при меньшем нагревании [33, 46].

В качестве одного из подходов к решению этой задачи можно привести пример разработки НТ-ТЧЛ путем включения в мембранный бислой ТЧЛ лизолипидов — фосфолипидов, у которых один из жирнокислотных остатков замещен атомом водорода, что меняет структуру мембран из-за образования лизофосфотидилхолинов. В результате усиливается высвобождение лекарственного средства при меньшем нагревании из-за образования лизолипид-стабилизированных мембранных пор. Например, высвобождение доксорубина из НТ-ТЧЛ при 41.3°C за 20 с составило 80%, а из обычных ТЧЛ за 30 мин нагревания при 42°C — только 40% [42, 46, 48].

Показано, что внутривенное введение доксорубина в составе НТ-ТЧЛ в сочетании с гипертермией привело к достижению более высоких концентраций доксорубина в опухоли, чем введение такой же дозы свободного доксорубина, также в сочетании с гипертермией [46].

Противоопухолевая эффективность системного введения цитостатика, инкапсулированного в НТ-ТЧЛ, в сочетании с гипертермией изучена в экспериментах *in vivo* на перевиваемых опухолях животных и ксенографтах опухолей человека. Применение такого рода комплексного воздействия вызывало более значительное торможение роста опухолей и частоту их полных регрессий, чем использование доксорубина в стандартной лекарственной форме [42, 46, 48, 49, 50].

Однако результаты клинических испытаний оказались разочаровывающими.

Эффективность терапии с применением НТ-ТЧЛ была оценена в семи клинических исследованиях, в которые было включено более 1000 больных. В двух наиболее крупных исследованиях (ОРТИМА — 550 пациентов и НЕАТ — 700 пациентов) изучалась эффективность сочетания «НТ-ТЧЛ — доксорубин» с радиочастотным нагреванием опухоли у больных с первичным и метастатическим раком печени. Установлено, что по основным критериям эффективности — время до прогрессирования

опухолевого процесса и общая выживаемость — группы больных, получавших комбинированное лечение или только радиочастотную абляцию опухоли, практически не различались [48].

Солідные липидные наночастицы предлагается использовать в качестве НСН для липофильных ПП. Солідные липидные наночастицы представляют собой смесь наноструктурированных твердых и жидких липидов, которые позволяют увеличивать загрузку лекарственного средства и замедлять его высвобождение в ткани-мишени. В отличие от липосом липидные наночастицы имеют мицеллеобразную структуру с неводным ядром, куда инкорпорируется препарат.

Более высокая эффективность по сравнению со стандартными лекарственными формами показана для липидных наночастиц, нагруженных митоксантроном, доксорубицином или идарубицином на клетках лимфолейкоза мышей P388, в том числе резистентных к доксорубину [2, 51], для липидных наночастиц с включенными в них этопозидом и куркумином, на клетках рака желудка человека линии SGC7901 [52], для липидных наночастиц, содержащих этопозид и цисплатину — на клетках A549 [53].

Природные экзосомы, имеющие биполярную мембрану, сходную с плазматической мембраной, исследуются в качестве НСН ПП липидной природы.

Природные экзосомы обладают высокой биосовместимостью, способны избегать иммунные клетки и быстро метаболизироваться в опухолевых клетках, высвобождая включенный в них цитостатик.

На клетках остеосаркомы человека линии MG63 была показана более высокая цитотоксичность экзосом, нагруженных доксорубицином, по сравнению со свободным доксорубицином.

Однако сложности с получением экзосом, которые наиболее часто выделяют из мезенхимальных стволовых клеток, и их очисткой пока не позволяют провести широкое изучение этих липидных носителей [2, 38, 54].

Конъюгаты лекарственной субстанции с полимерами и белками также исследуются в качестве НСН ПП. В этих системах обычно используются хорошо растворимые белки и полимеры, что ведет к улучшению растворимости липофильных лекарственных средств. Конъюгирование с макромолекулярными носителями изменяет скорость выведения препарата из организма, обеспечивает возможность его высвобождения в течение длительного времени [55].

Лекарственное средство может быть ковалентно связано с полимером (конъюгаты полимера с

лекарственным веществом), либо нековалентно (дендримеры, полимерные мицеллы, полимерные липосомы и др.).

Разработано и изучено большое число конъюгатов разнообразных полимеров с рядом цитостатиков (доксорубицин, цисплатина, карбоплатин, оксалиплатин, камптотецин, иринотекан) [23, 55].

Наиболее широко изучены конъюгаты «полимер–цитостатик», основанные на полиэтиленгликоле, что обусловлено рядом уникальных свойств этого разрешенного для медицинского применения полимера (отсутствие иммуногенности, антигенности и токсичности, высокая растворимость в воде).

Для ряда конъюгатов полиэтиленгликоль с ПП (камптотецин, SN38, иринотекан) в предклинических исследованиях зарегистрированы существенные преимущества перед стандартными лекарственными формами ПП. Эти конъюгаты прошли вторую фазу клинических испытаний, однако в клиническую практику не вошли, вероятно из-за недостаточной эффективности при лечении пациентов с разными опухолями (РМЖ, рак желудка, яичников, шейки матки, колоректальный рак [23].

Большое внимание уделяется использованию в качестве полимерных носителей ПП разных сополимеров. Получены, например, конъюгаты N-(2-гидроксипропил) метакриламида с доксорубицином, паклитакселом, цисплатином; поли(1-глутаминовой кислоты) с паклитакселом, камптотецином и некоторыми другими цитостатиками [2, 23].

Особое внимание привлекает сополимер полимолочной и гликолевой кислот (PLGA), поскольку это вещество уже применяется в различных лекарственных средствах, в том числе для парентерального введения [56]. Для PLGA, представляющего собой синтетический полиэфир, характерны хорошая биосовместимость и биodeградация; в водной среде *in vivo* под действием эстеразы сополимер распадается на молочную и гликолевую кислоты, которые окончательно метаболизируются в цикле Кребса до CO₂ и H₂O [57, 58]. Получены и изучаются в предклинических и клинических исследованиях НЧ PLGA, несущие разные ПП (цисплатин, карбоплатин, доцетаксел, камптотецин). Применение этих ПП в составе НЧ PLGA привело к увеличению их цитотоксичности и противоопухолевой активности по сравнению со стандартными лекарственными формами [23, 58–62].

Эффективность включения цитостатика в PLGA зависит от строения препарата. При изучении цитотоксичности четырех производных кар-

боплатина (клетки A549, H69, MCF-7) обнаружена зависимость между химической структурой лиганда в этих производных и их цитотоксичностью. Для двух производных инкорпорация в PLGA привела к усилению цитотоксичности, а для двух других не повлияла на их эффективность [58].

С поверхностью PLGA легко можно конъюгировать различные лиганды, в том числе способствующие таргетной доставке НЧ из сополимера с включенным в них цитостатиком к опухолевой клетке. Например, к НЧ PLGA с инкорпорированным паклитакселом конъюгировали рекомбинантный третий домен альфа-фетопротейна в качестве вектора для таргетной доставки НЧ к опухолевым клеткам с гиперэкспрессией рецептора альфа-фетопротейна. На ксенографтах рака яичников человека линии SKOV-3 и на перевиваемом РМЖ 4T1 мышей зарегистрирована более высокая эффективность этих НЧ по сравнению с применением «чистого» паклитаксела и НЧ с паклитакселом без альфа-фетопротейна [63].

Более высокий цитостатический эффект НЧ PLGA, конъюгированных с фолатом и с инкорпорированными доцетакселем и куркумином, по сравнению с наночастицами PLGA с этими цитостатиками, но без фолата, зарегистрирован на клетках A549, а более значительный противоопухолевый эффект — на перевиваемой саркоме S180 мышей [64].

Инкорпорирование в ядро PLGA цисплатина и каталазы привело к усилению цитотоксичности за счет одновременного действия цитостатика и оксидативного стресса. После попадания НЧ в клетку в нее проникает H₂O₂, под действием каталазы образуется O₂, повышается давление в НЧ, она лопается, высвобождая цисплатин и O₂, который инициирует оксидативное повреждение клетки [65].

НЧ из сополимера поли(ε-капролактон)-поли(этиленгликоль), конъюгированные с трастузумабом и анти-миРНК-21, оказывали более значительное цитостатическое и противоопухолевое действие на клетки рака желудка с гиперэкспрессией HER2 линии NUGC4 по сравнению с действием «чистых» трастузумаба и анти-миРНК-21. На клетках SGC7901 без экспрессии HER2 подобного эффекта не регистрировали [66].

В качестве наноразмерных систем доставки лекарственных препаратов предложено использовать трехблочные сополимеры поли-оксидиэтилена и поли-оксидипропилена. Эти НЧ с включенным в них доксорубицином (препарат SP1049C) в рамках клинических испытаний применили у 21 больного раком пищевода и зарегистрировали у 9 пациентов (43%) частичную ре-

грессию опухоли со средней длительностью ремиссии 6,6 месяца [67].

Мицеллярные наноразмерные лекарственные средства являются одной из форм НСН на основе сополимеров, которые в основном состоят из блок-сополимеров с гидрофильными и гидрофобными блоками, обладающих способностью к самосборке в НЧ с гидрофобным ядром, окруженном гидрофильной оболочкой. Мицеллярная инкапсуляция помогает солюбилизировать, стабилизировать и доставить гидрофобный ПП к цели. При попадании в целевую ткань мицеллы способны распадаться на более низкомолекулярные структуры, что позволяет удалять составляющие мицеллу поверхностно-активные вещества из организма.

Получены и исследованы мицеллы с включенными доксорубицином, паклитакселем, цисплатином.

Интрацеллюлярное распределение доксорубина в составе мицелл различалось в чувствительных и резистентных клетках — в чувствительных клетках доксорубин обнаруживался преимущественно в ядре, в резистентных — в митохондриях. Для некоторых из этих препаратов начаты клинические испытания [4, 23, 55].

Сообщается о результатах второй фазы клинического изучения препарата Genexol-PM, представляющего собой паклитаксел, включенный в мицеллы. Применение такой мицеллярной формы препарата позволило избежать премедикации, обязательной при лечении паклитакселем. Полные ремиссии зарегистрированы у пяти, частичные у 19 из 41 больной распространенным РМЖ, получивших в среднем восемь циклов лечения этим препаратом [68].

Конъюгаты «цитостатик–белок» являются еще одной формой НСН для ПП.

Наиболее изученным ПП с такой структурой является абраксан, представляющий собой нанодисперсный паклитаксел, стабилизированный альбумином, с размером НЧ 130 нм, в составе которых паклитаксел находится в некристаллическом (аморфном) состоянии. После внутривенного введения НЧ быстро диссоциируют с образованием растворимых комплексов паклитаксела, связанного с альбумином. Показано, что присутствие альбумина стимулирует транспорт паклитаксела через слой клеток эндотелия, поскольку альбумин регулирует процессы трансэндотелиального переноса компонентов плазмы [36].

Сообщается о разработке нанокристаллического паклитаксела, покрытого альбумином сыворотки крови человека. Полученные НЧ имели форму стержня и содержали $88.7 \pm 2.5\%$ пакли-

таксела. При сравнении с абраксаном выявлены меньшее поглощение макрофагами, более длительный период диссоциации НЧ в сыворотке, что предполагает более длительную циркуляцию НЧ в кровотоке. Зарегистрирована сопоставимая цитотоксичность обеих наноформ препарата *in vitro* на клетках меланомы мышей B16F10 и более высокая противоопухолевая активность нанокристаллического паклитаксела по сравнению с абраксаном на трансплантированной меланоме B16F10 мышей *in vivo* [69].

Усиления таргетной доставки НЧ с ПП можно добиться путем образования конъюгата НЧ, содержащих цитостатик, с моноклональным антителом, специфичным к рецепторам на поверхности опухолевых клеток. Получено несколько разных НЧ, в состав которых инкорпорированы доксорубин или паклитаксел, а поверхность модифицирована трастузумабом — моноклональным антителом к рецептору HER2. Показано, что при РМЖ с гиперэкспрессией HER2 эти конъюгаты более эффективны и менее токсичны, чем ПП в стандартной лекарственной форме [2].

Дендримеры также относящиеся к полимерным НСН лекарственных препаратов, представляют собой трехмерные глобулярные полимерные макромолекулы с определенной, сильно разветвленной, структурой, обладающие центральным ядром, из которого берут начало многочисленные ветви с обширным разветвлением. На концевых участках разветвлений могут располагаться амино- ($-\text{NH}_2$), гидроксильные ($-\text{OH}$), карбоксильные ($-\text{COOH}$) группы. К концевым участкам разветвлений могут быть ковалентно или нековалентно присоединены биологически активные молекулы, лекарственные соединения, контрастные вещества и прочие субстанции [70, 71].

Синтез дендримеров основан на повторяющейся последовательности нескольких реакций. Каждое дублирование приводит к синтезу все более высокой генерации дендритной структуры и удвоению количества активных групп на поверхности молекулы. В результате обеспечивается однородное и равномерное разветвление молекул, образование специфических групп на поверхности, низкий индекс поли дисперсности и уникальный размер молекул [70, 71].

Структурная универсальность и легко контролируемые характеристики дендримеров (контролируемый и регулируемый размер, форма, длина ветвей, функциональность поверхности, синтез целевых дендритных каркасов, взаимодействие с клеточными мембранами и молекулами разных лекарств, наличие внутренних полостей) делают дендримеры идеальными носителями ПП. Денд-

примеры обладают рядом преимуществ перед другими наносителями — высокая загрузочная способность из-за наличия многочисленных функциональных групп и внутренних полостей, повышение биодоступности ПП, способность проникать через биологические барьеры и мембраны [70, 72].

Существует два основных подхода к синтезу дендримеров, использующих соответственно дивергентные и конвергентные методы.

В дивергентном варианте к исходному центру ветвления (имеет несколько концевых групп) присоединяется базовый реагент (который также имеет несколько концевых групп) и образуется дендример первой генерации. Дендримеры следующих генераций получают путем присоединения либо исходного ветвящегося центра, либо базового реагента.

В конвергентном методе сначала синтезируются и затем соединяются плечи дендримера. С возрастанием числа генераций плотность упаковки молекул в поверхностной области дендримера увеличивается, что тормозит их дальнейший рост. В результате молекулы дендримеров могут синтезироваться только до десятого поколения [2, 6, 71, 79].

Создано более 100 семейств дендримеров различных типов — фосфорные (Р-дендримеры), полиамидоаминные (РАМАМ), полиаминные, полиамидные, полипептидные, полиэфирные (PGLSA-OH), карбосиликатные, дендримеры поли-L-лизина и другие [70, 72].

Наиболее широко используемыми дендримерами в настоящее время являются коммерчески доступные РАМАМ-дендримеры, характерной особенностью которых является структура, состоящая из ядра в виде аммиака или этилендиамина и присоединенных молекул метилакрилата и этилендиамина. Благодаря специфическому, характерному строению с областями свободных пространств (полостей) эти дендримеры можно использовать в качестве носителей для ПП, при этом они могут быть размещены либо на поверхности дендримера в результате ковалентной связи с группами на концевых участках разветвлений, либо внутри его в результате инкапсуляции в полостях дендримера [70, 73].

Размер дендримеров зависит от их генерации и плотности упаковки молекул на поверхности — диаметр РАМАМ-дендримеров первой генерации (G1) составляет 1.1 нм, последующих генераций: G2 — 2.0 нм, G3 — 3.1 нм, G4 — 4.0 нм, G5 — 5.3 нм, G6 — 6.7 нм, G7 — 8.0 нм, G10 — 12.4 нм [71, 73].

Описаны и изучены конъюгаты разных дендримеров с различными ПП (доксорубицином, па-

клитакселом, трастузумабом, метотрексатом, цисплатиной, 5-фторурацилом, темозоломидом, цетуксимабом, мелфаланом, иматинибом, сунитинибом) [70–72, 74].

Эффективность ПП, загруженных в дендримеры, зависит от генерации этих дендримеров. При инкубации клеток MCF-7 с полипропиленовыми дендримерами, модифицированными фолиевой кислотой и загруженными мелфаланом, коэффициент цитотоксичности IC_{50} для дендримеров G3 составил 8.00 ± 0.15 мкм, для дендримеров G4 — 0.90 ± 0.02 мкм, для дендримеров G5 — 0.20 ± 0.01 мкм, для свободного мелфалана — 10.00 ± 0.17 мкм. Медиана жизни мышей с ксенографтами MCF-7, получавших эти дендримеры разных генераций, составила 23, 59, 62 и 25 суток соответственно [75].

Большое внимание уделяется разработке дендримеров, содержащих помимо ПП молекулы, обеспечивающие таргетную доставку этих дендримеров.

РАМАМ-дендримеры G4, к которым присоединен паклитаксел с помощью пептидного линкера, *in vivo* расщепляющегося ферментом катепсином В, более эффективно ингибировали рост ксенотрансплантатов РМЖ линии MDA-MB-231 по сравнению с «чистым» паклитакселом [74].

РАМАМ-дендримеры с загруженным доксорубицином конъюгировали с трастузумабом и после четырехчасового культивирования в клетках HER2 положительного РМЖ MDA-MB-453 регистрировали 70%-е увеличение поглощение дендримеров по сравнению с вариантом без трастузумаба. В клетках HER2 отрицательного РМЖ линии MDA-MB-231 подобной разницы не наблюдали. Цитотоксичность дендримеров с доксорубицином и трастузумабом в отношении клеток MDA-MB-453 более чем в три раза превышала цитотоксичность варианта с доксорубицином без трастузумаба, тогда как на клетках MDA-MB-231 цитотоксичность этих дендримеров оказалась одинаковой [74]. Аналогичные результаты получены при изучении РАМАМ-дендримеров, конъюгированных с трастузумабом и загруженных доцетакселом или цисплатином [76, 77].

Инкубация клеток рака назофарингиального рака человека линии KB, экспрессирующих рецепторы фолиевой кислоты, с РАМАМ-дендримерами G5, модифицированными фолиевой кислотой и конъюгированными с доксорубицином с помощью pH-чувствительного линкера, привела к гибели 87.6% клеток. Гибель KB-клеток без гиперэкспрессии рецепторов составила 78.1%. При исследовании кинетики высвобождения доксорубина из этих дендримеров установлено, что после их 48-часовой инкубации в среде с pH 5.0

обнаружено 95.6% свободного доксорубина, в среде с pH 7.4% – 20% [78].

Попадание РАМАМ-дендримеров G4, модифицированных биотином и конъюгированных с паклитакселом, в клетки рака яичников человека линии OVCAR-3 было достоверно больше по сравнению с нормальными клетками почек эмбриона человека (HEK293T). Цитотоксичность и противоопухолевая эффективность в отношении клеток OVCAR-3 (с гиперэкспрессией мезотелина) полипропилениминовых дендримеров G4,5, загруженных паклитакселом и модифицированных моноклональным антителом к мезотелину (mAbK1), была достоверно выше цитотоксичности этих дендримеров с паклитакселом, но без mAbK1, и свободного паклитаксела [79].

При инкубации клеток MCF-7 в безглюкозной среде с РАМАМ-дендримерами, модифицированными глюкозой и конъюгированными с доксорубином, гибель клеток была значительно больше по сравнению с действием дендримеров без глюкозы и липосомного доксорубина. Авторы считают, что использование дендримеров, конъюгированных с глюкозой, может способствовать селективной доставке цитостатиков в опухолевые клетки, для которых характерен, в соответствии с эффектом Варбурга, дефицит глюкозы [80].

Сообщается о создании наноструктуры, в которой с поверхностью РАМАМ-дендримеров G4 конъюгированы одновременно два пептида в качестве векторных молекул для селективной доставки дендримеров в опухолевые клетки: пептид, связывающийся с В-селектином, продуцируемым эндотелиальными клетками, гиперэкспрессия которого характерна для опухолевой ткани, и пептид, связывающийся с рецептором α -фетопротейна. В экспериментах с клетками рака яичников SCOV-3 показана высокая степень интернализации этого дендримера, в опытах *in vivo* установлена селективность накопления дендримеров в опухоли [81].

Способность дендримеров к восприятию загрузки одновременно несколькими цитостатиками указывает на потенциальную возможность использования такого рода наноструктур в комбинированной терапии опухолей.

В РАМАМ-дендримеры G4, модифицированные гиалуроновой кислотой, с помощью ковалентной конъюгации ввели цисплатин и доксорубин в состав адресной системы доставки и показали более высокую противоопухолевую активность дендримеров при раке РМЖ MDA-MB-231 по сравнению с комбинированным применением этих препаратов в стандартной лекарственной форме [82].

Высокая противоопухолевая эффективность комплекса доксорубина с полипропилениминовыми дендримерами G6, обладающего антиангиогенной активностью, обнаружена в опытах со сфероидными раком предстательной железы DU145 *in vitro*, а также с ксенографтами рака легкого Calu-6 и трансплантатами меланомы B16F10 *in vivo* [83].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В истории лекарственного лечения злокачественных опухолей можно выделить несколько этапов. Каждый следующий этап начинается с появления новых подходов к лечению и новых классов ПП, что поднимает эффективность лечения на принципиально новую, более высокую, ступень. Так происходило при появлении вначале алкилирующих препаратов и антиметаболитов, затем производных нитрозомочевины и антрациклинов, далее препаратов цисплатины и таксанов, при возникновении современного этапа таргетной терапии и иммунотерапии.

Возможно, появление наноструктурированных препаратов свидетельствует о появлении нового этапа в истории развития лекарственного лечения опухолевых заболеваний.

Можно полагать, что использование нанотехнологий позволит получать лекарственные препараты, взаимодействующие с иными мишенями и имеющие иные механизмы действия, что может привести к появлению принципиально новых ПП. Важно отметить, что применение ПП в форме НЧ может привести к появлению лекарств, эффективных при опухолях, рефрактерных или малочувствительных к традиционным средствам, что является одной из главных задач современной противоопухолевой терапии.

Очевидно, что уже накопленный опыт клинического применения десятка наноструктурированных ПП указывает на реальность этих предположений.

В то же время результаты огромного числа исследований в этой области указывают на значительные технологические и биологические трудности, которые могут возникнуть при разработке наноструктурированных препаратов, имея в виду не только их получение (синтез) и масштабирование производства, но и стабильность и длительность сохранности, а также оценку терапевтической ценности с точки зрения соотношения эффективности и токсичности, в том числе обусловленной специфическими особенностями наноматериалов, и стоимости лечения такими препаратами.

Дальнейшее развитие нанотехнологий, как можно полагать, будет способствовать преодолению этих трудностей и наноструктурированные ПП войдут в арсенал лекарственных средств, применяемых в практической медицине для лечения больных опухолевыми заболеваниями.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. DeYong and P. J. Borm, *Int. J. Nanomedicine*, **3**, 133 (2008). DOI: 10.2147/ijn.S596
2. S. Cavas, S. Quazi, and T. M. Karpinski, **16**, 173 (2021). DOI: 10.1186/s11671-021-03628-6
3. J. Fang, H. Makamura, and H. Maeda, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **63**, 136 (2011). DOI: 10.1016/j.addr.2010.04.009
4. F. Farjadian, A. Ghasemi, O. Gohari, et al., *Nanomedicine (Lond.)*, **14**, 93 (2019). DOI: 10.2217/nnm-2018-0120
5. S. Fu, G. Li, W. Zang, et al., *Acta Pharmaceut. Sinica B*, **12**, 92 (2022). DOI: 10.1016/j.apab.2021.08.012
6. V. V. Veselov, A. E. Nosyrev, L. Jicsnszky, et al., *Cancers (Basel)*, **14**, 622 (2022). DOI: 10.3390/cancers14030622
7. F. Farjadian, S. Ghasemi, M. Akbarian, et al., *Front. Chem.*, **10**, 952675 (2022). DOI: 10.3389/fchem.2022.952675
8. M. Y. Yang, R. R. Zhao, Y. F. Fang, et al., *Int. J. Pharm.*, **570**, 118663 (2019). DOI: 10.106/jij-pharm.2019.118663
9. H. Mei, S. Cai, D. Huang, et al., *Bioact. Mater.*, **8**, 220 (2022). DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.06.035
10. S. Jiang, Y. Fu, X. Zhag, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 799806 (2021). DOI: 10.3389/fbioe.2021.799806
11. R. Fan, W. Sun, T. Zhang, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **150**, 113017 (2022). DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113017
12. J. Zhang, S. Li, F. F. An, et al., *Nanoscale*, **7**, 13503 (2015). DOI: 10.1039/c5nr03259h
13. R. Zhang, Z. Zhu, H. Ly, et al., *Small*, **49**, e1903881 (2019), DOI: 10.1002/smll.201903881
14. N. Yu, J. Li, Y. Zhang, et al., *RSC Adv.*, **10**, 12999 (2020). DOI: 10.1039/d0ra01117g
15. J. Zhang, W. Nie, R. Chen, et al., *ACS Nano Lett.*, **19**, 658 (2019). DOI: 10.1021/acs.nanolett.8603043
16. S. Barua and S. Mitragris, *ACS Nano*, **7**, 9558 (2013). DOI: 10.1021/nn403913k
17. M. Zhou, X. Zhang, Y. Yang, et al., *Biomaterials*, **34**, 8960 (2013). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.080
18. Y. Zhao, F. Chen, Y. Pan, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **7**, 19295 (2015). DOI: 10.1021/acsa-mi.5b05347
19. L. Fan, B. Zhang, A. Xu, et al., *Mol. Pharm.*, **15**, 2466 (2018). DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00444
20. Z. Zhang, L. Xhi, C. Wu, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 29505 (2017). DOI: 10.1021/acsa-mi.760756s
21. Y. Zheng, Y. Zhao, Y. Jia, et al., *Biomaterials*, **271**, 120716 (2021). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120716
22. J.S. Lan, Y.H. Qin, L. Liu, et al., *Int. J. Nanomed.*, **16**, 1775 (2021). DOI: 10.2147/IJM.S287806
23. S. Parveen, F. Arjmand, and S. Tabassum, *RSC Adv.*, **9**, 24699 (2019). DOI: 10.1039/c9ra04358f
24. M. Bai, M. Yang, J. Gong, et al., *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **23**, 41 (2021). DOI: 10.1208/s12249-021-02200-w
25. E. Merisko-Liversidge, G. Liversidge, and E. R. Cooper, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, **18**, 113 (2003). DOI: 10.1016/S0928-0987(0)00257-8
26. J. U. Junghanns and R. N. Muller, *Int. J. Nanomedicine*, **3**, 295 (2008). DOI: 10.2147/ijn.s595
27. R. N. Muller, S. Gohia, and C. M. Keck, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, **78**, 1 (2011). DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.01.07
28. V. P. Pardhi, T. Verma, S. A. Flora, et al., *Curr. Pharmaceut. Design*, **24**, 5129 (2018). DOI: 10.2174/1381612825666190215121148
29. Y. Zhang, C. Yang, W. Wang, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 21225 (2016). DOI: 10.1038/srep.21225
30. J. Gao, Z. Qiao, S. Liu, et al., *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, **163**, 188 (2021). DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.04.008
31. L. Yang, J. Xu, Z. Xie, et al., *Asian J. Pharm. Sci.*, **16**, 762 (2021). DOI: 10.1016/j.ajps.2021.08.001
32. Y. Hong, S. Che, B. Hui, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **118**, 108614 (2019). DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108614
33. M. Amin, A. L. Seynhave, M. Sharif, et al., *Pharmaceutics*, **14**, 2165 (2022). DOI: 10.3390/pharmaceutics14102165
34. B. Zhao, S. Chen, Y. Hong, et al., *Pharmaceutics*, **14**, 1522 (2022). doi: DOI: 10.3390/pharmaceutics14071522
35. A. G. Attanja, V. Pathak, T. Lammers, et al., *Pharmacol. Res.*, **115**, 87 (2017). DOI: 10.1016/j.phrs.2016.11.014

36. M. Ramachandran, Z. Ma, K. Lin, et al., *Nanoscale Adv.*, **4**, 4470 (2022). DOI: 10.1039/d2na004885b
37. B. Li, H. Shao, L. Gao, et al., *Drug Deliv.*, **29**, 213 (2022). DOI: 10.1080/10717544.2022.2094498
38. R. Tenchov, J. M. Sasso, X. Weng, et al., *ACS Nano*, **16**, 17802 (2022)
39. A. C. Anselmo and S. Mitragotri, *Bioeng. Translation Med.*, **1**, 10 (2016), DOI: 10.1002/btm2.10003
40. R. Cressey, V. Amrahli, and P. W. So, *Biomaterials*, **271**, 120758 (2021). DOI: 10.1016/biomaterials.2021.120758
41. J. Meng, F. Guo, H. Xu, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 22390 (2016). DOI: 10.1038/srep22390
42. B. Kneidl, M. Peller, G. Winter, et al., *Int. J. Nanomedicine*, **9**, 4387 (2014). DOI: 10.2147/IJN.S49297
43. A. A. Manzoor, L. H. Lindner, C. D. Landon, et al., *Cancer Res.*, **72**, 5566 (2012). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1683
44. S. H. Pham, Y. Choi, and J. Choi, *Pharmaceutics*, **12**, 630 (2020). DOI: 10.3390/pharmaceutics12070630
45. L. Xi, C. Li, Y. Wang, et al., *J. Pharm. Sci.*, **109**, 2544 (2020). DOI: 10.1016/j.xphs.2020.05.006
46. C. D. Landon, J. Y. Park, D. Needham, and M. W. Dewhirst, *Open Nanomed. J.*, **3**, 38 (2011). DOI: 10.2174/18759335011030100038
47. S. Limmer, J. Hahn, R. Schmidt, et al., *Pharm. Res.*, **31**, 2276 (2014). DOI: 10.1007/s11095-014-1322-6
48. N. Boris and M. W. Dewhirst, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **178**, 113985 (2021). DOI: 10.1016/j.addr.2021.113985
49. P. S. Yarmolenko, Y. Zhao, C. Landon, et al., *Int. J. Heperthermia*, **26**, 485 (2010). DOI: 10.3109/12656731003789284
50. S. Wang, X. G. Mei, S. N. Goldberg, et al., *Radiology*, **279**, 762 (2016). DOI: 10.1148/radiol.2015150787
51. K. Chandana, N. Gupta, and S. Kanna, *Asian J. Pharmaceut. Clin. Res.*, **12**, 8, 2019. DOI: 10.2215/ajpcr.2019.v12i7.33595
52. H. Jiang, D. Geng, H. Liu, et al., *Drug Delivery*, **23**, 3665 (2016). DOI: 10.1080/10717544.2016.1217954
53. M. Du and J. Jin, *Drug Des. Devel. Ther.*, **16**, 4139 (2022). DOI: 10.2147/DDDT.S386100
54. H. Wei, J. Chen, S. Wang, et al., *Int. J. Nanomed.*, **14**, 8603 (2019). DOI: 10.2147/IJN.S218988
55. X. Xiao, F. Terng, C. Shi, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 1024143 (2022). DOI: 10.3389/fbio.2022.1024143
56. Y. Wang, B. Qin, G. Xia, and S. Choi, *AAPS J.*, **23**, 92 (2021). DOI: 10.1208/S12248-021-00611-y
57. M. R. Mollaeva, E. D. Nikolskaya, V. Beganovskaya, et al., *Antioxidants*, **10**, 1985 (2021). DOI: 10.3390/antiox10121985
58. M. B. Sokol, M. V. Chirkina, N. G. Yabbarov, et al., *Pharmaceutics*, **14**, 2333 (2022). DOI: 10.3390/pharmaceutic.s14112333
59. Е. Д. Никольская, О. А. Жунина, Н. Г. Яббаров и др., *Биоорг. химия*, **43**, 274 (2017).
60. Е. Д. Никольская, О. А. Жунина, Е. А. Василенко и др., *Биоорг. химия*, **43**, 532 (2017).
61. Е. Д. Никольская, О. А. Жунина, Н. Г. Яббаров и др., *Изв. РАН, сер. хим.*, № 10, 1867 (2017).
62. M. B. Sokol, E. Nikolskaya, N. G. Yabbarov, et al., *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **107**, 1150 (2018). DOI: 10.1002/jbm.d.34208
63. M. B. Sokol, N. G. Yabbarov, M. R. Mollaeva, et al., *Nanomed. (Lond.)*, **17**, 1217 (2022). DOI: 10.2217/nnm-2022-0097
64. L. Hu, S. Pang, Q. Hu, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **75**, 26 (2015). DOI: 10.1016/j.biopha.2015.08.036
65. H. Chen, W. He, and Z. Guo, *Chem. Commun. (Camb)*, **50**, 9714 (2014). DOI: 10.1030/c4co03385
66. F. L. Wu, J. Zhang, W. Li, et al., *Oncotarget*, **8**, 67189 (2017). DOI: 10.18632/oncotarget.18066
67. J. W. Valle, S. T. Armstrong, C. Newman, et al., *Invest. New Drugs*, **29**, 1029 (2011). DOI: 10.1007/S10637-919-9399-1
68. K. S. Lee, Y. C. Chung, S. A. Im, et al., *Breast Cancer Res. Threat.*, **108**, 241 (2008). DOI: 10.1007/S10549-007-9591-y
69. J. Park, B. Sun, and Y. Yeo, *J. Control Release*, **263**, 90 (2017). DOI: 10.1016/J.jconrel.2016.12.040
70. A. P. Dias, S. da Silva Santos, J. V. da Silva, et al., *Int. J. Pharmaceut.*, **673**, 118814 (2020). DOI: 10.1016/j.ij-pharm.2019.118814
71. Z. Baber, D. Bartusir-Aebisher, and D. Aerbisher, *Molecules*, **27**, 3237 (2022). DOI: 10.3390/molecules27103237
72. A. A. Chis, C. Dobrea, O. Morgovan, et al., *Molecules*, **25**, 3982 (2020). DOI: 10.3390/molecules25173982
73. Н. Г. Яббаров, Е. Д. Никольская, О. А. Жунина и др., *Биоорг. химия*, **43**, 180 (2017). DOI: 10.7868/S013234231702021X
74. M. W. Amjad, *Pharmacy, Pharmacology*, **9**, 4 (2021). DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-1-4-16
75. P. Kesharwan, R. K. Tekade, and N. K. Jain, *Pharm. Res.*, **32**, 1438 (2015). DOI: 10.1007/s11095-014-1549-2
76. A. Kesevan, P. Ilaiyaraja, W. S. Beaula, et al., *Eur. J. Pharmaceut., Biopharmaceut.*, **96**, 255 (2015). DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.08.001
77. H. Kulhari, D. Pooja, and S. Shrivastava, *Sci. Rep.*, **6**, 23179 (2016). DOI: 10.1038/srep23179
78. M. Zhang, J. Zhu, Y. Zheng, et al., *Pharmaceutics*, **10**, 162 (2018). DOI: 10.3390/pharmaceutics10030162

79. N. K. Jain, M. S. Tare, V. Mishra, et al., *Nanomed: Nanotechnology, Biology, Medicine*, **11**, 207 (2015). DOI: 10.1016/j.nano.2014.09.006
80. K. Sztandera, P. Dzialak, M. Marcinko-Wska, et al., *Pharm. Res.*, **36**, 140 (2019). DOI: 10.1007/s11095-019-2673-9
81. N. Yabbarov, E. Nikolskaya, M. Sokol, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 3119 (2022). DOI: 10.33390/ijms23063119
82. X. L. Guo, X. X. Kang, Y. Q. Wang, et al., *Acta Biomater.* **84**, 367 (2019). DOI: 10.1016/j.actbio.2018.12.007
83. K. T. Al-Jamal, W. T. Al-Jamal, J. T. Wang, et al., *ACS Nano*, **7**, 1905 (2013). DOI: 10.1021/nn305860k

Nanotechnologies for Drug Therapy of Malignant Tumors

D.B. Korman*, L.A. Ostrovskaya*, N.V. Bluhterova*, V.A. Rikova*, and M.M. Fomina*

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

The review brings together experimental data from studies aimed to uncover the opportunities for application of nanotechnology in drug therapy of malignant tumors.

Keywords: nanoparticles, liposomes, polymers, micelles, dendrimers, cytotoxicity, antitumor activity, cell cultures of tumors, transplantable tumors

УДК 577.3

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ ИЗОФОРМ УРОМОДУЛИНА

© 2023 г. А.В. Яковлева^{*,#}, Н.А. Верлов^{**}, М.Г. Залеский^{*}, С.Б. Ланда^{*,**},
В.В. Шаповалов^{***}, В.Л. Эмануэль^{*}

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ,
ул. Льва Толстого, 6–8, Санкт-Петербург, 197022, Россия*

***Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»,
мкр. Орлова роща, 1, Гатчина, Ленинградская обл., 188300, Россия*

****Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина),
ул. Профессора Попова, 5, Санкт-Петербург, 197376, Россия*

#E-mail: gi_ns@mail.ru

Поступила в редакцию 30.12.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 11.01.2023 г.

Изучение изоформ уромодулина проведено различными биофизическими методами в условиях экспериментальных моделей мочеобразования (ионный состав, осмолярность, pH) при наличии интактного уромодулина и его изоформ, выделенного у больных уролитиазом. Проведена апробация модели медицинского изделия для скрининга лиц с доклинической формой уролитиаза. Выдвинута концепция таргетной терапии уролитиаза, основанной на модуляции свойств уромодулина.

Ключевые слова: уролитиаз, уромодулин, белок Тамма–Хорсфалла, динамическое светорассеяние, pH, катионы, осмолярность, лабораторная диагностика.

DOI: 10.31857/S0006302923030225, EDN: FTHEXU

Одним из видов гомеостаза является устойчивость коллоидного состояния биологических сред организма, нарушение которой приводит к образованию кристаллических тел — эндоцитогенезу [1].

Однако кристаллизация минеральных компонентов в моче возникает прежде всего при снижении ее коллоидной устойчивости, что подтверждается тем, что в моче здорового человека содержится существенно больше коллоидного материала, чем в моче больных мочекаменной болезнью [2].

Уникальные биофизические свойства уромодулина [3], его гелеобразная и/или молекулярная сито-подобная структура рассматривается как основа для обеспечения коллоидно-осмотических свойств мочи, которые и обуславливают способность ингибировать образование камней путем предотвращения адгезии кристаллоидов [4, 5].

Образование в моче гелеобразного осадка — криогеля под действием понижения температуры свидетельствует о присутствии в моче высокомолекулярного соединения [6]. В этой связи необходимо идентифицировать криогель с известными

диагностически значимыми белками мочи. Исследования, выполненные М.Г. Залеским [7] на 4155 пробах мочи доказали, что основные биохимические характеристики уромодулина и криогеля холодной пробы мочи совпадают: и тот и другой являются гликопротеидами богатыми сиаловыми кислотами, и уромодулин и криогель при изменении концентрации солей в моче одинаково проявляют свои свойства.

Для разработки доказательной базы таргетной терапии разработан дизайн, основанный на концепции патогенеза уролитиаза, как реализации посттрансляционных дефектов уромодулина с изменением его биофизических свойств, приводящих к снижению коллоидной устойчивости мочи.

Целью исследования явилось изучение биофизического феномена фазового перехода «золь–гель» изоформ уромодулина.

Задачи исследования:

1. Исследование биофизических свойств уромодулина в моделях мочи с различным ионным составом и наличием изоформ уромодулина, выделенного у здоровых лиц и пациентов с уролити-

азом, а в перспективе и различными вариантами патологии.

2. Верификация фотометрической технологии объективной регистрации фазового перехода «золь—гель» при стандартизованном процессе охлаждения мочи до 4°C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика клинических групп. В работе использован биоматериал, аликвотированный из биопроб пациентов, наблюдавшихся в специализированном урологическом отделении клиники Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского Университета им. акад. И.П. Павлова. Также был использован биологический материал аликвотированный из биопроб пациентов, проходящих обследование на базе Научно-методического Центра молекулярной медицины МЗ РФ. Банк образцов хранили при температуре -20°C. Верификацию диагноза проводили на основании комплекса клинических признаков и данных инструментального обследования. Комплекс лабораторной диагностики включал исследование мочевого синдрома, функционального состояния почек и микробиологическое исследование мочи. В исследуемую группу в подавляющем большинстве были включены пациенты с оксалатным уролитиазом. По данным общего анализа мочи были отобраны образцы с рН в пределах от 5.5 до 6.5; учитывались результаты «Литос-системы» [8]. Было обследовано 100 пациентов — 48 мужчин (48%) и 52 женщины (52%). Средний возраст больных составил 45.3 ± 9.8 лет. Контрольную группу составило 40 практически здоровых добровольцев — 20 женщин в возрасте от 19 до 52 лет и 20 мужчин в возрасте от 21 до 49 лет.

Аналитические методы исследований. Были использованы следующие методы:

1. Метод динамического светорассеивания — лазерная корреляционная спектроскопия для определения гидродинамических размеров биологических объектов на анализаторе ЛКС-03 («ИНТОКС», Россия) [9].

2. Технология «Литос-система». Принцип метода состоит в способности кристаллообразующего вещества модифицировать процесс образования кристаллов при добавлении его в кристаллообразующий раствор. (Приказ МЗ РФ № 17 от 21 января 1997 г.) [8].

3. Исследование Z-потенциала по измерению электрофоретической подвижности частиц с использованием эффекта Доплера, определение молекулярной массы по интенсивности рассеянного света с применением графика Дебая и оценка динамики этих характеристик при изменении рН и ионной силы с метрологической прослежи-

ваемостью к стандартам NIST (анализатор Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Великобритания). Метрологические характеристики технологии: размер частиц и молекул — диапазон от 0.3 нм до 10.0 микрон, точность $\pm 2\%$, воспроизводимость $\pm 2\%$ при использовании латексных образцов, соответствующих стандартам NIST; дзета-потенциал — диапазон измерения от 3.8 нм до 100 мкм, точность 0.12 мкм см/В-с для водных систем при использовании эталонного материала SRM1980 по стандартам NIST, чувствительность 10 мг/мл; абсолютная молекулярная масса — диапазон измерения от 980 Да до 20 МДа, точность $\pm 10\%$.

3. Методы медицинской информатики. Статистический анализ проводили с помощью пакета StatGraphics Plus for Windows v. 5.0 для сравнительного анализа гистограмм распределений значений показателей, кросс-табуляции, однофакторного дисперсионного анализа. Применяли тесты и критерии: критерий согласия Колмогорова-Смирнова, *t*-критерий для сравнения средних, тест Манна-Уитни, тест Chi-Square (критерий хи-квадрат).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были созданы модельные растворы, имитирующие состав мочи с содержанием ионов в различных концентрациях и наличием физиологических концентраций уромодулина, выделенного у здоровых лиц, и белка Тамма-Хорсфалла у пациентов с уролитиазом. Модели мочи содержали NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и мочевины в количествах, обеспечивающих плотность 1.010 (300 мосмоль/л), 1.017 (650 мосмоль/л) и 1.030 (1000 мосмоль/л). Во всех пробах модельных растворов мочи концентрация уромодулина составляла около 30–50 мг/л.

Методом динамического светорассеивания выявлено, что у здоровых лиц преобладает олигомерная форма уромодулина как при низкой осмолярности (95% при 300 мосмоль/л), так и при очень высокой осмолярности (75% при 1000 мосмоль/л). Уромодулин из мочи пациента с уролитиазом даже при осмолярности, соответствующей высокой гидратации организма или гипостенурии — 300 мосмоль/л, присутствует на 60% в полимерной форме уромодулина (28 МДа), а в концентрированной моче (1000 мосмоль/л) является подавляющим — 95% [10].

В табл. 1 представлены результаты измерений наличия изоформ уромодулина и Z-потенциала в биопробах мочи, полученных от лиц контрольной группы и пациентов с уролитиазом, помещенных в модельные растворы, имитирующие ионный состав мочи различной насыщенности, т.е. различной осмотической концентрации.

Таблица 1. Динамика относительного содержания изоформ уромодулина (%), выделенного из мочи здоровых лиц и пациентов с уролитиазом и Z-потенциала макромолекул при изменении осмотической концентрации модельных солевых растворов уромодулин (7) – олигомерная форма уромодулина в виде гауссова клубка

Осмолярность	300 мосмоль/л			650 мосмоль/л			1000 мосмоль/л		
Уромодулин	Уромодулин (7), %	Уромодулин (28), %	Z-потенциал, мВ	Уромодулин (7), %	Уромодулин (28), %	Z-потенциал, мВ	Уромодулин (7), %	Уромодулин (28), %	Z-потенциал, мВ
Контрольная группа	95	5	–30	90	10	–24	75	25	–6
Уролитиаз	40	60	–10	25	75	–8	5	95	–2

На рис. 1 представлены результаты измерения Z-потенциала пула уромодулина, выделенного из мочи здоровых лиц (кривая 1, формирует один пик) и лиц, страдающих уролитиазом (кривая 2, формирует два пика). Как видно из рисунка, уромодулин в моче здоровых лиц имеет отчетливый отрицательный заряд около –30 мВ, а кривая зависимости уромодулина из мочи больных уролитиазом имеет два пика. Один из пиков почти совпадает с кривой, характерной для интактного уромодулина, т.е. имеет отрицательный заряд около –30 мВ, а треть макромолекул, фактически лишена отрицательного заряда. Результирующая величина Z-потенциала пула уромодулина, выделенного из мочи пациентов с уролитиазом, снижена до –24 мВ.

Полученные данные подтверждают концепцию роли величины сialiрирования уромодулина как фактора стабильности коллоидных систем [11] в условиях изменчивости процесса мочеобразования и существенных колебаний величины pH и ионной силы. При величине Z-потенциала ниже –30 мВ система начинает терять устойчивость,

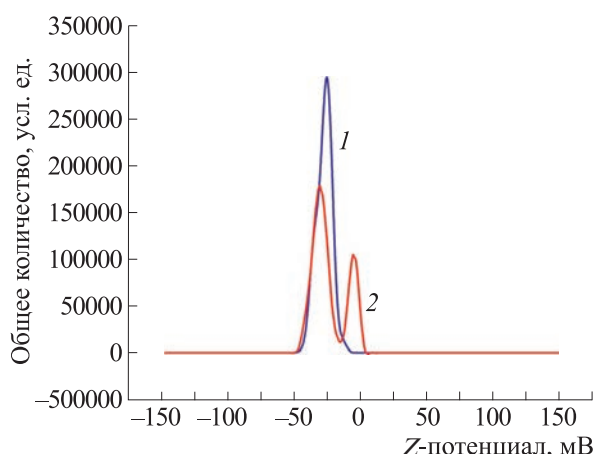


Рис. 1. Значение Z-потенциала макромолекул изоформ уромодулина из мочи здоровых лиц и пациентов с уролитиазом.

а при величине ниже –10 мВ начинается массовая агрегация наночастиц в коллоидных системах. Десиализация уромодулина на 40 % приводит к изменению pH на 1.5–1.9 единиц, что может свидетельствовать о снижении Z-потенциала десилированного уромодулина до критических величин.

Использованный метод обладает высокой точностью, специфичностью и чувствительностью, но требует больших трудозатрат и времени исследования, а главное – остается трудоемкой технологией, поскольку выполняется на сложном прецизионном средстве измерения, позволяющем проводить измерение размеров частиц в нативных биологических жидкостях в нанодиапазоне (от единиц до тысяч нм). Результаты применения этой технологии позволили валидировать биофизическую лабораторную технологию для верификации десилированной формы уромодулина.

Для верификации описанного феномена образования криогеля в пробах мочи, полученной от пациентов с уролитиазом, проведено измерение размеров молекул уромодулина в процессе охлаждения пробы до 4°C. Как видно из рис. 2, при охлаждении уромодулина из мочи здоровых лиц изменение размера частиц не происходит, в то время как уромодулин из мочи пациентов с уролитиазом (рис. 3) прогрессивно увеличивает гидродинамический размер, измеренный методом динамического светорассеивания.

Для валидации феномена фазового перехода «золя» в «гель» разработана модель медицинского изделия «Уроскрин» – анализатор регистрации образования «криогеля мочи» при выполнении «холодовой пробы мочи» по патенту М.Г. Залеского [6]. Макет установки (рис. 4) предназначен для регистрации изменения оптической плотности и коэффициента рассеивания исследуемого образца, находящегося в термостате при его охлаждении и регистрации изменения этих параметров во времени. Исследуемая проба в кювете подсвечивается источником света (лазером). Прошедший поток света регистрируется

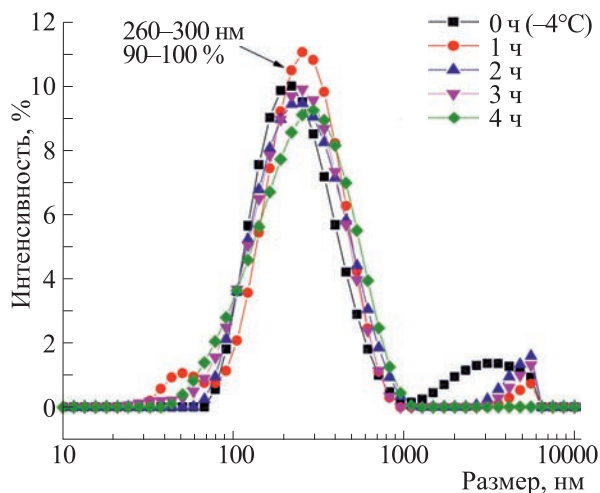


Рис. 2. Динамика гидродинамического размера макромолекулярных изоформ из проб мочи здоровых лиц (без уролитиаза) при снижении температуры до 4°C.

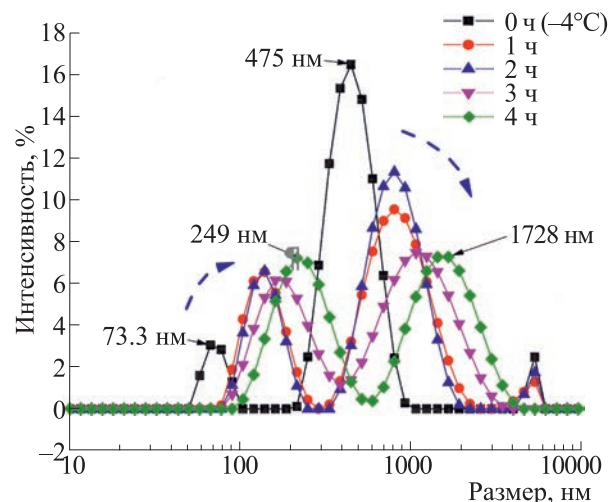


Рис. 3. Динамика гидродинамического размера макромолекулярных изоформ из проб мочи пациентов с уролитиазом при снижении температуры до 4°C.

фотоприемниками. Микропроцессор измеряет сигнал с фотоприемников, управляет работой термостата и осуществляет обмен данными с компьютером. Программное обеспечение позволяет управлять макетом, регистрировать и сохранять данные эксперимента. Макет представляет собой электронно-оптический прибор, в состав которого входят следующие функциональные узлы: лазерный излучатель, фотоприемники, узел охлаждения на элементе Пельтье, термостат и микропроцессор.

Стандартизация исследования феномена М.Г. Залеского выполнена на моделях мочи с за-

данными характеристиками (рН, ионная сила, концентрация верифицированных изоформ уромодулина), что позволяет описать аналитические характеристики (чувствительность, специфичность) новой медицинской технологии для изучения диагностической эффективности скрининга оценки состояния коллоидного гомеостаза мочи, как критерия ренальных дисфункций.

Прибор измеряет оптическую плотность (поглощение света) и плотность мощности излучения, рассеиваемого образцом в кювете. Индикатриса рассеиваемого излучения зависит от кон-



Рис. 4. Макет анализатора «Уроскрин».

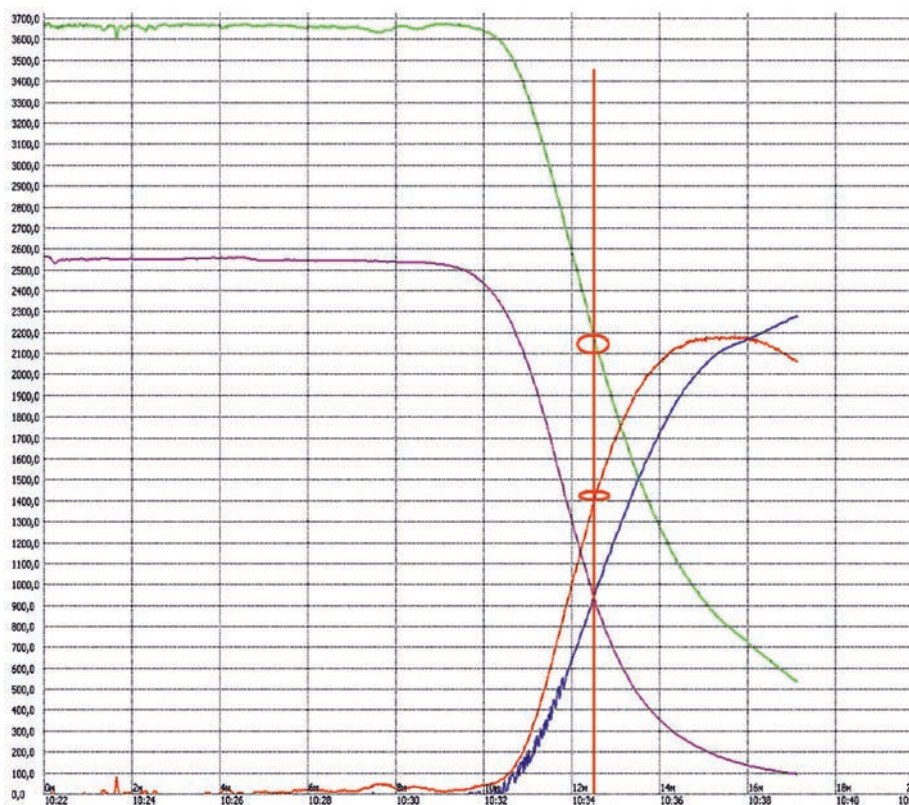


Рис. 5. График измерения интенсивности рассеяния света и оптической плотности проб мочи в анализаторе «Уроскрин».

центрации геля в кювете и размеров частиц: при малой концентрации максимум интенсивности расположен под углом около 45 градусов к оси излучения. При повышении концентрации (ОП более 0.4) максимум рассеивания находится под углом 65–85 градусов к оси излучения. Это справедливо для частиц размером около 1 мкм; если частицы имеют размеры 5–10 мкм, то основной максимум находится под углом 20 градусов и имеет узкую диаграмму направленности без провалов по оси излучения. Измерения значений производится каждую секунду и сохраняется в программе. На рис. 5 кривая 1 — график канала измерения оптической плотности, а кривая 2 — график измерения интенсивности рассеяния света. Время процесса (12 мин) отмечено вертикальной линией.

Апробация анализатора позволяет в дальнейшем использовать его для констатации эффекта фармакологической модификации процесса кристаллогенеза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уникальность уромодулина в стабилизации коллоида мочи заключается в том, что в широком диапазоне концентраций солей в части этого диапазона обеспечивается стабильность коллоида за

счет выраженных электроотрицательных свойств олигомерной формы уромодулина (7 МДа), а там, где емкость системы исчерпана и электроотрицательная форма уромодулина не способна предотвратить появление центров первичной кристаллизации насыщенного солями коллоида мочи, происходит переключение на иной механизм, в рамках действия которого олигомерная форма уромодулина (28 МДа) ингибирует рост образовавшихся микрокристаллов за счет увеличения вязкости коллоида. Для оценки вклада в вязкость коллоида мочи олигомерной формы уромодулина (28 МДа) можно использовать формулу для расчета характеристической вязкости η . В рассматриваемом случае вязкость определяется не столько общей длиной цепи, однозначно связанной с молекулярным весом олигомера, сколько эффективной длиной цепи в растворе. Только в случае предельно вытянутой цепи ее длина и молекулярный вес пропорциональны друг другу. Для определения молекулярного веса высокополимеров M по значению характеристической вязкости можно использовать следующую формулу: $\eta = K \times M^\alpha$, где K — коэффициент, постоянный для растворов данного полимергомологического ряда в данном растворителе, α — величина, характеризующая

форм-фактор макромолекулы в растворе. Значение α зависит от гибкости цепей и изменяется от 0.5 до 2.0. Из данного уравнения можно рассчитать прирост характеристической вязкости коллоида мочи при превращении олигомерной формы уромодулина (7 МДа). При постоянном K происходит увеличение молекулярной массы в четыре раза и изменение коэффициента α от 1 до 2 (1 — для глобулярной формы 7 МДа, 2 — для палочкоподобной формы 28 МДа), в результате получаем увеличение вязкости в 16 раз. Очевидно, что данный расчет носит приблизительный и оценочный характер, однако, косвенно подтверждает предположение о возможном физиологическом значении наблюдаемых превращений олигомерных форм уромодулина (7 МДа — 28 МДа) в растворах с высокой концентрацией солей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты нашего исследования не подтверждают распространенное мнение о том, что форма уромодулина (28 МДа) не характерна для нормы, а присутствует исключительно в моче пациентов с мочекаменной болезнью. В норме, в ряде случаев могут возникнуть условия (например, высокая концентрация солей, обезвоживание и длительные интервалы между мочеиспусканиями) при которых в моче можно наблюдать олигомерную форму уромодулина (28 МДа) у здоровых людей. Как правило, имеет место разнообразие олигомерных форм уромодулина и соотношение этих форм является отражением не только состояния здоровья конкретного человека, но и физико-химических свойств мочи в конкретный момент времени. Отличие между нормой и патологией заключается в соответствии свойств коллоида мочи и функциональной адекватности этим свойствам систем стабилизации, среди которых важную роль играет уромодулин.

Совокупность имеющихся литературных данных и результаты изучения белка Тамма—Хорсфалла позволяют выдвинуть следующие концептуальные положения:

1. Уромодулин — почечный эпителиальный гликопротеин, по существу, должен рассматриваться как протеом мочи, так как в большинстве своем иные белки имеют плазматическое происхождение или появляются в моче как следствие нарушения проницаемости клеточных мембран при поражении, прежде всего, канальцевого аппарата.

2. Уромодулин — мембранный белок, имеющий нетипичные физико-химические характеристики: гидродинамический размер, выраженный отрицательный заряд, что создает уникальную са-ногенетическую систему мочеотделения, характеризующую коллоидную устойчивость мочи, не-

обходимую для экскреции водонерастворимых кристаллоидов в условиях широкого размаха концентрации мочевых ингредиентов: pH, осмотической концентрации, ионов Na, K, NH_4 .

3. Нарушения посттрасляционных процессов сиилирования уромодулина с экскрецией изоформ белка Тамма—Хорсфалла с уменьшенным поверхностным зарядом и измененной стереохимической структурой, приводят к полимеризации уромодулина с образованием макрочастиц более 400 нм, которые становятся центрами кристаллизации, инициирующих агрегацию водонерастворимых кристаллоидов (оксалаты, прежде всего) и развитию уролитиаза.

4. Деполимеризацию макрочастиц уромодулина в центрах кристаллизации можно рассматривать как перспективную технологию по метафилактики уролитиаза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Проведенное исследование не имело спонсорской поддержки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья людей с соблюдением всех принципов гуманности и этических норм (Хельсинкская декларация WMA, 2013 г.) при одобрении локального этического комитета и наличии информированного согласия пациентов на участие в исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. К. Мартусевич, Дис. ... д-ра биол. наук (Кировская ГМА Минздрава России, М., 2013).
2. M. Carvalho, R. A. Mulinari, and Y. Nakagawa, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **35** (10) 1165 (2002).
3. С. Б. Ланда, В. В. Егоров, А. Б. Чухловин и др., *Клин.-лаб. конс.*, **6** (25), 33 (2008).
4. S. Youhanna, J. Weber, V. Beaujean, et al., *Nephrol. Dial. Transplant. J.*, **29** (1), 136(2014).
5. С.Б.Ланда, С. Х. Аль-Шукри, М. И. Горбачев и др., *Клин. лаб. диаг.*, **61** (6), 335(2016).
6. М. Г. Залеский, Патент № 2402769 РФ. Заявл. 27.04.09. Оpubл. 27.10.10. Зарегистр. 27.10.2010.
7. М. Г. Залеский, *Поликл. лаб. ЛПУ.*, **13**, 43 (2018)
8. С. Н. Шатохина и В. Н. Шабалин, *Урология и нефрология*, **1**, 23 (1998)
9. В. Л. Эмануэль и С. Б. Ланда, в сб. *Матер. XI межд. науч.-техн. конф. «Актуальные вопросы биологиче-*

- ской физики и химии» (Севастополь, 2016), т. 2, сс. 189–194.
10. С. Х. Аль-Шукри, Е. Т. Голощапов, М. И. Горбачев и др., Патент № 2504786 РФ. Заявл. 21.09.12, Опубл. 20.01.14, Бюл. №2. Зарегистр. 20.01.2014.
11. В. Л. Эмануэль, С. Б. Ланда, Ю. В. Эмануэль и др., *Лаборат. служба*, **6** (2), 27 (2017).
12. С. Б. Ланда, Н. А. Верлов, В. Л. Эмануэль и М. Р. Измайлов, в сб. *Матер. XIII межд. науч.-техн. конф. «Актуальные вопросы биологической физики и химии»* (Севастополь, 2017), сс. 468–473.

A Pathogenetic Role of Posttranslational Isoforms of Uromodulin

A.V. Iakovleva*, N.A. Verlov**, M.G. Zaleskiy*, S.B. Landa*, **, V.V.Shapovalov***, and V.L.Emanuel*

*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6–8, St. Petersburg, 197022 Russia

**Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov, National Research Centre «Kurchatov Institute», mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, Leningradskaya oblast, 188300 Russia

***Saint-Petersburg Electrotechnical University, ul. Professora Popova 5, St. Petersburg, 197376 Russia

Different biophysical techniques were used to study uromodulin isoforms using experimental models of urine formation (ionic composition, osmolality, pH) in the presence of intact uromodulin and its isoforms isolated from patients with urolithiasis. A model of a medical screening device for persons with preclinical urolithiasis was tested. The concept of targeted therapy of urolithiasis based on the modulation of the properties of uromodulin was put forth.

Keywords: urolithiasis, uromodulin, Tamm-Horsfall protein, dynamic light scattering, pH, cations, osmolality, laboratory diagnostics

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МАЛЯРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ИММУНОАНАЛИЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК ИЗ ТЕЛЛУРИДА КАДМИЯ

© 2023 г. Х. Чаухан*, А. Джаривала*, В. Кхерадж*,#

*Физический факультет Национального технологического института Сардара Валлабхая,
Сурат, Гуджарат, 395007 Индия

#E-mail: vk@phy.svnit.ac.in

Поступила в редакцию 24.06.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 12.07.2022 г.

Латеральный проточный иммуноанализ — это простой, дешевый и быстрый диагностический инструмент для определения болезней по таким анализам, как антитела, паразиты и другие интересующие биомаркеры. Однако многие его модификации могут определить инфекции лишь качественно. Также типичный латеральный проточный иммуноанализ, основанный на визуальной оценке тест-полоски, страдает от низкой чувствительности в случае легких форм инфекций или их ранних стадий и может вызывать ложноотрицательную интерпретацию результатов. Здесь мы приводим результаты применения квантовых точек из теллурида кадмия, покрытых тиогликолевой кислотой в качестве метки для усиления люминесценции и, таким образом, чувствительности детектирования для диагностики малярии. Химический путь синтеза квантовых точек из теллурида кадмия, покрытых тиогликолевой кислотой, был систематически оптимизирован с помощью анализа оптических свойств квантовых точек. Эти оптимизированные квантовые точки из теллурида кадмия, покрытого тиогликолевой кислотой, были конъюгированы с антималярийными антителами против белка HRP2 из *P. falciparum* и затем были включены в устройства для латерального проточного иммуноанализа. В дальнейшем был разработан код обработки изображений для количественного подсчета малярийных паразитов как отношения интенсивности контрольной и опытной линий иммуноанализа. Результаты сравнивались с результатами стандартного проточного иммуноанализа, проведенного с использованием коллоидного золота. Было продемонстрировано, что чувствительность обнаружения малярийной инфекции при низких концентрациях малярийного паразита существенно улучшена благодаря усиленной люминесценции контрольной и опытной линий под ультрафиолетовым освещением, вызванной использованием квантовых точек из теллурида кадмия, покрытых тиогликолевой кислотой. Также было показано, что подсчет концентрации паразита на основе обработки изображения может уменьшить вероятность ложноотрицательных результатов при низкой концентрации паразита и помочь в проведении ранней диагностики малярии.

Ключевые слова: CdTe, квантовые точки, нанотехнология, латеральный проточный иммуноанализ, малярия, диагностика.

DOI: 10.31857/S0006302923030237, EDN: FTTHTS

Методики диагностики на месте показали свою важность в области медицинской диагностики для раннего обнаружения болезней [1]. Они играют жизненно важную роль, особенно в случаях высококонтагиозных заболеваний, поскольку способствуют обнаружению патогена на ранней стадии и сдерживанию дальнейшего распространения инфекции. Также во время эпиде-

мий диагностика на месте облегчает быстрый скрининг большей части населения и помогает административному персоналу в разработке мер противодействия эпидемии. Одной из технологий диагностики на месте, которой с недавних пор уделяется значительное внимание, является флуоресцентный метод латерального проточного иммуноанализа [2–4]. Основанные на флуоресценции биорецепторы широко используются в иммуноанализе и ферментативных методах с

Сокращения: ЛПИ — латеральный проточный иммуноанализ, КТ — квантовые точки, ТГК — тиогликолевая кислота.

применением иммуносорбентов (ИФА/ELISA) для детекции биомаркеров [5, 6].

Латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИ) широко используется для качественного обнаружения с применением антител различных аналитов, таких, как бактериальные антигены, различные вирусы, лекарственные препараты, нуклеиновые кислоты и другие биомаркеры [7].

Обычно в ЛПИ используют такие репортеры, как коллоидное золото, окрашенные красители или частицы латекса, которые генерируют видимый сигнал при связывании соответствующего аналита [7]. Подобные тест-системы имеют очевидные преимущества в результативности, портативности и стабильности, что делает их подходящими для диагностики на месте. Однако обычные системы иммуноанализа на основе коллоидного золота имеют ряд присущих им ограничений, таких как отношение количества золота и связавшегося антитела, количество эффективных сайтов связывания и сравнительно низкая видимость тестовой и контрольной полос для невооруженного взгляда. Эти проблемы влияют на чувствительность метода, особенно в случае детекции малых концентраций аналитов. Масштабные исследования проводятся с целью увеличить чувствительность детекции с помощью увеличения интенсивности люминесценции [8, 9].

Учеными было предпринято несколько попыток увеличить чувствительность латерального проточного иммуноанализа. Один из таких подходов заключается в интеграции различных сигнальных молекул (меток, репортеров), таких как флуорофоры, коллоидный углерод, наночастицы серебра и полупроводниковые квантовые точки (КТ) [10–12]. Диспергируемые в воде КТ появились как возможная эффективная замена иммуноанализу с применением коллоидного золота. КТ широко применяются в получении изображений клеточных структур, в иммунологических методах обнаружения рака [13] и биосенсорных устройствах. Они также применяются для внутриклеточной сигнализации при изучении белок-белковых взаимодействий [14–16].

В целом КТ представляют собой смешиваемые с водой люминесцентные полупроводниковые нанокристаллы. Они могут эффективно связывать разные молекулы для применения в иммуноанализе. Вследствие высоких значений собственной люминесцентной активности они могут проявлять значительно большую чувствительность, чем коллоидное золото [12, 17, 18]. Существует ряд бинарных полупроводящих соединений, которые обладают подобными желательными оптоэлектронными свойствами. Сульфид кадмия (CdS) — один из активно изучаемых материалов для таких приложений. Однако недавно фокус внимания сместился в сторону теллурида кадмия

(CdTe). CdTe — это халькогенидное соединение с высокой интенсивностью фотолюминесценции [19]. Квантовые точки из CdTe размером в десятки нанометров особенно интересны в контексте иммуноаналитических приложений, поскольку синее смещение их максимума эмиссии фотолюминесценции, зависящее от размера, сдвигает пик люминесценции в видимую область электромагнитного спектра. Ранние работы по синтезу CdTe-КТ датируются концом 1980-х годов. Одними из пионеров в этой области были авторы работы [20], которые сообщили о синтезе CdTe-КТ напрямую в водном растворе с использованием перхлората кадмия и теллурида натрия как предшественников. В качестве стабилизатора реакций они использовали гексаметафосфат натрия. Авторами работы [21] латеральная проточная система на основе CdTe-квантовых точек была разработана во время работы по детекции шигатоксина типа II. Чтобы провести сравнительный анализ, они также метили антитела наночастицами золота и показали, что антитела, помеченные CdTe-КТ, имеют предел детекции 5 нг/мл, в то время как для ЛПИ на основе наночастиц золота нижний предел обнаружения составил 25 нг/мл. Таким образом, было показано, что КТ могут существенно улучшить чувствительность ЛПИ. Однако в литературе до сих пор недостаточно данных о применении CdTe-КТ для ЛПИ с другими антителами. Это особенно важная проблема, поскольку конъюгация различных типов биомолекул с CdTe-КТ — серьезная задача, требующая тщательной оптимизации. Например, насколько нам известно, до сих пор не было сообщений об ЛПИ на основе CdTe-КТ для обнаружения возбудителя малярии.

Малярия — это, возможно, одно из самых смертоносных заболеваний, в особенности в тропических и субтропических регионах. Согласно Всемирному докладу по малярии 2020 г., в 2019 г. было обнаружено 229 миллионов случаев малярии в 87 странах мира, из них полмиллиона случаев были смертельными. 94% случаев имели место в Африке [22]. Диагностика малярии на месте в африканских сельских регионах до сих пор очень затруднена вследствие ряда ограничений, таких как дефицит ресурсов, инфраструктуры и отсутствие квалифицированного медицинского персонала. В таких случаях быстрая диагностика на основе латерального проточного анализа может иметь огромное влияние на результативность борьбы с малярией, поскольку такие тесты, предположительно, будут достаточно надежными и простыми в обращении [23].

Однако в случае таких распространенных заболеваний, как малярия, улучшение чувствительности может быть жизненно важно, а использование CdTe-КТ могло бы значительно увеличить чувствительность детекции, что позволит обеспе-

чить раннюю диагностику заболевания и поможет в снижении смертности вследствие своевременного лечения. Ниже будут приведены данные о синтезе CdTe-квантовых точек и их последующей конъюгации с антималярийными антителами к белку HRP2 из *P. falciparum*, а также об их использовании в латеральной проточной иммуноаналитической платформе для ранней диагностики малярии на месте.

В дополнение к ранней диагностике результат количественного подсчета возбудителя инфекции мог бы стать очень важным параметром в принятии правильных решений в выборе терапии заболевания. Количественная оценка патогена также могла бы помочь в периодическом наблюдении за процессом выздоровления пациентов с помощью частого тестирования и отслеживания графика выздоровления. В данной статье мы также приводим данные по подсчету возбудителя инфекции *Malaria falciparum* с помощью определения относительных интенсивностей контрольного и опытного пиков в ЛПИ на основе CdTe-КТ через обработку изображений. Полученные с помощью ЛПИ на основе CdTe-КТ результаты сравниваются с современным «золотым стандартом детекции», которым на сегодняшний день являются системы ЛПИ на основе коллоидного золота.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Пентагидрат хлорида калия ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (98%), борогидрид натрия (NaBH_4) ($\geq 98\%$) и цитрат натрия (99%) были приобретены в компании SRL Chemical (Индия). Порошок металлического теллура (99.8%), N-гидроксисукцинимид и этилендиамидаминопропилкарбодиимида гидрохлорид (98%) были приобретены в Sigma Aldrich (Индия). Тиогликолевая кислота (ТГК) (80%) и бычий сывороточный альбумин ($\geq 98\%$) были закуплены в Loba Chemie и MP Bio-medical (Индия) соответственно. Нитроцеллюлозная мембрана приобретена в MDI Membrane (Индия). Фосфатно-солевой буферный раствор, ЛПИ на основе коллоидного золота, антималярийные антитела против белка HRP2 *P. falciparum* и образцы крови с возбудителем малярии были получены от IRIS Nanotech (Индия). Все реактивы, использованные в работе, были либо аналитической чистоты, либо максимально возможной степени чистоты из доступных. Синтез и измерения проводили с применением в качестве растворителя деионизированной воды MilliQ (Millipore, США).

Приготовление CdTe квантовых точек. Для приготовления CdTe-квантовых точек 1.5 ммоль/л пентагидрата хлорида кадмия ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяли в 100 мл воды. Затем добавляли ТГК до

концентрации 10 ммоль/л при перемешивании на магнитной мешалке. После добавления ТГК раствор становился слегка мутным. Для доведения pH до 10.0 добавляли NaOH (0.1 моль/л) до тех пор, пока раствор не становился прозрачным. Полученный раствор доводили до кипения в трехгорлой колбе. Этот раствор обозначали как Sol-A. Далее в отдельной емкости добавляли 30 мг NaBH_4 к 0.6 мл деионизированной воды, а затем сразу же добавляли 20 мг порошка теллура. Далее раствор нагревали при 50°C в течение 15 мин, пока раствор NaHTe не приобретал фиолетовый цвет. Этот раствор затем добавляли к кипящему раствору Sol-A при интенсивном перемешивании, смесь кипятили 120 мин для осуществления реакции. В течение процесса малую аликвоту раствора периодически отбирали с интервалом в 20 мин для исследования эффекта времени реакции на размер частиц. Это важный этап для оптимизации контроля размера и, следовательно, оптических свойств получаемых квантовых точек. Из этих образцов были получены CdTe-квантовые точки, покрытые ТГК, с разными оптическими свойствами, которые были обозначены как QD20M, QD40M, QD60M, QD80M, QD100M и QD120M соответственно, как показано на врезке на рис. 1 (образцы под ультрафиолетовым облучением, размещены слева направо). Приготовленные образцы КТ хранились при 2–8°C для дальнейшего использования. Для осаждения этих квантовых точек 20 мл полученного раствора помещали в 50 мл химический стакан. К данному раствору добавляли 20 мл смеси метанол-вода в соотношении 3:1, после чего смесь инкубировали 30 мин для прохождения реакции. КТ осаждались за 30 мин, осадок отбирали в отдельную пробирку. Процесс повторяли трижды для удаления избытка тиогликолевой кислоты из системы. Осадок ресуспендировали в 20 мл фосфатного буферного раствора (10 ммоль/л) с pH 7.4. Этот раствор позже обрабатывали ультразвуком с помощью погружного ультразвукового зонда в течение 30 мин на ледяной бане. Обработанные квантовые точки хранили при 2–8°C для дальнейшего использования.

Конъюгация квантовых точек с антималярийными антителами. В отдельной емкости разводили исходный раствор антималярийных антител против белка HRP2 *P. falciparum* в фосфатно-солевом буферном растворе (10 ммоль/л) до конечной концентрации 5 мг/мл. К этому раствору добавляли 0.2 мг этилендиамидаминопропилкарбодиимида гидрохлорида. Затем к раствору добавляли 0.6 мг N-гидроксисукцинимид для достижения финальной концентрации в 5 ммоль/л. К этому раствору антималярийных антител прибавляли 5 мл приготовленных CdTe-квантовых точек и тщательно смешивали растворы. Смесь инкубировали 60 мин для прохождения реакции и затем

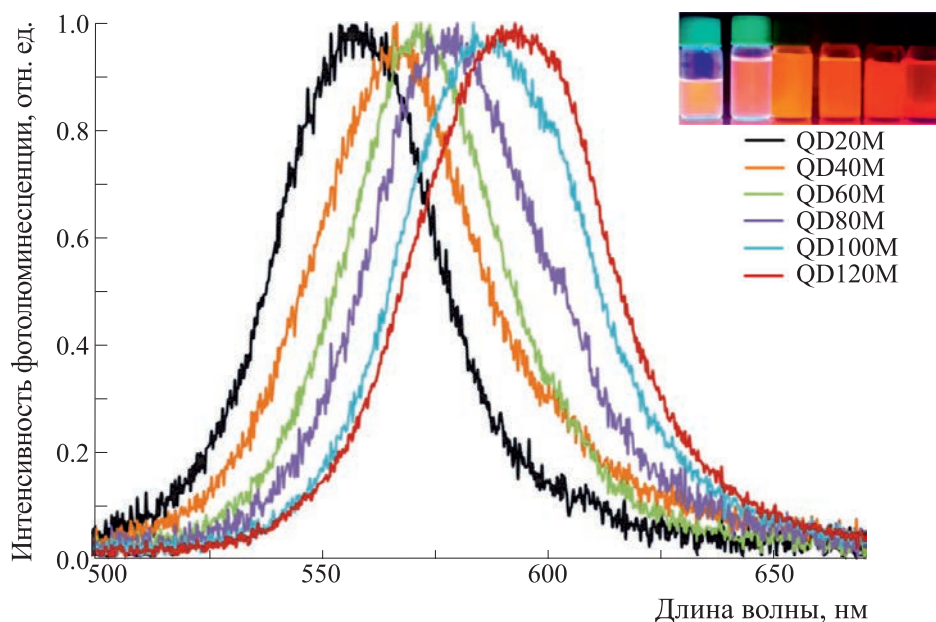


Рис. 1. Спектры фотолюминесценции свежеприготовленных CdTe-КТ, покрытых ТГК, полученные при различных временах реакции. На врезке показаны суспендированные КТ под ультрафиолетовым освещением, отмеченные как QD20M, QD40M, QD60M, QD80M, QD100M и QD120M (слева направо).

выдерживали 24 часа при 2–8°C. Бычий сывороточный альбумин в концентрации 10 мг/мл использовали для блокировки связывания и инкубировали 60 мин при постоянном перемешивании. Конъюгированные квантовые точки центрифугировали при 12000 g в течение 2 ч и собирали осадок, а затем ресуспендировали его в фосфатно-солевом буферном растворе (10.0 ммоль/л). Конечный объем доводили до 5 мл, чтобы поддерживать постоянную концентрацию комплексов «квантовые точки–антитела» на уровне 1 мг/мл.

Изготовление латерального проточного иммуноанализатора. Антималерийные антитела против белка HRP2 *P. falciparum* в концентрации 2.0 мг/мл распределяли по нитроцеллюлозной мембране в количестве 0.9 мкл/мм. Нанесенный раствор антител высушивали при 37°C в течение 2 ч. Одновременно с этим конъюгированный раствор квантовых точек с антителом распыляли на подложку для конъюгата из стекловолокна в концентрации 1.4 мкл/мм и высушивали при 37°C в течение 4 ч. Полученные полоски нарезали и собирали в латеральном проточном устройстве.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ CdTe-КД, покрытых тиогликолевой кислотой. Покрытые ТГК CdTe-квантовые точки были охарактеризованы по их поглощению и фотолюминесценции. Размер квантовых точек как функция от времени реакции рассчитывался численно из измеренных длин волн пиков фотолю-

минесценции. Конъюгация антималерийного антитела к квантовым точкам была подтверждена с помощью инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (FTIR-спектроскопии).

На рис. 1 показаны спектры фотолюминесценции покрытых ТГК CdTe-КТ, полученных при различных временах реакции. Спектры регистрировали в диапазоне длин волн от 500 до 700 нм при комнатной температуре на спектрофотометре USB4000-XR1-ES (Ocean Optics, США) при длине волны возбуждающего света 400 нм. Интенсивность фотолюминесценции всех образцов была нормализована в целях сравнения. Как показано на рис. 1, все образцы продемонстрировали очень выраженные и достаточно симметричные пики в спектрах испускания фотолюминесценции в диапазоне от 560 нм до 590 нм. Эти эмиссионные пики возникают вследствие экситонных переходов [24, 25] и являются характерными признаками CdTe-КТ, а их достаточно симметричная гауссова форма с малой шириной на половине высоты позволяет утверждать, что суспендированные в растворе квантовые точки имеют узкое распределение по размеру.

Из рис. 1 очевидно, что по мере увеличения времени реакции пик эмиссии фотолюминесценции сдвигается в более длинноволновую область. Это достаточно хорошо коррелирует с видимой окраской раствора, как показано на врезке на рис. 1. Красное смещение пика эмиссии фотолюминесценции с увеличением времени реакции

Таблица 1. Расчетный размер CdTe-КТ, покрытых ТГК

Время реакции, мин	Положение пика фотолюминесценции, нм	D , нм
20	560	3.34
40	565	3.38
60	570	3.43
80	580	3.50
100	585	3.54
120	590	3.58

Примечание. Размер рассчитан на основе положения пика фотолюминесценции согласно уравнению (1) как функция от времени реакции.

может быть отнесено к зависящему от размера эффекту конфайнмента в квантовых точках. По мере протекания реакции в смеси растворов при температуре кипения частицы CdTe увеличиваются в размере. Следовательно, с увеличением времени реакции процесс приводит к возникновению квантовых точек большего размера из CdTe, покрытых ТГК, и соответствующая шири-

на запрещенной зоны материала квантовых точек уменьшается [24–27].

Этот сдвиг пика эмиссии фотолюминесценции был применен для оценки размера CdTe-квантовых точек, покрытых ТГК, с использованием эмпирического уравнения, выведенного авторами работы [28] через аппроксимацию экспериментальных данных полиномиальной функцией:

$$D = (9.8127 \cdot 10^{-7})\lambda^3 - (1.7147 \cdot 10^{-3})\lambda^2 + 1.0064\lambda - 194.84, \quad (1)$$

где D — средний размер КТ из образца в нанометрах, а λ — центральная длина волны первого пика экситонной эмиссии фотолюминесценции соответствующего образца. С использованием вышеприведенного уравнения был определен средний размер КТ в каждом образце и выражен как функция времени реакции в табл. 1.

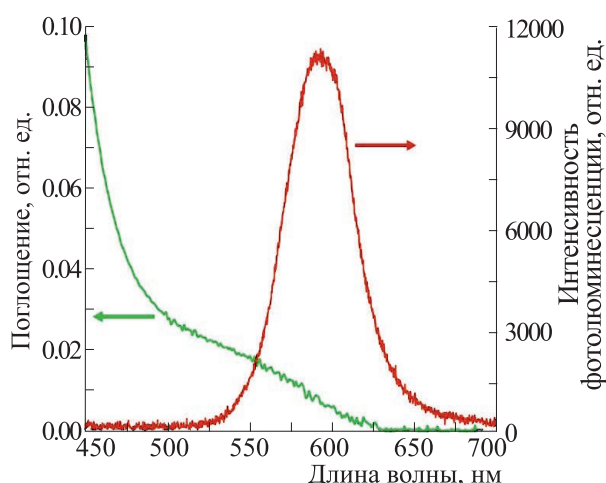


Рис. 2. Спектр поглощения и спектр фотолюминесценции свежеприготовленных CdTe-КТ, покрытых ТГК, для образца QD 120M.

Показано, что время реакции влияет на размер КТ более или менее линейно, как ясно из табл. 1, а это значит, что значительная степень управляемости размером КТ может быть достигнута путем простого контроля времени реакции.

Целью данной статьи было использовать CdTe-КТ, покрытые ТГК, для усиления чувствительности детекции систем латерального проточного иммуноанализа. Для этой цели желательно, чтобы эмиссия люминесценции в контрольной и опытной полосках под ультрафиолетовым облучением находилась как можно дальше от фиолетовой области видимого спектра. Это важно, поскольку стекловолокно, использованное в качестве матрицы для ЛПИ, демонстрирует сильное отражение света в сине-фиолетовой области, а цвет опытной и контрольной полоски должны существенно отличаться от фоновой эмиссии под ультрафиолетовым светом. Исходя из этого, для дальнейших экспериментов мы выбрали образец QD120M с CdTe-квантовыми точками, покрытыми ТГК, с максимумом эмиссии фотолюминесценции в 590 нм. Спектры поглощения образца QD120M регистрировали в диапазоне от 450 нм до 700 нм при комнатной температуре и записывали в одних осях со спектром фотолюминесценции, как показано на рис. 2. Резкое начало поглощения хорошо коррелирует с пиком эмиссии фотолюминесценции. Это подтверждает наличие ха-

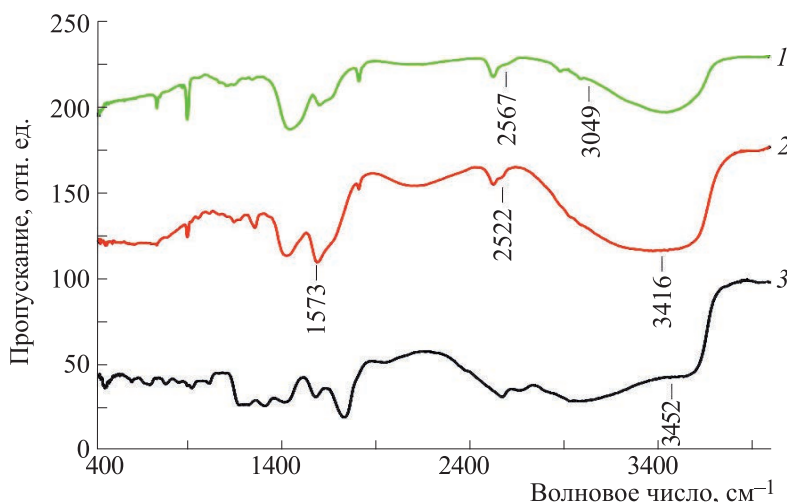


Рис. 3. FTIR-спектры, записанные для тиогликолевой кислоты (спектр 1); CdTe-КТ, покрытых ТГК (спектр 2); в) CdTe-КТ, покрытых ТГК, конъюгированных с антималярийными антителами (спектр 3).

рактерного экситонного перехода CdTe-КТ, что согласуется с литературными данными [25]. Полученные квантовые точки затем использовали для конъюгации с антималярийными антителами к белку HRP2 *P. falciparum*.

Конъюгация антималярийных антител к белку HRP2 *P. falciparum* с CdTe-КТ, покрытыми ТГК, была охарактеризована с помощью FTIR-спектроскопии и идентификации поверхностных функциональных групп на КТ. FTIR-спектры были получены с использованием спектрофотометра FTIR-8400S (Shimadzu, Япония).

На рис. 3 представлен FTIR-спектр, зарегистрированный для ТГК, CdTe-КТ, покрытых ТГК, и CdTe-КТ, покрытых ТГК, конъюгированных с антималярийными антителами против белка HRP2. На рис. 3а пики при волновых числах 2567 и 3049 указывают на наличие тиоловой ($-SH$) и карбоксильной ($-COOH$) функциональных групп соответственно [29]. FTIR-спектр CdTe-КТ образца QD120M показан на рис. 3б, пик тиоловой группы с волновым числом 2522 в этом случае значительно ослаблен, что позволяет утверждать, что тиоловая группа ТГК связана с поверхностью CdTe-КТ. Интенсивные широкие полосы при 3416 см^{-1} и 1573 см^{-1} относятся к колебаниям ($-OH$)- и ($-NH_2$)-групп соответственно [30]. Сдвиг пика карбоксильной группы с волновым числом 3416 указывает на то, что карбоксильная группа ориентирована в сторону от поверхности КТ. На рис. 3в показан FTIR-спектр CdTe-КТ, покрытых ТГК и конъюгированных с антималярийными антителами против белка HRP2 *P. falciparum*. Пик карбоксильной группы отсутствует, в то время как расширение пика ($-OH$)-группы с волновым числом 3452 указывает на образование карбодиимидной связи между

($-COOH$)-группой КТ и ($-NH_2$)-группой антител. Таким образом, мы подтвердили ковалентную связь между CdTe-КТ, покрытыми ТГК, и антималярийными антителами против HRP2-белка *P. falciparum*. Покрытые ТГК CdTe-КТ, конъюгированные с антималярийными антителами против белка HRP2 *P. falciparum*, были использованы для изготовления латеральной проточной иммуноаналитической системы, как описано выше в разделе «Экспериментальная часть», а изготовленные таким образом устройства для ЛПИ были применены для анализа и подсчета количества возбудителя малярии.

Проверка ЛПИ и количественные измерения с его помощью. Образцы крови, давшие положительный результат анализа на присутствие малярийного паразита *P. falciparum*, разводили кровью, не содержащей паразита, методом последовательных разведений, и для каждой известной концентрации паразита готовили образцы в трех повторностях. Образец крови с отрицательным результатом анализа на наличие паразита также проверяли в качестве контроля на кросс-реактивность и ложноположительные реакции. Таким образом, готовили четыре образца: i) кровь без малярийного паразита; ii) кровь с концентрацией паразитов 15 шт/мкл; iii) кровь с концентрацией паразитов 150 шт/мкл; iv) кровь с концентрацией паразитов 300 шт/мкл. Из каждого образца отбирали 5 мкл крови и наносили в лунку коммерчески доступного ЛПИ-устройства на основе коллоидного золота, а также в полученные в работе ЛПИ-устройства с CdTe-КТ, покрытыми ТГК. Затем добавляли 90 мкл промывочного раствора для облегчения движения образца через нитроцеллюлозную мембрану. Образцы, нанесенные на коммерческое ЛПИ-устройство на основе кол-

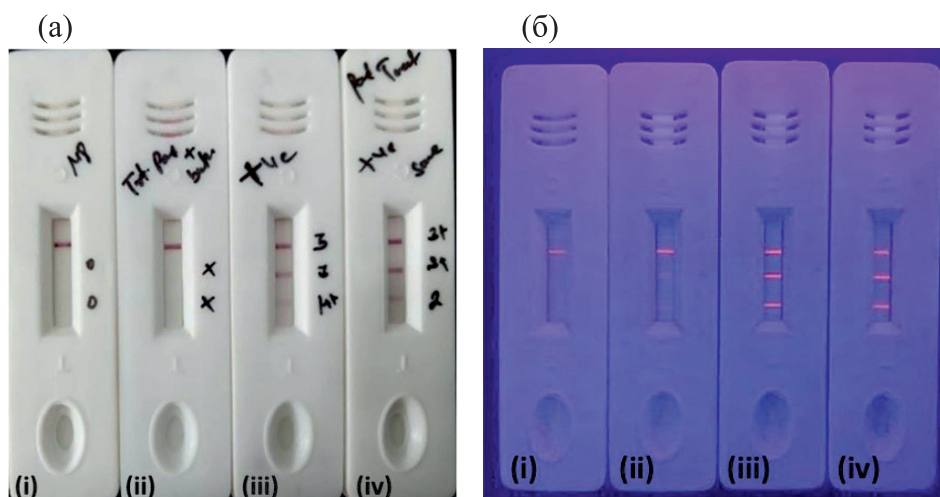


Рис. 4. Изображения ЛПИ-устройств с нанесенными образцами с известными концентрациями паразита (обозначены римскими цифрами i–iv): (a) – ЛПИ-устройство на основе коллоидного золота под нормальным белым светом; (б) – ЛПИ-устройство на основе CdTe-КТ, покрытых ТГК, под ультрафиолетовым освещением.

лоидного золота, показаны на рис. 4а, а образцы на ЛПИ-устройстве на основе полученных в работе CdTe-КТ, покрытых ТГК, – на рис. 4б. ЛПИ-устройства на основе коллоидного золота наблюдали под нормальным освещением, в то время как ЛПИ на основе CdTe-КТ, покрытых ТГК, – под ультрафиолетовым светом, чтобы визуализировать проявление контрольной и опытной линий на тест-полосках. Для количественного подсчета изображения полосок сканировали в течение 15 мин. С помощью программы LabVIEW была разработана специальная программа для обработки изображений с возможностью подсчета интенсивности контрольной и опытной линий на тест-полосках.

Для точного подсчета интенсивности контрольной и опытной линий на ЛПИ-тест-полосках выбирали интересующую нас область на изображениях, при этом и те, и другие линии выделяли с помощью прямоугольного окна выделения. Один и тот же размер интересующей нас области выбирался в контрольной и опытной линиях на всех полученных изображениях. Интенсивности контрольной и опытной линий измерялись по значениям цветов пикселей в контрольной и опытной областях с помощью правила Симпсона 3/8 с применением скрипта, написанного в LabVIEW. Использование вышеупомянутого скрипта позволило определить соотношения контрольной и опытной линий для различных концентраций паразита в обоих типах использованных ЛПИ-устройств – на основе коллоидного золота и на основе CdTe-КТ, покрытых ТГК. Эти отношения интенсивностей наносились на график как функции от концентрации паразита, что приведено на рис. 5а и 5б соответственно.

Как видно из рис. 4, ЛПИ-устройство на основе коллоидного золота имеет четкие опытные линии при концентрациях паразита 150 и 300 шт/мкл. Однако образец, соответствующий очень легкой форме инфекции, с концентрацией 15 шт/мкл, не демонстрировал опытную линию, что видно на рис. 4а, и этот результат может быть интерпретирован как ложноотрицательный результат визуального анализа. В сравнении с ним ЛПИ-устройство на основе CdTe-КТ, покрытых ТГК, показало слабую, но все же различимую опытную полосу под ультрафиолетовым излучением даже при столь малой концентрации паразита. Это может оказаться критически важным для диагностики у пациентов на самой ранней стадии инфекции.

Однако обработка изображений позволила успешно детектировать слабую красную опытную линию в интересующей нас области для образца 2 даже в случае ЛПИ-устройства на основе коллоидного золота, как было показано на рис. 5а. Другие образцы с более высокими концентрациями паразита показали очень значительные интенсивности сигналов инфекции, опытные полосы насыщаются при концентрациях более 150 шт/мкл в случае коллоидного золота, как показано на рис. 5а. С другой стороны, ЛПИ-устройства на основе КТ, покрытых ТГК, показали очень ясный рост отношения интенсивностей контрольной и опытной линий, как показано на рис. 5б. Кривая, показанная на рис. 5б, может использоваться не только для детекции малярийного паразита, но и для подсчета концентрации паразита при диагностике на месте без дополнительного сложного оборудования. Таким образом, квантовые точки, покрытые ТГК, пока-

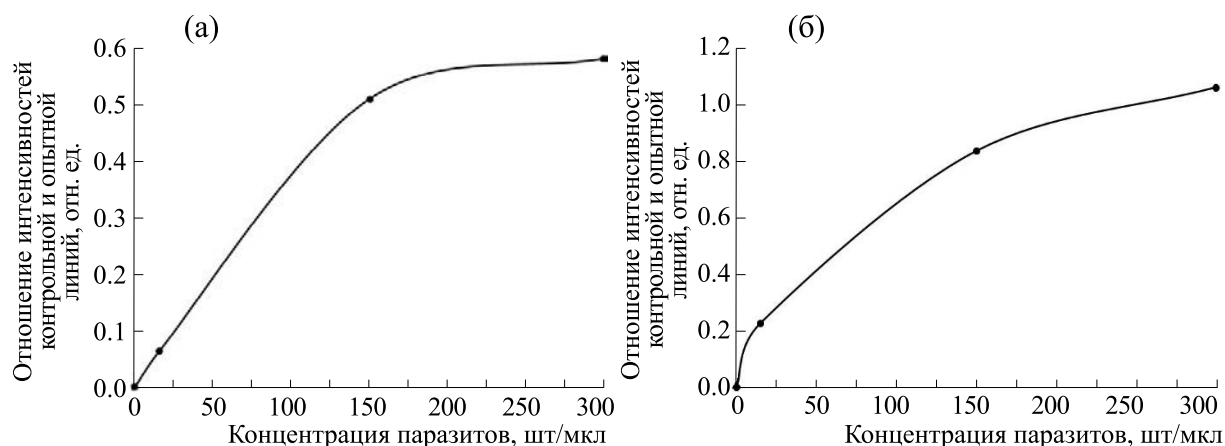


Рис. 5. Отношение измеренных интенсивностей опытной и контрольной линий для ЛПИ-устройства на основе коллоидного золота под нормальным белым светом (а) и ЛПИ-устройства на основе CdTe-КТ, покрытых ТК, под ультрафиолетовым освещением (б).

зали многообещающие значения чувствительности при детекции малярийного паразита (*P. falciparum*) даже при очень низкой концентрации паразита, как визуально, так и после обработки изображения и количественного подсчета.

ВЫВОДЫ

В работе показаны химический путь синтеза CdTe-КТ, покрытых ТК, и их конъюгации с антималарийными антителами против белка HRP2 из *P. falciparum*. КТ типа QD120M были выбраны из всех образцов CdTe-КТ, покрытых ТК, для встраивания в устройства ЛПИ и последующего сравнения со стандартными ЛПИ-устройствами на основе коллоидного золота. ЛПИ-устройства на основе CdTe-КТ, покрытых ТК, облученные ультрафиолетом, продемонстрировали значительное усиление интенсивности люминесценции и повышение чувствительности детекции малярийного паразита по сравнению со стандартными устройствами на основе коллоидного золота. Было показано, что ЛПИ-устройства на основе CdTe-КТ, покрытых ТК, могут давать ясный сигнал даже при очень малых концентрациях паразита (15 шт/мкл). Разработанная программа для подсчета концентрации малярийного паразита на основе обработки изображения может уменьшить вероятность ложноотрицательного результата при низких концентрациях паразита и помочь в проведении ранней диагностики малярии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Департаменту науки и технологий Правительства Индии за инфраструктурную поддержку по гранту FIST, номер договора SR/FST/PS-I/2017/12.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование не получало внешнего финансирования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. X. Shi and Z. Wang, Rev. Med. Microbiol., **32** (3), 183 (2021).
2. P. Liu, Y. Zhou, M. Guo, et al., Nanoscale, **10**, 848 (2018).
3. N. H. T. Tran, K. T. L. Trinh, J. H. Lee, et al., Small, **14**, 1801385 (2018).
4. R. Fan, W. Zhang, Y. Jin, et al., Microchim. Acta, **187**, 1 (2020).
5. Y. Liang, X. Huang, R. Yu, et al., Anal. Chim. Acta, **936**, 195 (2016).
6. G. Liu, J. Zhao, S. Wang, et al., Sensors and Actuators B: Chemical, **306**, 127583 (2020).
7. S. Wang, C. Zhang, and Y. Zhang, Biosensors and Bio-detection, Ed. by A. Rasooly and K. E. Herold (Humana Press, 2009), vol. 504.
8. Y. Jeong, Y. M. Kook, K. Lee, and W. G. Koh, Biosens. Bioelectron., **111**, 102 (2018).
9. S. M. Fothergill, C. Joyce, and F. Xie, Nanoscale, **10**, 20914 (2018).
10. G. A. Posthuma-Trumpie, J. Korf, and A. Van Amerongen, Anal. Bioanal. Chem., **393**, 569 (2009).
11. X. Gao, L. P. Xu, S. F. Zhou, et al., Am. J. Biomed. Sci., **6**, 41 (2014).

12. I. Y. Goryacheva, P. Lenain, and S. De Saeger, *Trends Analyt. Chem.*, **46**, 30 (2013).
13. O. A. Aladesuyi and O. S. Oluwafemi, *Nano-Structures & Nano-Objects*, **24**, 100568 (2020).
14. Z. Li, P. Huang, J. Lin, et al., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **10**, 4859 (2010).
15. Z. Wang, J. Ruan, and D. Cui, *Nanoscale Res. Lett.*, **4**, 593 (2009).
16. D. Cui, B. Pan, H. Zhang, et al., *Anal. Chem.*, **80**, 7996 (2008).
17. M. Sajid, A. N. Kawde and M. Daud, *J. Saudi Chem. Soc.*, **19**, 689 (2015).
18. H. Yang, D. Li, R. He, et al., *Nanoscale Res. Lett.*, **5**, 875 (2010).
19. J. Zhang, Y. Wei, S. Qiu, and Y. Xiong, *Spectrochim. Acta, Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **247**, 119107 (2021).
20. U. Resch, H. Weller, and A. Henglein, *Langmuir*, **5**, 1015 (1989).
21. T. Lu, K. D. Zhu, C. Huang, et al., *Analyst*, **145**, 76 (2020).
22. *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges* (World Health Organization, Geneva, 2020). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>.
23. D. Bell, C. Wongsrichanalai, and J. W. Barnwell, *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 682 (2006).
24. A. L. Rogach, L. Katsikas, A. Kornowski, et al., *Ber Bunsen Phys Chem.*, **101**, 1668-70 (1997).
25. N. Liu and P. Yang, *Luminescence*, **29** (6), 566 (2014).
26. S. Subramanian, S. Ganapathy, M. Rajaram, and A. Ayyaswamy, *Materials Chemistry and Physics*, **249**, 123127 (2020).
27. R. Carcione, F. Limosani, and F. Antolini, *Crystals*, **11** (3), 253 (2021).
28. W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, and X. Peng, *Chem. Mater.*, **15**, 2854 (2003).
29. T. Kondratenko, O. Ovchinnikov, I. Grevtseva, et al., *Materials*, **13**, 909 (2020).
30. J. Tashkhourian, G. Absalan, M. Jafari, and S. Zare, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **152**, 119 (2016).

Luminescent Diagnostics and Quantitative Assessment of Malaria Based on a Lateral Flow Immunoassay with CdTe Quantum Dots

H. Chauhan*, A. Jariwala*, and V. Kheraj*

*Department of Physics, Sardar Vallabhbhai National Institute of Technology (SVNIT), Surat 395007, Gujarat, India

A lateral flow immunoassay (LFI) is a simple, low-cost and rapid diagnostic tool to identify various diseases by detecting analytes such as antibodies, parasites, or other relevant biomarkers. However, most LFIs can only confirm the presence or absence of a target analyte being applied as qualitative diagnostic tools. In addition, the conventional LFIs, which require visual inspection of the test line, may demonstrate insufficient sensitivity for the mild form or early detection of infections and for this reason, the result can be falsely negative. This study presents the results of employing thioglycolic acid capped CdTe quantum dots as a probe to enhance luminescence and subsequently detection sensitivity in LFIs for diagnosis of malaria. The chemical route synthesis of thioglycolic acid capped CdTe quantum dots was optimized systematically by probing optical properties of the quantum dots. These optimized quantum dots of thioglycolic acid capped CdTe have been conjugated with the anti-malaria antibodies against HRP2 protein (*P. falciparum*) and were then incorporated into LFIs. Further, an image processing code has been developed to carry out the quantification of malaria parasites in terms of the ratio on intensities of control and test lines on the LFIs. The results have been compared with those obtained using the standard, colloidal gold based LFIs. It has been demonstrated that sensitivity and lower detection limits of malaria under low parasite concentration increase significantly due to enhanced luminescence of control and test lines under UV light, owing to the presence of thioglycolic acid capped CdTe quantum dots. It has also been shown that the image processing based quantification of malaria will likely minimize the chances of false negative results under low parasite concentration and assist in early diagnosis of malaria.

Keywords: CdTe, quantum dots, nanotechnology, lateral flow immunoassay, malaria, diagnostics