

ISSN 0006-3029

Том 68, Номер 4

Июль - Август 2023



БИОФИЗИКА

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 4, 2023

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Влияние динамики микроокружения триптофана на параметры его флуоресценции в зависимости от температуры

В.В. Горохов, П.П. Нокс, Б.Н. Корватовский, С.Н. Горячев, В.З. Пащенко, А.Б. Рубин 629

Структура лед-связывающего белка из *Myoxocephalus octodecemspinosus*, полученная методом молекулярной динамики и на основе спектров кругового дихроизма

Г.А. Олейник, П. Жданова, В.В. Коваль, А.А. Чернонос, С.В. Баранова 640

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Механизм ингибирования кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II катионами лантаноидов

Е.Р. Ловягина, А.В. Локтюшкин, Н.С. Васильев, Б.К. Сёмин 646

Действие антиоксидантной системы «ресвератрол – серанитрозильный комплекс железа натрий-μ2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат» на митохондрии эпикотилей проростков гороха *in vitro*

Н.Ю. Герасимов, О.В. Неврова, И.В. Жигачева, И.П. Генерозова, А.Н. Голощанов 653

Спектрофотометрическое определение поступления натрий-медного хлорофиллина в лимфоциты

Л.А. Ромодин 660

Свободные радикалы и трансдукция сигналов в клетках

Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, В.В. Войнаровский, Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, О.М. Панасенко 667

Антагонист рецепторов сигма-1 галоперидол ингибирует Ca^{2+} -ответы в перитонеальных макрофагах крысы

Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая 685

Соли короткоцепочечных жирных кислот усиливают активность Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов большой проводимости и снижают кальциевые осцилляции в GНЗ-клетках крысы

И.Ф. Шайдуллов, Е.В. Ермакова, Д.М. Сорокина, О.В. Яковлева, Г.Ф. Ситдикова 695

Кинетика и механизмы оксидативного гемолиза эритроцитов под действием азо- и пероксидного инициатора

Е.М. Соколова, Н.А. Дубенская, Б.Л. Психа, Н.И. Нешев 705

К вопросу о роли эктонуклеотидаз в синаптической передаче. Термолабильность метаболизма АТФ

А.Е. Хайруллин, Д.В. Ефимова, Д.В. Иванова, С.Н. Гришин, А.У. Зиганшин 712

Отличие ответов премоторных интернейронов на серотонин и предшественник его синтеза 5-гидрокситриптофан у интактных и сенситизированных улиток

Т.Х. Богодвид, В.В. Андрианов, Л.Н. Муранова, Х.Л. Гайнутдинов 718

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Количественное определение содержания натурального каучука в растениях *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin методом эпр спинного зонда

*Л.Ю. Мартиросян, В.М. Гольдберг, И.И. Барашкова, В.В. Каспаров,
Ю.Ц. Мартиросян, М.В. Мотякин, С.А. Гайдамака, С.Д. Варфоломеев*

730

Биолюминесценция гребневика *Pleurobrachia pileus* (O.F. Müller, 1776) в летний сезон

А.В. Темных, М.И. Силаков, О.В. Машукова

736

Влияние стимуляции $\alpha 1$ -адренорецепторов на электрическую активность предсердий крысы

Н. Мансур, Н.И. Зиятдинова, А.М. Галиева, Р.Р. Шакиров, Т.Л. Зефирова

748

Влияние блокатора оксида азота L-NAME на изолированное сердце крыс после гипокинезии

*М.И. Сунгатуллина, Р.И. Зарипова, Н.И. Зиятдинова, Г.Г. Яфарова,
В.В. Андрианов, Х.Л. Гайнутдино, Т.Л. Зефирова*

754

Радиомитигаторные свойства α -липоевой кислоты при изолированном и сочетанном с метформином или этилметилгидроксипиридина сукцинатом (мексидолом) применении у мышей после рентгеновского облучения

Е.Е. Карманова, А.В. Черников, А.М. Усачева, В.И. Брусков

761

Использование пероксиредоксина 6 для предотвращения дисфункции печени при остром поражении почек

А.Е. Гордеева, Э.А. Курганова, В.И. Новоселов

770

Пандемия SARS-Cov-2 как система «хищник–жертва»: биофизические, социальные и гелиофизические факторы развития локальных эпидемий

М.В. Рагульская

780

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Сравнительный анализ межканальных взаимодействий на электроэнцефалограммах у здоровых людей и пациентов с депрессией методом корреляционных отношений

М.Е. Соболев, А.Л. Горелик, О.Л. Власова

789

ДИСКУССИИ

XXI век: сознание и мозг

Г.Р. Иваницкий

800

О биофизике и о кафедре биофизики физического факультета МГУ

В.А. Твердислов, В.И. Лобышев, Л.В. Яковенко, М.Г. Гапочка

813

ХРОНИКА

VII съезд биофизиков России

Г.Ю. Ризниченко, А.А. Анашкина, А.Б. Рубин

831

Contents

Vol. 68, No. 4, 2023

Molecular Biophysics

Influence of the Microenvironment Dynamics of Tryptophan on Its Fluorescence Parameters at Different Temperatures

V.V. Gorokhov, P.P. Knox, B.N. Korvatovsky, S.N. Goryachev, V.Z. Paschenko, and A.B. Rubin 629

Structure of an Ice-Binding Protein from *Myoxocephalus octodecemspinosus* Determined by Molecular Dynamics and Based on Circular Dichroism Spectra

G.A. Oleinik, P. Zhdanova, V.V. Koval, A.A. Chernonosov, and S.V. Baranova 640

Cell Biophysics

Mechanism of Inhibition of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II by Lanthanide Cations

E.R. Lovyagina, A.V. Loktyushkin, N.S. Vasiliev, and B.K. Semin 646

The Effect of the Antioxidant System Resveratrol – Iron Sulfonitrosyl Complex Sodium- μ 2-Dithiosulphate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate on the Mitochondria of Pea Germ Epicotyls *in vitro*

N.Yu. Gerasimov, O.V. Nevrova, I.V. Zhigacheva, I.P. Generozova, and A.N. Goloshchapov 653

Spectrophotometric Determination of Sodium-Copper Chlorophyllin Level in Lymphocytes

L.A. Romodin 660

Free Radicals and Signal Transduction in Cells

G.G. Martinovich, I.V. Martinovich, V.V. Voinarouski, D.V. Grigorieva, I.V. Gorudko, and O.M. Panasenko 667

Haloperidol, a Sigma-1 Receptor Antagonist, Inhibits Ca^{2+} Responses in Rat Peritoneal Macrophages

L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, and N.I. Krutetskaya 685

Salts of Short-Chain Fatty Acids Increase the Activity of the Large Conductance, Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels and Reduce Calcium Oscillations in Rat GH3 Cells

I.F. Shaidullov, E.V. Ermakova, D.M. Sorokina, O.V. Yakovleva, and G.F. Sitdikova 695

Kinetics and Mechanisms of Oxidative Hemolysis of Erythrocytes in the Presence of Azo- and Peroxide Initiator

E.M. Sokolova, N.A. Dubenskaia, B.L. Psikha, and N.I. Neshev 705

Revisiting the Role of Ectonucleotidases in Synaptic Transmission. Thermal Sensitivities of ATP-Producing Metabolic Pathways

A.E. Khairullin, D.V. Efimova, D.V. Ivanova, S.N. Grishin, and A.U. Ziganshin 712

Differences in Responses of Premotor Interneurons to Serotonin and 5-Hydroxytryptophan, a Precursor for Serotonin Synthesis, in Naive and Trained Snails

T.K. Bogodvid, V.V. Andrianov, L.N. Muranova, and Kh.L. Gainutdinov 718

Age Peculiarities in the Effect of Stimulation of α 2-Adrenergic Receptor on Electrical Activity of Rat Cardiomyocytes

A.M. Galieva, N.I. Ziyatdinova, N. Mansour, L.I. Fashutdinov, and T.L. Zefirov 724

Complex Systems Biophysics

Quantitative Determination of Natural Rubber Content of <i>Taraxacum kok-saghyz</i> E. Rodin Plants Using Spin Probe Method of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy <i>L. Yu. Martirosyan, V.M. Goldberg, I.I. Barashkova, V.V. Kasparov, Yu. Ts. Martirosyan, M.V. Motyakin, S.N. Gaydamaka, and S.D. Varfolomeev</i>	730
Bioluminescence of Ctenophore <i>Pleurobrachia pileus</i> (O. F. Müller, 1776) in the Summer Period <i>A.V. Temnykh, M.I. Silakov, and O.V. Mashukova</i>	736
Effect of A1-Adrenoreceptors Stimulation on Electrical Activity of Rat Atria <i>N. Mansour, N.I. Ziyatdinova, A.M. Gallieva, R.R. Shakirov, and T.L. Zefirov</i>	748
Effect of the Nitric Oxide Synthesis Inhibitor L-NAME on the Isolated Rat Heart after Hypokinesia <i>M.I. Sungatullina, R.I. Zaripova, N.I. Ziyatdinova, G.G. Yafarova, V.V. Andrianov, Kh.L. Gainutdinov, and T.L. Zefirov</i>	754
Radio-Mitigation Properties of α -Lipoic Acid when Used alone and in Combination with Metformin or Ethylmethylhydroxypyridine Succinate (Mexidol) in Mice after Exposure to X-ray Radiation <i>E.E. Karmanova, A.V. Chernikov, A.M. Usacheva, and V.I. Bruskov</i>	761
Use of Peroxiredoxin 6 to Prevent Liver Dysfunction in Acute Kidney Injury <i>A.E. Gordeeva, E.A. Kurganova, and V.I. Novoselov</i>	770
SARS-CoV-2 Pandemic as a “Predator–Prey” Model: Biophysical, Social and Heliophysical Factors of the Spread of Local Epidemics <i>M.V. Ragulskaya</i>	780

Medical Biophysics

Comparative Analysis of Interchannel Interactions on Electroencephalograms in Healthy People and Patients with Depression Using the Method of Correlation Ratios <i>M.E. Sobolev, A.L. Gorelik, and O.L. Vlasova</i>	789
--	-----

Discussion

The XXI Century: Consciousness and the Brain <i>G.R. Ivanitskii</i>	800
On Biophysics and a Chair of Biophysics at the Faculty of Physics of Moscow State University <i>V.A. Tverdislov, V.I. Lobyshev, L.V. Yakovenko, and M.G. Gapochka</i>	813

Chronicle

VII Congress of Biophysicists of Russia <i>G. Yu. Riznichenko, A.A. Anashkina, and A.B. Rubin</i>	831
--	-----

ВЛИЯНИЕ ДИНАМИКИ МИКРООКРУЖЕНИЯ ТРИПТОФАНА НА ПАРАМЕТРЫ ЕГО ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

© 2023 г. В.В. Горохов*, П.П. Нокс*, Б.Н. Корватовский*,
С.Н. Горячев*, В.З. Пашенко*,[#] А.Б. Рубин*

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

[#]E-mail: vz.paschenko@gmail.com

Поступила в редакцию 21.12.2022 г.

После доработки 16.01.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Исследованы температурные зависимости быстрых и медленных компонент затухания флуоресценции водного раствора молекул триптофана в диапазоне $-170^{\circ}\text{C} \div 20^{\circ}\text{C}$, замороженных на свету и в темноте. Для количественного анализа использована модель прямых и обратных электронных переходов в молекуле триптофана из возбужденного состояния в основное состояние и в состояние с переносом заряда. Выделены три основные спектральные области флуоресценции триптофана, отличающиеся различным поведением температурных зависимостей скоростей перехода из возбужденного состояния триптофана в состояние с переносом заряда. Показана ключевая роль динамики системы водородных связей, определяющих нелинейный характер изменения параметров флуоресценции триптофана в выделенных спектральных областях. Нелинейное поведение длительности флуоресценции и спектров флуоресценции при изменении температуры определяется характером взаимодействия триптофана с водой и льдом. Показана важная роль, которую играют температурные перестройки в системе водородных связей структурных конфигураций H_2O , окружающей молекулу триптофана в возбужденном состоянии.

Ключевые слова: триптофан, кинетика затухания флуоресценции, температурная зависимость, водородные связи, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0006302923040014, EDN: KIKARV

Флуоресценция триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного индикатора их внутримолекулярной конформационной динамики, тесно связанной с функциональной активностью, в частности, при изменении температуры. Источником информации о характере внутримолекулярной динамики ближайшего окружения возбужденной молекулы триптофана (Тгр) являются температурные зависимости спектров и длительности флуоресценции Тгр [1–3]. Кинетика затухания флуоресценции Тгр как в растворе, так и в составе полипептидов многокомпонентна. В зависимости от типа растворителя, фактора pH, регистрируют две-три кинетики затухания компонент флуоресценции в интервале от сотен пикосекунд до ~ 10 нс [4–7].

Сольватация возбужденных молекул Тгр в ходе взаимодействия с ближайшим окружением мо-

жет индуцировать зависимые от температуры сдвиги их спектров поглощения и флуоресценции [5, 8]. В частности, в результате сложного перераспределения электронной плотности в возбужденных молекулах Тгр происходит красный сдвиг максимума спектра флуоресценции. Температура влияет на процессы сольватации, меняя состояние водородных связей — их жесткость и упорядоченность. Спектры и время жизни возбужденных электронных состояний Тгр при разных температурах обусловлены процессом внутримолекулярного переноса электрона от пирольного кольца возбужденной молекулы на индольную часть и на амидные группы основного скелета молекулы. В этот процесс вовлекается также система водородных связей (Н-связей) между молекулами Тгр и их водным окружением [8–11] с образованием состояния с переносом заряда (CTS).

Согласно данным метода квазиупругого рассеяния нейтронов [12, 13], можно выделить следующую

Сокращения: Тгр — триптофан, Н-связи — водородные связи, CTS — состояние с переносом заряда.

щие температурные области, в которых динамика протонов водородных связей в водно-белковой среде влияет на время жизни возбужденных электронных состояний Тгр. При $T < -150^\circ\text{C}$ (область I) происходят чисто гармонические колебания протонов около равновесных положений. В области II ($-150^\circ\text{C} \leq T < -30^\circ\text{C}$) динамика водно-белковой среды характеризуется скачкообразной диффузией протонов по Н-связям в пикосекундном временном диапазоне. При $T > -30^\circ\text{C}$ (область III) динамика водно-белковой среды характеризуется более медленными масштабными движениями крупных молекулярных фрагментов [12,13].

Исследованию динамики водородных связей в окружении возбужденных молекул Тгр и их влиянию на фотофизические и фотохимические переходы в таких системах в последние годы уделяется большое внимание [8–11, 14, 15]. В частности, в работе [15] было показано, что в водном растворе образуется стабильный цвиттерионный комплекс Н-связей с молекулой Тгр. Вокруг этого комплекса формируется водная оболочка с частично упорядоченными Н-связями за счет их взаимодействия с полярными группами Тгр [14, 15]. В ближайшем окружении возбужденной молекулы Тгр может происходить укорочение длин и, как следствие, усиление Н-связей молекул воды, взаимодействующих с электрическим полем индольной части молекул Тгр. В результате увеличивается жесткость и происходит их дополнительное упорядочение [15]. В свою очередь, в упорядоченной системе Н-связей может формироваться квазизона проводимости, на которую электрон переходит от индольной части возбужденной молекулы Тгр и делокализуется. Затем делокализованный электрон может перейти на амидные группы и образовать состояние с переносом заряда [15]. Такой процесс наиболее вероятен в области достаточно низких температур (область I). При этом при дальнейшем понижении температуры скорость переноса электрона от индольной части Тгр* в систему водородных связей должна увеличиваться. В области более высоких температур (области II и III) за счет тепловых флуктуаций молекул растворителя квазизона проводимости вырождается. В результате перенос электрона с индольной части на амидные группы будет идти уже по термоактивационному механизму. В окрестности возбужденной молекулы триптофана в системе водородных связей возможен также конформационный (фазовый) переход, приводящий к возникновению в этой системе электрического дипольного момента [16]. Этот процесс может происходить в определенном интервале температур $T_1 < T < T_2$, когда энергия теплового движения протонов достаточно велика для их перескоков вдоль водородной связи ($T > T_1$), однако все

еще остается меньше энергии взаимодействия диполей Н-связей молекул, что позволяет сохранять упорядоченность ($T < T_2$) [16]. В результате происходит перестройка системы водородных связей за счет диффузионного перескока протонов по Н-связям [13], что приводит к образованию суммарного дипольного момента, электрическое поле которого вызывает эффект дополнительной сольватации возбужденной молекулы Тгр. При этом изменение состояния системы водородных связей в окрестности Тгр* играет роль мягкой моды, т.е. критической подсистемы, испытывающей фазовый переход в результате взаимодействия дипольных моментов водородных связей в области температур $T_1 < T < T_2$ [16]. Кулоновское взаимодействие Тгр* с суммарным дипольным моментом системы водородных связей будет вызывать значительный красный сдвиг спектра флуоресценции триптофана в водно-белковой среде.

В данной работе выполнено детальное изучение температурных зависимостей длительности флуоресценции замороженных в темноте и на свету водных растворов триптофана в различных областях его спектра флуоресценции. Изучена также динамика спектров флуоресценции в наносекундном временном интервале и обнаружено увеличение скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции в области фазового перехода в системе водородных связей в диапазоне температур от -80°C до 20°C . Анализ экспериментальных данных базировался на идее формирования промежуточного состояния с переносом заряда в процессе дезактивации Тгр* и опосредованном влиянии динамики водородных связей ближайшего водного окружения на процессы дезактивации возбужденного состояния молекул триптофана. Настоящая статья является продолжением и развитием опубликованных ранее работ [8–11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали триптофан фирмы Sigma (США). Измерения кинетики флуоресценции проводили на установке с коррелированным по времени и длине волны счетом единичных фотонов PML-16 (Becker & Hickl GmbH, Германия; <http://www.becker-hickl.de/pdf/pml16c21.pdf>2006). Данная установка оборудована 16-канальной мультианодной трубкой Hamamatsu R5900, содержащей 16 отдельных входных анодных элементов и общую катодную и диодную систему. Получаемый сигнал флуоресценции направляется в полихроматор с дифракционной решеткой 600 штрихов/мм, обеспечивающей ширину спектральной полосы измерительной системы 200 нм с разрешением 12.5 нм/канал. Это позволяет ре-

гистрировать трехмерную картину флуоресценции, отражающую изменения длительности (τ), длины волны (λ) и интенсивности (I) свечения. Флуоресценцию образца возбуждали при 280 нм с помощью пикосекундного полупроводникового диода EPLED 280 (Edinburg Photonics, Шотландия), длительность импульса света составляла 870 пс, спектральная ширина — 10 нм, частота следования импульсов 10 МГц. Для получения хорошего отношения сигнал/шум время накопления сигнала было выбрано равным 30 с. Таким образом, регистрируя трехмерное (τ , λ , I) изображение свечения триптофанилов, мы могли измерять кинетики затухания флуоресценции в любом спектральном канале. Одновременно мы имели возможность регистрировать динамику спектров флуоресценции образца с различными временными задержками после возбуждения. В эксперименте образец, содержащий триптофан при концентрации 10 мМ, находился в охлаждаемой жидким азотом кювете. Время охлаждения до -170°C составляло около 10 мин, скорость последующего нагревания была равной 5–7 град/мин.

Получаемый в результате измерений массив спектрально-кинетических данных представляет собой набор кинетик затухания флуоресценции, зарегистрированных при разных λ в спектральной области 286–425 нм с интервалом 12.5 нм. Число экспериментальных точек при регистрации каждой кинетики составляло 4096. Для каждого спектрального канала измеряли также число

фотонов, зарегистрированных в данной области спектра.

Аппроксимацию экспериментальных кинетик флуоресценции проводили для каждого спектрального канала при помощи программы SPCImage (Becker & Hickl GmbH, Германия) по формуле (1), позволяющей разлагать кинетики по методу Марквардта–Левенберга на сумму от одной до пяти экспонент, свернутых с аппаратной функцией системы регистрации, измеряемой для каждого спектрального канала.

$$F(t, \lambda) = \sum_i a_i(\lambda) \exp(-t/\tau_i), i = 1, 2. \quad (1)$$

Здесь $a_i(\lambda)$ представляет собой зависящий от длины волны сигнала флуоресценции предэкспоненциальный множитель компоненты с временем жизни τ_i . При разложении экспериментальных кинетик мы ограничились двумя экспонентами, так как дальнейшее увеличение числа компонент не приводило к снижению χ_r^2 . Для всех выбранных спектральных областей значение χ_r^2 не превышало величины 1.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Процессы возбуждения и дезактивации возбужденного состояния молекулы Тгр представим в виде схемы 1. В соответствии с этой схемой кинетика затухания флуоресценции Тгр имеет двухкомпонентный характер: дезактивация возбужденного состояния триптофана происходит по

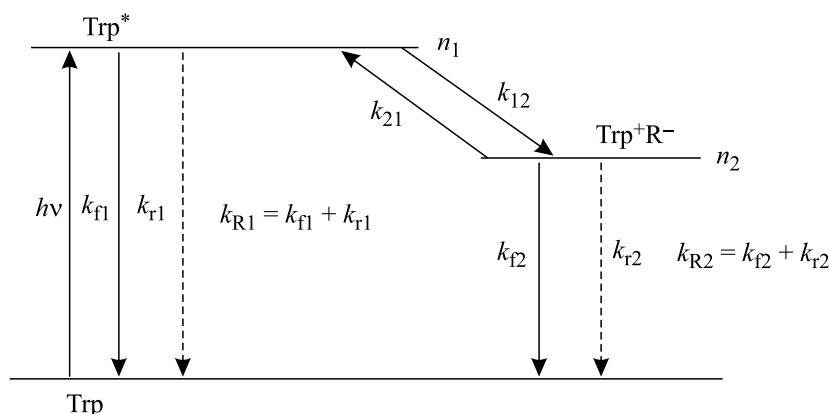


Схема 1. Модельная схема кинетических переходов в триптофане: n_1 , n_2 — населенности возбужденного состояния молекул Тгр и состояния с переносом заряда; $\text{Тгр}^+\text{R}^-$ — состояние с переносом заряда, где R может обозначать как систему водородных связей в окружении молекулы Тгр, так и амидные группы с электрон-акцепторными свойствами, связанные с Тгр; k_{R1} — константа скорости затухания возбужденного состояния Тгр,

включающая флуоресценцию (k_{f1}) и безызлучательную релаксацию (k_{r1}): $\text{Тгр}^* \xrightarrow{k_{R1}} S_0$, ($k_{R1} = k_{f1} + k_{r1}$); k_{12} — скорость перехода Тгр^* в состояние CTS; k_{21} — скорость рекомбинации $\text{CTS} \rightarrow \text{Тгр}^*$; k_{R2} — скорость затухания

CTS за счет флуоресценции и безызлучательной релаксации: $\text{CTS}^* \xrightarrow{k_{R2}} S_0$, $k_{R2} = k_{f2} + k_{r2}$.

двум каналам — с испусканием флуоресценции (k_{f1}) и безызлучательной релаксацией (k_{r1}) в основное состояние $S^* \xrightarrow{k_{r1}} S_0$ ($k_{R1} = k_{f1} + k_{r1}$), а также с переходом молекулы Трр в промежуточное состояние (состояние с переносом заряда) $\text{Трр}^* \rightarrow \text{Трр}^+ \text{R}^-$ со скоростью k_{12} , рекомбинирующего затем со скоростью k_{21} обратно в S^* -состояние: $S^* \xrightarrow{k_{12}} \text{CTS} \xrightarrow{k_{21}} S^* \xrightarrow{k_{r1}} S_0$. Согласно работе [17], помимо обратного перехода в S^* -состояние распад CTS также может происходить с испусканием флуоресценции и за счет безызлучательной релаксации в основное состояние ($\text{CTS} \xrightarrow{k_{R2}} S_0$) ($k_{R2} = k_{f2} + k_{r2}$). В этом отношении интересно отметить, что релаксация ион-радикальной пары реакционного центра фотосистемы II в основное состояние также сопровождается испусканием флуоресценции в длинноволновой области спектра [18, 19].

Мы детально исследовали кинетики затухания флуоресценции Трр в водном растворе в диапазоне температур от -170°C до 20°C для различных спектральных областей свечения при замораживании образцов в темноте (D) и на свету (L). Обработку экспериментальных кинетик проводили так, как это описано в работе [11].

На рис. 1–3 показаны рассчитанные температурные зависимости констант скоростей прямого перехода k_{12} ($\text{Трр}^* \rightarrow \text{CTS}$) и обратного перехода k_{21} ($\text{CTS} \rightarrow \text{Трр}^*$). При аппроксимации кинетик затухания флуоресценции варьировали значения скоростей перехода k_{12} и k_{21} . Остальные параметры схемы 1 фиксировали. Из рис. 1–3 видно, что температурная зависимость константы скорости перехода k_{12} в области $T < -125^\circ\text{C}$ носит безактивационный характер: с увеличением температуры k_{12} уменьшается пропорционально величине $1/\sqrt{T_K}$, где T_K — абсолютная температура. Как видно из рис. 1–3, для Трр в водной среде образование квазизоны проводимости системы Н-связей может происходить уже при температурах ($T < -125^\circ\text{C}$), что следует из безактивационного характера переноса электрона на амидные группы по системе Н-связей. Видно также, что при $T > -90^\circ\text{C}$ с ростом температуры происходит термоактивационное увеличение константы скорости k_{12} при постоянной энергии активации перехода.

Обработка экспериментальных результатов выявляет различный характер температурной зависимости скоростей перехода k_{12} и k_{21} в той области, где предполагается нелинейный характер сольватации возбужденного состояния триптофана ($-80^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$) для различных участков

спектра. Для адекватной аппроксимации экспериментальной температурной зависимости k_{12} во всей исследованной области температур предполагалась зависимость энергии активации перехода E_a от температуры в области $-80^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$ в следующем виде [20]

$$E_a = \frac{(-G + E_r)^2}{4E_r}. \quad (2)$$

Здесь E_r — энергия реорганизации среды преобразования CTS, ΔG — разность уровней свободной энергии состояний Трр^* и CTS (схема 1). При этом считалось, что процессы переноса электрона происходят в неинвертированной области параметров соотношения (2), для которой выполняется условие $\Delta G \leq E_r$. В этом случае при уменьшении энергии реорганизации E_r энергия активации перехода E_a также уменьшается и достигает нуля при $\Delta G = E_r$ (безактивационный переход). Водородные связи ближайшего окружения Трр^* дают определенный вклад в энергию реорганизации среды и, согласно уравнению (2), также влияют на величину энергии активации перехода $\text{Трр}^* \rightarrow \text{CTS}$.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе [15] показано, что в окружении молекулы триптофана в водном растворе и льдах образуется упорядоченная система водородных связей, имеющая вид цвиттерионного комплекса, которая оказывает существенное влияние на динамику возбуждений в системе. Показано также, что при электронном возбуждении молекулы триптофана происходит увеличение жесткости водородных связей, что приводит к делокализации электрона между индольной частью Трр и водородными связями цвиттерионного комплекса и вызывает значительный сдвиг спектра флуоресценции триптофана в красную область. Однако в работе [15] рассмотрены только стационарные спектры поглощения и флуоресценции триптофана в водном растворе без учета их зависимости от температуры. Поэтому представляло интерес исследовать динамику спектральных и кинетических параметров, описывающих процессы затухания флуоресценции триптофана в водной среде при импульсном фотовозбуждении в зависимости от температуры.

Анализ полученных в работе экспериментальных и теоретических кривых позволил выделить три области в спектре флуоресценции Трр: коротковолновую область (В) ($300 \text{ нм} < \lambda < 386 \text{ нм}$), промежуточную область (М) ($386 \text{ нм} < \lambda < 400 \text{ нм}$) и длинноволновую область (Р) ($400 \text{ нм} < \lambda < 470 \text{ нм}$), для которых температурная зависимость скорости образования CTS имеет различ-

ный характер. Оказалось, что в области спектра флуоресценции (В) при изменении температуры от -80°C до 20°C наблюдается отступление температурной зависимости скорости перехода k_{12} (рис. 1) от стандартного аррениусовского поведения с постоянной энергией активации. В температурной области $-80^{\circ}\text{C} < T < -20^{\circ}\text{C}$ скорость перехода k_{12} увеличивается до максимума при $T = -20^{\circ}\text{C}$. При дальнейшем росте температуры до 20°C происходит уменьшение k_{12} (рис. 1). Нелинейную колоколообразную зависимость скорости перехода возбужденного состояния Trp^* в состояние CTS по сравнению со стандартной реакцией с постоянной энергией активации E_a можно связать с возможным структурным фазовым переходом системы водородных связей в окружении Trp^* в области температур $-80^{\circ}\text{C} < T < 20^{\circ}\text{C}$. Действительно, система водородных связей в окружении возбужденной молекулы триптофана при фазовом переходе в температурной области ($T_1 < T < T_2$) перестраивается и описывается критической, мягкой модой [16], при которой протоны водородных связей переходят в новое положение равновесия. Возникающее электрическое поле индольной части возбужденной молекулы триптофана способствует процессу фазового перехода в системе окружающих водородных связей, при этом важную роль играет их взаимное (mutual) взаимодействие.

Характер температурных эффектов в спектральной области $300\text{ нм} < \lambda < 386\text{ нм}$. Коротковолновый участок спектра флуоресценции $300\text{ нм} < \lambda < 386\text{ нм}$ (область В) соответствует излучению той части возбужденных молекул триптофана, в окрестности которых система водородных связей в находится в начале перестройки и испытывает флуктуации положений протонов вдоль водородных связей. Известно, что потенциальная энергия движения протонов вдоль водородных связей имеет вид двухъямного потенциала [16]. Под воздействием электрического поля индольной части возбужденной молекулы триптофана энергия движения протонов становится выше барьеров потенциальных ям, в результате они могут определенное время двигаться вдоль водородных связей практически свободно. Также возможен переход протона вдоль водородной связи из одной потенциальной ямы в более близкую к индольной части потенциальную яму возбужденной молекулы триптофана по туннельному механизму. Данный механизм рассмотрен в работах [21, 22]. В этом участке спектра аномальный характер температурной зависимости скорости k_{12} перехода Trp^* в состояние CTS можно объяснить уменьшением энергии реорганизации данной реакции за счет уменьшения коэффициента упругости (жесткости) части водородных связей при их перестройке. При уменьшении энергии реоргани-

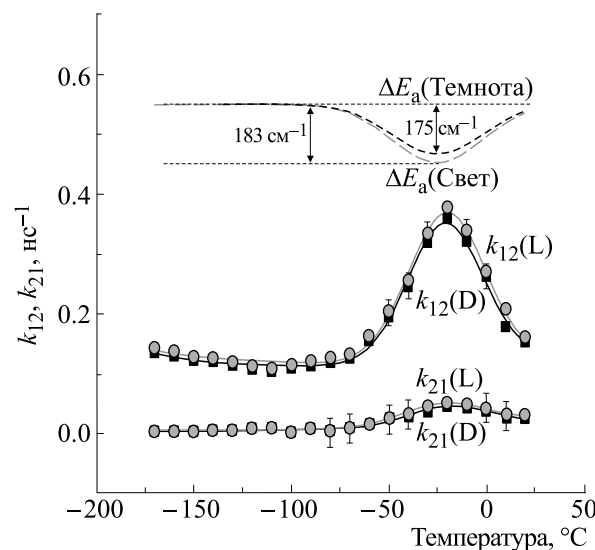


Рис. 1. Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$, k_{21} — обратной реакции $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ и энергии активации реакции ΔE_a для замороженных в темноте (D, ■) и на свету (L, ●) образцов в коротковолновой спектральной области (В). Зависимости ΔE_a от температуры для D- и L-образцов показаны в относительном масштабе. Среднеквадратичная ошибка значения k_{12} не превышала величины 0.01 нс^{-1} , значения k_{21} — 0.015 нс^{-1} для образцов, замороженных в темноте и на свету соответственно. Сплошные линии построены согласно модели рис. 2 (система уравнений (2)), с зависящей от температуры энергией активации ΔE_a в температурной области $-80^{\circ}\text{C} \div 20^{\circ}\text{C}$.

зации процесса переноса электрона уменьшается и энергия активации этого перехода E_a (уравнение 2), так как при этом величина ΔG остается еще практически постоянной. С ростом температуры количество взаимодействующих критических водородных связей, теряющих часть жесткости в начале фазового перехода, растет за счет увеличения числа эффективно взаимодействующих протонов, в результате продолжает уменьшаться энергия реорганизации перехода. Это приводит к уменьшению энергии активации перехода E_a для синего участка спектра с ростом температуры, которая достигает минимума при температуре $T_m = -20^{\circ}\text{C}$. При этом скорость перехода k_{12} возбужденного состояния триптофана в CTS состояние (рис. 1) увеличивается и достигает максимума при этой же температуре T_m (рис. 1). При дальнейшем росте температуры от T_m до $T_2 = 20^{\circ}\text{C}$ растет тепловая энергия движения протонов, уменьшается количество взаимно (mutual) взаимодействующих водородных связей мягкой моды, участвующих в фазовом переходе,

что приводит в результате к увеличению энергии реорганизации и соответствующему увеличению энергии активации. В результате при достижении максимальной температуры фазового перехода T_2 энергия активации возвращается к постоянной величине стандартного термоактивационного перехода. При этом скорость перехода $\text{Trp}^* \rightarrow \text{CTS}$ уменьшается до величины, наблюдаемой при стандартном переходе с постоянной энергией активации (рис. 1). Отсюда следует подтверждение ранее высказанного предположения, что в начале перестройки водородных связей в результате их взаимодействия, а также под воздействием электрического поля индольной части возбужденной молекулы Trp образуется виртуальная (временная) зона проводимости системы водородных связей, которая приводит к увеличенной скорости перехода возбужденного состояния Trp в состояние с переносом заряда в коротковолновой области спектра (В).

Температурная зависимость скорости обратного перехода k_{21} в спектральной области (В) хорошо описывается следующим выражением с постоянным значением свободной энергии перехода ΔG :

$$k_{21}(T) = k_{12}(T)\exp(-\Delta G/k_B T_K), \quad (3)$$

где k_B — постоянная Больцмана, T_K — абсолютная температура по шкале Кельвина. Оценка величины ΔG для D-образцов дает значение 375 см^{-1} . Для L-образцов температурная область в участке спектра (В), в которой происходит увеличение скорости перехода k_{12} , несколько шире, чем для D-образцов. При этом энергия активации для L-образцов уменьшается на большую величину, чем для D-образцов, что сопровождается соответствующим увеличением скорости k_{12} (рис. 1). Данный эффект может быть связан с тем, что для L-образцов в процессе замораживания на свету в системе Н-связей происходит предварительное накопление водородных связей в состоянии увеличенной жесткости в окрестности молекулы триптофана. В результате при перестройке водородных связей их жесткость уменьшается на большую величину, чем в D-образцах. Это вызывает дополнительное снижение энергии реорганизации перехода $\text{Trp}^* \rightarrow \text{CTS}$ и соответствующее уменьшение энергии активации (уравнение (2)). Температурная зависимость скорости обратного перехода k_{21} для образцов, замороженных на свету, также описывается выражением (3). Оценка величины G для L-образцов дает значение 330 см^{-1} . При этом для L-образцов скорость обратного перехода k_{21} в температурной области $-80^\circ\text{C} < T < -20^\circ\text{C}$ несколько больше, чем для Dh-образцов (рис. 1). Таким образом, из полученных результатов следует, что, в отличие от

данных работы [15], в спектральной области (В) динамика процессов прямого (k_{12}) и обратного (k_{21}) переходов определяется, главным образом, процессом перестройки водородных связей в окрестности возбужденной молекулы триптофана, сопровождающейся уменьшением их жесткости.

Характер температурных эффектов в спектральной области $386 \text{ нм} < \lambda < 400 \text{ нм}$. Средний участок спектра флуоресценции триптофана ($386 \text{ нм} < \lambda < 400 \text{ нм}$) соответствует излучению той части возбужденных молекул триптофана, в окружении которых уже произошел фазовый переход некоторого числа водородных связей, сопряженный с возникновением дипольного момента системы водородных связей и восстановлением их жесткости. Такой фазовый переход приводит к увеличению энергии реорганизации перехода E_r и уменьшению свободной энергии перехода ΔG , что вызывает соответствующий рост энергии активации E_a (уравнение (2)). В то же время для оставшейся части возбужденных молекул система водородных связей все еще находится в состоянии перестройки и вносит вклад в уменьшение энергии реорганизации перехода E_r и энергии активации E_a . В результате в данной спектральной области (М) увеличение энергии активации за счет фазового перехода и соответствующего уменьшения свободной энергии перехода ΔG компенсируется снижением величины E_a за счет уменьшения E_r для той части молекул, в окрестности которых перестройка системы водородных связей еще не завершена. При этом в спектральной области М энергия активации слабо зависит от температуры (рис. 2). Из этого рисунка видно также, что для L-образцов константа скорости прямого перехода k_{12} больше, чем для D-образцов. При температуре $T < -100^\circ\text{C}$ увеличение скорости k_{12} для L-образцов происходит в результате того, что при охлаждении в условиях постоянного освещения образцы замораживаются с большей жесткостью и упорядоченностью водородных связей, что приводит к образованию зоны проводимости. Такое явление способствует безактивационному переносу электрона с индольной части Trp^* на водородные связи и амидные группы. В области температур фазового перехода ($-80^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$) при замораживании на свету в системе водородных связей сохраняются микроконформационные смещения, благоприятствующие развитию взаимодействия водородных связей в окружении молекул Trp . В результате растет количество перестраиваемых Н-связей, что вызывает большее снижение энергии реорганизации E_r и соответствующее уменьшение энергии активации E_a для L-образцов по сравнению с D-образцами (рис. 2). В результате скорость пере-

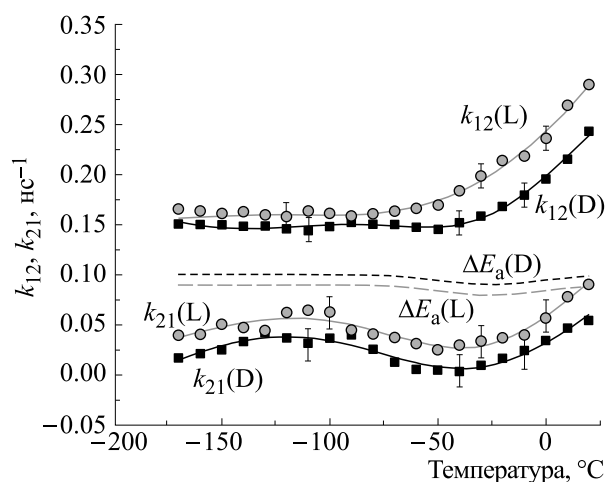


Рис. 2. Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$, k_{21} — обратной реакции $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ и энергии активации реакции ΔE_a для замороженных в темноте (D, ■) и на свету (L, ●) образцов в спектральной области (M). Зависимости ΔE_a от температуры для D- и L-образцов показаны в относительном масштабе. Среднеквадратичная ошибка значения k_{12} не превышала величины 0.012 нс^{-1} , значения k_{21} — 0.018 нс^{-1} для образцов, замороженных в темноте и на свету соответственно. Максимальное изменение ΔE_a для D- и L-образцов в области температуры -40°C не превышало величины 10 см^{-1} .

хода Trp^* в CTS для L-образцов больше, чем для D-образцов (рис. 2).

Для температурной зависимости константы скорости обратного перехода k_{21} ($\text{CTS} \rightarrow \text{Trp}^*$) в средней области спектра флуоресценции наблюдается минимум в районе -40°C для образцов, замороженных в темноте и на свету. Можно сделать вывод, что в окружении молекул Trp , находящихся в CTS-состоянии в температурной области фазового перехода свободная энергия перехода ΔG уменьшается на большую величину, чем энергия реорганизации E_r в уравнении (2). Такой эффект вызывает дополнительную сольватацию молекул Trp , перешедших в CTS-состояние. В результате происходит уменьшение константы скорости обратного перехода k_{21} (рис. 2). Видно также, что в образцах, замороженных на свету, константа скорости обратного перехода k_{21} превышает значение k_{21} в образцах, замороженных в темноте (рис. 2). Это, возможно, обусловлено тем, что свободная энергия перехода ΔG для L-образцов уменьшается на меньшую величину за счет большего числа «замороженных» микроконформационных искажений в системе Н-связей в окружении молекул Trp на свету, чем для D-образцов.

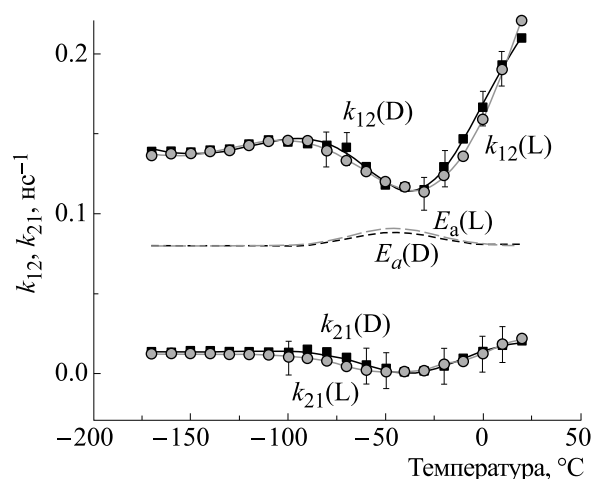


Рис. 3. Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ и энергии активации реакции ΔE_a для замороженных в темноте (D, ■) и на свету (L, ●) образцов в спектральной R-области. Зависимости ΔE_a от температуры для D- и L-образцов показаны в относительном масштабе. Среднеквадратичная ошибка значения k_{12} не превышала величины 0.015 нс^{-1} , значения k_{21} — 0.025 нс^{-1} для образцов, замороженных в темноте и на свету соответственно. Максимальное увеличение E_a для D-образцов в области -40°C равно 80 см^{-1} , для L-образцов — 85 см^{-1} .

Характер температурных эффектов в спектральной области $400 \text{ нм} < \lambda < 470 \text{ нм}$. Для молекул Trp^* , флуоресцирующих в длинноволновом участке спектра $400 \text{ нм} < \lambda < 470 \text{ нм}$ (область R), фазовый переход водородных связей в окружении возбужденных молекул триптофана в основном завершен, водородные связи находятся в новом устойчивом положении за счет затухания флуктуаций движения протонов вдоль водородных связей. В результате увеличивается их жесткость, что вызывает соответствующее увеличение энергии реорганизации перехода. При этом в данной температурной области в окружении возбужденных молекул Trp за счет смещения протонов возникает дополнительный дипольный момент в системе водородных связей. В результате взаимодействия электрического поля возникающего дипольного момента системы элементарных ячеек Н-связей с возбужденным электронным состоянием молекулы Trp происходит ее дополнительная сольватация, которая достигает максимума при $T_s = -40^\circ\text{C}$. Как следствие, в данной области температур происходит уменьшение свободной энергии перехода $\Delta G(T)$ и увеличение энергии активации перехода E_a (рис. 3). В результате в температурной области $-80^\circ\text{C} < T < -40^\circ\text{C}$ наблюдается уменьшение скорости перехода (рис. 3) и соответствующее увеличение времени жизни

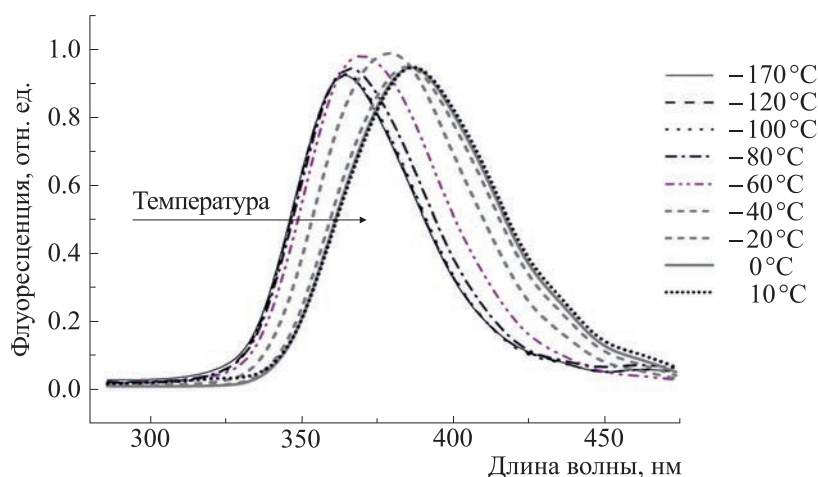


Рис. 4. Температурный сдвиг спектров флуоресценции триптофана с ростом температуры. Заметно увеличение скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции с ростом температуры в области фазового перехода в системе водородных связей в окружении Trp^* ($-70^\circ\text{C} < T < 10^\circ\text{C}$).

возбужденного состояния Trp^* относительно стандартной аррениусовской зависимости данных величин с постоянной энергией активации. При росте температуры выше -40°C увеличивается тепловая энергия протонов водородных связей, нарушающая их взаимное (mutual) взаимодействие и происходит уменьшение $\Delta G(T)$. Как следствие, происходит уменьшение энергии активации E_a до значения стандартного Аррениусовского перехода и, соответственно, увеличивается константа скорости k_{12} . Видно (рис. 2), что скорости прямого перехода k_{12} для образцов, замороженных на свету и в темноте, имеют близкие температурные зависимости, так как после завершения фазового перехода практически все дополнительные микроконформационные изменения водородных связей на свету нивелированы. Отметим, однако, что после перехода Trp в CTS-состояние, в L-образцах наблюдается сдвиг температурной зависимости минимума скорости обратного перехода в область -50°C по сравнению с -40°C для D-образцов. Следовательно, в окружении возбужденной молекулы Trp в CTS-состоянии для образцов, замороженных на свету, сохра-

няется часть микроконформационных смещений в системе водородных связей, что приводит к смещению минимума температурной зависимости константы скорости обратного перехода $\text{CTS} \rightarrow \text{Trp}^*$ в область -50°C и ее уширение на 10°C (рис. 2).

Температурная зависимость спектров флуоресценции триптофана. На рис. 4 показано поведение спектров флуоресценции триптофана с ростом температуры для образцов, замороженных в темноте. Для образцов, замороженных на свету, получены близкие результаты. Отчетливо видно увеличение скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции с ростом температуры в области фазового перехода в системе водородных связей в окружении Trp^* ($-80^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$), что связано с возникновением электрического поля, дающего вклад в дополнительную сольватацию возбужденного состояния молекулы триптофана.

Для детального анализа особенностей спектров флуоресценции Trp на рис. 5 показаны спектры флуоресценции триптофана для температур -60°C , -40°C , -20°C и 0°C . Проведена аппрок-

Таблица 1. Параметры разложения спектров флуоресценции триптофана на сумму гауссовых компонент

$T, ^\circ\text{C}$	(1) -60°C	(2) -40°C	(3) -20°C	(4) 0°C
A_{C1}	0.64	0.77	0.78	0.79
λ_{C1}, nm	365.1	373.4	380.6	382.8
W_{C1}, nm	19.3	23.97	26.0	26.5
A_{C2}	0.59	0.45	0.36	0.34
λ_{C2}, nm	386.1	398.9	408.7	412
W_{C2}, nm	33.1	35.7	37.9	39.1

Примечание. A_{Cj} — амплитуда, λ_{Cj} — длина волны максимума, W_{Cj} — ширина j -й гауссовой компоненты спектра, $j = 1, 2$.

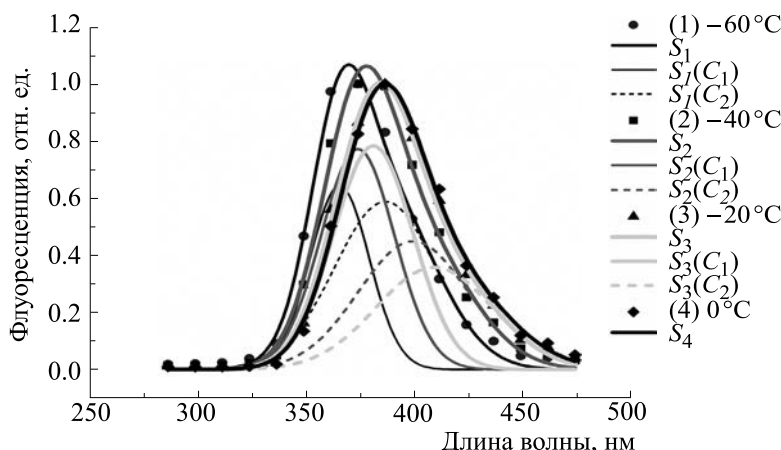


Рис. 5. Спектры флуоресценции триптофана в водном растворе при температурах -60°C , -40°C , -20°C и 0°C . Проведено разложение спектров флуоресценции на две гауссовых компоненты ($S_i(C_1)$) и ($S_i(C_2)$). S_i ($i = 1, 2, 3, 4$) обозначают аппроксимацию i -го спектра суммой гауссовых компонент ($S_i = S_iC_1 + S_iC_2$, показаны жирными линиями). Компоненты разложения спектра (4) не показаны. Параметры разложения представлены в таблице. Данные приведены для образцов, замороженных в темноте. Для образцов, замороженных на свету, получены близкие результаты.

симация данных спектров суммой двух гауссовых компонент, результаты разложения представлены в табл. 1. Данные получены для образцов, замороженных в темноте. Для образцов, замороженных на свету, были получены близкие результаты.

На рис. 6 показана температурная зависимость положений максимумов спектральных гауссовых компонент разложения спектров флуоресценции триптофана, а также скорости изменения положений этих максимумов от температуры. Данные показаны для D-образцов. Отчетливо видно, что максимальное увеличение скорости сольватационного сдвига наблюдается в области -40°C для обеих компонент разложения. При этом поведение кривых $\Delta\lambda_m/\Delta T$ в области температур $-80^{\circ}\text{C} \div 20^{\circ}\text{C}$ близко к форме кривых τ_1 и τ_2 в этой же области температур (данные не приведены). По нашему мнению, этот результат подтверждает уже сделанный ранее вывод, что в указанной области температур происходят конформационные (фазовые) перестройки систем Н-связей в окрестности возбужденной молекулы Трп. Была определена также разность энергий спектральных максимумов состояний Трп* и CTS в см^{-1} в зависимости от температуры. Результаты представлены на рис. 7. Видно, что в области температур от -170°C до -110°C разность энергий спектральных максимумов состояний Трп* и CTS примерно постоянна. Это соответствует случаю «замороженной» сольватационной координаты. В области $-110^{\circ}\text{C} \div -80^{\circ}\text{C}$ разность энергий спектральных максимумов состояний Трп* и CTS уменьшается, а затем начинает увеличиваться. Как предполагалось ранее, в области температур

$-110^{\circ}\text{C} \div -80^{\circ}\text{C}$ молекула Трп* действительно сольватируется быстрее, чем CTS, поэтому наблюдается минимум кривой $\Delta EC_{1,2}$. С дальнейшим ростом температуры уже CTS начинает соль-

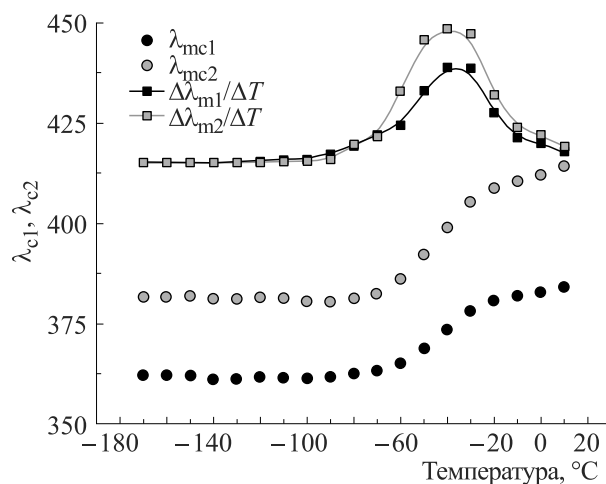


Рис. 6. Температурная зависимость положений спектральных максимумов компонент разложения спектров флуоресценции триптофана на гауссовы компоненты. λ_{mC1} (●) соответствует компоненте флуоресценции Трп*, λ_{mC2} (○) соответствует компоненте флуоресценции CTS. Данные зависимости показаны для образцов, замороженных в темноте. Для образцов, замороженных на свету, получены близкие данные. $\Delta\lambda_{m1}/\Delta T$ (■) и $\Delta\lambda_{m2}/\Delta T$ (□) — скорости изменения положений максимумов первого и второго гауссовых компонент разложения спектров флуоресценции от температуры. Данные зависимости показаны в относительном масштабе.

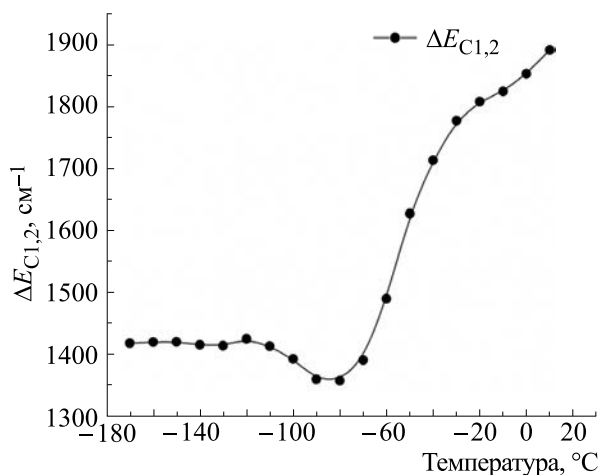


Рис. 7. Разность энергий спектральных максимумов компонентов разложения спектров флуоресценции триптофана $\Delta E_{C1,2}$ в зависимости от температуры.

ватироваться быстрее, чем Tgr*, это приводит к увеличению разности энергий спектральных максимумов состояний Tgr* и CTS (рис. 7). Максимальный прирост разности энергий спектральных максимумов состояний Tgr* и CTS происходит в области температуры -40°C . Таким образом, мы отчетливо видим, что с увеличением температуры от -80°C до 10°C CTS сольватируется быстрее, чем состояние Tgr*, так как в этой области температур в окружении CTS структурный (фазовый) переход захватывает большее количество водородных связей, чем в окружении Tgr*. Этот результат подтверждает уже сделанное нами предположение о том, что в температурном диапазоне от -80°C до 10°C происходит отступление температурной динамики переходов возбужденной молекулы триптофана от стандартного аррениусовского поведения с постоянной энергией активации за счет фазового перехода в системе водородных связей в ее окружении.

Отметим, что обнаруженные в работе температурные зависимости константы скорости прямого перехода Tgr* $\rightarrow$ CTS (k_{12}) и обратного перехода CTS $\rightarrow$ Tgr* (k_{21}) наблюдаются только для замороженных водных растворов триптофана, для которых возможно возникновение упорядоченной сетки водородных связей, тогда как для триптофана, например, в глицерине, такие эффекты не наблюдаются (данные не показаны).

Использованный в работе спектрально-динамический подход при исследовании температурных зависимостей процессов переходов возбужденных состояний Tgr позволил обнаружить и обосновать возникновение неравновесных фазовых переходов в системе водородных связей в определенном диапазоне температур в окруже-

нии Tgr* и CTS. Такой подход может, очевидно, быть полезен и при исследовании переходов возбужденных пигментов в белковой среде, обладающей упорядоченной системой водородных связей. Состояние системы водородных связей во многом определяет характер внутримолекулярной микроконформационной динамики водно-белковой среды, влияющей на функциональную активность триптофана.

Полученные в работе результаты во многом объясняются уникальными свойствами водной среды, ее переходами в неравновесные состояния, а также способностью к самоорганизации при внешнем воздействии. Такие структурные особенности воды изучались разными авторами во многих работах. В частности, в работе [23] изучали модуляцию спектра спонтанной флуоресценции триптофана, при этом авторы интерпретировали воду и водные растворы как неравновесные системы, способные к самоорганизации. В работе [24] было показано, что неравновесность воды обеспечивается сильно неравновесным отношением *орто/пара*-спиновых изомеров H_2O , вращательные спектры которых в терагерцовой области обнаружены в воде методом нелинейно-оптической спектроскопии когерентного антистоксового рассеяния. Способность воды к самоорганизации было подтверждено в эксперименте. Так устойчивое образование льдоподобных структур в воде наблюдалось в воде при комнатной температуре в работе [25]. Также существенно, что эти структуры формируются и в гидратных оболочках водных растворов спиртов [26], что позволяет существенно расширить номенклатуру исследуемых сред, в том числе водно-белковых фотобиологических структур.

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. L. Dashnau, B. Zelent, and J. M. Vanderkooi, *Bio-phys. Chem.*, **114**, 71 (2005).
2. D. E. Schlamadinger, J. E. Gable, and J. E. Kim, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 14769 (2009).
3. Э. А. Бурштейн, *Молекуляр. биология*, **17**, 455 (1983).
4. A. G. Szabo and D. M. Rayner, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 554 (1980).

5. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. (Springer, New York, 2006).
6. P. D. Adams, Y. Chen, K. Ma et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9278 (2002).
7. J. A. Ross and D. M. Jameson, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 1301 (2008).
8. P. P. Knox, E. P. Lukashev, V. V. Gorokhov, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **189**, 145 (2018).
9. P. P. Knox, V. V. Gorokhov, B. N. Korvatovsky, et al. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **393**, 112435 (2020).
10. В. В. Горохов, Б. Н. Корватовский, П. П. Нокс и др., Докл. РАН. Науки о жизни, **498**, 19 (2021).
11. В. З. Пашенко, В. В. Горохов, Б. Н. Корватовский и др., Биофизика, **66**, 354 (2021).
12. J. Pieper, Th. Hauss, A. Buchsteiner, et al., *Biochemistry*, **46**, 11398 (2007).
13. W. Doster, *Eur. Biophys. J.*, **37**, 591 (2008).
14. K. L. Han and G. J. Zhao, *Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State* (John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2011).
15. H. Liu, H. Zhang, and B. Jin. *Spectrochim. Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **106**, 54 (2013).
16. Р. Блинц и Б. Жекш, *Сегнетоэлектрики и антисегнетоэлектрики. Динамика решетки* (Мир, М., 1975).
17. K. Vandewal, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **67**, 113 (2016).
18. M. G. Müller, K. Griebenow, and A. R. Holzwarth, *Chem. Phys. Lett.*, **199**, 465 (1992).
19. Y. Miloslavina, M. Szczepaniak, M. G. Muller, et al. *Biochemistry*, **45**, 2436 (2006).
20. R. A. Marcus and N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 265 (1985).
21. P. M. Krasilnikov, P. P. Knox, and A. B. Rubin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8**, 181 (2009).
22. А. Б. Рубин, *Биофизика* (М., 2013), т. 3.
23. В. И. Лобышев, Б. Д. Рыжиков и Р. Э. Шихлинская, *Биофизика*, **43** (4), 710 (1998).
24. S. Pershin and A. Bunkin, *Laser Physics*, **19**, 1410 (2009). DOI: 10.1134/S1054660X0907007X
25. K. B. Jinesh and J. W. M. Frenken, *Appl. Phys. Lett.*, **101**, 036101 (2008).
26. J. Davis, K. Gierszal, P. Wang, and D. Ben-Amotz, *Nature*, **491**, 582 (2012). DOI: 10.1038/nature11570

Influence of the Microenvironment Dynamics of Tryptophan on Its Fluorescence Parameters at Different Temperatures

V.V. Gorokhov*, P.P. Knox*, B.N. Korvatovsky*, S.N. Goryachev*, V.Z. Paschenko*, and A.B. Rubin*

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

The temperature dependences of the fast and slow fluorescence decay components of aqueous solution of tryptophan molecules after freezing to $-170^{\circ}\text{C} \div 20^{\circ}\text{C}$ under actinic light and in the dark were investigated. A model of the direct and reverse electronic transitions from an excited state to the ground state and to the state with charge transfer for a tryptophan molecule was used to perform quantitative analysis. Three main spectral regions of tryptophan fluorescence are shown, they differ in the behavior of the temperature dependences depicted for the rates of transition from the excited state of tryptophan to the state with charge transfer. It has been shown that the dynamics of the hydrogen bonded system plays a key role in this transition. The system of hydrogen bonding determines the nonlinear nature in tryptophan fluorescence in the selected spectral regions. The non-linear behavior of the fluorescence lifetime and fluorescence spectra with temperature change is determined by the type of the interaction of tryptophan with water and ice. It has been found that temperature rearrangements play a critical role in hydrogen bonding structure of H_2O_2 that surrounds a tryptophan molecule in the excited state.

Keywords: tryptophan, fluorescence decay kinetics, temperature dependence, hydrogen bonds, molecular dynamics

СТРУКТУРА ЛЕД-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ *Myoxocephalus octodecemspinosus*, ПОЛУЧЕННАЯ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ И НА ОСНОВЕ СПЕКТРОВ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА

© 2023 г. Г.А. Олейник*, П. Жданова*, В.В. Коваль*, **, А.А. Черноносков*, С.В. Баранова*, #

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
пр-т Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

**Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090, Россия

#E-mail: swb@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 30.12.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Одна из стратегий, разработанных организмами для выживания в холодных экосистемах, где есть риск замерзания — наработка белков, способных связывать лед. Эти белки обладают важной способностью — связываться с поверхностью льда, влиять на его рост и предотвращать повреждение и гибель клеток. Для понимания механизма взаимодействия таких белков со льдом, необходимо знать их структуру. Данное исследование вносит вклад в изучение структурно-динамических механизмов действия лед-связывающих белков, которые обеспечивают адаптацию организмов в критических условиях. Изучение вклада белков, способных связывать лед, в адаптацию к холоду открывает широкие возможности в решении ряда интересных задач медицины, включая разработку эффективных клеточных и органных криопротекторов, а также долгосрочного хранения продуктов питания без потери их потребительских свойств в пищевой промышленности.

Ключевые слова: лед-связывающие белки, белки-антифризы, молекулярная динамика, круговой дихроизм, криопротекторы.

DOI: 10.31857/S0006302923040026, EDN: KJBZCU

Одна из стратегий, разработанных организмами для выживания в холодных экосистемах, где есть риск замерзания — наработка белков, способных связывать лед. Лед-связывающие белки обладают уникальным свойством связываться с поверхностью льда и, таким образом, контролируют его рост, тем самым помогая организмам избежать критических повреждений при понижении температуры. Это свойство позволяет им влиять на рост льда разными способами: формировать кристаллы льда определенной структуры, снижать температуру замерзания, препятствовать рекристаллизации и подавлять активность зародышеобразования льда. Зародышеобразование — это один из этапов формирования кристаллов льда, который инициируют инородные частицы (зародышеобразователи льда, активаторы). Лед-

связывающие белки предотвращают ассоциацию воды с зародышеобразователями льда и, как следствие, образование кристаллов [1, 2].

Несмотря на то, что в последнее время в научной литературе наблюдается повышенный интерес к лед-связывающим белкам [3, 4], структурно-динамические механизмы действия этих белков до сих пор не известны полностью.

Способность лед-связывающих белков контролировать рост льда может быть использована при хранении продуктов питания, в сельскохозяйственном производстве и для криоконсервации клеток, тканей и органов в медицине.

Первые лед-связывающие белки были описаны чуть больше 50 лет назад. Из сыворотки крови трех антарктических морских рыб был выделен белок, вклад которого в понижение ее точки замерзания составил 30% [5]. С тех пор исследователи обнаружили, что белки, способные связывать лед, очень разнообразны, существенно отличаются по размеру и структуре, кроме того, они и

Сокращение: MALDI-TOF — (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) — матрично-активированная лазерная десорбционно/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия.

по-разному функционируют [6–8]. Первыми были охарактеризованы белки-антифризы, которые подавляют рост льда [9]. Первоначально у рыб было найдено три типа белка, но коллективом авторов в 1996 г. из сыворотки крови *Myoxocephalus octodecimspinosus* (Longhorn sculpin) был выделен белок-антифриз, не похожий на ранее известные классы [10]. Характеризация этого белка показала, что, хотя он и является высокоспиральным по структуре, его молекулярная масса (12299 Да) намного больше, чем у других представителей лед-связывающих белков [10].

Последовательность белка-антифриза из сыворотки крови *Myoxocephalus octodecimspinosus* состоит из 108 (соответствует дикому типу белка) и 128 аминокислотных остатков (соответствует полноразмерному белку) [10, 11]. В организме Longhorn sculpin сначала синтезируется белок-предшественник, а затем происходит расщепление. Последовательность из 20 аминокислот MKFSLVATIVLLALAQGSFA, вероятно, является сигнальной последовательностью для секреции, а сам пептид — сильно гидрофобный [12].

В данной работе приведен оптимизированный метод выделения, очистки и характеристики рекомбинантного белка из *Myoxocephalus octodecimspinosus* (Long4) полноразмерной формы, а также с помощью методов кругового дихроизма и молекулярно-динамического моделирования описана его вторичная структура в комплексе со льдом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся лед-связывающий белок из рыбы Longhorn sculpin (*Myoxocephalus octodecemspinosus*). Плазмида со встроенным геном, кодирующим лед-связывающие белки и содержащим N-концевую метку His₆ и сайт расщепления протеазы TEV (MENLYFQS), была получена от ООО «Евроген» (Россия).

Получение белка. Плазмиду, содержащую целевой ген белка Long4, трансформировали в химически компетентные клетки BL21 *E. coli* по стандартному протоколу, описанному в работе [13]. Культуру клеток с векторной конструкцией выращивали в среде для роста бактерий Luria Broth с 50 мкг/мл канамицина при 37°C. При достижении OD₆₀₀ значения 0.5 температуру снижали до 15°C и инкубировали 1 ч (90 об/мин). Экспрессию белка индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом до конечной концентрации 1 мМ и культивированием в течение 18 ч при 15°C (220 об/мин). Клетки лизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора клеток Sonopuls HD 4100 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Германия), проводя на льду 16 циклов обработки ультразвуком по 15 с.

Полученный гомогенат разделяли центрифугированием 20000 g в течение 1 ч.

Белок выделяли на хелатирующей колонке Hi-Trap-ChelatingTM (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США) с последующей дополнительной очисткой ионообменной хроматографией на колонке Q-Sepharose FF (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США). Концентрацию гомогенного препарата белка определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop One^C (Thermo Scientific, США).

Характеризация белка. Белок был охарактеризован методом масс-спектрометрии с лазерной десорбционной ионизацией в присутствии матрицы (MALDI-TOF). Для анализа проводили гель-электрофорез в 18%-м полиакриламидном геле, белковые пятна вырезали из геля и расщепляли трипсином согласно методике, описанной в работах [14, 15]. Регистрацию масс-спектров осуществляли на MALDI-TOF-масс-спектрометре Autoflex Speed (Bruker, Германия), снабженном азотным лазером (337 нм) (VSL-337 ND, Laser Science, США), с продолжительностью импульса 1–5 нс. В качестве матрицы был использован насыщенный раствор α-циано-4-гидрокориичной кислоты в смеси ацетонитрила и 0.1%-й трифторуксусной кислоты (1 : 2). К 1 мкл реакционной смеси, содержащей гидролизованный белок, добавляли 1 мкл 0.2%-й трифторуксусной кислоты и 1 мкл матрицы, затем 1 мкл конечной смеси наносили на мишень для MALDI масс-спектрометрии, мишень высушивали на воздухе. Калибровка MALDI-спектров была проведена с использованием Peptide calibration standart (Bruker Daltonic, Германия).

Круговой дихроизм. Спектры кругового дихроизма регистрировали при комнатной (25°C) и пониженной (1.5°C) температуре с использованием спектрополяриметра J-600 (Jasco, Япония) в кювете с оптическим путем 1 см в диапазоне длин волн 200–240 нм с шагом 1 нм, используя раствор рекомбинантного белка в концентрации 0.03 мг/мл в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (Na₂HPO₄–NaH₂PO₄, pH 7.4), содержащем 100 мМ NaCl.

Молекулярное моделирование. Для получения трехмерной структуры белка Long4 использовали моделирование по гомологии с помощью веб-серверов AlphaFold [16] и SWISS-MODEL [17]. Моделирование молекулярной динамики пространственной структуры белка осуществляли с использованием программного обеспечения Amber20 [18] с ускоренным кодом для GPU [19, 20] и силовыми полями ff14SB для белка и TIP5P [21] для льда и растворителя. Для генерации льда использовали GenIce2 [22] и модель воды tip5p. Молекулярную динамику проводили для белка и его комплекса со льдом в явной модели раствори-

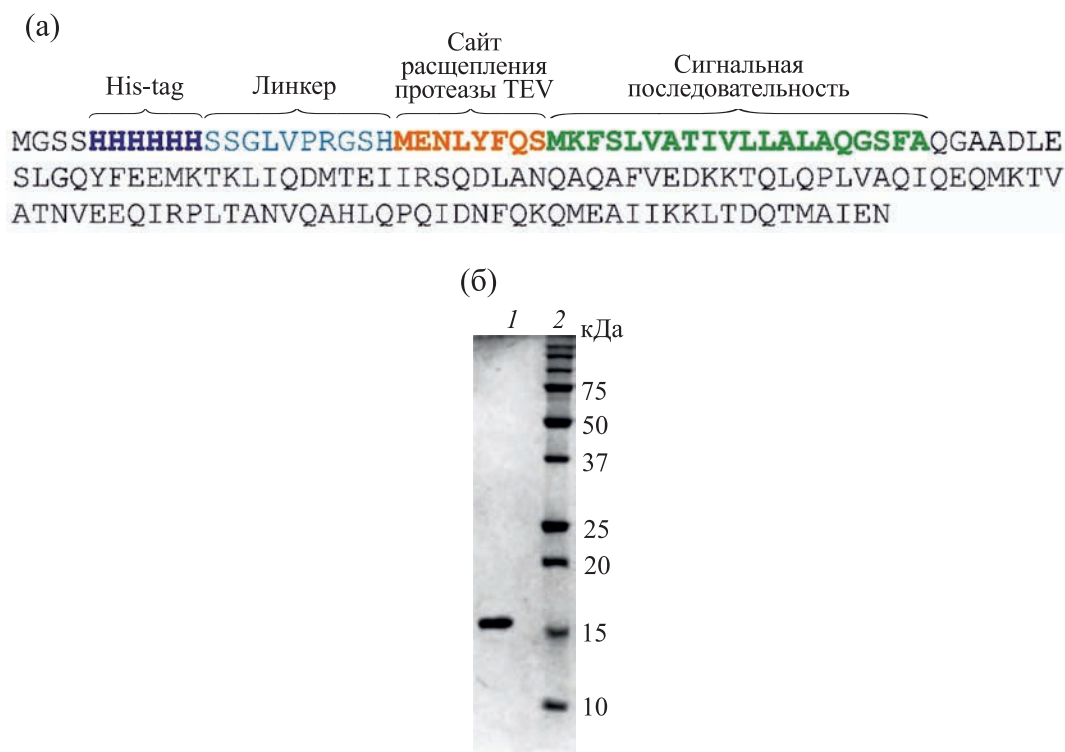


Рис. 1. (а) — Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка Long4. Выделены следующие фрагменты последовательности: His-tag, сайт расщепления протеазы TEV, сигнальная последовательность и линкер между His-tag и сайтом расщепления протеазы TEV. (б) — Электрофоретический контроль гомогенности препарата белка Long4: дорожка 1 — белок Long4 с молекулярной массой 17.5 кДа (масса белка приведена с His-tag и сайтом расщепления протеазы TEV); дорожка 2 — белковые маркеры молекулярной массы.

теля в течение 50 нс. Системы состояли из белка (128 аминокислот), поверхности льда (8320 молекул), 9841 молекул воды в модели белка и 18844 — в системе со льдом. Системы сначала минимизировали в неявной модели растворителя для релаксации молекулы белка. Затем белок, лед и комплекс растворяли в *tip5p*-воде. Полученные системы минимизировали в две стадии, на первой — релаксировали молекулы растворителя, удерживая белок и лед, на второй — релаксации подвергали всю систему. Далее проводили постепенное нагревание до 269 К. Дополнительно для белка проводили нагревание до 300 К. Молекулярную динамику проводили при установленных температурах (269 К для всех систем и 300 К дополнительно для белка в растворителе) в течение 50 нс. Анализ полученных траекторий проводили с помощью Chimera 1.16.1 [23] и CPPTRAJ [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеризация белка. В ходе разработанной и оптимизированной методики получен гомогенный полноразмерный белок Long4 (рис. 1а). Гомогенность белка подтверждали методом гель-

электрофореза в 18%-м полиакриламидном геле (рис. 1б).

Характеризацию проводили методом MALDI масс-спектрометрии. Для анализа использовали наиболее распространенный вариант «Bottom-up» — анализ соединений пептидной структуры [25]. Вырезанное из геля белковое пятно расщепляли трипсином по пептидным связям, образованным карбоксильными группами лизина и аргинина. После ферментативного расщепления полученную смесь пептидов очищали от низкомолекулярных примесей на ZipTip C₁₈ и анализировали на MALDI-TOF масс-спектрометре Autoflex Speed (Bruker, Германия).

Идентификацию белка проводили по полученным массам пептидов в Mascot по базе данных Swiss-Prot с допуском 0.3 Да. Типичный масс-спектр MALDI-TOF трипсинового гидролизата Long4 представлен на рис. 2.

После проведения поиска в системе белков Mascot с допуском 0.3 Да полученный белок был идентифицирован как белок-антифриз из *Myoxocephalus octodecemspinosus* (Longhorn sculpin). Были найдены пептиды, суммарно соответствующие 55% последовательности белка.

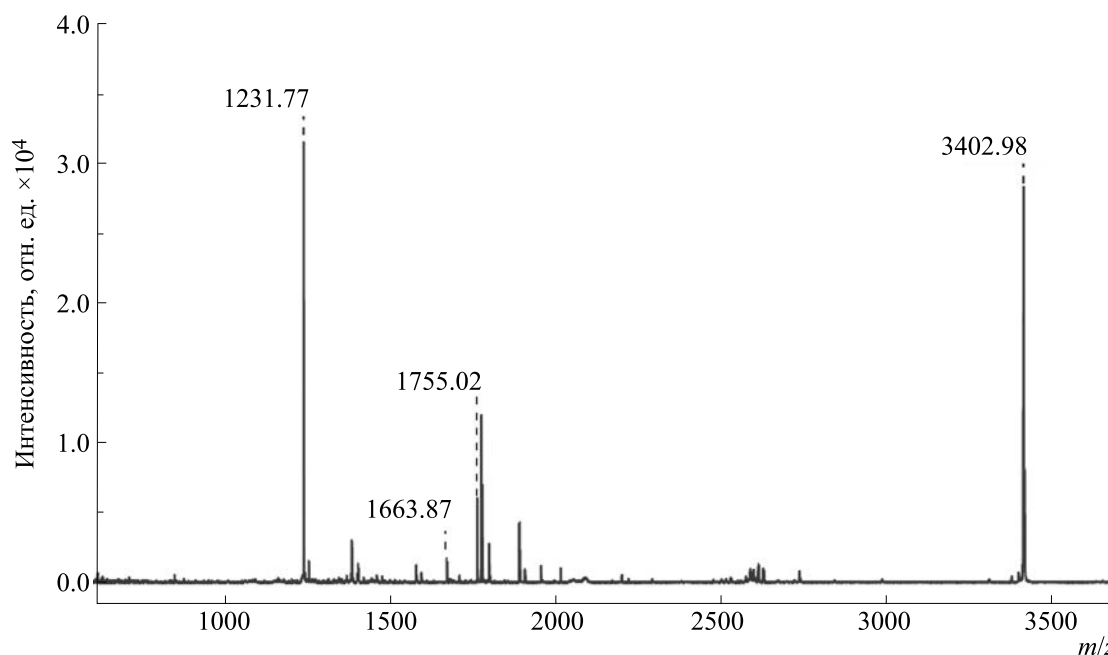


Рис. 2. Масс-спектр MALDI-TOF трипсинового гидролизата белка Long4. На рисунке приведены массы характерных пептидов.

Определение структуры белка Long4. Вторичную структуру белка изучали методом спектроскопии кругового дихроизма. Спектры кругового дихроизма представлены на рис. 3. Экспериментальные данные обрабатывали на сайте DichroWeb (DichroWeb job submission form (bbk.ac.uk)). Спектр кругового дихроизма при комнатной температуре представляет собой кривую, характерную для белков с невысоким содер-

жанием α -спиралей, при понижении температуры вклад α -спиралей в структуру белка увеличивается. Вероятно, при понижении температуры α -спирали способствуют увеличению поверхности соприкосновения со льдом. Это согласуется и с данными полученными разными коллективами авторов [10, 11]. Белок Long4 на N-конце содержит пироглутамильную группу и имеет высокое (17%) содержание глутамина, он сильно спирале-

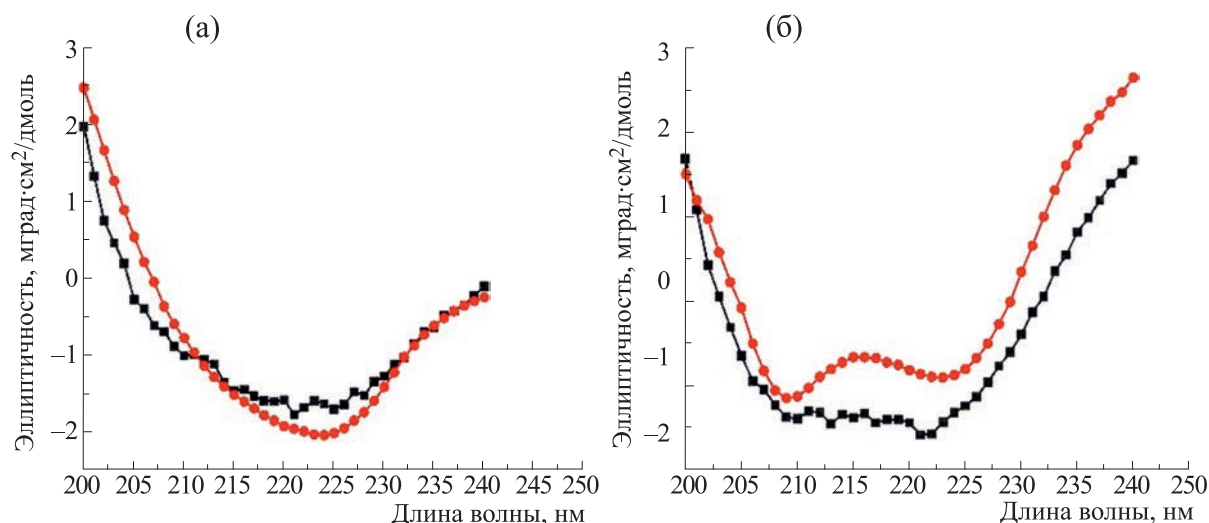


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма при различных температурах: (а) — 25°C, (б) — 1.5°C. Квадраты — кривая, построенная по экспериментальным данным, кружки — кривая построена после обработки экспериментальных значений на сайте DichroWeb. Символ на кривой обозначает шаг длин волн.

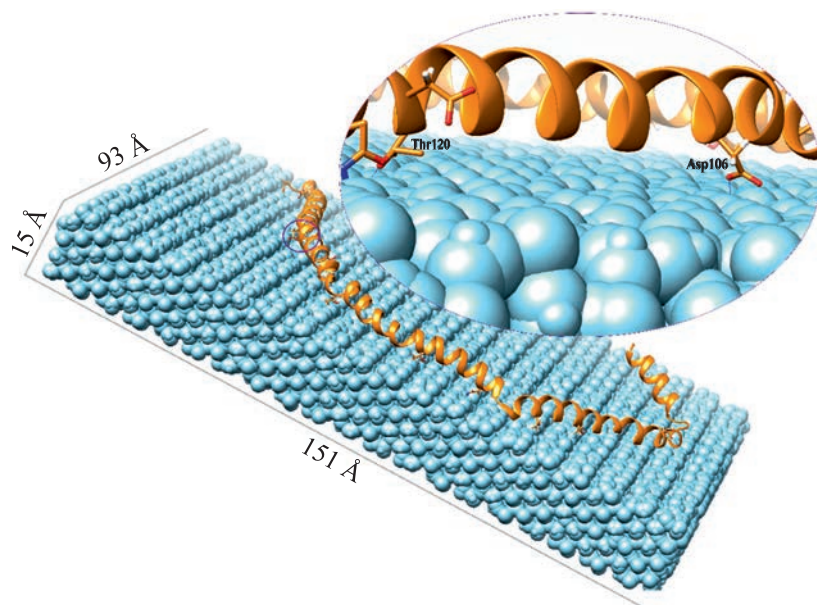


Рис. 4. Модель связывания белка с поверхностью льда 1h. Размеры кристалла льда указаны в ангстремах.

видный [10, 11]. Спектры кругового дихроизма и конформационный анализ, основанный на данных о последовательности, показали, что этот белок имеет четыре спирали и, вероятно, складывается в пучок [10, 26].

Компьютерное моделирование. Одним из подходов, позволяющих предложить конформационные изменения, происходящие при понижении температуры, являются методы компьютерного моделирования. Белок Long4 из *Myoxocephalus octodecemspinosus* на сегодняшний день не имеет структуры в базе данных PDB. Моделированием по гомологии с помощью веб-серверов AlphaFold [16] и SWISS-MODEL [17] в настоящей работе получены структуры белка Long4. Структуры использовали для проведения молекулярной динамики в неявной модели растворителя в силовом поле ff14SB [27]. Белок флуктуировал на протяжении всех 50 нс молекулярной динамики. Из литературных данных известно, что наиболее близкими к реальным температурам плавления обладают модели воды tip4p/ice и tip5p [28]. В данной работе была использована модель tip5p. Изучаемые системы содержали белок в явной модели растворителя и комплекс «белок—лед». Системы на протяжении всей динамики оставались стабильными. Анализ полученных траекторий показал, что среднеквадратичное отклонение для белка в явном растворителе при 269 К достигало ~25 Å, хотя альфа-спирали оставались довольно стабильными и значение среднеквадратичного отклонения для данных структур находилось в области 5 Å. Комплекс белка со льдом, в свою очередь, проявляет большую стабильность и зна-

чение среднеквадратичного отклонения для белковой молекулы достигает 8 Å благодаря неструктурированным областям, а отклонения во вторичных структурах, взаимодействующих с поверхностью льда, колеблется в районе 2 Å. Показано, что с поверхностью льда образуют водородные связи (рис. 4) Thr, Asn, Asp, Gln и Glu в различных позициях, находящиеся на расстоянии 15–20 Å друг от друга, что согласуется с литературными данными [29]. На малых временах видимого эффекта на стабилизацию/дестабилизацию структуры льда не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании оптимизирован метод выделения и очистки рекомбинантного белка Long4, белок охарактеризован методом масс-спектрометрического анализа. Методом кругового дихроизма показано, что структура молекулы белка Long4 может быть представлена несколькими структурными типами: α -спиралями и неструктурированными элементами. При этом вклад α -спиралей в структуру белка увеличивается при понижении температуры. Полученные данные согласуются со структурой, полученной методами компьютерного моделирования. Показано, что в процессе динамики аминокислотные остатки Thr, Asn, Asp, Gln и Glu образуют водородные связи с поверхностью льда, что стабилизирует структуру белка при 269 К.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 23-24-00256.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Kawahara, in *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, Ed. by R. Margesin (Springer International Publishing, Cham, 2017), PP. 237–257.
2. J. S. H. Lorv, D. R. Rose, and B. R. Glick, *Scientifica (Cairo)*, **2014**, 976895 (2014).
3. M. Bar Dolev, I. Braslavsky, and P. L. Davies, *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 515 (2016).
4. A. Białkowska, E. Majewska, A. Olczak, and A. Twarda-Clapa, *Biomolecules*, **10** (2), 274 (2020).
5. A. L. DeVries and D. E. Wohlschlag, *Science*, **163** (3871), 1073 (1969).
6. C.-H. C. Cheng, *Curr. Opin. Genetics & Development*, **8** (6), 715 (1998).
7. C. Deng, C.-H. C. Cheng, H. Ye, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** (50), 21593 (2010).
8. D. Doucet, V. K. Walker, and W. Qin, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66** (8), 1404 (2009).
9. M. Bredow, V. K. Walker, *Ice-Binding Proteins in Plants. Front Plant Sci* **8**, S. 2153 (2017).
10. G. Deng, D. W. Andrews, and R. A. Laursen, *FEBS Lett.*, **402**, 17 (1997).
11. W. K. Low, Q. Lin, C. Stathakis, et al., *J. Biol. Chem.*, **276** (15), 11582 (2001).
12. Z. Zhao, G. Deng, Q. Lui, and R. A. Laursen, *Biochim. Biophys. Acta – Prot. Structure and Mol. Enzymol.*, **1382** (2), 177 (1998).
13. A. Y. Chang, V. W. Chau, J. A. Landas, and Y. Pang, *JEMI-methods*, **1**, 22 (2017).
14. *ProteaseMAX(TM) Surfactant, Trypsin Enhancer Technical Bulletin TB373* (Promega Corporation, 2015).
15. A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann, *Anal. Chem.*, **68** (5), 850 (1996).
16. J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, et al., *Nature*, **596** (7873), 583 (2021).
17. A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, et al., *Nucl. Acids Res.*, **46** (W1), W296 (2018).
18. D. Case, K. Belfon, S. Ben-Shalom, et al., *Amber20* (University of California, San Francisco, 2020).
19. A. W. Götz, M. J. Williamson, D. Xu, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **8** (5), 1542 (2012).
20. R. Salomon-Ferrer, A. W. Götz, D. Poole, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **9** (9), 3878 (2013).
21. Y. Khalak, B. Baumeier, and M. Karttunen, *J. Chem. Phys.*, **149** (22), 224507 (2018).
22. M. Matsumoto, T. Yagasaki, and H. Tanaka, *J. Comput. Chem.*, **39** (1), 61 (2018).
23. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, and C. C. Huang, *J. Comput. Chem.*, **25** (13), 1605 (2004).
24. D. R. Roe and T. E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.*, **9** (7), 3084 (2013).
25. B. Bogdanov and R. D. Smith, *Mass Spectrom. Rev.*, **24** (2), 168 (2005).
26. G. Deng and R. A. Laursen, *Biochim. Biophys. Acta*, **1388** (2), 305 (1998).
27. C. Tian, K. Kasavajhala, K. A. A. Belfon, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **16** (1), 528 (2020).
28. C. Vega, E. Sanz, and J. L. F. Abascal, *J. Chem. Phys.*, **122** (11), 114507 (2005).
29. A. S. Oude Vrielink, A. Aloj, L. L. C. Olijve, and I. K. Voets, *Biointerphases*, **11** (1), 18906 (2016).

Structure of an Ice-Binding Protein from *Myoxocephalus octodecemspinosus* Determined by Molecular Dynamics and Based on Circular Dichroism Spectra

G.A. Oleinik*, P. Zhdanova*, V.V. Koval*, **, A.A. Chernonosov*, and S.V. Baranova*

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, prosp. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

One of the survival strategies evolved by the organisms living in cold ecosystems is production of ice-binding proteins. An important feature of these proteins is to bind to the surface of ice, keep the ice from growing and prevent cells from damage and death. To understand the mechanism underlying interaction between ice-binding proteins and ice, it is necessary to know the structure of these extraordinary proteins. This study contributes towards information on the structural and dynamic mechanisms of ice-binding proteins that ensure the adaptation of organisms to extreme conditions. Research on the mechanisms by which ice-binding proteins develop adaptation to cold opens up great opportunities in solving a wide range of interesting problems in medicine, such as the development of effective cryoprotectants for cells and organs, as well as in the food industry, such as long-term food storage without losing nutritional quality at the consumer level.

Keywords: ice-binding proteins, antifreeze proteins, molecular dynamics, circular dichroism, cryoprotectants

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ II КАТИОНАМИ ЛАНТАНОИДОВ

© 2023 г. Е.Р. Ловягина*, #, А.В. Локтюшкин*, Н.С. Васильев*, Б.К. Сёмин*

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

#E-mail: elena.lovaygina@gmail.com

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 27.03.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Исследован процесс взаимодействия катионов La^{3+} и Tb^{3+} с Са-связывающим участком кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II без кальция. Катионы связываются необратимо и не могут быть удалены переосаждением препарата или замещением их катионом Ca^{2+} . Эта способность лантаноидов прочно связываться с Са-связывающим участком была использована для исследования возможности влияния связанного катиона Ln^{3+} на высокоаффинный Мп-связывающий участок кислород-выделяющего комплекса. С этой целью из кислород-выделяющего комплекса препарата фотосистемы II без кальция с заблокированным катионами La^{3+} или Tb^{3+} Са-связывающим участком гидрохиноном экстрагировали катионы марганца, после чего исследовали активность высокоаффинного Мп-связывающего участка, используя экзогенные доноры электронов ($\text{Mn}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) и 1,5-дифенилкарбазид. Было установлено, что связанный с Са-связывающим участком катион лантаноида значительно ингибирует скорость окисления доноров электронов через высокоаффинный Мп-связывающий участок. Обсуждается механизм обнаруженного эффекта.

Ключевые слова: фотосистема II, кислород-выделяющий комплекс, высокоаффинный Мп-связывающий участок, кальций, лантаноиды.

DOI: 10.31857/S0006302923040038, EDN: KJDNJM

Каталитический центр комплекса, выделяющего молекулярный кислород в процессе окисления двух молекул воды (кислород-выделяющий комплекс, КВК) в окисленных фотосинтетических организмах состоит из четырех катионов Мп и одного катиона Ca^{2+} , соединенных между собой пятью кислородными мостиками [1, 2]. Этот металлический кластер фиксирует четыре молекулы воды, две из которых связаны с катионом Мп4, а две другие — с катионом Ca^{2+} . Возможно, одна из молекул воды, связанных с катионом Ca^{2+} , является молекулой, участвующей в образовании молекулярного кислорода [3, 4], хотя роль Ca^{2+} в процессе окисления воды может быть и другой [5–7].

Сокращения: КВК — кислород-выделяющий комплекс, ФСII — фотосистема II, ФСII(-Са) — фотосистема II без катиона кальция в кислород-выделяющем комплексе, Ln^{3+} — катион лантаноида, Хл — хлорофилл, РЦ — реакционный центр, ДХФИФ — 2,6-дихлорофенолиндофенол, ДФК — 1,5-дифенилкарбазид, ФСII(-Са,+Ln) — фотосистема II без катиона кальция в кислород-выделяющем комплексе с заблокированным катионом лантаноида Са-связывающим участком.

Катион Ca^{2+} может быть экстрагирован из КВК путем обработки мембран фотосистемы II (ФСII) средой с высокой ионной силой (1–2 М NaCl) [8] или цитратным буфером с низким pH [9], что сопровождается потерей способности ФСII к выделению молекулярного кислорода. Кислород-выделяющая активность препаратов ФСII без катиона Ca^{2+} в КВК (ФСII(-Са)) может быть в значительной степени восстановлена добавлением экзогенного Ca^{2+} в концентрации 10–30 мМ (до ~70%) [10]. С Са-связывающим участком КВК способны связываться и другие катионы металлов, однако восстановления кислород-выделяющей активности при этом не происходит [11]. Показано, что единственным ионом металла, который может функционально заместить Ca^{2+} , является Sr^{2+} [12]. Некоторые катионы металлов, включая лантаноиды [13, 14] и Cd^{2+} [15], конкурируют с Ca^{2+} за взаимодействие с Са-связывающим участком. Лантаноиды (Ln^{3+}) способны вытеснять катион Ca^{2+} из нативного КВК и связываться с освободившимся Са-связываю-

щим участком в мембранных препаратах ФСII [13], а также со свободным Са-связывающим участком в препаратах ФСII без кальция [14]. Связанные катионы Ln^{3+} не вытесняются катионом Ca^{2+} [13]. Несмотря на то, что лантаноиды эффективно конкурируют с катионами Ca^{2+} за Са-связывающие участки [16], они не способны восстановить процесс окисления воды марганцевым кластером. Это может быть связано с различиями в характеристиках катионов Ca^{2+} и Ln^{3+} (ионный радиус, рК связанной молекулы воды, валентность), но могут быть и другие причины. В этой связи важно отметить, что катионы Ln^{3+} способны эффективно связываться не только с Са-связывающим участком, но и с высокоаффинным Мп-связывающим участком в препаратах ФСII без марганца [17]. В данной работе мы исследовали возможные варианты механизма ингибирования лантаноидами КВК в препаратах ФСII(-Са).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты ФСII. Фрагменты фотосинтетических мембран, обогащенные ФСII (BBY-тип), выделяли из листьев шпината *Spinacia oleracea* L. согласно методике, опубликованной в работе [18]. Скорость выделения кислорода полученными мембранными препаратами ФСII составляла 450–550 мкмоль O_2 мг Хл $^{-1}$ ч $^{-1}$. Концентрацию хлорофилла (Хл) определяли в 80%-м растворе ацетоне согласно методу, описанному в работе [19]. Препараты хранили при -80°C в буфере А следующего состава: 400 мМ сахарозы, 15 мМ NaCl, 50 мМ MES/NaOH (2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота), pH 6.5. Перед обработкой или измерением препараты размораживали в темноте при 5°C в течение 1 ч, далее они находились при тех же условиях. Активность контрольных препаратов ФСII в течение времени проведения экспериментов сохранялась постоянной. Концентрация реакционных центров (РЦ) ФСII рассчитана в мкМ из соотношения 250 молекул Хл на один РЦ [20, 21].

Удаление Ca^{2+} из кислород-выделяющего комплекса мембранных препаратов ФСII. Мембраны ФСII обрабатывали буфером, содержащим 2 М NaCl, 0.4 М сахарозы и 25 мМ MES/NaOH, pH 6.5 [8], в течение 15 мин при комнатной температуре и освещении 4 мкЭ·м $^{-2}$ ·с $^{-1}$. После инкубации мембраны осаждали и дважды отмывали буфером А. Полученные препараты ФСII(-Са) помимо катионов кальция не содержали двух периферических белков PsbQ и PsbP, защищающих КВК от проникновения экзогенных веществ.

Удаление Мп из кислород-выделяющего комплекса мембранных препаратов ФСII(-Са). Мембраны ФСII(-Са) (50 мкг Хл/мл) инкубировали с гидрохиноном (600 мкМ) в буфере А (pH 6.5) в темноте при 5°C в течение 30 мин. Затем к суспензии мембран добавляли 25 мМ CaCl_2 для удаления поверхностно связанных катионов Mn^{2+} , после инкубации в течение 2 мин мембраны осаждали и дважды отмывали буфером А. После обработки гидрохиноном в КВК полученных препаратов сохранялось 1.0 ± 0.1 Мп на один РЦ [23].

Измерение скорости выделения кислорода препаратами ФСII. Кинетику фотоиндуцированного выделения кислорода препаратами ФСII регистрировали амперометрически с помощью закрытого электрода Кларка в термостатируемой ячейке с интенсивным перемешиванием при 25°C . В качестве искусственного акцептора электронов использовали 2,6-дихлоро-*n*-бензохинон (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 200 мкМ. Для калибровки величины диффузионного тока использовали значение концентрации кислорода в воде в равновесии с воздухом при 25°C , равное 253 мкМ. Источником возбуждающего света служили светодиоды XBDROY (Cree Inc., США) с максимумом при длине волны 450 нм, обеспечивающие насыщающую интенсивность света (1800 мкЭ·м $^{-2}$ ·с $^{-1}$).

Спектральное определение фотохимической активности препаратов ФСII. Фотохимическую активность препаратов ФСII измеряли как скорость фотовосстановления экзогенного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндифенола (ДХФИФ) на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) в кюветах с длиной оптического пути 1 см. В качестве возбуждающего источника света использовали светодиоды XBDROY (Cree Inc., США). Перед трубкой фотоумножителя спектрофотометра устанавливали оранжевый стеклянный фильтр ОС-14, пропускающий свет с $\lambda > 590$ нм, для отсекающего возбуждающего света. Фотоиндуцированные изменения оптической плотности ДХФИФ регистрировали на длине волны 600 нм (максимум поглощения депротонированной формы ДХФИФ). Скорость восстановления ДХФИФ определяли, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon = 21.8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Са-связывающий участок КВК оксигенных организмов имеет два аминокислотных остатка D1-Asp170 и D1-Ala344, связывающих катион кальция с белком D1 реакционного центра ФСII и, одновременно, с катионами марганца Mn^{4+} и Mn^{2+} марганцевого кластера, т. е. карбоксильные группы аминокислотных остатков Asp170 и

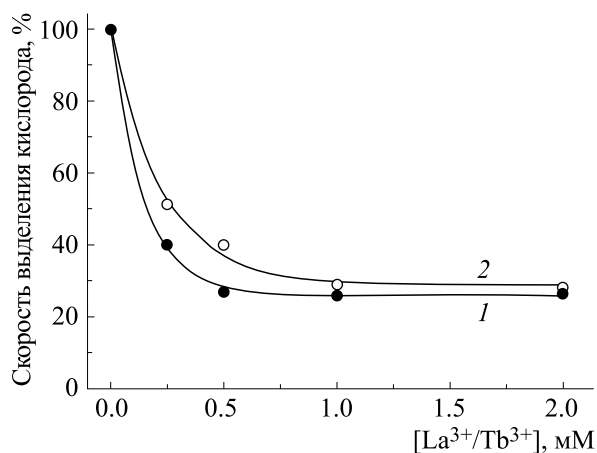


Рис. 1. Зависимость скорости выделения кислорода препаратами ФСII(-Ca) от концентрации катионов $\text{La}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$ во время преинкубации. Мембраны ФСII(-Ca) (50 мкг Хл/мл) инкубировали в присутствии катионов La^{3+} (кривая 1) или Tb^{3+} (кривая 2) в течение 3 мин в темноте при комнатной температуре, после чего осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буфере А (10 мкг Хл/мл). Скорость выделения кислорода измеряли в присутствии 10 мМ CaCl_2 .

Ala344 являются бидентантными лигандами. Соединение катиона кальция с катионами марганца дополнительно осуществляется и через взаимодействие с кислородными мостиками O1, O2 и O5 [2]. С катионом Ca^{2+} также связаны две молекулы воды — W3 и W4. Эти данные позволяют полагать, что связывание катиона лантаноида с Ca-связывающим участком КВК может затрагивать в первую очередь катионы Mn4 и Mn2 марганцевого кластера через бидентантные лиганды. Один из этих катионов, Mn4, связан с высокоаффинным Mn-связывающим участком [1, 24, 25]. Функциональную активность этого участка довольно легко проверить. Если этот участок не занят катионом металла — Mn или Fe [26], то через него интенсивно фотоокисляются экзогенные катионы марганца донорной системы $[\text{Mn}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2]$ [27–29] тирозином $\text{Y}_Z^\bullet$ [30]. Учитывая изложенное выше, мы планировали проверить активность высокоаффинного Mn-связывающего участка в препаратах ФСII(-Ca) после замещения катиона Ca^{2+} катионом Ln^{3+} и последующей экстракции из этих препаратов катионов марганца.

В предварительном эксперименте мы исследовали возможность удаления связанного с Ca-связывающим участком катиона Ln^{3+} посредством центрифугирования суспензии мембран и их отмывки буфером А. Известно, что катионы кальция не могут вытеснять связанный катион лантаноида в мембранах ФСII [13] или ФСII(-Ca) [14], что свидетельствует о прочном связывании

катионов Ln^{3+} . Связанные с Ca-связывающим участком в мембранах ФСII(-Ca) катионы La^{3+} и Tb^{3+} также не удаляются процедурой переосаждения с последующей отмывкой (рис. 1). Это позволяет провести экстракцию марганца из препарата ФСII(-Ca) с заблокированным катионом лантаноида Ca-связывающим участком без потери Ln^{3+} .

Наиболее часто для удаления катионов марганца из КВК используется обработка щелочным Трис-буфером или раствором гидроксилamina, что позволяет практически полностью удалить марганец (остаточное содержание ≤ 0.5 Мн/РЦ [31]). В нашей работе мы использовали другой восстановитель для экстракции — гидрохинон. Гидрохинон восстанавливает только три катиона марганца из четырех, соответственно, в КВК остается один катион марганца [23]. Мы использовали этот восстановитель, чтобы определить, связан ли остающийся катион марганца с высокоаффинным Mn-связывающим участком. Следует отметить, что частичная экстракция катионов марганца из КВК (например двух катионов из четырех) сопровождается практически полной инактивацией выделения кислорода (остаточная активность около 10% [32]), но незначительным уменьшением скорости электронного транспорта (скорость восстановления ДХФИФ уменьшается лишь до 83% [23]), что свидетельствует о незначительном ингибировании реакции окисления воды. В случае экстракции марганца гидрохиноном остается только один Mn на РЦ, скорость выделения кислорода уменьшается до 8%, тогда как скорость восстановления ДХФИФ уменьшается лишь до 41% (рис. 2).

Далее мы исследовали влияние связанных с Ca-связывающим участком катионов La^{3+} (рис. 3) и Tb^{3+} (рис. 4) на скорость восстановления ДХФИФ в частицах ФСII(-Ca) после обработки их гидрохиноном. В качестве источника электронов использовали донорную пару $[\text{Mn}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2]$ или 1,5-дифенилкарбазид (ДФК). На рис. 3 и 4 показаны кинетики восстановления ДХФИФ, а в таблице представлены величины измеренных скоростей. Кинетики восстановления ДХФИФ в препаратах ФСII(-Ca), обработанных гидрохиноном (остаточное содержание марганца — один Mn/РЦ), представлены кривыми 1 на рис. 3 и 4. При измерении кинетик 2 были использованы препараты, приготовленные следующим образом: мембраны ФСII(-Ca) были проинкубированы 20 мин с 1 мМ La^{3+} (рис. 3) или Tb^{3+} (рис. 4), после чего мембраны были осажены центрифугированием и отмывы буфером А (ФСII(-Ca, +Ln)). Затем марганец был экстрагирован из КВК гидрохиноном. В случае донорной

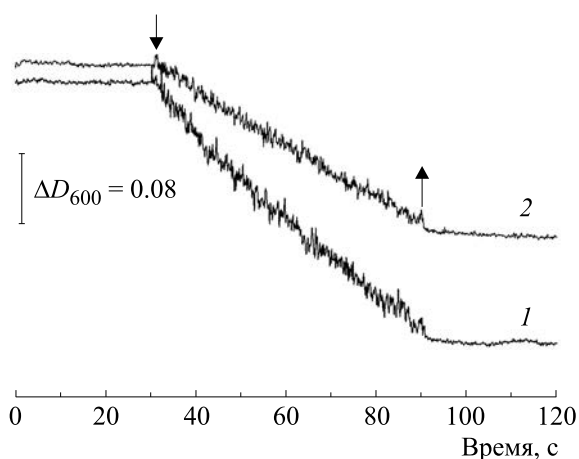


Рис. 2. Кинетики восстановления ДХФИФ мембранными препаратами ФСII(-Ca). Кривая 1 — препараты ФСII(-Ca); кривая 2 — препараты ФСII(-Ca), обработанные гидрохиноном. Все кинетики измерены при концентрации Хл 10 мкг/мл и концентрации ДХФИФ 40 мкМ без искусственного донора электронов. Скорость восстановления ДХФИФ нативными препаратами ФСII составляла 145 ± 5 мкмоль ДХФИФ мг Хл⁻¹·ч⁻¹ (100%), препаратами ФСII(-Ca) 100 ± 5 мкмоль ДХФИФ мг Хл⁻¹·ч⁻¹ (69%), препаратами ФСII(-Ca), обработанными гидрохиноном, 59 ± 7 мкмоль ДХФИФ мг Хл⁻¹·ч⁻¹ (41%).

пары $[\text{Mn}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2]$, донирующей электроны только через высокоаффинный Мп-связывающий участок, видно, что скорость восстановления ДХФИФ уменьшается до 76% при блокировании Са-участка катионом лантана (рис. 3а) и значительно больше уменьшается в случае катиона тербия (41%, рис. 4а). Этот факт ясно показывает, что связанные с Са-участком катионы La^{3+} и Tb^{3+} ингибируют высокоаффинный Мп-связывающий участок. В случае ДФК, другого донора электронов, ингибирование восстановления ДХФИФ выражено значительно слабее — остаточная активность $\approx 84\%$ для обоих катионов (рис. 3б и 4б). Это объясняется тем, что ДФК донирует электроны через два участка — высокоаффинный и низкоаффинный [33], что снижает долю потока электронов через высокоаффинный участок. Этот факт также свидетельствует о том, что в препаратах ФСII(-Ca), обработанных гидрохиноном, сохраняющийся катион марганца не связан с высокоаффинным участком. Полученные результаты демонстрируют, что связанные с Са-участком катионы лантаноидов ингибируют высокоаффинный Мп-связывающий участок, но не полностью. Это подтверждается тем, что добавление катионов La^{3+} или Tb^{3+} к препаратам ФСII(-Ca, +Ln), обработанным гидрохиноном,

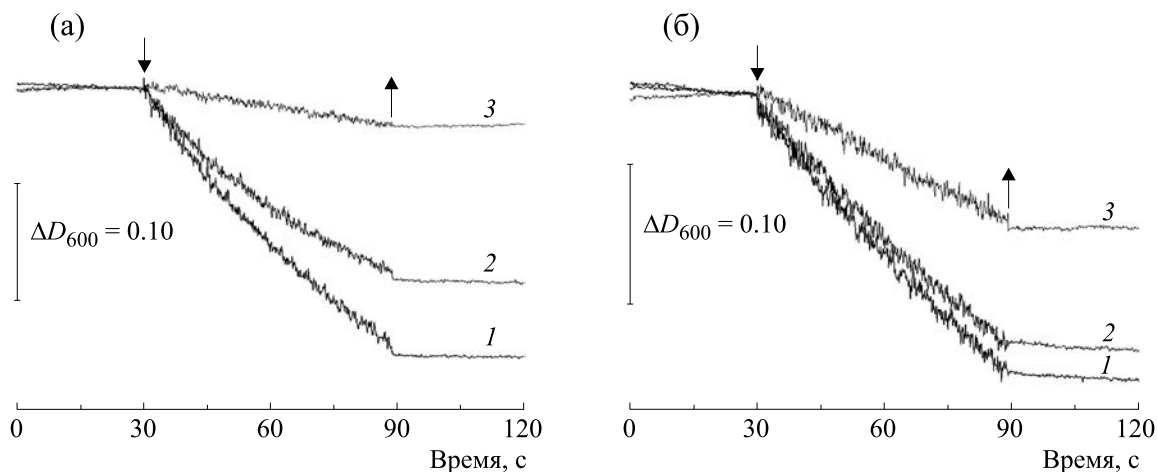


Рис. 3. Влияние La^{3+} на восстановление ДХФИФ в препаратах ФСII(-Ca), обработанных гидрохиноном: кривые 1 — препараты ФСII(-Ca), обработанные гидрохиноном (условия обработки приведены в разделе «Материалы и методы»); кривые 2 — препараты ФСII(-Ca) (250 мкг Хл/мл) инкубировали с 1 мМ La^{3+} в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте, затем центрифугировали в режиме $16100 \text{ g} \times 5 \text{ мин}$ и ресуспендировали в буфере А, после чего обрабатывали гидрохиноном; кривые 3 — препараты ФСII(-Ca) (250 мкг Хл/мл) инкубировали с 1 мМ La^{3+} в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте, затем центрифугировали в режиме $16100 \text{ g} \times 5 \text{ мин}$ и ресуспендировали в буфере А, после чего обрабатывали гидрохиноном и измеряли скорость восстановления ДХФИФ в присутствии 1 мМ La^{3+} . Все кинетики были измерены при концентрации хлорофилла 10 мкг/мл и концентрации ДХФИФ 40 мкМ в присутствии донорной пары $[2 \text{ мкМ } \text{Mn}^{2+} + 3 \text{ мМ } \text{H}_2\text{O}_2]$ (а) или 200 мкМ 1,5-дифенилкарбазида (б). Стрелки показывают моменты включения и выключения света. Скорость восстановления ДХФИФ препаратами ФСII(-Ca), обработанными гидрохиноном, в присутствии донорной пары $[\text{Mn}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2]$ составляла 88 ± 7 мкмоль ДХФИФ мг Хл⁻¹·ч⁻¹ (61% скорости восстановления ДХФИФ нативными препаратами ФСII), в присутствии ДФК 63 ± 6 мкмоль ДХФИФ мг Хл⁻¹·ч⁻¹ (43% скорости восстановления ДХФИФ нативными препаратами ФСII).

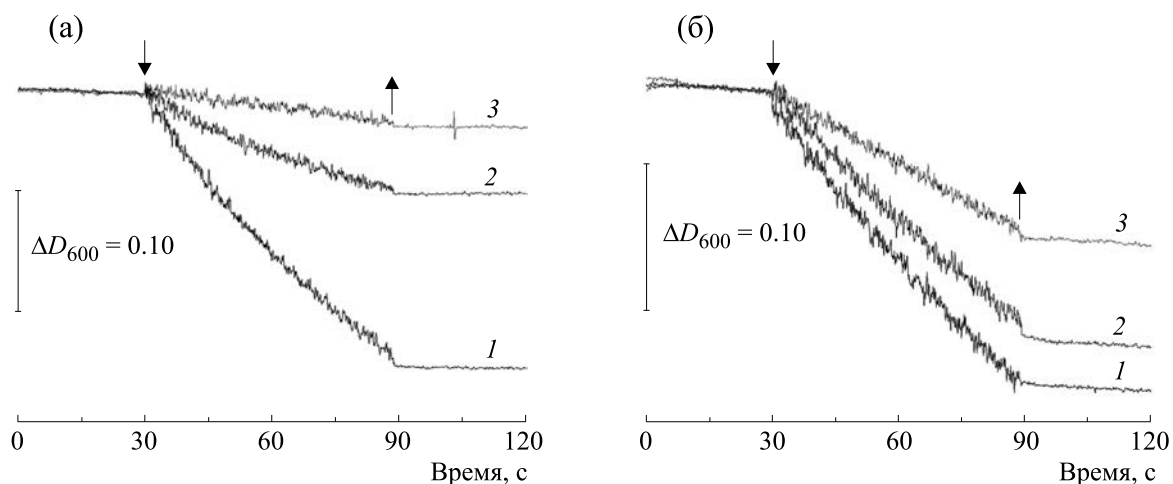


Рис. 4. Влияние Tb^{3+} на восстановление ДХФИФ в препаратах ФСII(-Ca), обработанных гидрохиноном: кривые 1 – препараты ФСII(-Ca), обработанные гидрохиноном; кривые 2 – препараты ФСII(-Ca) (250 мкг Хл/мл) инкубировали с 1 мМ Tb^{3+} в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте, затем центрифугировали при 16100 g в течение 5 мин и ресуспендировали в буфере А, после чего обрабатывали гидрохиноном; кривые 3 – препараты ФСII(-Ca) (250 мкг Хл/мл) инкубировали с 1 мМ Tb^{3+} в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте, затем центрифугировали 16100g x 5 мин и ресуспендировали в буфере А, после чего обрабатывали гидрохиноном и измеряли скорость восстановления ДХФИФ в присутствии 1 мМ Tb^{3+} . Все кинетики были измерены при концентрации хлорофилла 10 мкг/мл и концентрации ДХФИФ 40 мкМ в присутствии донорной пары [2 мкМ Mn^{2+} + 3 мМ H_2O_2] (а) или 200 мкМ 1,5-дифенилкарбазида (б).

сопровождается дальнейшим ингибированием реакции окисления доноров электронов через высокоаффинный Mn-связывающий участок (кинетики 3 на рис. 3 и 4).

Следует отметить, что помимо отрицательно заряженных аминокислотных остатков в КВК ФСII, способных связывать катионы лантаноидов,

мембраны тилакоидов содержит и другие неспецифические центры связывания, например, отрицательно заряженные липиды, такие как фосфатидилглицерол и сульфохиновозилдиацилглицерол. Эти липиды присутствуют и в мембранных препаратах ФСII, однако их содержание невелико (четыре молекулы/РЦ) [34]. Сульфохи-

Таблица 1. Влияние катионов La^{3+} and Tb^{3+} на скорость восстановления ДХФИФ в мембранах ФСII(-Ca) перед и после экстракции Mn из КВК гидрохиноном

Препарат	Скорость восстановления ДХФИФ, %	
	Донор [Mn^{2+} + H_2O_2], %	Донор ДФК, %
ФСII(-Ca) → + гидрохинон → + донор	100a	100б
ФСII(-Ca) + 1мМ La^{3+} → центрифугирование → + гидрохинон → + донор	76.5	83.8
ФСII(-Ca) + 1 мМ La^{3+} → центрифугирование → + гидрохинон → + 1 мМ La^{3+} → + донор	12.8	45.3
ФСII(-Ca) + 1мМ Tb^{3+} → центрифугирование → + гидрохинон → + донор	41.0	83.3
ФСII(-Ca) + 1 мМ Tb^{3+} → центрифугирование → + гидрохинон → + 1 мМ Tb^{3+} → + донор	9.9	43.2

Примечание. Экспериментальные условия приведены в подписях к рис. 3 и 4. Все данные являются средними арифметическими значений, полученных не менее чем в двух независимых экспериментах с тремя повторностями. Стандартное отклонение каждого находится в пределах $\pm 9\%$. Активность 100% соответствует скорости фотовосстановления ДХФИФ: а – 88 ± 7 мкмоль ДХФИФ мг Хл–1·ч–1; б – 63 ± 6 мкмоль ДХФИФ мг Хл–1·ч–1.

новозилдиацилглицерол (три молекулы/РЦ) расположен достаточно далеко от КВК [35], что делает маловероятным взаимодействие между этим липидом и КВК. Фосфатидилглицерол (одна молекула/РЦ), возможно, является необходимым компонентом в процессе переноса электронов на акцепторном участке $Q_A \rightarrow Q_B$ [35]. Однако исследования показали, что лантаноиды ингибируют перенос электронов не на акцепторном, а на донорном участке ФСII [13, 14, 17].

Неспецифическое связывание трехвалентных катионов может оказывать влияние на поверхностный заряд мембран ФСII, потенциально приводить к их слипанию и, как следствие, затруднённой диффузии реагентов в более крупные частицы. В случае агрегации частиц ФСII должно увеличиваться светорассеяние препарата, но мы не наблюдали увеличения начальной оптической плотности препаратов ФСII в присутствии ионов лантаноидов. Это свидетельствует о том, что выраженная агрегация мембран ФСII в присутствии La^{3+} и Tb^{3+} отсутствует. С другой стороны, выявленные нами эффекты лантаноидов нельзя объяснить нейтрализацией отрицательных фиксированных зарядов на поверхности частиц с последующей их агрегацией, поскольку в предыдущей работе [17] мы наблюдали значительное (на два порядка величин) различие в константах ингибирования лантаноидами фотохимической активности препаратов ФСII с различными нарушениями в КВК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экстракция катионов марганца из КВК мембранных препаратов ФСII(-Са), в которых Са-связывающий участок блокирован катионом лантаноида, демонстрирует ингибирование не только Са-связывающего участка, но и высокоаффинного Mn-связывающего участка. Предположительно, это может происходить следующим образом. При связывании катиона Ln^{3+} с Са-связывающим участком происходит вытеснение из координационной сферы высокоаффинного участка связывания Mn4 бидентантного лиганда D1-Asp170 и его перехват катионом Ln^{3+} . Это приводит к изменению высокоаффинного участка и снижению эффективности связывания им экзогенного катиона марганца. Можно предполагать, что процесс модификации координационной сферы высокоаффинного участка происходит не до экстракции катионов марганца, а после. Однако сильное влияние катиона La^{3+} на эффективность окисления воды препаратом ФСII(-Са) противоречит этому предположению: скорость восстановления ДХФИФ в препаратах ФСII(-Са) без искусственного донора электронов равна 100 мкмоль

ДХФИФ мМ $Хл^{-1} \cdot ч^{-1}$ (100%) (рис. 2), а в присутствии La^{3+} (1 мМ) она значительно снижается — до 45 мкмоль ДХФИФ мМ $Хл^{-1} \cdot ч^{-1}$ (45%).

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. Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, et al., *Nature*, **473**, 55 (2011). DOI: 10.1038/nature09913
2. M. Suga, F. Akita, K. Hirata, et al., *Nature*, **517**, 99 (2015). DOI: 10.1038/nature13991
3. J. P. McEvoy and G. W. Brudvig, *Chem. Rev.*, **106**(11), 4455 (2006). DOI: 10.1021/cr0204294
4. C. J. Kim and R. J. Debus, *Biochemistry*, **56**, 2558 (2017). DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01278
5. E. Y. Tsui, R. Tran, J. Yano, et al., *Nature Chem.*, **5**, 293 (2013). DOI: 10.1038/nchem.1578
6. M. Shamsipur and A. Pashabadi, *Coord. Chem. Rev.*, **374**, 153 (2018). DOI: 10.1016/j.ccr.2018.07.006
7. K. Saito, M. Nakagawa, M. Mandal, et al., *Photosynth. Res.*, **148**, 153(2021). DOI: 10.1007/s11120-021-00846-y
8. T. Ono and Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 269 (1990). DOI: 10.1016/0005-2728(90)90157-Y
9. T. Ono and Y. Inoue, *FEBS Lett.*, **227**, 147 (1988). DOI: 10.1016/0014-5793(88)80886-X
10. T. Ono and Y. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 380 (1986). DOI: 10.1016/0005-2728(86)90194-5
11. J. S. Vrettos, D. A. Stone, and G. W. Brudvig, *Biochemistry*, **40**, 7937 (2001). DOI: 10.1021/bi010679z
12. D. F. Ghanotakis, G. T. Babcock, and C. F. Yocum, *FEBS Lett.*, **167**, 127 (1984a). DOI: 10.1016/0014-5793(84)80846-7
13. D. F. Ghanotakis, G. T. Babcock, and C. F. Yocum, *Biochim. Biophys. Acta*, **809**, 173 (1985). DOI: 10.1016/0005-2728(85)90060-X
14. T. Ono, *J. Inorg. Biochem.*, **82**, 85 (2000). DOI: 10.1016/S0162-0134(00)00144-6
15. C. M. Waggoner and C. F. Yocum, in: *Current Research in Photosynthesis*, Ed. by M. Baltscheffsky (Springer, Dordrecht, Netherlands, 1990), pp. 733–736. DOI: 10.1007/978-94-009-0511-5_167
16. M. Epstein, J. Reuben, and A. Levitzki, *Biochemistry*, **16**, 2449 (1977).
17. E. R. Lovyagina, A. V. Loktyushkin, and B. K. Semin, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **26**, 1 (2021). DOI: 10.1007/s00775-020-01832-w
18. D. F. Ghanotakis and G. T. Babcock, *FEBS Lett.*, **153**, 231 (1983). DOI: 10.1016/0014-5793(83)80154-9

19. R. J. Porra, W. A. Thompson, and P. E. Kriedemann, *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384 (1989). DOI: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0
20. D. F. Ghanotakis, G. T. Babcock, and C. F. Yocum, *Biochim. Biophys. Acta*, **765**, 388 (1984). DOI: 10.1016/0005-2728(84)90180-4
21. Q. Xu and T. M. Bricker, *J. Biol. Chem.*, **267**, 25816 (1992). DOI: 10.1016/S0021-9258(18)35683-7
22. J. M. Armstrong, *Biochim. Biophys. Acta*, **86**, 194 (1964). DOI: 10.1016/0304-4165(64)90180-1
23. B. K. Semin, L. N. Davletshina, and A. B. Rubin, *Photosynth. Res.*, **125**, 95 (2015). DOI: 10.1007/s11120-015-0155-4
24. P. J. Nixon and B. A. Diner, *Biochemistry*, **31**, 942 (1992). DOI: 10.1021/bi00118a041
25. K. A. Campbell, D. A. Force, P. J. Nixon, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3754 (2000). DOI: 10.1021/ja000142t
26. B. K. Semin, M. L. Ghirardi, and M. Seibert, *Biochemistry*, **41**, 5854 (2002). DOI: 10.1021/bi0200054
27. H. Inoue and T. Wada, *Plant Cell Physiol.*, **28**, 767 (1987). DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077357
28. A. Boussac, M. Picaud, and A.-L. Etienne, *Photobiophys. Photobiophys.*, **10**, 201 (1986).
29. B. K. Semin, L. N. Davletshina, A. Yu. Aleksandrov, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 410 (2004). DOI: 10.1023/B:BIRY.0000022066.38297.8a
30. C. W. Hoganson, D. F. Ghanotakis, G. T. Babcock, et al., *Photosynth. Res.*, **22**, 285 (1989). DOI: 10.1007/BF00048306
31. A.-F. Miller and G. W. Brudvig, *Biochemistry*, **29**, 1385 (1990). doi:10.1021/bi00458a007
32. B. K. Semin, L. N. Davletshina, M. Seibert, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **178**, 192 (2018). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.016
33. V. N. Kurashov, E. R. Lovyagina, D. Yu. Shkolnikov, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1492 (2009). DOI: 10.1016/j.bbabi.2009.07.002
34. B. Loll, J. Kern, W. Saenger, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 509 (2007). DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.12.009
35. N. Mizusawa and H. Wada, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 194 (2012). DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.04.008

Mechanism of Inhibition of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II by Lanthanide Cations

E.R. Lovyagina, A.V. Loktyushkin, N.S. Vasiliev, and B.K. Semin

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

The process of the interaction of La^{3+} and Tb^{3+} cations with the Ca-binding site of the oxygen-evolving complex of photosystem II samples depleted of calcium has been studied. The binding of cations to the Ca-binding site is irreversible and the bound cations cannot be washed out or replaced by Ca^{2+} cation. A feature of lanthanides to bind strongly to the Ca-binding site has been used to investigate if the bound Ln^{3+} cation has an effect on the high-affinity Mn-binding site of the oxygen-evolving complex. Therefore, in this work, hydroquinone was used for the extraction of manganese cations from the oxygen-evolving complex of the calcium-depleted photosystem II membranes with the Ca-binding site blocked by La^{3+} or Tb^{3+} and the activity of the high-affinity site was then examined using exogenous electron donors ($\text{Mn}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) and 1,5-diphenylcarbazine. It was found that lanthanide cation bound to the Ca-binding site can significantly inhibit the oxidation rates of electron donors through the high-affinity Mn-binding site. The mechanism of the observed effect is discussed.

Keywords: photosystem II, oxygen-evolving complex, high-affinity Mn-binding site, calcium, lanthanides

ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ «РЕСВЕРАТРОЛ – СЕРАНИТРОЗИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ЖЕЛЕЗА НАТРИЙ- μ 2-ДИТИОСУЛЬФАТОТЕТРАНИТРОЗИЛДИФЕРАТ ТЕТРАГИДРАТ» НА МИТОХОНДРИИ ЭПИКОТИЛЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА *in vitro*

© 2023 г. Н.Ю. Герасимов^{*,#}, О.В. Неврова^{*}, И.В. Жигачева^{*},
И.П. Генерозова^{**}, А.Н. Голощапов

Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля

Российской академии наук, 119334 ул. Косыгина, 4, г. Москва, Россия

2Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева

Российской академии наук, 12727 ул. Ботаническая, 35, г. Москва, Россия

[#]E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.01.2023 г.

После доработки 03.04.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Проведено исследование взаимодействия антиоксидантов – растительного полифенола ресвератрола и донора оксида азота серанитрозильного комплекса железа с тиосульфатом $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ТНКЖ-тио) – и их совместного действия на митохондрии эпикотилей проростков гороха *in vitro*. Антиоксидантная активность ресвератрола в концентрации 10^{-6} М частично компенсировала токсическое действие ТНКЖ-тио в большой концентрации, что вероятнее всего связано с проявлением прооксидантных свойств высоких концентраций донора оксида азота. Воздействие ресвератрола в концентрациях 10^{-6} М и 10^{-8} М на мембраны митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, в присутствии 10^{-8} М ТНКЖ-тио, приводило к нарушению связей в системе регуляции пероксидного окисления липидов мембран, что вызывало антиоксидантный стресс. Действие ресвератрола в дозе $2 \cdot 10^{-5}$ М носило двойственный характер и практически не влияло на структурное состояние мембран митохондрий.

Ключевые слова: структура мембран митохондрий, микровязкость мембран, полифенол, донор оксида азота, антиоксидантный стресс.

DOI: 10.31857/S000630292304004X, EDN: KJQGFU

Окислительные процессы, в которых митохондрии играют ключевую роль, оказывают принципиальное влияние на жизнедеятельность клеток. В процессе окислительного фосфорилирования на мембранах митохондрий образуются супероксид, пероксид водорода и свободные радикалы. Окисление липидов, вызванное накоплением активных форм кислорода (АФК), уменьшает количество ненасыщенных жирных кислот в липидах мембран клеток, что приводит к изменению микровязкости липидного бислоя. АФК могут также разрушать липиды, вызывая патологические нарушения в мембранах, приводя, вероятно, к митохондриальным дисфункциям и за-

пуская процессы клеточного старения [1]. Вместе с тем процесс здоровой работы клетки зависит от баланса между образованием АФК и поддержанием их на относительно низком уровне. В присутствии антиоксидантов через регуляцию скорости пероксидного окисления липидов мембранами может достигаться нормальный гомеостаз клетки. Однако в зависимости от условий антиоксиданты могут проявлять как антиоксидантный, так и прооксидантный эффект [2, 3]. При взаимодействии с АФК антиоксиданты, отдавая или принимая электрон, могут становиться реакционноспособными свободнорадикальными частицами и проявлять прооксидантный эффект. Иными словами, такая частица может не только нейтрализовать АФК, но и приводить к увеличению количества АФК, например, как в случае витамина С в реакции Фентона за счет присутствия ионов переходных металлов [4–6], и обра-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, NO – оксид азота, ТНКЖ-тио – серанитрозильный комплекс железа с тиосульфатом, ПОЛ – пероксидное окисление липидов, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

зованию нестабильных (радикальных) частиц других веществ [7]. Окислительно-восстановительная способность антиоксидантов может, таким образом, приводить к накоплению свободно-радикальных частиц, токсичных в больших количествах. Такой эффект антиоксидантов, связанный с негативным действием на клетку, впервые был описан в работе [8] и назван «антиоксидантный стресс». Таким образом, антиоксиданты оказывают не только положительное воздействие, но также могут проявлять негативный эффект [9]. Антиоксидантный стресс как результат прооксидантных и, вероятно, вредных эффектов антиоксиданта может вызывать патологические изменения в органах и тканях животных и людей. Вопрос о том, какие условия могут привести к антиоксидантному стрессу, остается открытым. Ряд исследований витаминов С, Е, А, каротина, селена с антиоксидантным статусом, включающих рандомизированные контролируемые исследования и экспериментальные данные по животным и людям в норме и при наличии хронических заболеваний, либо не показали значительных изменений, либо оказывали вредное воздействие на биологическую систему и в некоторых случаях повышали уровень смертности среди испытуемых [10–14]. При этом показано что экзогенные источники пищевых антиоксидантов растительного происхождения могут благотворно влиять на здоровье человека [14–16].

Между тем понятие «антиоксидантный стресс» для растений не столь широко используется в литературе [17], как для людей и животных. Достоверно не установлено, какова в общем «полезность» растительных антиоксидантов для организма [14, 18]. Свободные радикалы, образованные в результате прооксидантной активности антиоксидантов полифенольного ряда — флавоноидов, антоцианов и каротиноидов [19–21] — могут вызывать антиоксидантный стресс, а также повреждение ДНК и мутации, и приводить к апоптотической гибели клеток. Увеличению прооксидантного потенциала полифенолов способствует их концентрация, высокий уровень pH среды, наличие ионов переходных металлов [19–22]. Так, феноксильные радикалы, образующиеся в результате окислительно-восстановительных реакций растительных антиоксидантов, могут провоцировать пероксидное окисление липидов, в том числе и за счет участия металлов, в частности, железа [20, 21, 23]. Для нейтрализации реакционной способности железа и транспортировки его в безопасной форме в органах и тканях растения используются комплексы железа с оксидом азота (NO) [24]. Однако роль нитрозильных комплексов железа в NO-зависимом апоптозе клетки до конца не ясна.

Предполагается, что совместное действие антиоксидантов будет выключать реактивность ра-

дикальных антиоксидантных частиц, образованных в результате нейтрализации АФК [25, 26].

С целью исследования антиоксидантного стресса у растений, а также понимания путей антиоксидантно-прооксидантного действия фенольных соединений, проведено исследование взаимодействия антиоксидантов — растительного полифенола ресвератрола и донора оксида азота серанитрозильного комплекса железа с тиосульфатом $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ТНКЖ-тио), и их совместного действия на митохондрии эпикотилей проростков гороха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ТНКЖ-тио — кристаллический водорастворимый донор оксида азота натрий- μ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат ($[\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$) был синтезирован в Институте проблем химической физики РАН (Черноголовка, Московская обл.). Генерация NO и образование моонитрозильного интермедиата и частицы $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]$ из ТНКЖ-тио начинается только через 40 мин после растворения комплекса [27]. Семена гороха сорта Немчиновский 100 промывали мыльной водой и 0.01% KMnO_4 . От KMnO_4 семена тщательно промывали дистиллированной водой. Затем контрольные семена замачивали в воде, опытные семена — в 10^{-8} М и 10^{-4} М ТНКЖ-тио в течение 1 ч. После этого семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение 7 суток. Затем выделяли митохондрии из эпикотилей гороха методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере. Для приготовления образца митохондрии разбавляли в среде выделения таким образом, чтобы содержание белка в конечном растворе составляло 2 мг/мл.

Ресвератрол в концентрациях $2 \cdot 10^{-5}$ М, 10^{-6} М и 10^{-8} М добавляли в готовые образцы митохондрий.

Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксил (зонд II), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (Москва) (рис. 1).

В работе [28] показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном бислое липидных компонент мембраны, а зонд II — в липидах бислоя, прилегающих к белкам, что позволяет по поведению зондов I и II в липидном бислое судить о липид-белковых взаимодействиях в

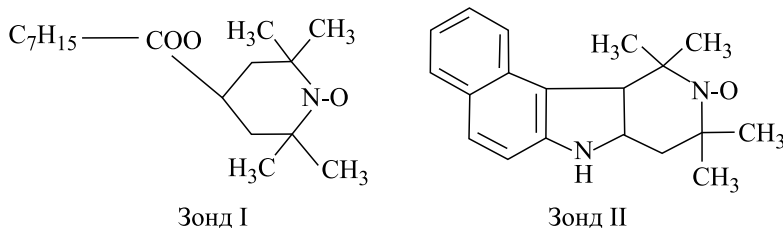


Рис. 1. Структурные формулы использованных ЭПР-зондов.

мембранах. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I «липидным», а зонд II – «белковым».

Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по приведенной в работе [29] формуле $\tau_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_+ \cdot ((I_+/I_-)^{0.5} - 1)$, где ΔH_+ – ширина низкочастотной линии, I_+ – интенсивность низкочастотной линии, I_- – интенсивность высокочастотной линии. Регистрацию спектров ЭПР проводили в диапазоне температур 285–305 K (10–44°C) на радиоспектрометре ER 200D-SRC фирмы Bruker (США).

Каждый опыт повторяли три-пять раз, исходя из чего рассчитывали погрешность измерений с учетом неточности измерения ширины линий. Статистическую обработку данных осуществляли методами параметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft® Excel и Origin® 6.1 при статистической надежности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано [30], что донор NO ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М сдвигал термоиндуцированные структурные переходы в прибелковых областях мембран митохондрий в сторону более низких температур (на 6 K) (рис. 2б). Подобный сдвиг, но в меньшей степени (на 3 K), наблюдался также и в липидных областях мембран (рис. 2а). Такие сдвиги указывают на уменьшение степени «кристалличности» мембран. ТНКЖ-тио в дозе 10^{-4} М на всем исследованном температурном интервале приводил к резкому уменьшению микровязкости липидной фазы митохондриальных мембран, которая не зависела от температуры (рис. 2а). Такое состояние мембран характерно, например, при патологиях [31], т.е. ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-4} М проявлял токсическое действие на митохондрии [32]. Считается, что оксид азота NO в малых физиологических концентрациях ($<10^{-6}$ М) обладает цитопротекторным действием, выступая в качестве регуляторного агента и проявляя, в том числе, антиоксидантные свойства [3, 33–35]. В больших

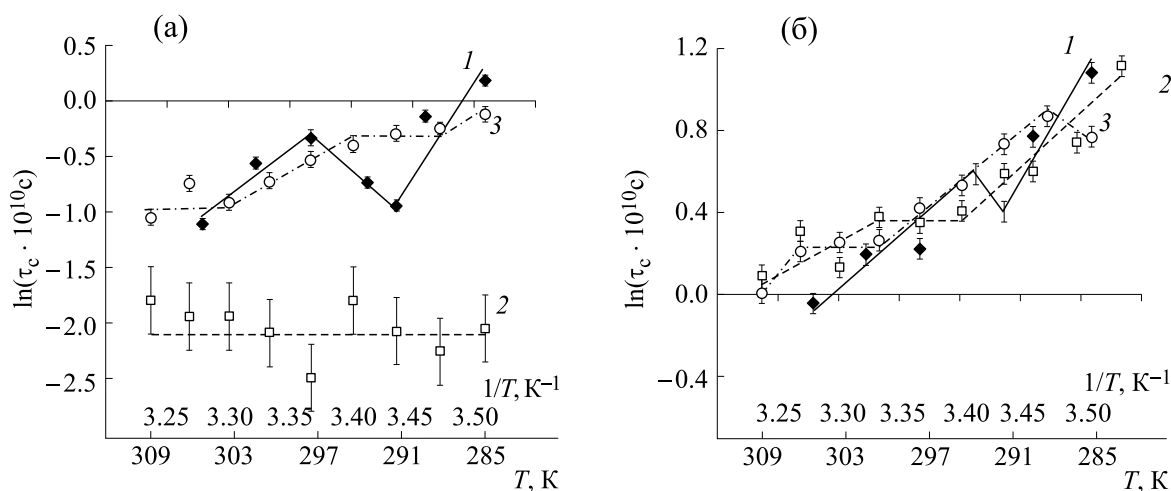


Рис. 2. Температурная зависимость микровязкости мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, в аррениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от $1/T$, для удобства указана T) при использовании липидного зонда (а) и прибелкового зонда (б): 1 – данные контрольной группы, 2 – при воздействии ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-4} М, 3 – при воздействии ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М.

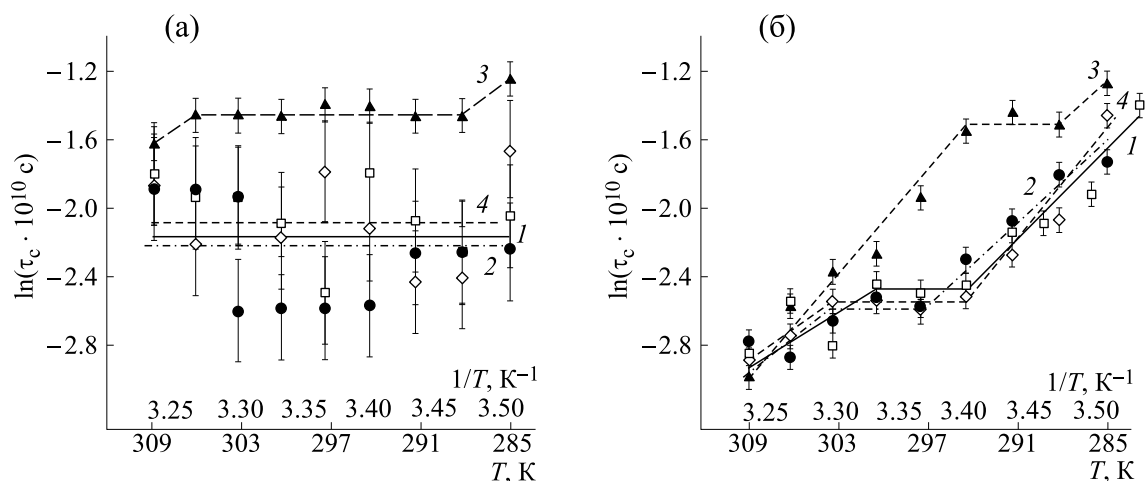


Рис. 3. Действие ресвератрола на температурную зависимость микровязкости мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, в аррениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от $1/T$, для удобства указана T) в присутствии ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-4} M при использовании липидного зонда (а) и при белкового зонда (б): 1 — без ресвератрола, 2 — при воздействии ресвератрола в дозе $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, 3 — при воздействии ресвератрола в дозе 10^{-6} M , 4 — при воздействии ресвератрола в дозе 10^{-8} M .

концентрациях ($>10^{-6} \text{ M}$) NO оказывает цитотоксическое действие, инициируя, например, пероксидное окисление липидов путем образования пероксинитрита ONOO^- [35], или приводит к разрушению мембран органелл и последующей гибели клеток [36]. Чрезвычайно низкое значение микровязкости липидной фазы мембран под действием ТНКЖ-тио в дозе 10^{-4} M (рис. 2а) могло быть вызвано несколькими механизмами. Во-первых, антиоксидантная активность NO, высвобождающегося из ТНКЖ-тио, могла привести одновременно к снижению дыхательных процессов [37] и к накоплению большого количества ненасыщенных липидов, а тем самым — к увеличению проницаемости мембран для всех видов ионов. Вслед за катионами калия и натрия и анионом хлора в матрикс митохондрий проникает вода [37]. В результате этих процессов происходит набухание митохондрий и, следовательно, уменьшение плотности упаковки липидов в мембране. Во-вторых, те же процессы могли вызвать настолько сильное набухание митохондрий, что могло привести к разрыву мембран митохондрий [36]. В-третьих, NO в высокой концентрации мог проявлять прооксидантные свойства путем ингибирования каталазы [35] или образования пероксинитрита [38]. Увеличение количества АФК могло привести к окислительному стрессу и сильному ускорению процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Высокий уровень ПОЛ митохондриальных мембран мог приводить к накоплению диеновых конъюгатов и других продуктов окисления, в результате этого — к нарушению структурированности липидного бислоя или

разрушению мембран. Нельзя также исключать и токсическое действие атома металла в железосодержащем комплексе ТНКЖ-тио.

С целью выяснения причин резкого увеличения текучести липидной фазы мембран при воздействии высокой концентрации ТНКЖ-тио (рис. 2а) было исследовано действие ресвератрола в различных концентрациях на структуру мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха, обработанных ТНКЖ-тио.

Ресвератрол в концентрации 10^{-6} M приводил к увеличению микровязкости как липидной, так и белковой фазы мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, обработанных 10^{-4} M ТНКЖ-тио (рис. 3). По-видимому, ресвератрол в концентрации 10^{-6} M уменьшает уровень ПОЛ, вызванный ТНКЖ-тио, вследствие чего появляется структурированность липидной фазы бислоя. При этом в липидной фазе (рис. 3а) проявляется тенденция к слабой зависимости времени корреляции вращательной диффузии от температуры, в отличие от контроля. Таким образом, антиоксидантная активность ресвератрола в концентрации 10^{-6} M частично компенсировала токсическое действие ТНКЖ-тио в дозе 10^{-4} M , а значит, NO в этом случае вероятнее всего проявлял прооксидантные свойства. Ресвератрол в концентрации 10^{-8} M практически не влиял на структурное состояние мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, обработанных ТНКЖ-тио 10^{-4} M (рис. 3). Вероятно, данной концентрации ресвератрола недостаточно, чтобы погасить

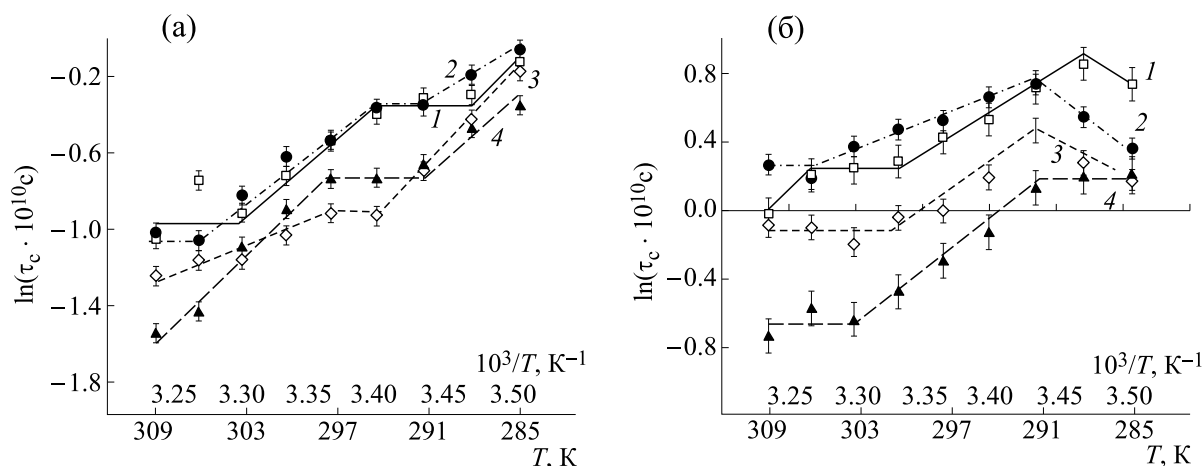


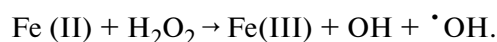
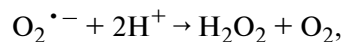
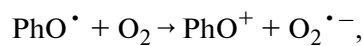
Рис. 4. Действие ресвератрола на температурную зависимость микровязкости мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, в арениусовских координатах ($\ln \tau_c$ от $1/T$, для удобства указана T) в присутствии ТНКЖ-тио в концентрации 10^{-8} М при использовании липидного зонда (а) и при белкового зонда (б): 1 — без ресвератрола, 2 — при воздействии ресвератрола в дозе $2 \cdot 10^{-5}$ М, 3 — при воздействии ресвератрола в дозе 10^{-6} М, 4 — при воздействии ресвератрола в дозе 10^{-8} М.

уровень ПОЛ, вызванный высокой концентрацией ТНКЖ-тио, так как концентрация ресвератрола на несколько порядков ниже.

Совершенно другая картина наблюдалась при действии ресвератрола на структуру мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, обработанных 10^{-8} М ТНКЖ-тио (рис. 4). Из рис. 4 видно, что кривые 3 и 4 лежат ниже кривой 1, т.е. ресвератрол в концентрациях 10^{-6} и 10^{-8} М снижал микровязкость обеих областей мембран митохондрий, тогда как в норме обычно эти изменения разнонаправлены. Одновременное снижение микровязкости при белковой и липидной фаз говорит о нарушениях связей в системе регуляции ПОЛ мембран [39, 40]. По-видимому, в данном случае ресвератрол увеличивает антиоксидантную активность малой физиологической дозы донора оксида азота NO, приводя тем самым к антиоксидантному стрессу.

Особое внимание следует уделить действию ресвератрола в дозе $2 \cdot 10^{-5}$ М. Данная концентрация ресвератрола практически не влияла на микровязкость мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, обработанных ТНКЖ-тио как в дозе 10^{-8} М (рис. 4), так и в дозе 10^{-4} М (рис. 3). По-видимому, из-за слишком большой концентрации ресвератрол проявлял как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства, которые гасили друг друга. Прооксидантные свойства полифенолов могут быть вызваны взаимодействием с железом, содержащим-

ся в ТНКЖ-тио или ферментах дыхательной цепи, в реакциях по типу реакции Фентона:



Ресвератрол в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М практически не влиял на структуру мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха и обработанных ТНКЖ-тио в обеих исследованных концентрациях, лишь немного сдвигая термоиндуцированные структурные переходы в липидном бислое в область более высоких температур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Действие ТНКЖ-тио в большой концентрации (10^{-4} М) приводил к нарушению структурного состояния мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, что проявлялось в резком уменьшении микровязкости липидной фазы, до состояния характерного при патологиях [31]. Антиоксидантная активность ресвератрола в дозе 10^{-6} М частично компенсировала токсическое действие ТНКЖ-тио в большой концентрации. Следовательно, в этом случае токсическое действие вероятнее всего связано с проявлением прооксидантных свойств вы-

соких концентраций NO, высвобождаемых из ТНКЖ-тио.

Воздействие ресвератрола в дозах 10^{-6} М и 10^{-8} М на мембраны митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, обработанных 10^{-8} М ТНКЖ-тио, приводило к нарушению связей в системе регуляции ПОЛ мембран, что проявлялось в однонаправленном уменьшении микровязкости липидной и приобелковой фазы, т.е. присутствие ресвератрола в данном случае вызывало антиоксидантный стресс.

Действие ресвератрола в дозе $2 \cdot 10^{-5}$ М носило, по-видимому, двойственный характер. Антиоксидантный и прооксидантный эффекты гасили друг друга, в результате чего данная доза полифенола практически не повлияла на структурное состояние мембран митохондрий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 1201253310).

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. Н. Е. Фомченко, Е. В. Воропаев, А. В. Скачков и Н. Ю. Затора, Проблемы здоровья и экологии, **4**, 8 (2015). DOI: 10.51523/2708-6011.2015-12-4-2
2. C. Villanueva and R. D. Kross., Int. J. Mol. Sci., **13**, 2091 (2012). DOI: 10.3390/ijms13022091
3. F. Groß, J. Durner, and F. Gaupels, Front. Plant Sci., **4**, 419 (2013). DOI: 10.3389/fpls.2013.00419
4. Y. Chen, J. Li, J. Wei, et al., J. Hazard Mater., **321**, 888 (2017). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.10.010
5. A. Samuni and J. Arontovich, Eur. J. Biochem. **137**, 119 (1983).
6. V. A. Timoshnikov, T. V. Kobzeva, N. E. Polyakov, and G. J. Kontoghiorghes, Int. J. Mol. Sci., **21**, 3967 (2020). DOI: 10.3390/ijms21113967
7. E. Damiani, P. Astolfi, P. Carloni, et al., Antioxidants, **8**, 251 (2008). DOI: 10.3390/antiox8080258
8. Y. Dundar and R. Aslan, East. J. Med., **5** (2), 45 (2000).
9. B. Poljsak and I. Milisav, Oxid. Med. Cell. Longev., **2012**, ID 480895 (2012). DOI: 10.1155/2012/480895
10. G. Bjelakovic, D. Nikolova, R. G. Simonetti, and C. Glud, Lancet, **364** (9441), 1219 (2004). DOI: 10.1016/S0140-6736(04)17138-9
11. E. R. Miller, R. Pastor-Barriuso, D. Dalal, et al., Ann. Int. Med., **142** (1), 37 (2005). DOI: 10.1016/j.accreview.2005.04.017
12. I. D. Podmore, H. R. Griffiths, K. E. Herbert, et al., Nature, **392** (6676), 559 (1998). DOI: 10.1038/33308
13. P. Palozza, Nutr. Rev., **56** (9), 257 (1998). DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01762.x
14. B. Salehi, M. Martorell, J. L. Arbiser, et al., Biomolecules, **8** (4), 124 (2018). DOI: 10.3390/biom8040124
15. S. Kumar and A. K. Pandey, Sci. World J., **2013**, ID 162750 (2013). DOI: 10.1155/2013/162750
16. R. Sotler, B. Poljšak, R. Dahmane, et al., Acta Clin. Croat., **58** (4), 726 (2019). DOI: 10.20471/acc.2019.58.04.20
17. Z. Lei, S. Mingyu, W. Xiao, et al., Biol. Trace Elem. Res., **121**, 69 (2008). DOI: 10.1007/s12011-007-8028-0
18. B. Halliwell, Cardio. Res., **73** (2), 341 (2007). DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.10.004
19. D. Ribeiro, M. Freitas, A. M. S. Silva, et al., Food Chem. Tox., **120**, 681 (2018). DOI: 10.1016/j.fct.2018.07.060
20. Y. Sakihama, M. F. Cohen, S. C. Grace, and H. Yamasaki, Toxicology, **177** (1), 67 (2002). DOI: 10.1016/S0300-483X(02)00196-8
21. S. Eghbaliferiz and M. Iranshahi, Phytother. Res., **30** (9), 1379 (2016). DOI: 10.1002/ptr.5643
22. M. Olszowy, J. Pl. Phys. Biochem., **144**, 135 (2016). DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.09.039
23. G. Agati, E. Azzarello, S. Pollastri, and M. Tattini, Plant Sci., **196**, 67 (2012). DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014
24. L. Ramirez, M. Simontacchi, I. Murgia, et al., Plant Sci., **181** (5), 582 (2011). DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.04.006
25. W. Siems, C. Salerno, C. Crifo, et al., Forum Nutr., **61**, 75 (2009). DOI: 10.1159/000212740
26. C. Liu, R. M. Russell, and X. D. Wang, J. Nutr., **134**, 426 (2004). DOI: 10.1093/jn/134.2.426
27. Н. А. Санина и С. М. Алдошин, Изв. РАН. Сер. хим., **7**, 1199 (2011).
28. В. И. Бинюков, С. Ф. Борунова, М. Г. Гольдфельд и др., Биохимия, **36** (6), 1149 (1971)
29. А. М. Вассерман, А. Л. Бучаченко, А. Л. Коварский и И. Б. Нейман, Высокомолекуляр. соединения, **10A**, 1930 (1968)
30. Н. Ю. Герасимов, О. В. Неврова, И. В. Жигачева и др., в сб. тезисов *Физиология растений и феномика как основа современных биотехнологий* (ННГУ, Н. Новгород, 2022), с. 42.
31. А. Н. Голощапов и Е. Б. Бурлакова, Биофизика, **25** (1), 97 (1980).
32. И. В. Жигачева, Н. И. Крикунова, И. П. Генерозова и др., Биофизика, **67** (4), 671 (2022).
33. J. Sang, M. Jiang, F. Lin, et al., J. Integr. Plant Biol., **50**, 231 (2008). DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00594.x

34. Y. V. Karpets, Y. E. Kolupaev, and T. O. Yastreba, Russ. J. Plant Physiol., **58**, 1027 (2011). DOI: 10.1134/S1021443711060094
35. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. M. Alam, and M. Fujita, Aust. J. Agric. Res., **6**, 1314 (2012).
36. V. Casolo, E. Petrucci, J. Krajňáková, et al., J. Exp. Bot., **56** (413), 997 (2005). DOI: 10.1093/jxb/eri093
37. О. С. Сергеев, Л. И. Уксусова, В. В. Сапрыкин и др., Типовые патологические процессы. Воспаление. Лихорадка. Повреждение клетки (СамГМУ, Самара, 2004).
38. R. S. Seymour, Biosci. Rep., **21** (2), 223 (2001). DOI: 10.1023/A:1013608627084
39. С. А. Аристархова, Г. В. Архипова, Е. Б. Бурлакова и др., ДАН СССР, **228**, 215 (1976).
40. Е. Б. Бурлакова и Н. Г. Храпова, Успехи химии, **54** (9), 540 (1985).

The Effect of the Antioxidant System Resveratrol – Iron Sulfonitrosyl Complex Sodium- μ 2-Dithiosulphate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate on the Mitochondria of Pea Germ Epicotyls *in vitro*

N.Yu. Gerasimov*, O.V. Nevrova*, I.V. Zhigacheva*, I.P. Generozova**, and A.N. Goloshchapov*

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

**Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276 Russia

The interaction of antioxidants – plant polyphenol resveratrol and nitric oxide donor, iron-sulfo-nitrosyl complex with thiosulfate $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (TNIC-thio), and their combined action on mitochondria of pea germ epicotyls was studied *in vitro*. The antioxidant activity of resveratrol (10^{-6} M), partially compensated the toxic effect of TNIC-thio at high concentration, that is most likely associated with the exhibition of the prooxidant properties of high concentrations of the nitric oxide donor. The effect of resveratrol at concentrations 10^{-6} M and 10^{-8} M on the membranes of mitochondria isolated from the pea germ epicotyls treated with 10^{-8} M TNIC-thio led to coordinations failure in the system of regulation of lipid peroxidation of membranes, that caused antioxidant stress. The action of resveratrol at the dose of $2 \cdot 10^{-5}$ M had a dual character and practically did not effect on the structural state of mitochondrial membranes.

Keywords: mitochondria membrane structure, membrane microviscosity, polyphenol, nitric oxide donor, antioxidant stress

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТУПЛЕНИЯ НАТРИЙ-МЕДНОГО ХЛОРОФИЛЛИНА В ЛИМФОЦИТЫ

© 2023 г. Л.А. Ромодин*, **, #

*Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, ул. Маршала Новикова, 23, Москва, 123098, Россия

**Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Волоколамское шоссе, 11, Москва, 125080, Россия

#E-mail: rla2904@mail.ru

Поступила в редакцию 24.01.2023 г.

После доработки 24.01.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Оценена возможность попадания натрий-медного хлорофиллина внутрь лимфоцитов. Для этого фотометрическим методом определено содержание хлорофиллина в лизате лимфоцитов, предварительно инкубированных в среде, содержащей 300 мкМ медного хлорофиллина. Обнаружено большое содержание хлорофиллина, что позволяет говорить о том, что он может поступать внутрь клеток. Остается открытым вопрос о том, может ли хлорофиллин проникать через ядерную мембрану. На основе анализа собственной и представленной в литературе информации сделан вывод, что через нее хлорофиллин проходит значительно хуже, чем через плазмалемму.

Ключевые слова: лимфоциты, хлорофиллин, радиопротекторы, спектрофотометрия, трансмембранный транспорт.

DOI: 10.31857/S0006302923040051, EDN: KJSRDS

Многими исследователями препараты на основе хлорофилла изучались в качестве средства борьбы с различными патологиями [1–3], в том числе с последствиями лучевого поражения. В литературе имеются сведения и о радиозащитных свойствах препаратов на основе хлорофилла [4–10].

Обычно молекулярно-биологические эффекты действия ионизирующего облучения рассматриваются в аспекте разрушения клеточных молекул ДНК (в более общем смысле — повреждения генетического аппарата) или в аспекте перехода клетки в состояние окислительного стресса, главным образом — запуска реакций перекисного окисления липидов. При этом препараты на основе хлорофилла продемонстрировали как генопротекторные свойства [7, 8, 11], так и способность ослаблять степень окислительного стресса [4, 9].

Однако в недавно проведенном исследовании [12] по облучению рентгеновским излучением в дозе 2 Гр суспензии лимфоцитов, проведенном методом гель-электрофореза одиночных клеток, у натрий-медного хлорофиллина защитные свойства обнаружены не были. Данный метод заключается в анализе кометоподобных структур, образующихся из содержащихся в предварительно лизированных клетках молекул ДНК в геле в

электрическом поле. Степень повреждений ДНК тем выше, чем более выражен хвост ДНК-кометы [13–16]. Значения величин содержания ДНК в хвосте ДНК-кометы и момента хвоста (произведения содержания ДНК в хвосте на длину хвоста) для диапазона концентраций хлорофиллина 0–100 мкМ не дали достоверных различий.

Для интерпретации полученных в работе [12] результатов было выдвинуто предположение о том, что хлорофиллин в обсуждаемом исследовании не попал внутрь лимфоцитов, а потому не смог проявить внутри них своих антиоксидантных свойств. Поэтому возникла необходимость изучить способность хлорофиллина к проникновению в лимфоциты.

В настоящем исследовании использована модельная система, аналогичная использованной в работе [12]. Для оценки поступления хлорофиллина внутрь лимфоцитов после инкубации в нем клетки были выделены из среды инкубации, после чего — лизированы. Далее были зарегистрированы спектры оптической плотности лизатов. По данным спектрам и было оценено наличие хлорофиллина в лизате, а значит — и в цитоплазме лимфоцитов после инкубации.

Стоит отметить, что исследование по биодоступности натрий-медного хлорофиллина было

проведено авторами работы [17] более 10 лет назад. Однако они изучали возможность попадания хлорофиллина в органы крыс, которым скармливался хлорофиллин. При этом использовались огромные дозы хлорофиллина: 10–30 мг/г массы животного. Это многократно превышает концентрации хлорофиллина, использованные в работе [12]. Кроме того, авторы работы [17] оценивали содержание хлорофиллина не в клетках, а в органах, где он мог находиться, скажем, в межклеточном веществе. Не удивительно, что на фотографиях, представленных в работе [17], почки и печень крыс, получавших хлорофиллин в дозе 30 мг/г массы животного, полностью окрашены в зеленый цвет: содержание хлорофиллина в органах оказалось колоссальным.

Однако анализировать результаты работы [12] в контексте работы авторов [17] некорректно, так как экспериментальные модельные системы в них слишком различаются. Необходимо также принять во внимание возможные химические превращения хлорофиллина в желудочно-кишечном тракте животных. Поэтому мы и провели эксперимент на суспензии лимфоцитов, аналогичной использованной в работе [12], с аналогичным веществом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение лимфоцитов крови. Лимфоциты были выделены из проб крови пациентов ГНЦ ФМБЦ имени А.И. Бурназяна ФМБА России методом центрифугирования в градиенте плотности. Гепаринизированная кровь в соотношении 1 : 1 была разведена фосфатно-солевым буфером, приготовленным путем растворения таблетки буфера (Thermo Fisher Scientific, США) в деионизированной воде. Далее в центрифужные пробирки добавляли по 2 мл раствора фиколла плотностью 1.077 г/мл («ПанЭко», Россия), после чего на него было наложено по 2.7 мл разведенной крови. Далее пробы центрифугировали при 400 g в течение 30 мин. Опалесцирующее кольцо, содержащее моноклеары, было отобрано в чистые центрифужные пробирки с добавлением 10 мл фосфатно-солевого буфера. Далее пробы были центрифугированы при 300 g в течение 15 мин, после чего осадок был ресуспендирован в добавленных 5 мл фосфатно-солевого буфера. Затем пробы снова были центрифугированы при 300 g в течение 10 мин, а полученный осадок — ресуспендирован в добавленных 5 мл фосфатно-солевого буфера. После этого пробы еще раз были центрифугированы при 300 g в течение 10 мин с последующим ресуспендированием осадка в 1 мл среды RPMI 1640 (полной). Среда была приготовлена путем добавления к 500 мл среды RPMI Medium 1640 1x (GIBCO (Life Technologies (Invitrogen)), США) 50 мл инактивированной фетальной

бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США), 146 мг L-глутамин («ПанЭко», Россия), смеси 25000 ед. пенициллина и 25 мг стрептомицина («ПанЭко», Россия).

Инкубирование лимфоцитов в хлорофиллине. Полученную суспензию лимфоцитов смешивали с 600 мкМ раствором медного хлорофиллина натрия (CZY Prosperity Store, Китай) в среде RPMI 1640 (полной) в соотношении 1 : 1. В итоге лимфоциты оказывались в 300 мкМ хлорофиллине. Контрольные пробы просто были разбавлены в два раза средой RPMI 1640 (полной). Также в данной среде были приготовлены растворы хлорофиллина (300 мкМ), в которые клетки не добавлялись. Все образцы были инкубированы в течение часа в воздушном термостате MCO-15AC фирмы Sanyo (Япония) при температуре 37°C.

Анализ поступления хлорофиллина в лимфоциты. После инкубации в хлорофиллине пробы были центрифугированы в течение 20 мин при 200 g. После этого из проб было взято по 8 мкл среды, к ним добавлено 72 мкл фосфатно-солевого буфера. Далее из проб с лимфоцитами была удалена надосадочная жидкость, а лимфоциты ресуспендированы в 72 мкл фосфатно-солевого буфера. Для оценки проникновения хлорофиллина в лимфоциты определяли содержание вещества в их цитоплазме. Для лизиса клеточных мембран и перехода содержимого цитоплазмы в раствор к суспензии лимфоцитов в пробы было добавлено по 20 мкл 5%-го раствора тритона X-100 (при приготовлении данного раствора тритон X-100 (Helicon, Россия) был в 20 раз разбавлен деионизированной водой). Далее пробы были инкубированы в течение часа при 4°C.

После инкубации все пробы были смешаны в соотношении 1 : 1 с деионизированной водой. Далее на спектрофотометре Cary 60 (Agilent Technologies, США) были зарегистрированы спектры оптической плотности в диапазоне длин волн 400–800 нм. Значения оптической плотности обнуляли по пробе, содержащей 0.5%-й раствор тритона X-100 и среду RPMI 1640 (полную), разбавленную в 25 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение результатов измерений количества хлорофиллина в лизатах лимфоцитов и в среде, в которой они инкубировались, показало, что, во-первых, хлорофиллин попадает в клетки, а во-вторых, что он там накапливается: темп проникновения хлорофиллина в клетку выше, чем из нее.

Стоит отметить, что используемая в настоящем исследовании концентрация хлорофиллина в три раза выше максимальной, использованной в исследовании [12]. Это было сделано для более

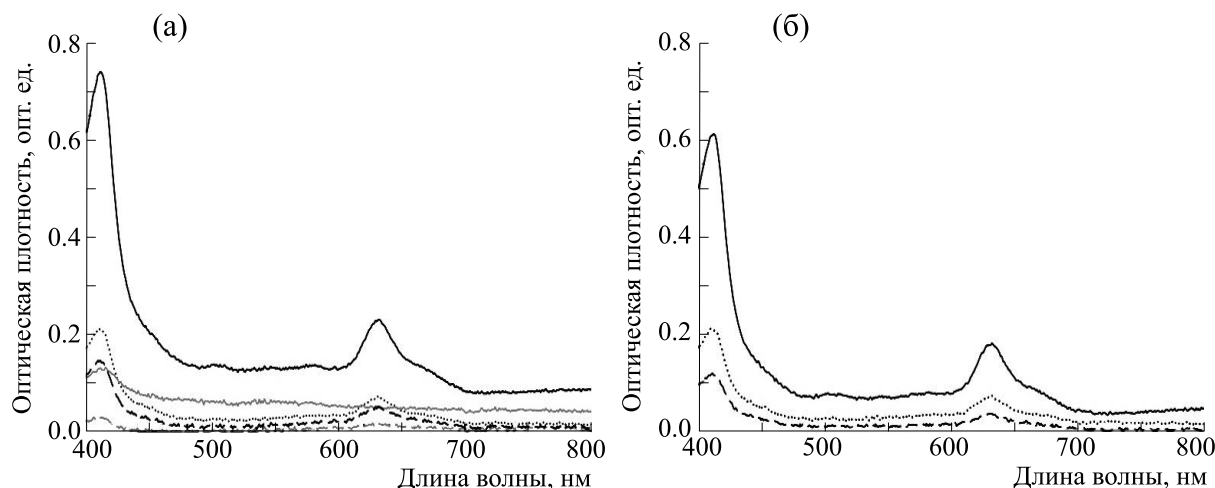


Рис. 1. Усредненные спектры оптической плотности образцов: (а) — непосредственно зарегистрированные спектры, без вычета вклада гемовых белков; (б) — спектры оптической плотности с учетом поправки на вклад гемовых групп. Сплошная черная линия — лизат лимфоцитов, инкубированных в хлорофиллине; пунктирная черная линия — среда с хлорофиллином, в которой инкубировались лимфоциты после удаления их из нее; точечная линия — раствор хлорофиллина, аналогичный тому, в котором инкубировались лимфоциты; сплошная серая линия — лизат лимфоцитов, инкубированных в среде без добавления хлорофиллина; пунктирная серая линия — среда без хлорофиллина, в которой инкубировались лимфоциты после удаления их из нее.

точного спектрофотометрического определения хлорофиллина в лизатах лимфоцитов. Однако все концентрации — и используемая в настоящей работе, и применяемые в работе [12], имеют один порядок. Поэтому концентрацию хлорофиллина, выбранную в настоящем исследовании, можно считать адекватной.

Спектры поглощения лизатов лимфоцитов, инкубированных в 300 мкМ хлорофиллине и в среде без него, среды без лимфоцитов после инкубации и среды с хлорофиллином, в которую клетки не добавлялись (контрольный раствор), представлены на рис. 1а. Изначальные растворы (среда после инкубации и контрольный раствор) в процессе подготовки пробы для измерения оптической плотности разбавлялись в 25 раз. Примерно в такое же число раз в процессе пробоподготовки была разбавлена цитоплазма лизированных лимфоцитов.

Натрий-медный хлорофиллин имеет максимумы поглощения на длинах волн 404 нм и 628 нм [18]. При интерпретации результатов представляет проблему схожесть спектров поглощения гемовых белков с таковым для хлорофиллина [19–21]. Гемовые белки, очевидно, присутствуют в составе лимфоцитов, а также могут оказаться в среде инкубации, попав в нее из плазмы крови. Наиболее выраженный максимум поглощения приходится на так называемую полосу Соре — область 402–410 нм [18, 22], соответствующую порфириновым группам, входящих в состав как хлорофиллина, так и гемовых групп.

Спектр оптической плотности пробы, таким образом, представляет собой спектр суммы оптических плотностей ее компонентов [23], главными из которых являются хлорофиллин и гемовые белки. Поэтому для того, чтобы увидеть спектры оптической плотности именно хлорофиллина, необходимо из спектров поглощения проб, содержащих хлорофиллин, вычесть спектры поглощения соответствующих проб, не содержащих его: из спектра, обозначенного на рис. 1а сплошной черной линией, был вычтен спектр, обозначенный сплошной серой линией, а из обозначенного пунктирной черной линией — обозначенный серым пунктиром. Полученные спектры оптической плотности представлены на рис. 1б.

На основании проиллюстрированной рис. 1б информации можно говорить о том, что по сравнению с контрольным, не содержащим клетки, раствором хлорофиллина, концентрация данного вещества в среде после инкубации лимфоцитов снизилась. В то же время в лизатах этих лимфоцитов содержание хлорофиллина было выше, чем в контрольном растворе.

Мы вычислили значения концентраций хлорофиллина в этих пробах, используя значение коэффициента молярной экстинкции, равное 11100 л/моль·см (приведено в работе авторов [18]). Данные результаты иллюстрирует рис. 2.

Статистический анализ результатов, представленных на рис. 2, с использованием критерия Манна–Уитни показал достоверные отличия между всеми пробами.

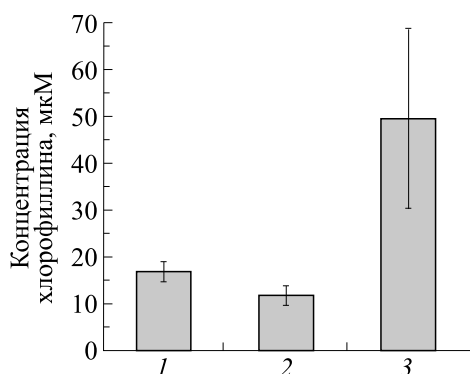


Рис. 2. Сравнение концентрации хлорофиллина в среде после инкубации лимфоцитов (2), лизате лимфоцитов (3) и в среде с добавлением хлорофиллина, аналогичной той, в которой проводили инкубацию (1). Так как объем выделенных лимфоцитов составлял примерно 8 мкл, для проб 1 и 2 отбирали по 8 мкл раствора. Далее к образцам добавляли 72 мкл фосфатно-солевого буфера, после чего — 20 мкл 5%-го раствора тритона X-100 в фосфатно-солевом буфере.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Описанное выше наличие хлорофиллина в лизатах лимфоцитов свидетельствует о том, что он мог находиться в их цитоплазме, а возможно, и в ядре. Очевидно, что попасть туда он мог только из среды инкубации. Таким образом, хлорофиллин имеет способность каким-то образом проникать через клеточную мембрану в цитоплазму лимфоцитов.

Вещество может проникать в клетку из среды путем простой либо облегченной диффузии или же с помощью различных видов активного транспорта. Хлорофилл за счет остатка фитола имеет некоторое сродство с липидными мембранами, собственно, именно за счет него он закрепляется за мембрану тилакоида хлоропластов [24]. Хлорофиллин, использованный в исследовании [12], — водорастворимая молекула, а потому неспособная диффундировать через липидный бислой. В случае диффузного попадания вещества в клетку его концентрация в цитоплазме не может превышать таковую в межклеточной среде. А поскольку содержание хлорофиллина в лизате лимфоцитов достоверно выше, чем в среде, в которой они были инкубированы (рис. 2), то можно предположить, что в нее он проник путем активного транспорта. При этом темп его поступления внутрь был выше, чем обратно в межклеточную среду.

В этом случае в цитоплазматической мембране лимфоцитов должна существовать система переноса порфиринов, которая способна также осуществлять транспорт хлорофиллина.

В литературе имеют место сообщения об обнаружении трансмембранных переносчиков порфиринов. Так, около 20 лет назад в качестве

трансмембранного переносчика гема был описан белок-продукт экспрессии гена SLC46A1 [25]. Однако несколько позже было сказано, что он — переносчик фолиевой кислоты [26] (впрочем, здесь, к примеру, остается открытым вопрос, почему экспрессия этого переносчика увеличивается в условиях гипоксии [27]). При этом продолжают поступать новые сведения о способности данного белка, называемого «heme carrier protein 1», переносить через мембрану гемовые группы [28].

В целом же известно, что белки, связывающие гем, присутствуют почти во всех клеточных компартментах, однако молекулярные механизмы, регулирующие транспорт гема внутри клетки, остаются по сей день малоизученными [29]. Вопрос о том, есть ли какие-либо переносчики порфиринов и их производных в ядерной мембране, остается открытым. Поэтому вполне вероятно, что и в плазмалемме лимфоцитов имеется система для переноса металлопорфиринов из межклеточной среды в цитоплазму, и именно она способна через мембрану транспортировать хлорофиллин.

Таким образом, с учетом вышесказанного, можно утверждать, что хлорофиллин способен проникать через плазмалемму внутрь клеток. Но тогда встает вопрос, как трактовать результаты исследования [12] о невлинии хлорофиллина на степень повреждения ДНК лимфоцитов, облученных рентгеновским излучением.

Самым банальным ответом на данный вопрос будет предположение о неспособности хлорофиллина проникать в ядро клетки из ее цитоплазмы. Тогда становится понятно, почему хлорофиллин не защитил ДНК лимфоцитов от радиационно-индуцированного окислительного стресса. В обзоре [30], посвященном анализу работ о свойствах хлорофилла и его производных внутри организма, большое внимание уделяется различным химическим превращениям упомянутых веществ в процессе метаболизма. И при этом указывается, что данные свойства у хлорофилла и многочисленных его производных сильно различаются.

Если говорить о превращениях хлорофиллина в пищеварительной системе, то здесь нужно вспомнить, что в кислой среде он имеет тенденцию к образованию хлоринов — хлорина e_6 , который впоследствии может перейти в хлорин e_4 . При этом интересно, что хлорин e_6 не усваивается в кишечнике, выходя с фекалиями, а хлорин e_4 попадает в кровь [17, 30].

На рис. 3 представлены структурные формулы медного хлорофиллина и хлоринов — его производных.

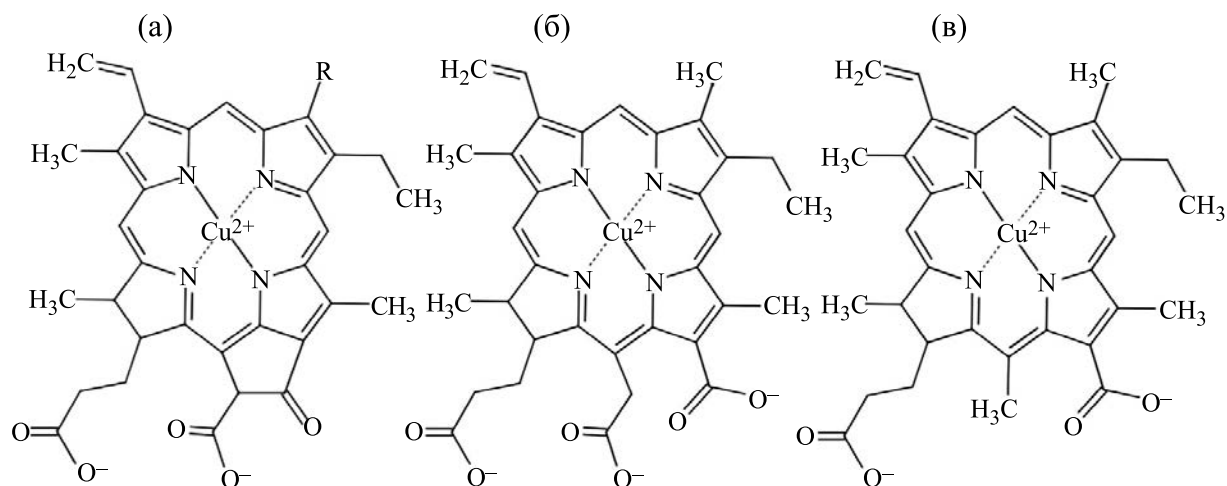


Рис. 3. (а) — Медный хлорофиллин, R — метильная группа в хлорофиллине-а, альдегидная группа в хлорофиллине-б; (б) — медный комплекс хлорина e_6 ; (в) — медный комплекс хлорина e_4 .

Не исключено, что хлорин e_4 легче проникает через мембраны за счет меньшего, по сравнению с хлорином e_6 , числа карбоксильных групп, увеличивающих отрицательный заряд молекулы.

Анализируя информацию из обзора [30], необходимо помнить, что в нем речь идет о хлорофилле и его производных, поступающих в организм через желудочно-кишечный тракт и претерпевающих в нем изменения. Главным образом, здесь речь идет о превращении хлорофиллина в кислой среде в хлорины. Однако в настоящем исследовании хлорофиллин не подвергался кислотному воздействию. Поэтому, если в составе используемого препарата не было хлорина e_4 , данные, приведенные в разделе «Результаты», относятся именно к натрий-медному хлорофиллину. К слову, в обзоре [30] имеются сведения об обнаружении хлорофиллина в сыворотке крови человека, употреблявшего его. В этом случае вещество без изменений дошло до его кишечника, где попало в энтероцит, а оттуда — в кровяное русло, таким образом, дважды проникнув через плазмалемму.

Детально рассуждать о возможных метаболических путях хлорофиллина, употребленного перорально, в настоящей статье нет необходимости, так как целью исследования было установить, проникает ли хлорофиллин в клетки из межклеточной среды. На основании информации, проиллюстрированной на рис. 1 и 2, можно утверждать, что проникает. Но при этом он вряд ли проникает в ядро клетки, поэтому в работе [12] не было обнаружено никакого его влияния на степень повреждений ДНК лимфоцитов, суспензия которых подверглась воздействию рентгеновского излучения.

Но при этом в работах [7, 8] приводятся данные о защитном действии хлорофиллина на гене-

тический аппарат облученных животных: хлорофиллин уменьшил у них число сестринских хроматидных обменов. Раскрывая полученный парадокс, необходимо обратить внимание даже не на то, что в работах [7, 8] использовалась большая, чем в работе [12], доза препарата хлорофиллина, а на то, что в исследовании [12] влияние хлорофиллина изучалось на суспензии лимфоцитов. Данные клетки в процессе исследования не делились, а потому их ядерная мембрана (которая, скорее всего, хлорофиллин не пропускает) оставалась целой.

В работах [7, 8] исследовались изъятые у облученных мышей быстроделющиеся клетки: клетки костного мозга [8] и спермогонии [7]; то есть исследуемые клетки проходили через митоз. Однако общеизвестно, что в начале митоза ядерная мембрана разрушается, а цитоплазма и кариоплазма смешиваются [31–33]. Следовательно, хлорофиллин (или хлорин e_4 , в который он превратился в организме мышей [30]), попавший в цитоплазму клетки, после митоза оказывался и внутри ее ядра, где мог уже ингибировать радиационно-индуцированный окислительный стресс.

Таким образом, сопоставляя результаты настоящего исследования и работ [7, 8, 12], можно прийти к выводу, что хлорофиллин попадает из межклеточного вещества в цитоплазму, причем скорее всего по механизму активного транспорта. Однако через ядерную мембрану в кариоплазму он либо не проходит, либо проходит очень плохо. Поэтому полноценно попасть в ядро он может лишь во время деления клеток. По этой причине хлорофиллин и хлорины в отношении тканей с быстроделющимися клетками должны обладать большим радиозащитным эффектом, чем в отношении более дифференцированных тканей с не-

делящимися или медленно делящимися клетками. Собственно, еще с начала прошлого века известно, что именно недифференцированные ткани с быстроделяющимися клетками являются наиболее радиочувствительными [34]. Поэтому их защита поможет уменьшить степень проявления многих синдромов лучевой болезни.

Было бы правильным высказать еще одно возможное объяснение того, почему в лизатах лимфоцитов, инкубированных в среде с хлорофиллином, он был обнаружен. Хлорофиллин мог «налипнуть» на клетки сверху и оставаться связанным с их поверхностью при отмывании клеток от среды инкубации. Но данное явление нельзя считать высоковероятным ввиду того, что за счет отсутствия фитолового «хвоста», который имеет место в молекуле хлорофилла, у хлорофиллина он не может закориваться в липидном бислое мембраны.

ВЫВОДЫ

Настоящим исследованием было обнаружено наличие хлорофиллина в лизате лимфоцитов, инкубированных в содержащей его среде. На основании этого сделан вывод о том, что хлорофиллин способен проникать в цитоплазму клеток через плазмалемму, причем, скорее всего, по механизму активного транспорта. Однако, на основании ранее проведенных исследований и анализа литературы, был сделан вывод, что через ядерную мембрану хлорофиллин не проходит или проходит очень плохо. Поэтому эффективное генозащитное действие он может проявлять только в тканях, состоящих из быстроделяющихся клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор настоящей статьи выражает благодарность и признательность А. А. Ларенкову, заведующему Лабораторией технологии и методов контроля радиофармпрепаратов, и В. Б. Бубенчикову, инженеру Циклотронной лаборатории ГНЦ ФМБЦ имени А.И. Бурназяна ФМБА России, за предоставленную возможность проведения измерений на спектрофотометре.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. M. Ong, W. Z. Whong, J. Stewart, and H. E. Brockman, *Mutation Res.*, **173** (2), 111 (1986). DOI: 10.1016/0165-7992(86)90086-2
2. M. Ozcan, D. Aydemir, M. Bacanli, et al., *Biol. Trace Element Res.*, **199** (12), 4475 (2021). DOI: 10.1007/s12011-021-02585-6
3. J. P. Kamat, K. K. Boloor, and T. P. Devasagayam, *Biochim. Biophys. Acta*, **1487** (2-3), 113 (2000). DOI: 10.1016/s1388-1981(00)00088-3
4. А. В. Поздеев и В. П. Гугало, *Вестн. Курской гос. с.-х. академии*, № 2, 107 (2012).
5. А. В. Поздеев и Н. П. Лысенко, *Изв. Междунар. академии аграрного образования*, **42** (2), 60 (2018).
6. А. В. Поздеев, В. К. Промоненков и Н. П. Лысенко, *Ветеринар. медицина*, № 1, 42 (2010).
7. P. Morales-Ramirez and M. T. Mendiola-Cruz, *Mutation Res.*, **344** (1-2), 73 (1995). DOI: 10.1016/0165-1218(95)90041-1
8. P. Morales-Ramirez and M. C. Garcia-Rodriguez, *Mutation Res.*, **320** (4), 329 (1994). DOI: 10.1016/0165-1218(94)90085-x
9. S. S. Kumar, B. Shankar, and K. B. Sainis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1672** (2), 100 (2004). DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002
10. S. Zimmering, O. Olvera, M. E. Hernandez, et al., *Mutation Res.*, **245** (1), 47 (1990). DOI: 10.1016/0165-7992(90)90024-e
11. S. K. Abraham, L. Sarma, and P. C. Kesavan, *Mutation Res.*, **322** (3), 209 (1994). DOI: 10.1016/0165-1218(94)90008-6
12. Л. А. Ромодин и М. А. Игнатов, *Радиационная биология. Радиоэкология*, **63**, (2023). DOI:
13. A. N. Osipov, N. M. Smetanina, M. V. Pustovalova, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **73**, 34 (2014). doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.027
14. I. B. Korzeneva, S. V. Kostuyk, L. S. Ershova, et al., *Mutation Res.*, **779**, 1 (2015). DOI: 10.1016/j.mrfmm.2015.05.004
15. P. L. Olive, J. P. Banath, and R. E. Durand, *Radiation Res.*, **122** (1), 86 (1990).
16. K. D. Walsh and T. A. Kato, *Methods Mol. Biol.*, **2519**, 65 (2023). DOI: 10.1007/978-1-0716-2433-3_7
17. B. B. Gomes, S. B. Barros, E. R. Andrade-Wartha, et al., *J. Sci. Food Agriculture*, **89**, 2003 (2009). DOI: 10.1002/jsfa.3681
18. L. F. Sciuti, L. H. Z. Cocca, A. R. L. Caires, et al., *Chem. Phys. Lett.*, **706**, 652 (2018). DOI: 10.1016/j.cplett.2018.07.016
19. A. G. Favinha, D. S. Barreiro, J. N. Martins, et al., *Spectrochim. Acta. Part A – Mol. Biomol. Spectrosc.*

- ру, **241**, 118644 (2020). DOI: 10.1016/j.saa.2020.118644
20. К. Р. Григорян и А. А. Шиладжян, Биоорганич. химия, **43** (3), 257 (2017). DOI: 10.7868/S0132342317020038
 21. Г. Б. Постникова и Е. А. Шеховцова, Биохимия, **83** (2), 269 (2018). DOI: 10.1134/S0006297918020098
 22. Y. Yao, B. Zhang, H. Pang, et al., Food Chem., **398**, 133875 (2023). DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133875
 23. A. M. A. al Alamein, H. M. Elwy, and S. H. S. El-Din, Spectrochim. Acta. Part A – Mol. Biomol. Spectroscopy, **206**, 37 (2019). DOI: 10.1016/j.saa.2018.07.073
 24. М. Б. Березин и О. И. Койфман, Рос. химич. журн., **61** (4), 42 (2017).
 25. M. Shayeghi, G. O. Latunde-Dada, J. S. Oakhill, et al., Cell, **122** (5), 789 (2005). DOI: 10.1016/j.cell.2005.06.025
 26. A. Qiu, M. Jansen, A. Sakaris, et al., Cell, **127** (5), 917 (2006). DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.041
 27. N. C. Andrews, Cell Metabolism, **5** (1), (2007). DOI: 10.1016/j.cmet.2006.12.004
 28. M. Sakiyama, H. Matsuo, Y. Toyoda, et al., Human Cell, **34** (4), 1082 (2021). DOI: 10.1007/s13577-021-00534-y
 29. F. Sun, Z. Zhao, M. M. Willoughby, et al., Nature, **610** (7933), 768 (2022). DOI: 10.1038/s41586-022-05347-z
 30. M. Hayes and M. G. Ferruzzi, Nutrition Res., **81**, 19 (2020). DOI: 10.1016/j.nutres.2020.06.010
 31. U. Kutay and M. W. Hetzer, Curr. Opin. Cell Biol., **20** (6), 669 (2008). DOI: 10.1016/j.ceb.2008.09.010
 32. V. Archambault, J. Li, V. Emond-Fraser, and M. Larouche, Front. Cell Devel. Biol., **10**, 1012768 (2022). DOI: 10.3389/fcell.2022.1012768
 33. S. Y. van der Zanden, M. L. M. Jongsma, A. C. M. Neeffjes, et al., Trends Cell Biol., **33**, 18 (2022). DOI: 10.1016/j.tcb.2022.06.002
 34. J. Bergonie and L. Tribondeau, Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Science. **143**, 983 (1906).

Spectrophotometric Determination of Sodium-Copper Chlorophyllin Level in Lymphocytes

L.A. Romodin*, **

*State Scientific Center of the Russian Federation – A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the Federal Medical Biological Agency of Russia, ul. Marshala Novikova 23, Moscow, 123098 Russia

**Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Volokolamskoe shosse 11, Moscow, 125080 Russia

This study raises the question of whether it is possible to determine the appearance of sodium-copper chlorophyllin in lymphocytes. To answer this question, the content of chlorophyllin was determined in lymphocyte lysate previously incubated in a medium containing 300 μM of copper chlorophyllin. Significant amounts of chlorophyllin were observed in the lysate, thus, suggesting that chlorophyllin is able to enter cells. However, the question remains as to whether chlorophyllin can pass through the nuclear membrane. Based on our own data and information obtained from the scientific literature, it can be concluded that the passage of chlorophyllin through the nuclear membrane happens at a much slower rate than through the plasmalemma.

Keywords: lymphocytes, chlorophyllin, radioprotectors, spectrophotometry, transmembrane transport

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И ТРАНСДУКЦИЯ СИГНАЛОВ В КЛЕТКАХ

© 2023 г. Г.Г. Мартинович*,[#], И.В. Мартинович*, В.В. Войнаровский*, Д.В. Григорьева*,
И.В. Горудко*, О.М. Панасенко**

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

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

[#]E-mail: martinovichgg@bsu.by

Поступила в редакцию 19.12.2022 г.

После доработки 04.01.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Представлен обзор молекулярных механизмов внутриклеточной передачи информации с участием свободных радикалов. Детально рассмотрены структура и функционирование ферментативных систем продукции супероксидного анион-радикала и пероксида водорода. Обсуждаются механизмы регуляции свойств клеток с участием специализированных редокс-цепей, образованных группой белков, взаимодействующих через электрон-транспортные процессы. Анализируются генетически опосредованные механизмы регуляции редокс-гомеостаза клеток. Особое внимание уделяется проблеме количественной характеристики сети взаимодействий окислителей и восстановителей, определяющей видовые и индивидуальные особенности редокс-гомеостаза и стрессового ответа клеток.

Ключевые слова: свободные радикалы, активные формы кислорода, редокс-регуляция, окислительный стресс, восстановительный стресс, фактор транскрипции Nrf2.

DOI: 10.31857/S0006302923040063, EDN: KJSYZR

Активное исследование свободнорадикальных процессов в живых системах началось в середине прошлого века, когда образование окислителей в организме связали с развитием хронических и дегенеративных заболеваний. В 1954 г. Р. Гершман с соавторами предположила, что известные токсические эффекты кислорода обусловлены образованием его активных радикальных интермедиатов [1]. В том же году Б.Н. Тарусов высказал гипотезу о ведущей роли свободнорадикальных реакций перекисного окисления липидов в развитии радиационно-индуцированных повреждений клеток [2]. Дальнейшие работы Н.М. Эмануэля и ряда других авторов способствовали выяснению механизмов свободнорадикального окисления липидов и антиоксидантных защитно-восстановительных процессов в клетках [3, 4]. В

последующем было установлено, что свободнорадикальные продукты метаболизма кислорода или активные формы кислорода (АФК), как их стали называть позже, образуются не только после облучения, но и продуцируются метаболически, вызывая повреждение клеточных структур при развитии патологического состояния организма [5, 6].

В 1956 г. Д. Харман выдвинул свободнорадикальную теорию старения, согласно которой ослабление физиологических функций с возрастом происходит в результате аккумуляции различного рода повреждений, в том числе и генетического материала, образующимися при дыхании клеток свободными радикалами [7]. Данная теория привела к формированию целого направления биологии старения, исследующего роль АФК в процессах старения и развитии возрастной патологии, а также способы регуляции процессов старения с помощью антиоксидантных средств [8, 9]. Развитие исследований в данной области значительно расширило список заболеваний и патологических процессов, объединяемых понятием «свободнорадикальные».

Открытие регуляторной роли монооксида азота ($\cdot\text{NO}$), рассматривавшегося до этого как цитотоксическое соединение, инициировало начало

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, НАДФН — никотинамидадениндинуклеотид фосфат, Nox — НАДФН-оксидаза (NADPH oxidase), ФАД — флавинадениндинуклеотид, ФМН — флавиномононуклеотид, НАДН — никотинамидадениндинуклеотид, СОД — супероксиддисмутаза, ARE — антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant respons(iv)e element), Duox — двойная оксидаза (Dual oxidase), Nrf2 — транскрипционный фактор 2 семейства NFE (NF-E2-related factor 2), Keap1 — Kelch-подобный ECH-ассоциированный протеин 1, Klf9 — Kruppel-подобный фактор 9, Prx6 — пероксиредоксин 6.

исследований физиологических функций свободнорадикальных процессов. Первые свидетельства того, что в ходе метаболических процессов в живых системах может продуцироваться $\cdot\text{NO}$, приводящий к образованию динитрозильных комплексов железа, были получены в работах А.Ф. Ванина [10, 11]. Дальнейшее изучение регуляторных свойств этого свободного радикала привело к открытию его физиологической функции, состоящей в регуляции тонуса сосудов, за которое Р. Фарчготт, Л. Игнаро и Р. Мьюрэд в 1998 г. были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине [12].

В настоящее время участие свободнорадикальных продуктов метаболизма кислорода показано в регуляции широкого спектра биохимических и физиологических процессов, включая регенеративные и адаптационные процессы, дифференцировку клеток и апоптоз [13, 14]. Важно отметить, что монооксид азота, который синтезируется цитохром P_{450} -подобными гемопroteинами семейства NO-синтаз, главным образом участвует в межклеточной сигнализации [15]. С другой стороны, основными участниками процессов внутриклеточной трансдукции сигналов являются супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) и продукт его дисмутации — пероксид водорода (H_2O_2) [16].

АФК, по-видимому, являются универсальными биорегуляторами жизненных функций у всех типов живых организмов — от бактерий и простейших до высших растений и животных. Показано, что при повышении внутриклеточной концентрации АФК изменяется активность практически всех классов сигнальных эффекторных белков, участвующих в передаче сигнала от клеточной поверхности к ядру [13]. Однако в рамках традиционной биохимии и физиологии механизмы регуляции АФК широкого спектра биохимических и физиологических процессов трудно объяснить.

Многочисленные исследования указывают на сложность и многообразие процессов, протекающих в живых системах с участием АФК и антиоксидантов. Целью настоящей работы является обзор современных представлений о механизмах участия АФК в процессах внутриклеточной передачи информации. Особое внимание уделяется проблеме количественной характеристики уникальной сети взаимодействий окислителей и восстановителей, определяющей видовые и индивидуальные особенности редокс-гомеостаза и стрессового ответа клеток.

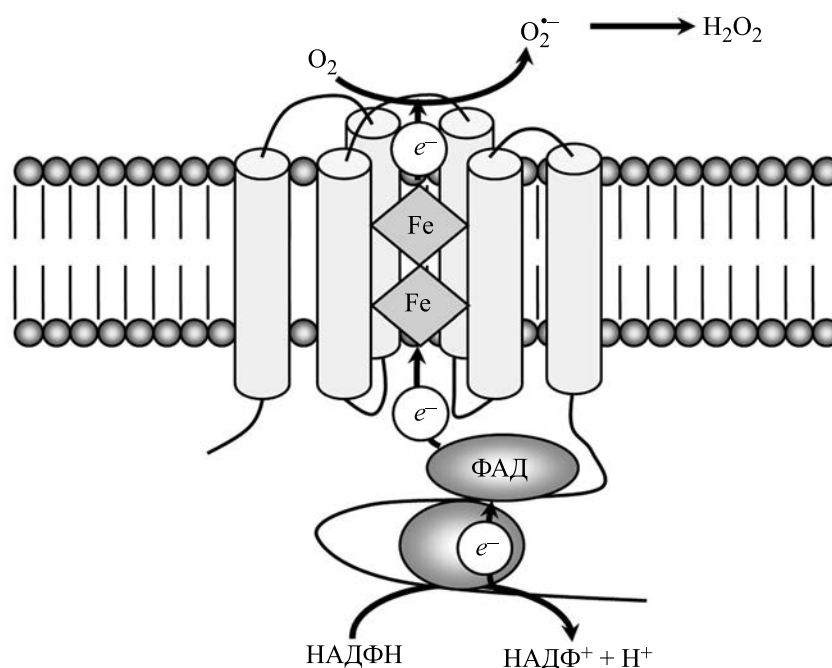
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ КИСЛОРОДА В КЛЕТКАХ ПРИ СИГНАЛИЗАЦИИ

АФК ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, $\text{HO}\cdot$ и др.) образуются в клетках как в результате действия внешних физико-химических факторов, так и в процессах клеточного метаболизма. Это гетерогенная группа соединений, характеризующаяся разными физико-химическими свойствами и биологической активностью. В процессах внутриклеточной передачи сигнала ключевую роль выполняет H_2O_2 , образование которого происходит в результате дисмутации $\text{O}_2^{\cdot-}$ [16]. Генерация $\text{O}_2^{\cdot-}$ в клетках человека, в основном, происходит при одноэлектронном восстановлении молекулярного кислорода с участием НАДФН-оксидаз и комплексов дыхательной цепи митохондрий.

НАДФН-оксидазы млекопитающих. НАДФН-оксидаза относится к семейству $\text{O}_2^{\cdot-}$ -генерирующих оксидаз (обозначаемых как Nox-семейство оксидаз), состоящему из семи членов: Nox1 (NADPH oxidase 1), Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, двойные оксидазы Duox1 (Dual oxidase 1) и Duox2 [17]. Ключевым компонентом $\text{O}_2^{\cdot-}$ -генерирующих оксидаз является гликопротеин $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (phagocyte oxidase), составляющий каталитическую часть НАДФН-оксидазы фагоцитов и известный как Nox2.

Простетическими группами гликопротеина $\text{gp91}^{\text{phox}}$ являются флавинадениндинуклеотид (ФАД) и два гема, которые образуют трансмембранную электрон-транспортную цепь и обеспечивают перенос электронов между субстратами (НАДФН и O_2), располагающимися по разным сторонам клеточной мембраны [18]. Полипептидная цепь $\text{gp91}^{\text{phox}}$ состоит из 570 аминокислот и содержит шесть трансмембранных α -спиральных участков, образующих мембранный домен фермента. В области III и V трансмембранных α -спиральных участков находятся пять консервативных остатков гистидина, четыре из которых обеспечивают места связывания для двух гемов. Каждая из гемовых групп $\text{gp91}^{\text{phox}}$ связана двумя координационными связями с остатками гистидина (His101:His209 и His115:His222) таким образом, что тетрапиррольные структуры располагаются параллельно плоскости трансмембранных α -спиральных участков [19]. Цитозольный домен полипептидной цепи со стороны карбоксильного окончания содержит ФАД и место связывания НАДФН (рис. 1).

Трансмембранный перенос электронов от НАДФН на O_2 включает несколько этапов [20]. Сначала два электрона переносятся на ФАД. Следующим этапом является одноэлектронный

Рис. 1. Топология gp91^{phox}-комплекса.

перенос электронов с ФАДН₂ (E^0 (ФАДН[•]/ФАДН₂) = -304 мВ) через внутренний гем (E^0 (Fe³⁺/Fe²⁺) = -225 мВ) и внешний гем (E^0 (Fe³⁺/Fe²⁺) = -265 мВ) на O₂ (E^0 (O₂/O₂^{•-}) = -137 мВ). Наличие O₂ является необходимым условием для переноса электронов по простетическим группам фермента. Поскольку редокс-потенциал внешнего гема ниже, чем внутреннего, в отсутствие O₂ электроны будут оставаться на внутреннем геме. Таким образом, движущую силу процесса определяет разность редокс-потенциалов O₂ и НАДФН.

Оксидазы Nox-семейства используются для защиты от вирусов и бактерий, а также регуляции многих клеточных функций [18]. Основным продуктом Nox1, Nox2, Nox3 и Nox5 является O₂^{•-}, тогда как Duox1, Duox2 и Nox4 имеют пероксидазный домен и продуцируют преимущественно H₂O₂ [21]. При этом биологические функции и тканевое распределение разных изоформ НАДФН-оксидаз существенно различаются.

Высокий уровень экспрессии гена Nox1 наблюдается в клетках эпителия толстой кишки [22]. Фермент также обнаружен в клетках гладкой мышечной ткани, эндотелиальных клетках, тромбоцитах, остеокластах, нейронах, астроцитах и клетках микроглии [23, 24]. Nox1 локализована в плазматической мембране клеток, преимущественно в кавеолах [25]. В клетках эпителия

толстой кишки и микроглии Nox1 участвует в механизмах иммунной защиты, подобно Nox2 фагоцитов [26, 27]. В тромбоцитах Nox1 участвует в коллаген-индуцированном формировании тромбов [28]. В гладкой мышечной ткани Nox1 участвует в процессах внутриклеточной сигнализации, активированных действием ангиотензина II [29, 30].

Генерация АФК с участием Nox2 необходима для микробицидного действия и регуляции иммунного ответа. Ген изоформы Nox2, главным образом, экспрессируется в фагоцитах, однако также обнаружен в клетках поперечно-полосатых и гладких мышц, кардиомиоцитах, нейронах, эндотелиоцитах, фибробластах, гепатоцитах и гемопоэтических стволовых клетках [31]. В фагоцитирующих клетках Nox2 преимущественно (95%) локализована в мембране фагосом, а в эндотелиальных клетках Nox2 содержится в кавеолах мембран ламеллоподий [32]. В гладкомышечных клетках Nox2 располагается вблизи перинуклеарного цитоскелета, а в нейронах — в мембране синапсов [33]. В эндотелиоцитах активация Nox2 происходит при механотрансдукции и действии эндотелина-1, фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и фактора некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha, TNF-α) [34, 35]. Нарушение функционирования Nox2 приводит к дисфункции эндотелия и развитию гипертензии [36].

Оксидаза Nox3 является O₂^{•-}-генерирующей оксидазой клеток внутреннего уха, ее ген экс-

прессируется в кохлеарном и вестибулярном сенсорном эпителии, а также в спиральном ганглии [37]. Nox3 выполняет ключевую роль в образовании отолитов — кристаллов бикарбоната кальция, являющихся компонентами отолитового аппарата в вестибулярном анализаторе, адекватными раздражителями для которого являются изменения положения головы, воздействие на организм гравитационных сил, прямолинейных и центростремительных ускорений [18]. Предполагается, что Nox3 является конститутивно активным ферментом [36]. Усиление продукции АФК в клетках внутреннего уха происходит при действии ототоксических агентов и шума [38].

Участником процессов внутриклеточной сигнализации является H_2O_2 , продуцируемый Nox4. Оксидоза Nox4 выявлена во многих типах клеток, включая эндотелиоциты [39], фибробласты [40], кератиноциты [41], остеокласты [42], нейроны [43] и гепатоциты [44]. Высоким содержанием Nox4 характеризуются клетки почек [45]. В клетках Nox4 локализуется в плазматической мембране (в областях фокальных контактов), в мембранах эндоплазматического ретикулума и ядерных мембранах [46, 47]. В кардиомиоцитах Nox4 обнаружена в митохондриях [48], однако точная локализация и ориентация фермента в мембранах митохондрий неизвестна [49].

Nox5 локализована в плазматической мембране и ее ген экспрессируется в клетках селезенки [50], гладкомышечных клетках [51], эндотелиоцитах [52] и других типах клеток. Предполагается, что оксидоза Nox5 играет важную роль в регуляции пролиферации клеток [51]. Высокий уровень экспрессии гена данного фермента наблюдается во многих типах опухолевых клеток [53–55].

Двойные оксидазы Duox1 и Duox2 первоначально были обнаружены в клетках щитовидной железы, в которых они участвуют в биосинтезе тиреоидных гормонов [56]. Гены Duox1 и Duox2 также экспрессируются в клетках эпителия дыхательных путей [57] и предстательной железы [58]. Показано, что двойные оксидазы Duox1 и Duox2 участвуют в синтезе аденидинуклеотидфосфата никотиновой кислоты (НААДФ) и регуляции Ca^{2+} -сигнализации при активации Т-клеток [59].

В одних и тех же клетках могут экспрессироваться гены разных типов Nox-оксидаз. Скорость продукции $O_2^{\bullet -}$ различными оксидазами также различается. Разные изоформы НАДФН-оксидазы активируются разными стимулами, и, следовательно, вызывают разные клеточные отклики. Среди основных факторов, определяющих специфичность действия продуктов Nox, следует отметить субклеточную колокализацию фермента и мишени действия его продуктов, а также внутриклеточные редокс-условия.

Электрон-транспортная цепь митохондрий. Оксидоредуктазы митохондрий являются основным источником образования АФК для большинства клеток млекопитающих. Наиболее эффективными участками продукции $O_2^{\bullet -}$ являются комплекс I (НАДН-убихинон оксидоредуктаза, ЕС 7.1.1.2) и комплекс III (убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза, ЕС 7.1.1.8) дыхательной цепи митохондрий.

Комплекс I дыхательной цепи митохондрий млекопитающих состоит из 44 субъединиц и имеет молекулярную массу 980 кДа [60]. Простетическими группами белка являются флавиномононуклеотид (ФМН) и восемь железосерных кластеров (N1a, N1b, N2, N3, N4, N5, N6a, N6b). Два электрона, поступающие от НАДН, переносятся через ФМН и железосерные центры на убихинон, который связывается с активным центром, расположенным внутри гидрофобной части мембраны.

Путь переноса электронов от НАДН к убихинону в комплексе I, проходящий через ФМН и железосерные кластеры, составляет более 100 Å. ФМН присоединяет сразу два электрона от НАДН и затем по одному электрону последовательно переносит их на кластер N3. Дальнейший перенос электронов осуществляется в последовательности $N3 \rightarrow N1b \rightarrow N4 \rightarrow N5 \rightarrow N6a \rightarrow N6b \rightarrow N2$. Расстояние между редокс-центрами в электрон-транспортной цепи фермента составляет около 14 Å и соответствует максимально возможному расстоянию для переноса электрона в биологических системах путем туннелирования [61]. У большинства железосерных кластеров фермента редокс-потенциал составляет около –250 мВ. Наиболее высоким редокс-потенциалом характеризуется центр N2 ($E^0 = -100$ мВ). Именно через этот центр осуществляется передача электронов на убихинон. Перенос электронов с железосерных кластеров на убихинон ингибируется хиноноподобными ингибиторами — пестицидом ротеноном и антибиотиком пирицидином А.

Образование АФК в комплексе I происходит как при транспорте электронов от НАДН к убихинону (прямой электронный перенос), так и при транспорте от убихинола к $НАД^+$ (обратный электронный перенос). Обратный электронный перенос наблюдается при высоком мембранном потенциале митохондрий и сопровождается большим выходом АФК [62]. Скорость генерации H_2O_2 изолированными митохондриями нейронов крысы при прямом электронном переносе в комплексе I составляет 0.06–0.40 нмоль H_2O_2 /мин на мг белка, а при обратном — 1.0–3.0 нмоль H_2O_2 /мин на мг белка [63]. Образование АФК при обратном переносе зависит от величины мембранного потенциала и увеличивается с

ростом потенциала [64]. Показано, что ротенон усиливает продукцию АФК в комплексе I при прямом электронном переносе и снижает образование АФК при обратном переносе [65].

В комплексе I компонентами, с которых возможен перенос электронов на O_2 , являются флавин, семиубихинон и не относящийся к основной цепи внутрибелкового переноса электронов железосерный центр N1a ($E^{0'} = -370$ мВ) в флавин-содержащей субъединице. Железосерный центр N1a выполняет функцию временного депо для электронов при интенсивном переносе с ФМН [66, 67]. Перенос электрона с железосерного кластера N1a на O_2 приводит к образованию $O_2^{\bullet-}$. Продуктами взаимодействия флавинового кофермента с молекулярным кислородом являются $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 [68].

В изолированном комплексе I основным донором электронов для восстановления O_2 выступает ФМН [69]. В комплексе I, функционирующем в митохондриальной мембране, генерация $O_2^{\bullet-}$ происходит с участием семиубихиноновых радикалов ($CoQ^{\bullet-}$), образующихся при переносе электрона с железосерного кластера N2 на убихинон в активном центре фермента [65]. Семиубихиноны, генерируемые в комплексе III при протекании Q-цикла, также являются донорами электронов для одноэлектронного восстановления кислорода. Скорость образования семиубинонов (а, следовательно, и скорость образования АФК) зависит при этом от места их образования в комплексе III [70].

Перенос электронов в комплексе III блокируется антимицином А и миксотиазолом. Антимицин А блокирует перенос электронов от гема b_L к убихинону в центре связывания убихинона Q_N , расположенном вблизи матрикса митохондрий. Миксотиазол ингибирует передачу электрона от убихинола к железосерному белку вблизи наружной стороны внутренней мембраны (Q_P). Антимицин А и миксотиазол ингибируют транспорт электронов в комплексе III, но оказывают различное действие на процессы генерации $O_2^{\bullet-}$. Антимицин А блокирует переход электрона с гема b_H , вызывая увеличение генерации $O_2^{\bullet-}$ в комплексе III примерно в десять раз [70]. Ингибирование миксотиазолом образования убисемиубинонов с цитозольной стороны внутренней митохондриальной мембраны приводит к незначительному увеличению выхода $O_2^{\bullet-}$. Таким образом, наиболее интенсивная продукция $O_2^{\bullet-}$ дыхательной цепью при физиологических условиях наблюдается на внутренней мембране со стороны митохондриального матрикса. Следует

также отметить, что митохондрии разных тканей сильно различаются по относительным и абсолютным активностям участвующих в метаболизме АФК ферментов, а также по локальным концентрациям O_2 (печень, почки, эндотелий сосудов, легкие) [63].

Регуляция скорости окисления убихинолов является одним из ключевых этапов регуляции скорости переноса электронов в электрон-транспортной цепи и скорости генерации $O_2^{\bullet-}$ комплексом III. Показано, что образование $O_2^{\bullet-}$ максимально, если убихинол окислен на 25–30 % [71]. Генерация АФК митохондриями также модулируется $^{\bullet}NO$ посредством его обратимого связывания с гемовыми группами комплексов III и IV [72, 73].

В митохондриях наряду с комплексами электрон-транспортной цепи образование АФК может также протекать с участием ряда ФАД-содержащих оксидоредуктаз, включая сукцинатдегидрогеназу, дегидролипоямиддегидрогеназу, глицерол-3-фосфатдегидрогеназу, цитохром b_5 редуктазу, моноаминоксидазу и другие [74]. Однако вклад дыхательных комплексов в суммарную продукцию АФК выше вследствие их более высокого содержания в митохондриях.

Образование АФК в митохондриях является важным регуляторным фактором, необходимым для поддержания гомеостаза и адаптации к стрессу [75]. Изменение скорости генерации АФК митохондриями может выступать в качестве одного из механизмов переключения функциональной активности клеток. В последние годы интенсивно исследуется роль митохондриальных АФК при адаптации к гипоксии и в регуляции иммунитета, аутофагии, дифференцировки, апоптоза [76]. Увеличение продукции АФК в митохондриях при возрастных изменениях рассматривается в качестве ключевого фактора, инициирующего запуск дегенеративных процессов при старении [9, 77].

Супероксиддисмутазы. В клетках наиболее высокая скорость образования H_2O_2 наблюдается при катализируемой супероксиддисмутазами (СОД, ЕС 1.15.1.1) дисмутации $O_2^{\bullet-}$ [78]. Суперсемейство СОД подразделяется на три группы ферментов, различающихся по величине скорости реакции, строению и содержанию металлов переменной валентности. Первая группа ферментов включает семейство СОД, содержащих ионы меди и ионы цинка, и обозначается как Cu,Zn -СОД. Семейство ферментов, содержащих в активном центре ион железа или ион марганца, составляет второе семейство СОД и его члены обозначаются как Fe -СОД и Mn -СОД. К третьей группе ферментов относятся СОД, содержащие ион никеля (Ni -СОД).

Cu,Zn-СОД встречается во всех клетках эукариот и представляет собой гомодимер с молекулярной массой 32 кДа, состоящий из двух β -баррельных мономеров, активные центры которых располагаются на внешних петлях. Ион меди активного центра координирован четырьмя связями с атомами азота гистидинов боковых цепей [79]. Один из лигандов Cu^{2+} (His61) совместно с двумя другими аминокислотными остатками гистидина и остатком аспарагиновой кислоты координирует ион цинка. Считается, что ион меди обеспечивает каталитическую активность фермента, а ион цинка придает ему стабильность. Катализ протекает в две стадии: на первой стадии происходит восстановление иона меди $\text{O}_2^{\bullet-}$, на втором — его окисление.

Cu,Zn-СОД у человека и животных является, в основном, внутриклеточным ферментом. Только небольшие количества фермента присутствуют в плазме крови и цереброспинальной жидкости. У человека внеклеточная Cu,Zn-СОД (в отличие от внутриклеточной) является тетрамером, построенным из четырех одинаковых субъединиц. В клетках Cu,Zn-СОД преимущественно локализована в цитозоле [80].

Ген Mn-СОД экспрессируется в прокариотических и эукариотических клетках. У высших животных основным местом локализации Mn-СОД является матрикс митохондрий. Fe-СОД содержится в прокариотах и в хлоропластах растительных клеток [81]. Fe-СОД и Mn-СОД у одноклеточных являются гомодимерами. Mn-СОД человека — гомотетрамер с молекулярной массой 88 кДа. Ni-СОД обнаружена только у бактерий семейства *Streptomyces*, и поэтому является наименее распространенной формой СОД [82].

В организме человека распределение и содержание различных форм СОД зависит от типа ткани и изменяется при патологии. Увеличение экспрессии генов СОД наблюдается при диабете [83], онкологических [84, 85], нейродегенеративных [86] и сердечно-сосудистых заболеваниях [87].

РЕДОКС-ЦЕПИ КАК СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОДУЛИ СИГНАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

При трансдукции сигналов в клетках с участием свободных радикалов (редокс-сигнализации) в серии электрон-транспортных процессов происходит направленный перенос электронов от белков к O_2 , что изменяет конформацию и активность биологических молекулярных «машин». В транспорте электронов от начального донора к конечному акцептору могут участвовать несколько посредников (редокс-активных соединений), создавая цепи направленного переноса электро-

нов или редокс-цепи [88, 89]. Изменение активности белков-мишеней происходит в результате окисления, главным образом, депротонированных тиоловых групп цистеиновых остатков [90, 91]. Данный механизм не является специфическим для ряда редокс-активных соединений и запускается как эндогенными, так и экзогенными акцепторами электронов. Важным фактором, определяющим биологический эффект действия АФК в клетках, является внутриклеточная локализация фермента, генерирующего АФК, и белка-мишени [92]. Клеточная антиокислительная система ограничивает эффективность действия АФК на удаленные от источника белки-мишени. В связи с этим высокая концентрация АФК, необходимая для активации мишени, формируется только вблизи источника генерации окислителей. Источники генерации АФК, сами АФК и белки-мишени образуют единую цепь передачи информации, специфичность действия которой определяется типом мишени.

В настоящее время в литературе обсуждается ряд регуляторных механизмов, функционирование которых обеспечивается специализированными редокс-цепями. Примером комплексной молекулярной структуры, образованной группой взаимодействующих высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений, являются кислород-чувствительные рецепторы в нейроэпителиальных тельцах легкого и каротидных тельцах. Одним из ключевых компонентов данного сенсора являются K^+ -каналы [93].

Функциональное состояние K^+ -каналов кислородного сенсора регулируется посредством редокс-зависимого механизма: образование дисульфидов приводит к открытию канала, тогда как их восстановление — к закрытию [94]. В.П. Скулачев рассматривал K^+ -каналы как неотъемлемый компонент H_2O_2 -сенсоров высших животных, один из которых расположен в нейроэпителиальных тельцах легкого и отвечает за сужение дыхательных путей при повышении уровня H_2O_2 , а второй выполняет ту же функцию применительно к кровеносным сосудам, находясь в каротидных тельцах [95]. Повышение концентрации H_2O_2 увеличивает число открытых K^+ -каналов, что приводит к гиперполяризации клеточной мембраны и ингибированию секреции нейротрансмиттеров. Гипоксия, наоборот, приводит к снижению концентрации H_2O_2 в нейроэндокринных клетках, что индуцирует закрытие K^+ -каналов, деполяризацию мембраны, активацию потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и последующую секрецию нейротрансмиттеров [94].

В глобусных клетках каротидных телец источником H_2O_2 для регуляции активности K^+ -кана-

лов являются оксидоредуктазы митохондрий [96]. Предполагается, что ключевую роль в работе хеморецептора O_2 выполняет митохондриальный комплекс I [97]. Клетки каротидных телец содержат большое количество митохондрий, расположенных вблизи содержащей K^+ -каналы плазматической мембраны, в результате чего формируются « O_2 -чувствительные микродомены» [97, 98]. Редокс-цепь в этом случае образована колокализированными митохондриальным комплексом I и H_2O_2 -чувствительным K^+ -каналом плазматической мембраны, связь между которыми осуществляется с участием АФК.

В нейроэпителиальных тельцах легких O_2 -чувствительным компонентом хеморецептора O_2 является НАДФН-оксидаза, а именно — Nox2 [99, 100]. Показано, что в нейроэндокринных клетках нейроэпителиальных телец легких происходит коэкспрессия мРНК для НАДФН-оксидазы и H_2O_2 -чувствительного K^+ -канала [101]. У мышей, нокаутированных по $gp91^{phox}$, наблюдается нарушение ответа на гипоксию [99, 102]. Таким образом, структурной основой хеморецептора O_2 в нейроэпителиальных тельцах является редокс-цепь, включающая колокализированные в плазматической мембране белки НАДФН-оксидазу и H_2O_2 -чувствительный K^+ -канал.

В гладкомышечных клетках сосудов активация редокс-цепи, содержащей НАДФН-оксидазу, происходит при регуляции вазомоторной функции организма. Показано, что при действии ангиотензина II в результате фосфорилирования активируется Nox1 [103]. Пероксид водорода, образующийся при дисмутации продуцируемого Nox1 супероксида, ингибирует Ca^{2+} -каналы Т-типа плазматической мембраны гладкомышечных клеток, что уменьшает частоту кальциевых колебаний и усиливает сужение артерий [104]. Эффективное ингибирование именно Ca^{2+} -каналов Т-типа обеспечивается близкой колокализацией белков в пределах клеточной мембраны. Показано, что фермент Nox1 и мишень действия его продуктов Ca^{2+} -канал ($Ca_v3.2$) располагаются в caveолах плазматической мембраны в пределах 40 нм [104, 105]. Таким образом, вазоконстрикция при действии ангиотензина II обеспечивается редокс-цепью, включающей колокализированные в caveолах плазматической мембраны гладкомышечных клеток белки Nox1 и H_2O_2 -чувствительный Ca^{2+} -канал.

Редокс-цепи, содержащие колокализированные в мембране ферменты семейства Nox и тирозинфосфатазы, играют важную роль при передаче сигналов, опосредованных активацией рецепто-

ров с тирозинкиназной активностью. Одним из первых был описан путь передачи сигналов с участием АФК, инициируемый рецепторами инсулина [106]. При действии инсулина усиление фосфорилирования происходит путем ингибирования тирозинфосфатазы РТР1В с участием H_2O_2 , продуцируемого Nox4 [107, 108]. РТР1В, также как и Nox4, является ассоциированным с инсулиновым рецептором белком [109], в результате чего обеспечивается эффективное функционирование редокс-цепи и достигается адресная инактивация тирозинфосфатазы H_2O_2 .

Внутриклеточная локализация структур, продуцирующих АФК, является важным фактором, определяющим специфичность действия окислителей при апоптозе. Показано, что механизм аскорбат-зависимой регуляции Ca^{2+} -сигналикации при апоптозе клеток включает усиление локальной продукции АФК с участием оксидоредуктаз электрон-транспортной цепи митохондрий [110, 111]. Обнаружено, что основной компонент масла черного тмина (*Nigella sativa*) тимохинон, инициирующий более низкий выход АФК в сравнении с 1,4-бензохиноном, более токсичен в отношении опухолевых клеток [112]. Высокая в сравнении с 1,4-бензохиноном токсичность тимохинона обусловлена активацией редокс-сигнального механизма запуска апоптоза, ключевым элементом которого является колокализация митохондриальных оксидоредуктаз, участвующих в продукции окислителей, и соответствующего редокс-сенсора — АДФ/АТФ-транслоказы [113, 114]. Показано, что изменение редокс-свойств клеток, ведущее к увеличению концентрации восстановителей, вызывает ослабление индукции апоптоза и способствует формированию лекарственной устойчивости опухолевых клеток [115]. С другой стороны, уменьшение содержания восстановителей повышает токсичность противоопухолевых агентов [115]. Таким образом, одним из факторов, определяющих специфичность отклика клеток на действие редокс-активных соединений, является внутриклеточное редокс-состояние, характеризующее определенный редокс-гомеостаз.

НАРУШЕНИЯ РЕДОКС-СИГНАЛИЗАЦИИ КАК ОСНОВА РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИИ

В настоящее время нарушения функционирования биосистем связывают не столько со свободнорадикальным повреждением, сколько с нарушением процессов переноса электронов между макромолекулами и редокс-активными соединениями. В 2008 г. Д. Джонс в противовес свободнорадикальной гипотезе повреждения биосистем выдвинул «редокс-гипотезу», основанную на четырех постулатах [116]: 1) Все биологические системы содержат редокс-элементы, которые функ-

ционируют в клеточной сигнализации, движении макромолекул и физиологической регуляции; 2) организация и координация редокс-активности этих элементов осуществляется через редокс-цепи, включающие общие контролирующие узлы (т.е. тиоредоксина, глутатиона); 3) редокс-чувствительные элементы пространственно и «кинетически» изолированы, так что вентильные (ключевые) редокс-цепи могут быть активированы транслокацией/агрегацией и/или каталитическими механизмами; 4) окислительный стресс представляет собой нарушение функционирования этих цепей, вызванное конкретной реакцией с тиольными редокс-чувствительными элементами при изменении путей переноса электронов или разрывом «вентильных» механизмов, контролирующих поток через эти пути. Таким образом, в рамках данной гипотезы патологические нарушения в организме могут возникать не только в результате прямого повреждения биомолекул окислителями (что уже изучается на протяжении многих лет), но и в результате нарушения процессов сигнализации с участием АФК и антиоксидантов.

Переоценка роли свободнорадикальных процессов в функционировании организмов привела к изменению ряда основных понятий свободнорадикальной медицины, включая понятие «окислительный стресс». В соответствии с современным определением окислительный стресс — это дисбаланс между окислителями и восстановителями в пользу окислителей, ведущий к нарушению редокс-сигнализации и контроля и/или к повреждению макромолекул [117]. Важным аспектом современного понимания проблемы редокс-регуляции в биологических системах является обоснование того факта, что нарушение редокс-сигнальных процессов может происходить не только в результате повышения концентрации окислителей, но и в результате накопления восстановителей в клетке, что характеризуется как восстановительный стресс [118, 119]. При высоком содержании восстановителей в клетке окислители, продуцируемые в физиологических процессах, уже не могут активировать специфические мишени. Восстановительный стресс следует рассматривать как дисбаланс между окислителями и восстановителями в пользу восстановителей, ведущий к нарушению редокс-сигнализации и функционирования клеток.

Значительное повышение содержания антиоксидантов наблюдается в опухолевых клетках [120, 121]. В результате повышения концентрации антиоксидантов нарушается редокс-сигнализация, что способствует изменению клеточного функционирования и развитию химиорезистентности [115, 122]. Показано также, что усиление восстановительных процессов играет важную роль в этиологии сердечно-сосудистых заболева-

ний. Ключевым молекулярным событием, связанным с восстановительным стрессом в патофизиологии сердечно-сосудистых заболеваний является, вероятно, нарушение пространственной структуры белков, вызванное снижением числа внутримолекулярных дисульфидных связей в присутствии высоких концентраций восстановителей. В результате изменения редокс-потенциала цистеиновых остатков боковых цепей на поверхности появляются гидрофобные аминокислотные остатки и усиливается агрегация белков, что способствует развитию кардиомиопатии [123, 124].

В модельных экспериментах на животных показано, что сверхэкспрессия генов белков антиокислительной системы может индуцировать развитие патологических состояний, характерных и для других заболеваний [125]. Так, глобальная сверхэкспрессия гена глутатионпероксидазы 1 (ЕС 1.11.1.9) у не страдающих ожирением мышей вызывает гипергликемию, инсулинорезистентность и гипертрофию β -клеток поджелудочной железы [126]. Лауреат Нобелевской премии Д. Уотсон предположил, что нарушение пространственной структуры белков, обусловленное восстановительным стрессом, способствует развитию диабета 2 типа, деменции, сердечно-сосудистых заболеваний и некоторых форм рака [127]. В качестве возможного профилактического средства данных заболеваний Д. Уотсон рассматривает физические упражнения, поскольку их выполнение сопровождается повышением продукции АФК.

Молекулярные механизмы, объясняющие благоприятное действие физических нагрузок в продлении жизни и профилактике многих заболеваний, могут быть обусловлены кратковременным усилением продукции АФК в митохондриях скелетных мышц [128]. В экспериментах *in vivo* показано, что использование антиоксидантных препаратов после физических нагрузок блокирует развитие адаптационных метаболических изменений [129]. Повышение митохондриальной продукции АФК также запускает адаптационный ответ клеток при гипоксии, холодовой адаптации и тепловом стрессе [14]. Таким образом, направленная коррекция редокс-гомеостаза клеток открывает новые возможности регуляции свойств клеток в норме и при патологии.

ГЕНЕТИЧЕСКИ ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС- ГОМЕОСТАЗА КЛЕТОК

Направление и скорость переноса электронов в редокс-цепях зависят от соотношения концентраций внутриклеточных редокс-мессенджеров, которое определяется редокс-гомеостазом клетки. Поддержание редокс-гомеостаза является ос-

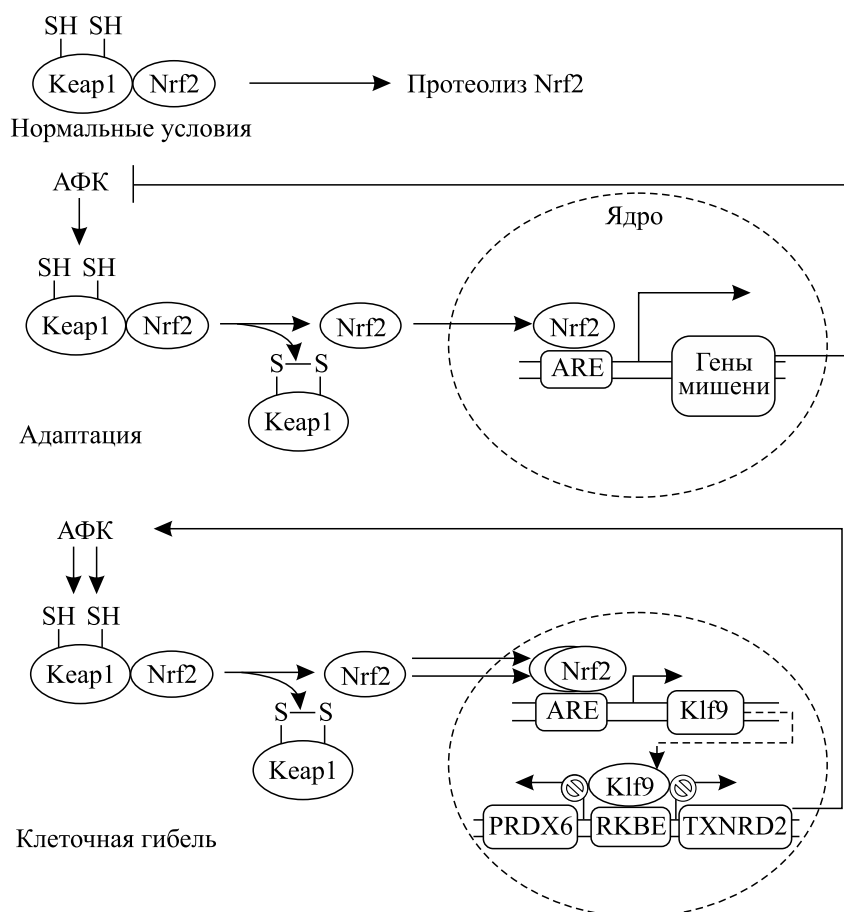


Рис. 2. Механизмы переключения Nrf2-зависимой экспрессии генов. ARE — антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant respons(iv)e element), Keap1 — Kelch-подобный ECH-ассоциированный протеин 1 (Kelch-like ECH-associating protein 1), Klf9 — Kruppel-подобный фактор 9 (Kruppel-like factor 9), Nrf2 — транскрипционный фактор 2 семейства NFE (NF-E2-related factor 2), DuoX — двойная оксидаза (Dual oxidase), Nox — НАДФН оксидаза (NADPH oxidase), Prx6 — пероксиредоксин 6, TXNRD2 — тиоредоксинредуктаза 2, RKBE — repressive Klf9 binding element.

новой нормальной жизнедеятельности клеток и осуществляется в результате сопряженного функционирования систем генерации АФК и антиокислительной защиты, а также систем трансмембранного транспорта редокс-активных соединений [130]. Структурно-функциональные перестройки редокс-гомеостаза клеток млекопитающих регулируются, главным образом, транскрипционным фактором 2 семейства NFE (Nrf2 — NF-E2-related factor 2), активность которого контролируется с участием редокс-зависимого адаптерного белка Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1) [131].

В нормальных условиях Keap1 нековалентно связывает Nrf2, что обуславливает направленный транспорт и деградацию фактора транскрипции в 26S-протеасомах (рис. 2) [132]. Умеренный окислительный стресс и электрофильные агенты в результате модификации тиоловых групп цистеиновых остатков Keap1 нарушают взаимодействие в комплексе Keap1–Nrf2 и активируют тран-

скрипцию сотен генов, участвующих в защите клеток и адаптации к окислительному стрессу [133].

Белок Keap1 человека содержит 27 доступных для окислительной модификации цистеинов (4.3% от всех аминокислот). Критическими для формирования комплекса Nrf2–Keap1 являются цистеины Cys273 и Cys288, которые могут связывать ионы металлов в гомодимере Keap1 [134]. Еще одним необходимым для снятия репрессии транскрипционного фактора Nrf2 аминокислотным остатком адаптерного белка является Cys151. В условиях окислительного стресса и при действии электрофилов к этому остатку ковалентно присоединяется множество различных низкомолекулярных соединений, образующих устойчивые к действию восстановителей модификации Keap1, что нарушает взаимодействие с Cul3–E3-лигазой [135]. Последовательности из 6–9 аминокислот, включающие Cys151, Cys273 и Cys288, идентичны у мыши, крысы и человека, что свиде-

тельствует об их физиологической важности [136].

Алкилирование критических остатков цистеина на одной молекуле Keap1 электрофилами приводит к нарушению убиквитирования и стабилизации Nrf2. Активаторами Nrf2 являются такие группы соединений, как акцепторы Михаэля, изотиоцианаты, геминальные дитиолы, сероорганические и селенсодержащие соединения, гидропероксиды и нитрозирующие агенты [137, 138]. Активация Nrf2 наблюдается также при действии многих природных и синтетических фенольных антиоксидантов [139, 140]. Важно отметить, что электрофильные Nrf2-активирующие формы антиоксидантов образуются при взаимодействии фенолов с внутриклеточными АФК [141]. Образование электрофилов происходит в результате двухэлектронного окисления-восстановления, в котором могут участвовать полифенолы со взаимным *орто*- и *пара*-, но не *мета*-расположением гидроксильных групп [142]. Таким образом, внутриклеточная продукция АФК является важным фактором, определяющим специфичность регуляторного действия антиоксидантов. Какой именно из 27 цистеинов в Keap1 подвергается алкилированию, по-видимому, зависит как от конкретного электрофила, так и от его концентрации [143, 144]. Наиболее реакционноспособным по отношению к природному индуктору Nrf2 сульфорафану цистеиновым остатком Keap1 является Cys489 [144], тогда как Cys273 и Cys288 наиболее реакционноспособны по отношению к модельному алкилирующему агенту мезилату дексаметазона [143]. Кроме того, H_2O_2 также может активировать Nrf2, вызывая образование дисульфидов в молекулах Keap1 [145, 146].

Активация Nrf2 приводит к его транспорту в ядро и связыванию с антиоксидант-респонсивным элементом ARE [147]. Среди генов-мишеней Nrf2, в промоторных областях которых содержится регуляторная последовательность ARE, важное значение для функционирования антиоксидательной системы клеток имеют гены каталазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, тиоредоксинов, глутаредоксинов, пероксиредоксинов, тиоредоксинредуктаз, и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [148, 149]. Под контролем фактора транскрипции Nrf2 находятся также ключевые белки метаболизма глутатиона, увеличение концентрации которого способствует выживанию клеток в стрессовых условиях [148, 150].

Ключевая роль системы Keap1–Nrf2 в адаптации клеток при стрессовых воздействиях позволяет рассматривать ее в качестве потенциальной мишени для терапии широкого спектра заболеваний [131, 140]. Однако при превышении определенного порога активации Nrf2 запускается экс-

прессия генов, продукты которых способствуют развитию окислительного стресса и последующей гибели клеток (рис. 2). Показано, что Nrf2 усиливает продукцию АФК, опосредованную митохондриями и НАДФН-оксидазой [151]. При высокой транскрипционной активности Nrf2 увеличивается экспрессия гена фактора транскрипции Klf9 (Kruppel-like factor 9) [152].

Klf9 принадлежит к семейству Kruppel-подобных факторов транскрипции (KLF) и играет важную роль в онкогенезе, дифференцировке и гибели клеток [153, 154]. Klf9 действует как активатор или как репрессор в зависимости от количества GC-элементов, присутствующих в промоторе генов-мишеней в разных типах клеток [155, 156]. Гены, промоторы которых имеют множественные или повторяющиеся GC-боксы, активируются Klf9, в отличие от генов с одним GC-боксом, которые репрессируются Klf9 [157]. Klf9 является индуцибельным фактором транскрипции, синтез которого стимулируется различными стрессорами. Аберрантная экспрессия гена Klf9 при действии стрессоров вызывает опосредованную окислителями гибель клеток [153]. Показано, что синтез Klf9 при высокой транскрипционной активности Nrf2 в результате взаимодействия с сайтом связывания RKBE (repressive Klf9 binding element) подавляет экспрессию генов митохондриальных антиоксидантных ферментов тиоредоксинредуктазы 2 и пероксиредоксина 6 [152, 158]. Низкая активность антиоксидантных ферментов в митохондриях приводит к смещению редокс-баланса в пользу окислителей и к последующей АФК-индуцированной гибели клеток. Передача сигнала через путь Nrf2/Klf9/Prx6 рассматривается как молекулярный механизм переключения от редокс-регуляции к сверхпродукции АФК и гибели клеток [159, 160]. Таким образом, фактор транскрипции Nrf2 является важным регулятором редокс-гомеостаза клеток, способным усиливать как восстановительные, так и окислительные процессы в клетках. Наличие обратной связи в системе регуляции редокс-гомеостаза может лежать в основе гормезисных эффектов АФК, благоприятных при низких концентрациях и токсических при высоких [140, 161]. Ключевым вопросом регуляции системы является вопрос о детектировании и преобразовании системой Keap1–Nrf2 различных внутриклеточных окислительных и электрофильных стимулов.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-ЦЕПЕЙ И ПАРАМЕТРЫ РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗА

Сопряженное функционирование систем регуляции редокс-гомеостаза осуществляется группой взаимодействующих редокс-активных соединений, для количественной характеристики ста-

ционарного состояния которой предложены три подхода [162]. Наиболее широкое использование в редокс-биологии получил подход, предложенный Ф. Шаффер и Г. Бюттнером в 2001 г. [163]. Согласно данному подходу для количественного описания набора связанных между собой редокс-пар вводится понятие «редокс-окружение» («redox environment»), которое является суммой восстановительных потенциалов редокс-пар, обнаруженных в биологических жидкостях, органеллах, клетках или тканях, умноженных на концентрацию восстановленных форм в редокс-парах. В математических терминах «редокс-окружение» представлено выражением (1):

$$\text{редокс-окружение} = \sum_{i=1}^k c_i E_i, \quad (1)$$

где E_i — восстановительный потенциал i -й редокс-пары, c_i — концентрация восстановленной формы i -й редокс-пары. Однако единицы результатов расчета в выражении (1) не позволяют интерпретировать полученные данные относительно известных единиц измерения, поэтому в 2004 г. Дж. Хэнкок с коллегами предложили модифицировать выражение (1) путем учета усредненного вклада соединений [164]:

$$\text{редокс-окружение} = \frac{\sum_{i=1}^k c_i E_i}{\sum_{j=1}^k c_j}, \quad (2)$$

где c — суммарная концентрация редокс-пары. В том же году нами для количественной характеристики группы взаимодействующих редокс-активных соединений было теоретически обосновано применение эффективного редокс-потенциала [165, 166]:

$$E^{\text{эфф}} = \frac{\sum_{i=1}^k z_i c_i E_i}{\sum_{j=1}^k z_j c_j}, \quad (3)$$

где $E^{\text{эфф}}$ — эффективный редокс-потенциал среды, E_i — стандартный восстановительный потенциал i -й редокс-пары при pH 7.0, c_i — концентрация восстановленной формы i -й редокс-пары, z_i — число электронов, которые присоединяет молекула окисленной формы вещества, переходя в восстановленную форму. Величина $E^{\text{эфф}}$, также как и величина «редокс-окружения», определяется редокс-потенциалами и концентрациями участников окислительно-восстановительных процессов. Однако, в отличие от расчетного параметра «редокс-окружение», параметр $E^{\text{эфф}}$ имеет

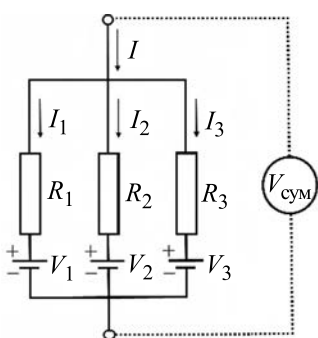
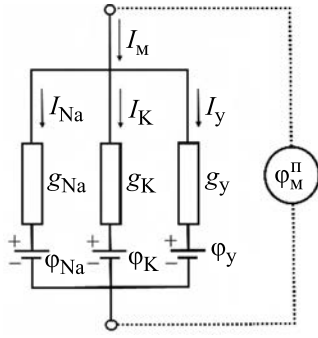
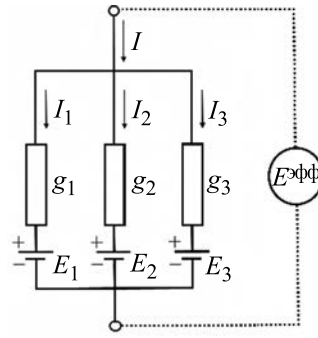
конкретный физический смысл и его можно измерить [167].

Показано, что процессы, протекающие с участием редокс-цепей, могут быть количественно охарактеризованы по аналогии с электрическими цепями [88]. При этом основные закономерности функционирования редокс-цепей являются следствием выполнения законов сохранения заряда и энергии в системе. Важно отметить, что единые закономерности, проявляемые в различных биофизических процессах, описываются на основе сходных эквивалентных электрических цепей. Аналогия между электрическими цепями, ионными токами в мембране и редокс-цепями проиллюстрирована данными, представленными в табл. 1.

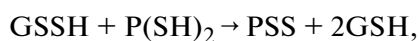
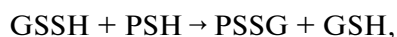
Направленный перенос электронов в клеточных окислительно-восстановительных процессах можно рассматривать как аналог электрического тока. Если направление движения электронов в электрической цепи задается напряжением (разностью электрических потенциалов), то направление движения электронов в редокс-реакциях задается разностью редокс-потенциалов. Концентрация редокс-активных соединений определяет «проводимость» редокс-цепи, также как и проводимость мембраны для ионов зависит от концентрации носителей заряда. Чем больше молекул участвует в передаче заряда по редокс-цепи, тем больший по величине заряд они могут перенести от начального донора к конечному акцептору.

С учетом проводимости эффективный редокс-потенциал может быть рассчитан как взвешенная сумма равновесных редокс-потенциалов. Взвешивающий фактор для каждого редокс-активного соединения представляет собой отношение «проводимости» g_i , опосредованной соединением i -го типа, к суммарной «проводимости» системы $g_{\text{сум}}$. Мембранный потенциал покоя также представляет собой взвешенную сумму равновесных редокс-потенциалов Нернста для всех транспортируемых через мембрану ионов, а взвешивающий фактор для каждого иона представляет собой отношение мембранной проводимости для иона g_i к суммарной мембранной ионной проводимости $g_{\text{сум}}$. Таким образом, $E^{\text{эфф}}$ представляет собой суммарную ЭДС для цепи взаимодействующих редокс-активных соединений. Величины параметров редокс-свойств молекул и клеток, выражаемые с помощью потенциала Нернста (для однокомпонентных систем — молекул) и эффективного редокс-потенциала (для многокомпонентных систем — клеток), являются важными характеристиками биосистем, взаимосвязь которых со многими свойствами клеток остается не изученной до сих пор.

Таблица 1. Сходство и различия электрических и редокс-цепей

	Электрические цепи	Ионные токи в мембране	Редокс-цепи
Эквивалентная электрическая схема	 где I_i — сила тока i-го элемента цепи, I — общая сила тока, R_i — сопротивление i-го элемента цепи, V_i — падение напряжения i-го элемента цепи, $V_{\text{сум}}$ — суммарное ЭДС цепи	 где I_i — мембранный ток для i-го иона, I_m — суммарный мембранный ток, g_i — проводимость мембраны для иона i-го типа, ϕ_i — потенциал Нернста для i-го иона, ϕ_m^n — мембранный потенциал покоя	 где g_i — проводимость i-го элемента цепи, E_i — стандартный редокс-потенциал участников реакций, $E^{\text{эфф}}$ — эффективный редокс-потенциал
Носители заряда	Электроны или ионы	Ионы	Электроны
Проводимость элемента цепи	$g_i = \frac{1}{R_i}$	$g_i = \frac{z_i c_i F u_{ei} S}{d},$ где z_i — заряд иона, c_i — концентрации ионов в мембране, u_{ei} — электрическая подвижность иона, S — площадь мембраны, d — толщина мембраны	$g_i = z_i c_i$
Суммарная проводимость цепи	$g_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^k g_i$	$g_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^k g_i$	$g_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^k g_i$
Физико-химический параметр состояния покоя	Электродвижущая сила (ЭДС) цепи $V_{\text{сум}} = \sum_{i=1}^k \frac{g_i}{g_{\text{сум}}} V_i$	Мембранный потенциал покоя (ϕ_m^n) $\phi_m^n = \sum_{i=1}^k \frac{g_i}{g_{\text{сум}}} \phi_i$	Эффективный редокс-потенциал ($E^{\text{эфф}}$) $E^{\text{эфф}} = \sum_{i=1}^k \frac{g_i}{g_{\text{сум}}} E_i$
Клеточные сенсоры		Сенсор напряжения — лизиновые и аргининовые группы белков	Сенсор напряжения — цистеиновые группы белков

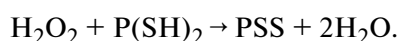
Согласно выражению (1), «редокс-окружение» является расчетной величиной, которую нельзя измерить. Если известны концентрации всех участников и их редокс-потенциалы, то данный параметр может быть рассчитан. В экспериментальных исследованиях величину «редокс-окружения» связывают с редокс-потенциалом глутатиона $E_{GSSG/2GSH}$, который рассчитывается с помощью уравнения Нернста на основе измеренных концентраций окисленного и восстановленного глутатиона. Считается, что при изменении редокс-состояния глутатиона изменяется редокс-состояние белковых тиолов, которые являются нанопереклещателями в процессах трансдукции сигналов с участием глутатиона и характеризуются следующими реакциями [163]:



где PSH — белковый тиол, PSSG — смешанный белковый дисульфид (глутатиолированный белок), $P(SH)_2$ — два белковых тиола, PSS — белковый дисульфид. Данный подход основывается на предположении, что все тиол/дисульфидные редокс-пары клетки находятся в состоянии термодинамического равновесия [163]. Однако многочисленные экспериментальные исследования не подтвердили данного предположения [168, 169]. Тиол/дисульфидные редокс-пары участвуют в окислительно-восстановительных реакциях как между собой, так и в реакциях с другими окислителями и восстановителями. В результате предположение о том, что редокс-состояние пары $GSSG/2GSH$ может регулировать состояние белковых тиолов, подвергается критике со стороны ряда исследователей [169, 170].

Мы предполагаем, что тиолсодержащие соединения стремятся к равновесию со средой, поскольку участвуют в реакциях не только с глутатионом, но и с другими редокс-активными соединениями. Иначе говоря, редокс-сенсоры, в качестве которых могут рассматриваться внутриклеточные редокс-пары и тиолы белка, являются сенсорами изменений интегральных параметров редокс-состояния клетки ($E^{\text{эфф}}$), а не сенсорами изменений редокс-состояния одной редокс-пары ($E_{GSSH/2GSH}$).

Рассмотрение взаимодействия H_2O_2 с тиолами белков как альтернативного процесса реакциям с антиоксидантами показало, что белковые тиолы являются нанопереклещателями в процессах трансдукции сигналов, изменение состояния которых регулируется H_2O_2 и описывается следующей реакцией [115, 171]:



С учетом реакций H_2O_2 с восстановителями зависимость количества окисленных тиолов от концентрации восстановителей и окислителя выражается функцией [115]:

$$[PSS] = c_0 \frac{1}{1 + \frac{\sum_{i=1}^n z_i c_i}{z_{\text{ок}} c_{\text{ок}}}} \quad \text{или} \quad [PSS] \approx \Delta E^{\text{эфф}}, \quad (4)$$

где c_0 — общая концентрация окисленных и восстановленных SH-групп белкового сенсора, $c_{\text{ок}}$ — концентрация окислителя, $\Delta E^{\text{эфф}}$ — изменение величины эффективного редокс-потенциала.

Согласно выражению (4), величина изменения редокс-состояния сенсора зависит от суммарной концентрации редокс-активных групп. В этой связи, если внутриклеточная концентрация глутатиона значительно выше, чем концентрации других редокс-активных соединений, то именно значение редокс-потенциала глутатиона ближе всего к значению $E^{\text{эфф}}$. Однако во внеклеточной среде, в которой содержание цистеина значительно выше, чем глутатиона, именно, редокс-потенциал цистеина более точно отражает изменения редокс-состояния [172]. Предложенный подход позволяет теоретически обосновать наличие и рассчитать величину различий в значениях редокс-потенциалов тиолсодержащих соединений [88].

Следует отметить, что количество окисленных групп сенсора, а, следовательно, и запускаемый им биологический ответ, определяется величиной изменения редокс-потенциала, которая, в свою очередь, зависит от концентрации антиоксидантов. При увеличении концентрации антиоксидантов число молекул H_2O_2 , которые взаимодействуют с тиолами сенсора, уменьшится, что снизит количество окисленных групп сенсора и вызовет снижение биологического ответа, обусловленного действием АФК.

Теоретически показано, что зависимость $\Delta E^{\text{эфф}}$ от концентрации введенного в систему окислителя ($c_{\text{ок}}$) в двойных обратных координатах описывается уравнением прямой с наклоном $k_{\text{ем}}/\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}$ и пересечениями: по оси ординат в точке $1/\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}$ и по оси абсцисс в точке $-1/k_{\text{ем}}$ [169, 171]:

$$\frac{1}{\Delta E^{\text{эфф}}} = \frac{1}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}} + \frac{k_{\text{ем}}}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}} \frac{1}{c_{\text{ок}}}, \quad \text{где} \quad k_{\text{ем}} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i z_i}{z_{\text{ок}}}, \quad (5)$$

где $\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}} = E_{\text{ок}} - E_0^{\text{эфф}}$ — максимальное изменение величины эффективного редокс-потенциала,

возможное при условии $c_{\text{ок}} \gg c_{\text{вос}}$, $E_{\text{ок}}$ — стандартный редокс-потенциал окислителя при pH 7,0, $E_0^{\text{эфф}}$ — начальное значение эффективного редокс-потенциала. Константа $k_{\text{ем}}$ имеет размерность концентрации и численно равна концентрации окислителя, при которой изменение величины эффективного редокс-потенциала составляет половину своего максимального значения. Из выражений (4) и (5) следует, что для определения редокс-состояния среды можно использовать различные индикаторы, проводя их калибровку на основе редокс-титрования [14, 171]. Величина константы $k_{\text{ем}}$ определяет редокс-буферную емкость системы r , характеризующую способность системы сохранять величину эффективного редокс-потенциала при изменении концентрации редокс-активных соединений [171, 173]:

$$r(E^{\text{эфф}}) = \frac{\partial c_{\text{ок}}}{\partial E^{\text{эфф}}} = \frac{\sum_{i=1}^k c_i z_i}{z_{\text{ок}} \cdot \Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}} = \frac{k_{\text{ем}}}{\Delta E_{\text{max}}^{\text{эфф}}}. \quad (6)$$

Из выражения (6) с учетом выражения (5) также следует, что для внутриклеточных редокс-условий с низкими концентрациями окислителя

$c_{\text{ок}} (c_{\text{ок}} \ll \sum_{i=1}^k c_i z_i)$ зависимость величины изменения эффективного редокс-потенциала от концентрации окислителя и редокс-буферной емкости может быть выражена соотношением:

$$\Delta E^{\text{эфф}} \approx \frac{c_{\text{ок}}}{r}. \quad (7)$$

Таким образом, редокс-буферная емкость является значимым физико-химическим показателем внутриклеточных редокс-свойств, определяющим тип ответа клеток на действие редокс-активных соединений и наноматериалов, и служит показателем сохранения редокс-гомеостаза, поскольку его регуляция осуществляется через модуляцию синтеза антиоксидантов. Величина изменения редокс-буферной емкости используется для количественной оценки устойчивости клеток к стрессу [115, 174], химио- и радиорезистентности клеток [115, 175], выраженности патологических изменений клеток [167], антиоксидантной емкости клеток [176, 177], регуляторных свойств биологически активных наночастиц [178, 179].

Развитие эффективных методов антиоксидантной терапии и редокс-медицины невозможно без учета специфических особенностей редокс-гомеостаза клеток в норме и при патологии [139, 180]. Количественная характеристика уникальной структуры взаимодействий, определяющих характерные видовые и индивидуальные особенности редокс-гомеостаза, является важ-

ным этапом при разработке подходов дифференциации физиологических и патофизиологических процессов с участием свободных радикалов. Дальнейшие исследования должны быть направлены на выявление молекулярных особенностей организации редокс-цепей и закономерностей изменения их физико-химических свойств. Задача состоит в выработке новых понятий и физических моделей, которые в законченном виде в настоящее время не существуют. Одной из ключевых проблем является установление фундаментальных физико-химических механизмов, определяющих взаимодействие структурных компонентов в сетевых процессах регуляции редокс-гомеостаза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № B22-045 и российско-белорусский грант РНФ/БРФФИ (№23-45-10026 и № B23РНФ-093, соответственно). Описание механизмов регуляции функционирования НАДФН-оксидазы в клетках поддержано Российским научным фондом, грант №23-45-10026, в ходе выполнения которого запланировано исследование ее активации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Gerschman, D. L. Gilbert, S. W. Nye, et al., Science, **119** (3097), 623 (1954).
2. Б. Н. Тарусов, *Основы биологического действия радиоактивных излучений* (Медгиз, М., 1954).
3. Н. М. Эмануэль, Тр. Моск. об-ва испыт. природы, **7**, 73 (1963).
4. Н. М. Эмануэль, Р. Е. Кавецкий, Б. Н. Тарусов и др., *Биофизика рака* (Наук. думка, Киев, 1976).
5. A. Boveris and B. Chance, Biochem. J., **134** (3), 707 (1973).
6. E. Cadenas, Ann. Rev. Biochem., **58** (1), 79 (1989).
7. D. Harman, J. Gerontol., **11** (3), 298 (1956).
8. В. Х. Хавинсон, В. А. Баринков, А. В. Арутюнян и др., *Свободнорадикальное окисление и старение* (Наука, СПб, 2003).

9. Н. К. Зенков, П. М. Кожин, А. В. Чечушков и др., *Успехи геронтологии*, **33** (1), 10 (2020).
10. А. Ф. Ванин и Р. М. Налбандян, *Биофизика*, **10**, 167 (1965).
11. А. Ф. Ванин, Л. А. Блюменфельд и А. Г. Четвериков, *Биофизика*, **12** (5), 829 (1967).
12. L. J. Ignarro, *Biosci. Rep.*, **19** (2), 51 (1999).
13. H. Sauer, M. Wartenberg, and J. Hescheler, *Cell. Physiol. Biochem.*, **11**, 173 (2001).
14. Г. Г. Мартинович, *Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы* (БГУ, Минск, 2021).
15. U. Forstermann and W. C. Sessa, *Eur. Heart J.*, **33** (7), 829 (2012).
16. H. Sies and D. P. Jones, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21** (3), 1 (2020).
17. J. D. Lambeth, *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 181 (2004).
18. K. Bedard and H. Krause, *Physiol. Rev.*, **87**, 245 (2007).
19. D. Robertson, R. Farid, C. Moser, et al., *Nature*, **368**, 425 (1994).
20. A. R. Cross and A. W. Segal, *Biochim. Biophys. Acta*, **1657**, 1 (2004).
21. J. D. Lambeth, G. Cheng, R. S. Arnold, et al., *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 459 (2000).
22. K. Rokutan, T. Kawahara, Y. Kuwano, et al., *Semin. Immunopathol.*, **30**, 315 (2008).
23. N. K. Lee, Y. G. Choi, J. Y. Baik, et al., *Blood*, **106**, 852 (2005).
24. S. Sorce and H. Krause, *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 2481 (2009).
25. I. Helmcke, S. Heumüller, R. Tikkanen, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 1279 (2008).
26. K. Rokutan, T. Kawahara, Y. Kuwano, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1573 (2006).
27. C. Cheret, A. Gervais, A. Lelli, et al., *J. Neurosci.*, **28**, 12039 (2008).
28. D. Vara, R. K. Mailer, A. Tarafdar, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **41**, 683 (2021).
29. B. Lassegue, D. Sorescu, K. Szocs, et al., *Circ. Res.*, **88**, 888 (2001).
30. P. N. Seshiah, D. S. Weber, P. Rocic, et al., *Circ. Res.*, **91**, 406 (2002).
31. D. I. Brown and K. K. Griendling, *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1239 (2009).
32. M. Ushio-Fukai, *Sci. STKE*, **2006**, re8 (2006).
33. M. V. Tejada-Simon, F. Serrano, L. E. Villasana, et al., *Mol. Cell Neurosci.*, **29**, 97 (2005).
34. R. Dworakowski, S. P. Alom-Ruiz, and A. M. Shah, *Pharmacol. Rep.*, **60**, 21 (2008).
35. M. Ushio-Fukai, *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 731 (2007).
36. O. Jung, J. G. Schreiber, H. Geiger, et al., *Circulation*, **109**, 1795 (2004).
37. B. Banfi, B. Malgrange, J. Knisz, et al., *J. Biol. Chem.*, **279**, 46065 (2004).
38. W. J. Clerici, K. Hensley, D. L. DiMartino, et al., *Heart Res.*, **98**, 116 (1996).
39. T. Ago, T. Kitazono, H. Ooboshi, et al., *Circulation*, **109**, 227 (2004).
40. I. Cucoranu, R. Clempus, A. Dikalova, et al. *Circ. Res.*, **97**, 900 (2005).
41. W. Chamulitrat, W. Stremmel, T. Kawahara, et al., *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 1000 (2004).
42. S. Yang, P. Madyastha, S. Bingel, et al., *J. Biol. Chem.*, **276**, 5452 (2001).
43. P. Vallet, Y. Charnay, K. Steger, et al., *Neuroscience*, **132**, 233 (2005).
44. I. Carmona-Cuenca, B. Herrera, J. J. Ventura, et al., *J. Cell Physiol.*, **207**, 322 (2006).
45. M. Geiszt, J. B. Kopp, P. Varnai, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8010 (2000).
46. L. L. Hilenski, R. E. Clempus, M. Quinn, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 677 (2004).
47. J. Kuroda, K. Nakagawa, T. Yamasaki, et al., *Genes & Cells*, **10**, 1139 (2005).
48. J. Kuroda, T. Ago, S. Matsushima et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 15565 (2010).
49. Y. Maejima, J. Kuroda, S. Matsushima, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **50**, 408 (2011).
50. G. Cheng, Z. Cao, X. Xu, et al., *Gene*, **269**, 131 (2001).
51. D. B. Jay, C. A. Papaharalambus, B. Seidel-Rogol, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 329 (2008).
52. R. S. BelAiba, T. Djordjevic, A. Petry, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 446 (2007).
53. S. S. Brar, Z. Corbin, T. P. Kennedy, et al., *Am. J. Physiol.*, **285**, C353 (2003).
54. A. S. Kamiguti, L. Serrander, K. Lin, et al., *J. Immunol.*, **175**, 8424 (2005).
55. J. Si, J. Behar, J. Wands, et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **294**, G174 (2008).
56. C. Dupuy, R. Ohayon, A. Valent, et al., *J. Biol. Chem.*, **274**, 37265 (1999).
57. R. Forteza, M. Salathe, F. Miot, et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **32**, 462 (2005).
58. D. Wang, X. De Deken, M. Milenkovic, et al. *J. Biol. Chem.*, **280**, 3096 (2005).
59. F. Gu, A. Krüger, H. Roggenkamp, et al., *Sci. Signaling*, **14** (709), eabe3800 (2021).
60. K. Fiedorczuk, J. A. Letts, G. Degliesposti, et al. *Nature*, **538** (7625), 406 (2016).
61. C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen, et al., *Nature*, **402** (6757), 47 (1999).
62. F. Scialo, D. J. Fernandez-Ayala, and A. Sanz, *Front. Physiol.*, **8**, 428 (2017).
63. A. A. Starkov, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1147**, 37 (2008).
64. S. S. Korshunov, V. P. Skulachev, and A. A. Starkov, *FEBS Lett.*, **416**, 15 (1997).
65. S. T. Ohnishi, T. Ohnishi, S. Muranaka, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**, 1 (2005).
66. L. A. Sazanov and P. Hinchliffe, *Science*, **311** (5766), 1430 (2006).
67. L. A. Sazanov, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **46**, 247 (2014).

68. V. Massey, J. Biol. Chem., **269**, 22459 (1994).
69. A. Galkin and U. Brandt, J. Biol. Chem., **280**, 30129 (2005).
70. S. Raha and B. Robinson, Trends Biochem. Sci., **25**, 502 (2000).
71. S. Droese and U. Brandt, J. Biol. Chem., **283**, 21649 (2008).
72. A. Boveris and E. Cadenas, IUBMB Life, **50**, 1 (2000).
73. E. Cadenas, Mol. Asp. Med., **25**, 17 (2004).
74. A. Y. Andreyev, Y. E. Kushnareva, and A. A. Starkov, Biochemistry (Moscow), **70**, 200 (2005).
75. L. A. Sena and N. S. Chandel, Mol. Cell., **48**, 158 (2012).
76. G. S. Shadel and T. L. Horvath, Cell, **163** (3), 560 (2015).
77. A. V. Kudryavtseva, G. S. Krasnov, A. A. Dmitriev, et al., Oncotarget, **7** (29), 44879 (2016).
78. J. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem., **244** (60), 6049 (1969).
79. R. H. Holm, P. Kennepohl, and E. I. Solomon, Chem. Rev., **96**, 2239 (1996).
80. J. Slot, H. J. Geuze, B. A. Freeman, et al., Lab. Invest., **55**, 363 (1986).
81. K. A. Hopkin, M. A. Papazian, and H. M. Steinman, J. Biol. Chem., **267**, 24253 (1992).
82. H. D. Youn, E. J. Kim, J. H. Roe, et al., Biochemistry, **318**, 889 (1996).
83. A. Houldsworth, A. Hodgkinson, S. Shaw, et al., Gene, **569**, 41 (2015).
84. S. Govatati, S. Malempati, B. Saradamma, et al., Tumor Biol., **37**, 10357 (2016).
85. I. Batinic-Haberle, A. Tovmasyan, E. R. Roberts, et al., Antioxid. Redox Signal., **20**, 2372 (2014).
86. C. A. Massaad, T. M. Washington, R. G. Pautler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **106**, 13576 (2009).
87. K. Baumgart, V. Simkova, F. Wagner, et al., Intensive Care Med., **35**, 344 (2009).
88. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и С. Н. Черенкевич, Биофизика, **56** (3), 465 (2011).
89. D. P. Jones and H. Sies, Antioxid. Redox Signal., **23** (9), 734 (2015).
90. M. Reth, Nat. Immunol., **3**, 1129 (2002).
91. M. A. Wouters, S. W. Fan, and N. L. Haworth, Antioxid. Redox Signal., **12** (1), 53 (2010).
92. L. S. Terada, J. Cell Biol., **174** (5), 615 (2006).
93. J. Lopez-Barneo, J. R. Lopez-Lopez, J. Urena, et al., Science, **241** (4865), 580 (1988).
94. E. Cutz, J. Pan, H. Yeger, et al., Semin. Cell Dev. Biol., **24** (1), 40 (2013).
95. В. П. Скулачев, Биохимия, **66**, 7 (2001).
96. L. Gao, P. González-Rodríguez, P. Ortega-Sáenz, et al., Redox Biol., **12**, 908 (2017).
97. M. C. Fernandez-Aguera, L. Gao, P. González-Rodríguez, et al., Cell Metab., **22**, 825 (2015).
98. A. Platero-Luengo, S. González-Granero, R. Durán, et al., Cell, **156**, 291 (2014).
99. X. W. Fu, D. Wang, C. A. Nurse, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97** (8), 4374 (2000).
100. J. Buttigieg, J. Pan, H. Yeger, et al., Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., **303** (7), L598 (2012).
101. D. Wang, C. Youngson, V. Wong, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93** (23), 13182 (1996).
102. P. Kazemian, R. Stephenson, H. Yeger, et al., Respir. Physiol., **126**, 89 (2001).
103. R. M. Touyz, X. Chen, F. Tabet, et al., Circ. Res., **90**, 1205 (2002).
104. A. M. Hashad, M. Sancho, S. E. Brett, et al., Sci. Rep., **8**, 3445 (2018).
105. O. F. Harraz, R. R. Abd El-Rahman, K. Bigdely-Shamloo, et al., Circ. Res., **115**, 650 (2014).
106. H. I. Krieger-Brauer, and H. Kather, J. Clin. Invest., **89**, 1006 (1992).
107. K. Mahadev, H. Motoshima, X. Wu, et al., Mol. Cell. Biol., **24** (5), 1844 (2004).
108. X. Wu and K. J. Williams, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **32**, 1236 (2012).
109. B. L. Seely, P. A. Staubs, D. R. Reichart, et al., Diabetes, **45** (10), 1379 (1996).
110. G. G. Martinovich, I. V. Martinovich, and S. N. Cherenkevich, Bull. Exp. Biol. Med., **147** (4), 469 (2009).
111. G. G. Martinovich, E. N. Golubeva, I. V. Martinovich, et al., J. Biophys., **2012**, 921653 (2012).
112. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., Докл. НАН Беларуси, **60** (5), 96 (2016).
113. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., Биофизика, **61** (6), 1164 (2016).
114. A. V. Vcherashniaya, I. V. Martinovich, G. G. Martinovich, et al., J. Appl. Spectroscopy, **87** (3), 515 (2020).
115. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., Биофизика, **62** (6), 1142 (2017).
116. D. P. Jones, Am. J. Physiol. Cell Physiol., **295**, C849 (2008).
117. H. Sies, C. Berndt, and D. P. Jones, Annu. Rev. Biochem., **86** (25), 715 (2017).
118. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, Окислительно-восстановительные процессы в клетках (БГУ, Минск, 2008).
119. M. Narasimhan and N. S. Rajasekaran, Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis., **1852**, 53 (2015).
120. Z. Huang, C. Chen, Z. Zeng, et al., FASEB J., **15**, 19 (2001).
121. Y. Lee, H. G. Kim, H. I. Jung, et al., Mol. Cells, **14**, 305 (2002).
122. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Е. Н. Голубева и др., Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук, № 2, 85 (2012).
123. S. Kannan, V. R. Muthusamy, K. J. Whitehead, et al., Cardiovasc. Res., **100**, 63 (2013).
124. D. E. Handy and J. Loscalzo, Free Radic. Biol. Med., **109**, 114 (2017).
125. X. G. Lei, J. H. Zhu, W. H. Cheng, et al., Physiol. Rev., **96**, 307 (2016).

126. J. P. McClung, C. A. Roneker, W. Mu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8852 (2004).
127. J. D. Watson, *Lancet*, **383** (9919), 841 (2014).
128. D. E. Warburton, C. W. Nicol, and S. S. Bredin, *Can. Med. Assoc. J.*, **174**, 801 (2006).
129. M. Ristow, K. Zarse, A. Oberbach, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8665 (2009).
130. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Успехи физиологич. наук*, **39** (3), 29 (2008).
131. A. V. Ulasov, A. A. Rosenkranz, G. P. Georgiev, et al., *Life Sciences*, **291**, 120111 (2021).
132. P. Canning, F. J. Sorrell, and A. N. Bullock, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 101 (2015).
133. M. Kobayashi, L. Li, N. Iwamoto, et al., *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 493 (2009).
134. D. D. Zhang and M. Hannink, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8137 (2003).
135. J. Zhu, H. Wang, F. Chen, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **99**, 544 (2016).
136. Н. К. Зенков, А. В. Чечушков, П. М. Кожин и др., *Биохимия*, **82** (5), 749 (2017).
137. M. C. Lu, J. A. Ji, Z. Y. Jiang, et al. *Med. Res. Rev.*, **36**, 924 (2016).
138. M. C. Egbujor, M. Petrosino, K. Zuhra, et al., *Antioxidants*, **11** (7), 1255 (2022).
139. S. Qin and D. X. Hou, *Engineering*, **3** (5), 738 (2017).
140. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, А. В. Вчерашняя и др., *Биофизика*, **65** (6), 1081 (2020).
141. X. J. Wang, J. D. Hayes, L. G. Higgins, et al., *Chem. Biol.*, **17** (1), 75 (2010).
142. A. T. Dinkova-Kostova, J. W. Fahey, and P. Talalay, *Methods Enzymol.*, **382**, 423 (2004).
143. F. Hong, K. R. Sekhar, M. L. Freeman, et al., *J. Biol. Chem.*, **280**, 31768 (2005).
144. F. Hong, M. L. Freeman, and D. C. Liebler, *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 1917 (2005).
145. S. Fourquet, R. Guerois, D. Biard, et al., *J. Biol. Chem.*, **285**, 8463 (2010).
146. T. Suzuki, A. Muramatsu, R. Saito, et al., *Cell Rep.*, **28**, 746 (2019).
147. R. Venugopal and A. K. Jaiswal, *J. Clin. Invest.*, **93**, 14960 (1996).
148. J. D. Hayes and A. T. Dinkova-Kostova, *Trends Biochem. Sci.*, **39** (4), 199 (2014).
149. Y. Mitsuishi, K. Taguchi, Y. Kawatani, et al., *Cancer Cell*, **22**, 66 (2012).
150. E. Sun, H. Erb, and T. H. Murphy, *Bioch. Biophys. Res. Com.*, **326**, 371 (2005).
151. S. Kovac, P. R. Angelova, K. M. Holmstrom, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 794 (2015).
152. S. N. Zucker, E. E. Fink, A. Bagati, et al., *Mol. Cell*, **53**, 916 (2014).
153. S. Mannava, D. Zhuang, J. R. Nair, et al., *Blood*, **119**, 1450 (2012).
154. M. Ying, J. Tilghman, Y. Wei, et al., *J. Biol. Chem.*, **289**, 32742 (2014).
155. F. A. Simmen, Y. Su, R. Xiao, et al., *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **6**, 41 (2008).
156. R. M. Bonett, F. Hu, P. Bagamasbad, et al., *Endocrinology*, **150**, 1757 (2009).
157. H. Imataka, K. Sogawa, K. Yasumoto, et al. *EMBO J.*, **11**, 3663 (1992).
158. Q. Yan, B. He, G. Hao et al., *Life Sci.*, **233**, 116641 (2019).
159. E. E. Fink, S. Moparthy, A. Bagati, et al., *Cell Rep.*, **25**, 212 (2018).
160. B. Chhunchha, E. Kubo, and D. P. Singh, *Cells*, **8** (10), 1159 (2019).
161. B. Chhunchha, E. Kubo, and D. P. Singh, *Cells*, **11** (8), 1266 (2022).
162. C. S. Pillay, J. H. Hofmeyr, L. N. Mashamaite, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **18**, 2075 (2013).
163. F. Q. Schafer and G. R. Buettner, *Free Rad. Biol. Med.*, **30**, 1191 (2001).
164. J. T. Hancock, R. Desikan, S. J. Neill, et al. *J. Theor. Biol.*, **226**, 65 (2004).
165. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 1, № 1*, 28 (2004).
166. G. G. Martinovich, S. N. Cherenkevich, and H. Sauer, *Eur. Biophys. J.*, **34** (7), 937 (2005).
167. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Биофизика*, **53** (4), 618 (2008).
168. Y. M. Go, J. J. Gipp, R. T. Mulcahy, et al., *J. Biol. Chem.*, **279**, 5837 (2004).
169. M. Kemp, Y. M. Go, and D. P. Jones, *Free Radic. Biol. Med.*, **44**, 921 (2008).
170. L. Flohe, *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*, **1830** (5), 3139 (2013).
171. G. G. Martinovich, I. V. Martinovich, S. N. Cherenkevich, et al. *Cell Biochem. Biophys.*, **58** (2), 75 (2010).
172. D. P. Jones, Y. M. Go, C. L. Anderson, et al., *FASEB J.*, **18** (11), 1246 (2004).
173. Г. Г. Мартинович и С. Н. Черенкевич, *Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 1, № 3*, 1 (2004).
174. Г. Г. Мартинович, И. В. Мартинович, Е. Б. Меньшикова и др., *Докл. НАН Беларуси*, **59** (3), 82 (2015).
175. S. Clement, J. M. Campbell, W. Deng, et al. *Advanced Science*, **7** (24), 2003584 (2020).
176. M. Elas, K. Ichikawa, and H. J. Halpern, *Radiat. Res.*, **177** (4), 514 (2012).
177. G. Bacic, A. Pavicevic, and F. Peyrot, *Redox Biol.*, **8**, 226 (2016).
178. A. Adhikari, S. Mondal, M. Das, et al., *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **7** (6), 2475 (2021).
179. S. Mondal, A. Adhikari, R. Ghosh, et al., *MRS Advances*, **6** (16), 427 (2021).
180. J. Meng, Z. Lv, Y. Zhang, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **34** (14), 1069 (2021).

Free Radicals and Signal Transduction in Cells

**G.G. Martinovich*, I.V. Martinovich*, V.V. Voinarouski*, D.V. Grigorieva*,
I.V. Gorudko*, and O.M. Panasenko****

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

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

This review provides an overview of molecular mechanisms of intracellular signal transduction involving free radicals. The structure and functions of enzymes that can form superoxide anion-radical and hydrogen peroxide are considered in detail. The mechanisms of regulation of cell properties with the participation of specialized redox chains formed by a group of proteins interacting through electron transport processes are discussed. Genetically mediated mechanisms of regulation of redox cell homeostasis are analyzed. Particular attention is paid to the issue concerning quantitative characterization of the network of interactions of oxidizing and reducing agents, which determines the species and individual characteristics of redox homeostasis and the stress response of cells.

Keywords: free radicals, reactive oxygen species, redox regulation, oxidative stress, reductive stress, transcription factor Nrf2

АНТАГОНИСТ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1 ГАЛОПЕРИДОЛ ИНГИБИРУЕТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ КРЫСЫ

© 2023 г. Л.С. Миленина^{*,#}, З.И. Крутецкая^{*}, В.Г. Антонов^{**}, Н.И. Крутецкая^{*}

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

^{**}Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, 194100, Россия

[#]E-mail: l.milenina@spbu.ru

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Рецепторы сигма-1 — повсеместные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикула, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль. Рецепторы сигма-1 модулируют широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии, включая процессы Ca^{2+} -сигнализации. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM мы показали, что антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик галоперидол значительно подавляет мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в клетки, вызываемые ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязоникой кислотой, а также иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. Результаты свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в макрофагах, а также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: галоперидол, рецепторы сигма-1, внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , макрофаги.

DOI: 10.31857/S0006302923040075, EDN: KJXKZD

Важными участниками процессов Ca^{2+} -сигнализации в клетках являются рецепторы сигма-1, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологию, и модулирующие широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии [1–5]. Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в мембране эндоплазматического ретикула, на границе с митохондриями (MAM — mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane) [1–5]. Они могут также транслоцироваться к плазмалемме и взаимодействовать с другими рецепторами и ионными каналами; встречаются и в ядерной оболочке, где участвуют в регуляции транскрипции [1]. Эти рецепторы экспрессированы в клетках различных типов, включая иммунные [2, 3, 5]. Рецепторы сигма-1 имеют очень широкий фармакологический профиль. Их лигандами являются различные по хи-

мической структуре и фармакологическому действию соединения: антидепрессанты (флувоксамин, сертралин, имипрамин), нейролептики (галоперидол, хлорпромазин), анальгетики (пентазоцин), анксиолитики (афобазол), противосудорожные (фенитоин), противокашлевые (декстрометорфан, карбетапентан) и антигистаминные (хлорфенамин) препараты, наркотические средства (метамфетамин и кокаин) и препараты, применяемые при лечении нейродегенеративных заболеваний (амантадин, мемантин, донепезил) [6–8]. Типичные нейролептики (галоперидол, флуфеназин, хлорпромазин, трифлуоперазин) имеют высокое сродство к рецепторам сигма-1 [9].

Выполняя функции шаперонов, рецепторы сигма-1 взаимодействуют с белками-мишенями (ионными каналами, рецепторами в плазмалемме и др.) и модулируют многие клеточные процессы, включая процессы Ca^{2+} -сигнализации [1, 3, 10]. В плазмалемме они взаимодействуют с потенциалзависимыми Ca^{2+} -, Na^{+} - и K^{+} -каналами, протон-активируемыми ионными каналами,

Сокращения: ЦПК — циклопязоникой кислота, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — внутриклеточная концентрация Ca^{2+} .

NMDA-рецепторами, рецепторами, связанными с G-белками (мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами, μ -опиоидными и D1- и D2-дофаминовыми рецепторами) и другими белками-мишенями [1, 3]. В мембране эндоплазматического ретикулама рецептор сигма-1 взаимодействует с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата 3-го типа, с другим молекулярным шапероном белком BiP (binding immunoglobulin protein) [11] и Ca^{2+} -сенсором белком STIM1 [12]. Обнаружено, что, взаимодействуя с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата, рецепторы сигма-1 модулируют процессы Ca^{2+} -сигналикации в клетках — мобилизацию Ca^{2+} из депо и вход Ca^{2+} из наружной среды [10, 11]. Показано их участие в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в клетках [12–14].

Ранее нами было впервые показано, что лиганды рецепторов сигма-1, нейролептики фенотиазинового ряда хлорпромазин и трифлуоперазин, значительно подавляют обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом® (динатриевая соль окисленного глутатиона с *d*-металлом в наноконцентрации) и моликсаном® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина) и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязоникой кислотой (ЦПК) в перитонеальных макрофагах крысы [15, 16].

Для подтверждения участия рецепторов сигма-1 в регуляции процессов Ca^{2+} сигнализации в макрофагах, представлялось целесообразным исследовать влияние других, структурно отличных, лигандов рецепторов сигма-1 на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном, а также тапсигаргином и ЦПК, в перитонеальных макрофагах крысы, что и составило предмет настоящего исследования.

В экспериментах использовали антагонист рецепторов сигма-1 — нейролептик галоперидол (производное бутирофенона) [17], относящийся к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов), и имеющий долгую историю использования в клинике для терапии шизофрении и других психических заболеваний [18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов крыс. Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar. Резидентные макрофаги выделяли из перитонеальной полости крыс массой 180–250 г по методу, описанному ранее [19]. Сразу после выделения клетки имели сферическую форму (диаметр 10–20 мкм). Суспензию клеток помещали в бакпечатки, содержа-

щие кварцевые стекла размером 10×10 мм. Клетки на стеклах культивировали в течение 1–3 сут при 37°C в среде 199 (pH 7.2), содержащей 20% сыворотки крови быка, глутамин (3%), пенициллин (100 ед/мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Тест на α -нафтилэстеразу [20] показал, что по меньшей мере 96% клеток в монослоях были макрофагами.

Эксперименты проводили при комнатной температуре ($22\text{--}24^\circ\text{C}$) через одни–двое суток после начала культивирования клеток. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 и 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.3–7.4. Бескальциевая среда отличалась тем, что содержала 0 mM CaCl_2 и 1 mM ЭГТА.

Реактивы. В работе использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Маточные растворы Fura-2AM (1 mM), циклопязоникой кислоты (10 mM) и тапсигаргина (0.5 mM) готовили в диметилсульфоксиде. Препараты глутоксим и моликсан были предоставлены фирмой ФАРМА-ВАМ (Санкт-Петербург). Маточные растворы галоперидола (5 мг/мл), глутоксима (50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) готовили в воде.

Измерение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM, при $22\text{--}24^\circ\text{C}$. Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру флуоресцентного микроскопа DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм через объектив микроскопа. Для выделения соответствующих участков спектра использовали узкополосные оптические фильтры. Эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм при помощи специализированной видеокамеры DFC340FX (Leica Microsystems, Германия). Для управления экспериментом использовали систему обработки изображения ImageJ (плагин Micro-Manager 1.4).

Результатом измерений являлось отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при облучении светом с длиной волны 340 нм к интенсивности флуоресценции при облучении светом с длиной волны 380 нм (F_{340}/F_{380}), где F_{340} — интенсивность флуоресценции Fura-2AM, связанного с Ca^{2+} , а F_{380} — интенсивность флуорес-

ценции Fura-2AM, не связанного с Ca^{2+} . Это отношение отражает изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках во время измерений [21]. Для избежания фотоблеширования измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. В экспериментах применяли объектив $10\times$ с апертурой 8 мм. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [22].

Статистический анализ проводили с применением t -критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Каждую регистрацию получали для группы из 40–50 клеток. На рисунках представлены результаты однотипных экспериментов из шести-восьми независимых. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние галоперидола на Ca^{2+} -ответы, вызываемые дисульфидсодержащими иммуномодуляторами в макрофагах. Фармакологические аналоги окисленного глутатиона (глутоксим и моликсан) используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [23–26]. Эти препараты оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы их действия далеки от полного понимания. Клинические исследования показали, что моликсан эффективен в профилактике и лечении коронавирусной инфекции COVID-19. Он приводит к более быстрому регрессу тяжести заболевания в более легкую форму [27]. Ранее [28, 29] нами впервые было показано, что глутоксим и моликсан увеличивают $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргинчувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крыс.

В настоящей работе контрольные эксперименты показали, что инкубация макрофагов в течение 20 мин со 100 мкг/мл глутоксима (рис. 1а) или 100 мкг/мл моликсана (рис. 2а) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Через 20 мин после добавления агентов $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в среднем увеличивалась от базального уровня, равного 90 ± 18 , до 135 ± 18 нМ ($n = 7$, $p < 0.05$) для глутоксима и 134 ± 20 нМ ($n = 6$, $p < 0.05$) для моликсана. При введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали дальнейшее повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1а и 2а).

В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 223 ± 22 нМ ($n = 7$, $p < 0.05$) и 202 ± 20 нМ ($n = 6$, $p < 0.05$) для глутоксима и моликсана соответственно.

Обнаружено, что преинкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на $50.3 \pm 8.4\%$, $n = 7$, $p < 0.05$), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетку (на $54.5 \pm 9.5\%$, $n = 7$, $p < 0.05$), индуцируемых глутоксимом (рис. 1б). Сходные данные были получены в опытах по влиянию 30 мкг/мл галоперидола на Ca^{2+} -ответы, вызываемые 100 мкг/мл моликсана (рис. 2б). Так, галоперидол вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на $49.3 \pm 8.1\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$) и подавление входа Ca^{2+} в клетки на $47.6 \pm 9.7\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$), индуцируемых моликсаном. Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в активации депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого глутоксимом или моликсаном, в макрофагах.

Кроме того, выявлено, что добавление 30 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного глутоксимом (рис. 1а) или моликсаном (рис. 2б), вызывает значительное (на $51.4 \pm 9.0\%$, $n = 12$, $p < 0.05$) подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Влияние галоперидола на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз. В контрольных экспериментах было обнаружено, что добавление 0.5 мкМ тапсигаргина к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 3а). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации составило 31 ± 9 нМ ($n = 7$, $p < 0.05$). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 3а). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 152 ± 20 нМ ($n = 7$, $p < 0.05$). Сходные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК (рис. 4а). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой ЦПК, составило 26 ± 9 нМ ($n = 7$, $p < 0.05$), а во время входа Ca^{2+} в макрофаги – 141 ± 22 нМ ($n = 7$, $p < 0.05$).

Показано, что преинкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 10 мин до введения 0.5 мкМ тапсигаргина вызывала подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, индуцируемого тап-

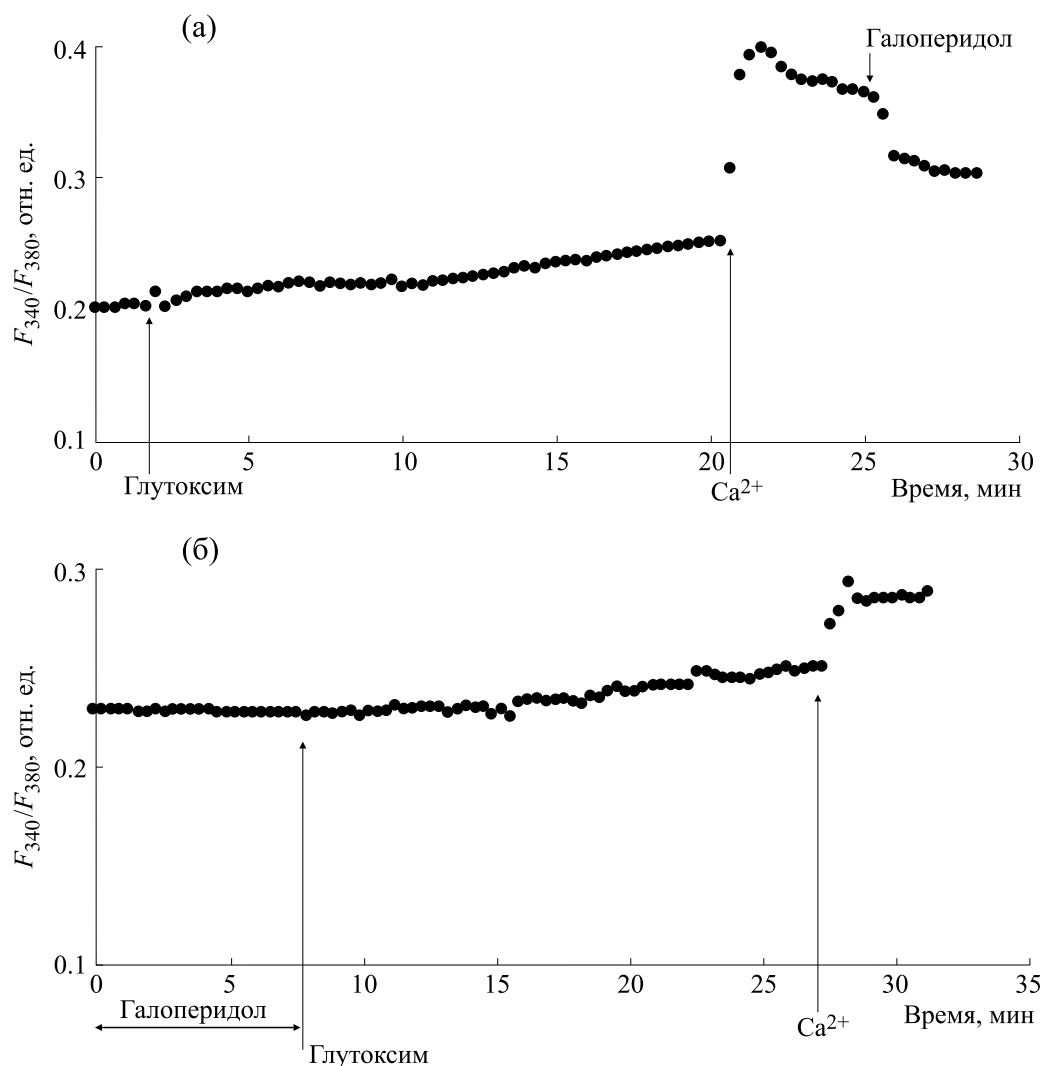


Рис. 1. Влияние галоперидола на увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах крыс, вызываемое глутоксимом: (а) — клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 30 мкг/мл галоперидола; (б) — макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 30 мкг/мл галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Здесь и далее на рис. 2–4: по оси ординат — отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2АМ при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (F_{340}/F_{380} , отн. ед.), по оси абсцисс — время (мин). Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из шести–восьми независимых экспериментов.

сигаргином (рис. 3б). В среднем галоперидол подавлял фазу мобилизации Ca^{2+} из депо на $23.2 \pm 7.9\%$ ($n = 7, p < 0.05$), а последующий депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги — на $42.3 \pm 13.6\%$ ($n = 7, p < 0.05$). Сходные результаты были получены в опытах с применением 10 мкМ ЦПК (рис. 4б). В среднем галоперидол вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на $25.9 \pm 8.0\%$ ($n = 7, p < 0.05$) и подавление входа Ca^{2+} на $43.8 \pm 12.5\%$ ($n = 7, p < 0.05$), индуцируемых ЦПК. Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в

активации депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого тапсигаргином или ЦПК в макрофагах.

Кроме того, было обнаружено, что добавление 30 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного тапсигаргином (рис. 3а) или ЦПК (рис. 4а), вызывает значительное подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги. Так, подавление входа Ca^{2+} составило: $48.5 \pm 17.1\%$ ($n = 7, p < 0.05$) для тапсигаргина и $48.1 \pm 16.9\%$ ($n = 7, p < 0.05$) для ЦПК. Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 не

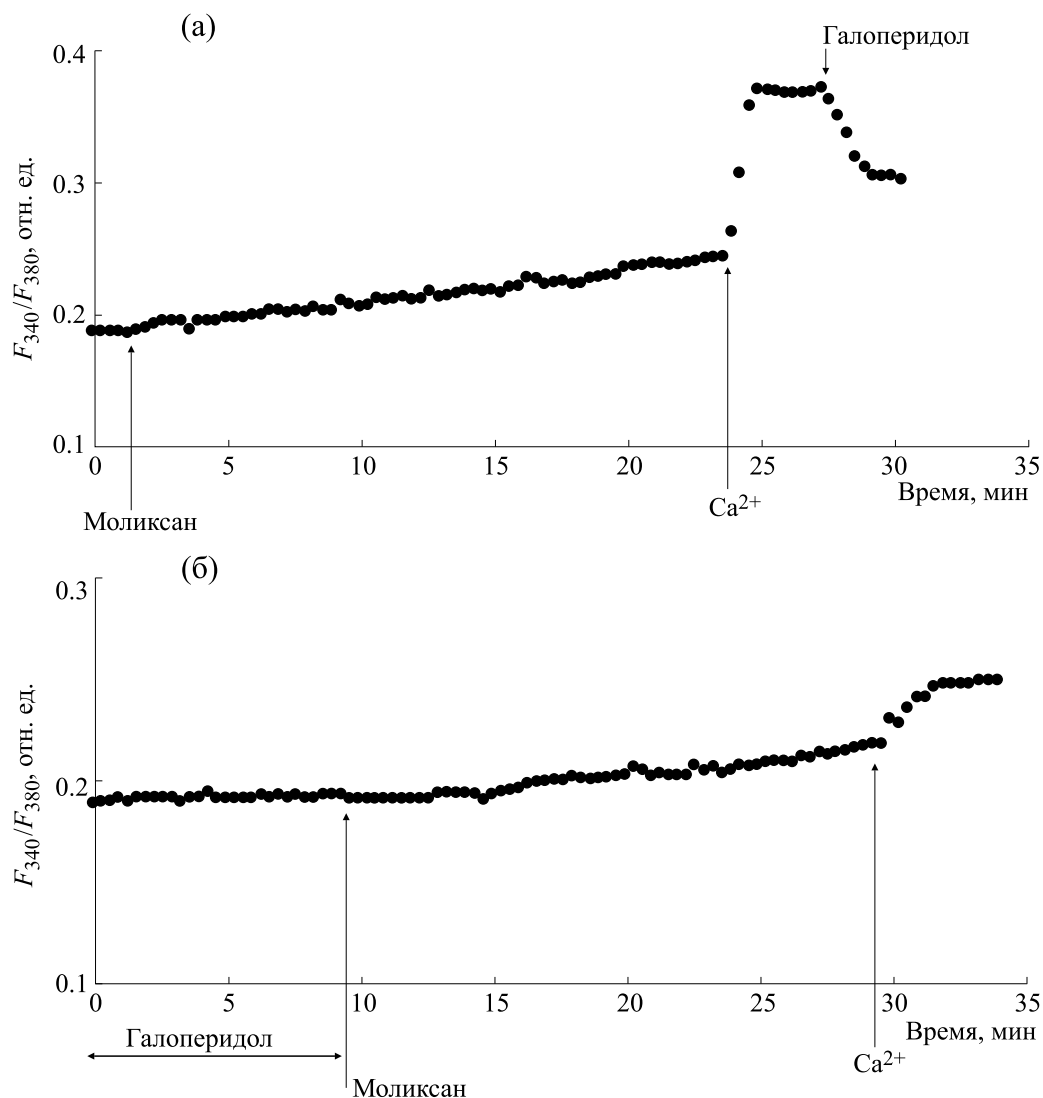


Рис. 2. Влияние галоперидола на увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах крыс, вызываемое моликсаном: (а) — клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 30 мкг/мл галоперидола; (б) — макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 30 мкг/мл галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

только в активации, но и в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик галоперидол подавляет в макрофагах обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом или моликсаном, а также тапсигаргином и ЦПК. Результаты согласуются с данными исследований других авторов, которые обнаружили, что лиганды рецепторов сигма-1 нейролептики фенотиазинового ряда хлорпромазин и трифлуоперазин подавляют мобилизацию Ca^{2+} из депо и последу-

ющий депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемые АТФ или тапсигаргином, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) [30, 31]. Показано также, что хлорпромазин ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый брадикинином или тапсигаргином в клетках феохромоцитомы крысы (линия PC12) [32], а преинкубация клеток с трифлуоперазином приводит к существенному подавлению депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином, в клетках эмбриональной почки человека (линия НЕК-293) [33]. Обнаружено, что антагонисты сигма-1 рецепторов (вещества BD1063 и BD1047) ингибируют депозависимый

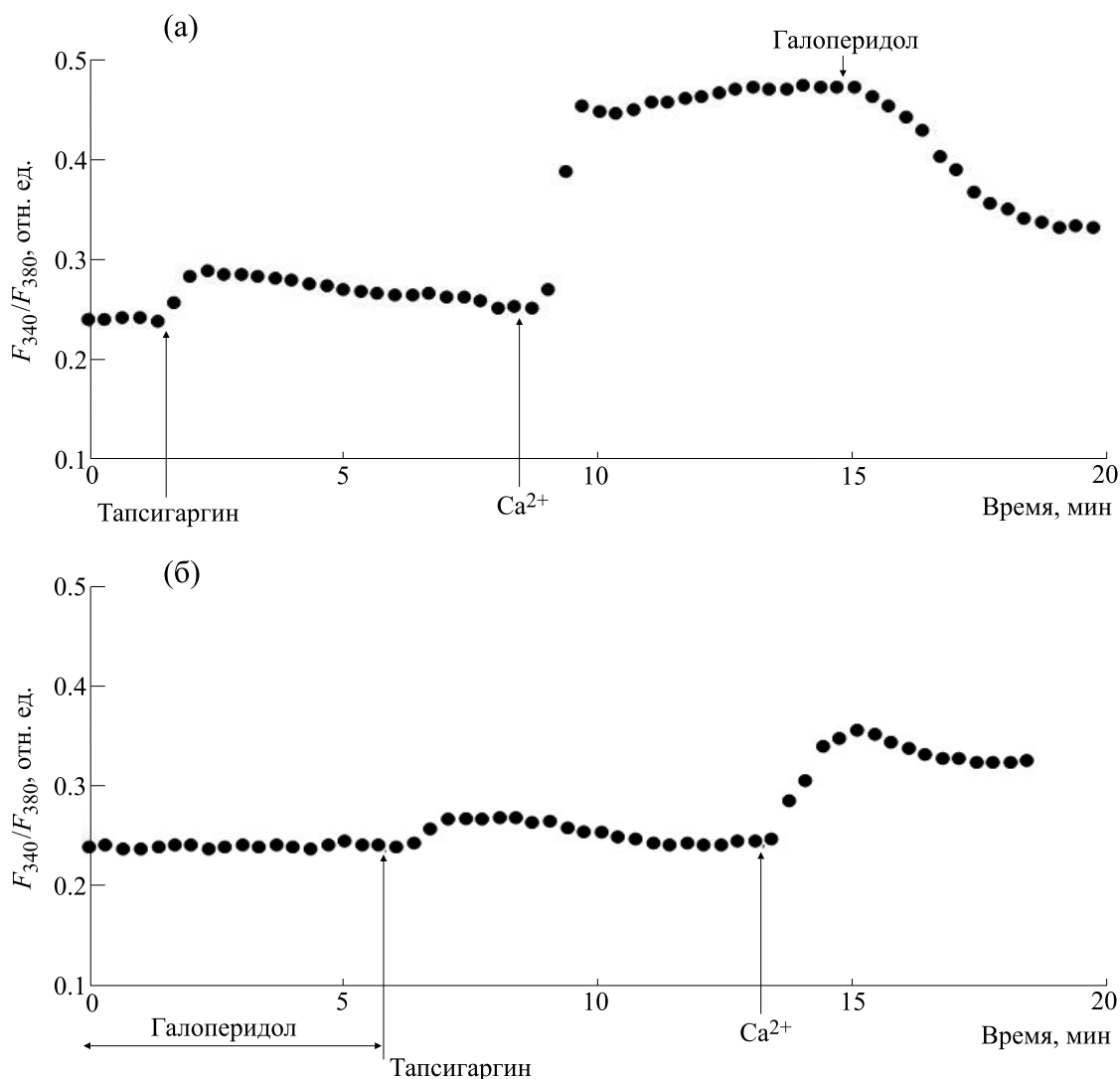


Рис. 3. Влияние галоперидола на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы: (а) – макрофаги стимулировали 0.5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+} добавляли 30 мкг/мл галоперидола; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 30 мкг/мл галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 0.5 мкМ тапсигаргина, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

вход Ca^{2+} , индуцируемый гистамином в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека [34], а BD1063 значительно подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый тапсигаргином, в клетках аденокарциномы молочной железы человека (линия MCF7) [35].

Кроме того, известно, что галоперидол ингибирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в клетках разных типов. Так, галоперидол и хлорпромазин блокируют потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в гладкомышечных клетках аорты кролика [36]. Галоперидол ингибирует Ca^{2+} -каналы L-типа в нейронах гиппокампа мыши [37] и кардио-

миоцитах крысы [38], Ca^{2+} -каналы N-, L-, P/Q- и R-типов в симпатических и парасимпатических нейронах крысы [39] и Ca^{2+} -каналы T-типа в клетках эмбриональной почки человека (линия HEK293) [40].

Результаты настоящей работы о подавлении антагонистом рецепторов сигма-1 галоперидолом Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в макрофагах, свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах

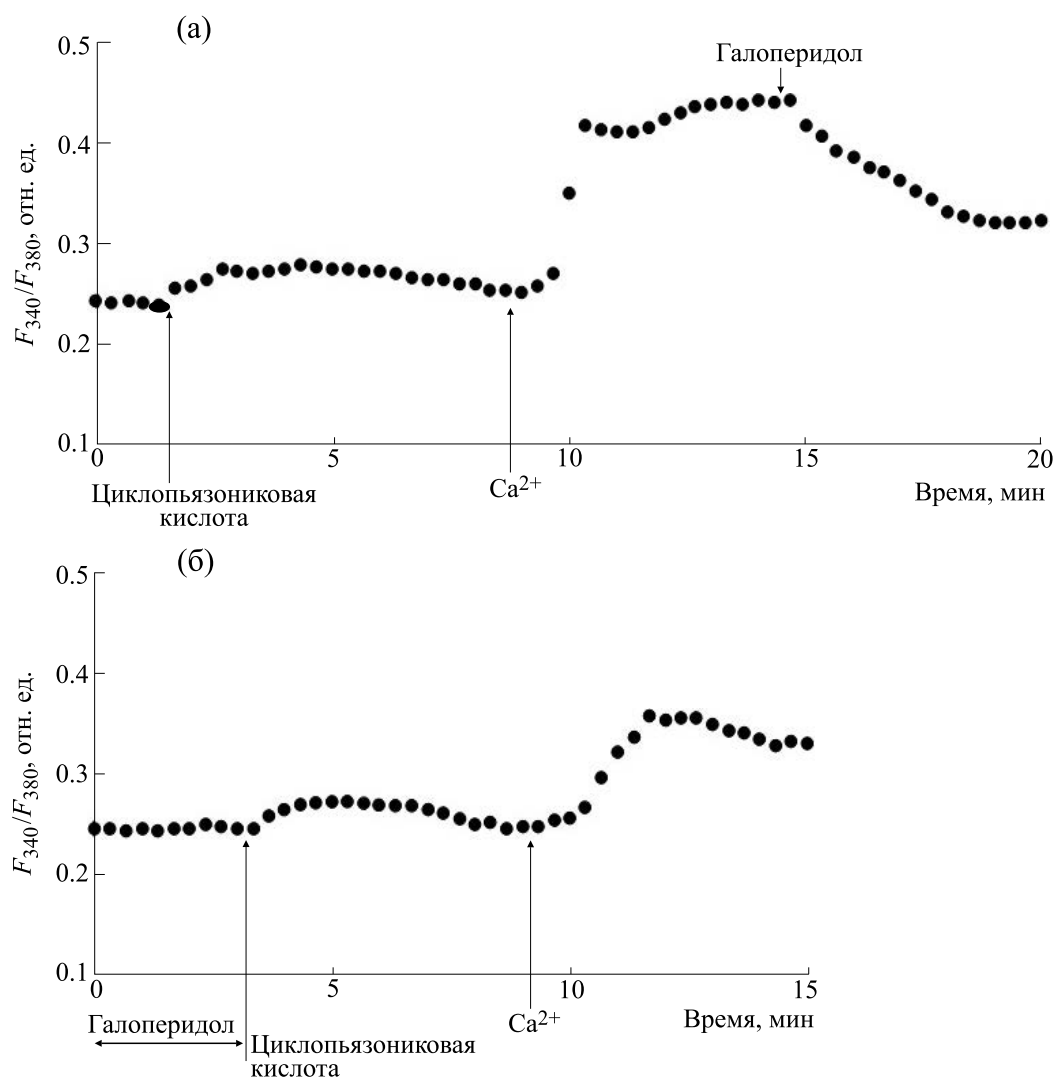


Рис. 4. Влияние галоперидола на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые циклопязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крысы: (а) – макрофаги стимулировали 10 μM циклопязониковой кислоты в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 mM Ca^{2+} ; на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+} добавляли 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ галоперидола; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 10 μM циклопязониковой кислоты, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 mM Ca^{2+} .

крыс. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препаратов глутоксима или моликсана и нейролептика галоперидола.

Полученные нами данные свидетельствуют также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого дисульфидсодержащими иммуномодуляторами и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз, в перитонеальных макрофагах крыс, и позволяют рассматривать рецепторы сигма-1 в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Рецепторы сигма-1 могут влиять на депозависимый вход Ca^{2+} , модулируя связывание между основными компонентами белкового комплекса депозависимого входа Ca^{2+} – белками STIM1 в мембране эндоплазматического ретикула и Orai1 в плазмалемме [12].

Результаты могут также способствовать более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия нейролептиков первого поколения. Кроме того, полученные данные могут иметь значение для терапии заболеваний, опосредованных нарушением функционирования рецепторов сигма-1. Так, известно, что изменения субклеточной локализации, экспрессии и сигнальных функций рецепторов

сигма-1 приводят к развитию широкого ряда заболеваний человека [2–5]. Выявлено участие этих рецепторов в патофизиологии нейропсихиатрических (шизофрении, тревожных расстройств, депрессивных состояний и деменции), нейродегенеративных (болезней Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона, бокового амиотрофического склероза), онкологических и сердечнососудистых заболеваний, болевых синдромов и ретинопатий [2–5, 10, 41, 42]. Это позволило рассматривать рецепторы сигма-1 как перспективные фармакологические мишени для терапии этих заболеваний.

В последнее время изучается также возможная роль сигма-1 рецепторов в патофизиологии коронавирусной инфекции (COVID-19). Появляются данные, что рецепторы сигма-1 могут быть перспективной терапевтической мишенью при лечении пациентов с COVID-19. Полагают, что рецепторы сигма-1 регулируют ключевые механизмы адаптивного стрессового ответа клеток-хозяев и принимают участие в ранних стадиях репликации вируса [43, 44]. Обнаружено, что белок NSP6 вируса SARS-CoV-2 взаимодействует с рецепторами сигма-1, играющими важную роль в регуляции стресса эндоплазматического ретикула [45].

Многие перепрофилированные лекарства, включенные в схемы комплексной терапии пациентов с COVID-19, часто идентифицируются как лиганды рецепторов сигма-1. К их числу относятся нейролептики галоперидол, хлорпромазин и трифлуоперазин [43, 46]. Показано, что они эффективно ингибируют репликацию и рост вируса SARS-CoV-2 [45]. Так, галоперидол имеет значительную противовирусную активность, сильно связывается с белком NSP6 вируса SARS-CoV-2 [47] и ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках эпителия легких человека (линия Calu-3) и клетках обезьяны (линия VeroE6) [45, 48]. Лиганды рецепторов сигма-1 галоперидол [49] и хлорпромазин [50] уже прошли клинические испытания в качестве препаратов для терапии пациентов с COVID-19.

Известно также, что вирусы выработали механизмы нарушения Ca^{2+} -гомеостаза клеток-хозяев и увеличивают $[\text{Ca}^{2+}]_i$, поскольку Ca^{2+} необходим для проникновения вируса в клетку, для репликации, созревания и освобождения вируса [51, 52]. В связи с этим, блокирование вызванного вирусом увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ путем ингибирования каналов кальциевого выброса в мембране эндоплазматического ретикула (рецепторов инозитол-1,4,5-трифосфата и риадиноновых рецепторов) или каналов входа Ca^{2+} в плазмалемму (потенциалзависимых и депозависимых Ca^{2+} -каналов) является одним из подходов в терапии вирусных инфекций [52]. Так, обнаружено, что бло-

каторы потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов нифедипин и амлодипин снижают смертность и уменьшают риск необходимости искусственной вентиляции легких у пожилых пациентов с COVID-19 и гипертонией [53, 54]. Показано также, что внутривенное введение пациентам с тяжелой пневмонией при COVID-19 блокатора депозависимых Ca^{2+} -каналов соединения Аухага стабилизирует эндотелий легких и ингибирует выделение провоспалительных цитокинов, тем самым существенно облегчая и ускоряя выздоровление пациентов [55, 56].

Таким образом, полученные нами данные о подавлении антагонистом рецепторов сигма-1 галоперидолом обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцируемых дисульфидсодержащими иммуномодуляторами и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз в перитонеальных макрофагах крыс, дополнительно подтверждают многогранность эффектов нейролептиков и свидетельствуют в пользу их терапевтического потенциала, как лигандов рецепторов сигма-1.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках договоров СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 01/18-НИОКР от 05.03.2018 и № 05/03-20 от 12.03.2020.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание животных и все манипуляции с ними выполняли в соответствии с нормативными документами и требованиями Приказа Минздрава России № 267 от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T.-P. Su, T.-C. Su, Y. Nakamura, et al., *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 262 (2016).
2. C. G. Rousseaux and S. F. Greene, *J. Recept. Signal Transduct.*, **36**, 327 (2016).
3. H. R. Schmidt and A. C. Kruse, *Trends Pharmacol. Sci.*, **40**, 636 (2019).
4. R. Aishwarya, C. S. Abdullah, M. Morshed, et al., *Front. Physiol.*, **12**, 705575 (2021).
5. B. Penke, L. Fulop, M. Szucs, et al., *Curr. Neuropharmacol.*, **16**, 97 (2018).

6. E. J. Cobos, J. M. Entrena, F. R. Nieto, et al., *Curr. Neuropharmacol.*, **6**, 344 (2008).
7. T. Maurice and T.-P. Su, *Pharmacol. Ther.*, **124**, 195 (2009).
8. U. B. Chu and A. E. Ruoho, *Mol. Pharmacol.*, **89**, 142 (2016).
9. S. W. Tam and L. Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5618 (1984).
10. I. Pontisso and L. Combettes, *Genes*, **12**, 139 (2021).
11. T. Hayashi and T.-P. Su, *Cell*, **131**, 596 (2007).
12. S. Srivats, D. Balasuriya, M. Pasche, et al., *J. Cell Biol.*, **213**, 65 (2016).
13. G. C. Brailoiu, E. Deliu, L. M. Console-Bram, et al., *Biochem. J.*, **473**, 1 (2016).
14. S. Berlansky, C. Humer, M. Sallinger, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 471 (2021).
15. Л. С. Миленина, З. И. Крутецкая, В. Г. Антонов и др., *Биофизика*, **66** (1), 92 (2021).
16. Л. С. Миленина, З. И. Крутецкая, В. Г. Антонов и др., *Цитология*, **64** (1), 58 (2022).
17. E. J. Cobos, E. Del Pozo, and J. M. Baeyens, *J. Neurochem.*, **102**, 812 (2007).
18. G. Ayano, *Res. Rev. J. Chem.*, **5**, 53 (2016).
19. C. Randriamampita and A. Trautmann, *Cell. Biol.*, **105**, 761 (1987).
20. R. A. Monahan, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak, *Blood*, **58**, 1089 (1981).
21. Q. Xie, Y. Zhang, C. Zhai, et al., *J. Biol. Chem.*, **277**, 16559 (2002).
22. G. Gryniewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
23. А. Е. Борисов, Л. А. Кожемякин, А. Е. Антушевич и др., *Вестн. хирургии им. И.И. Грекова*, **4** (2), 32 (2001).
24. Г. Б. Соколова, М. В. Сеницын, Л. А. Кожемякин и др., *Антибиотики и химиотерапия*, **47** (2), 20 (2002).
25. А. А. Антушевич, В. Г. Антонов, А. Н. Гребенюк и др., *Вестн. Рос. воен.-мед. акад.*, **3** (43), 32 (2013).
26. О. А. Толстой, В. Н. Цыган, А. Г. Климов и др., *Известия Рос. воен.-мед. акад.*, **38** (1), 271 (2019).
27. M. V. Dubina, V. V. Gomonova, A. E. Taraskina, et al., <https://doi.org/10.1101/2020.09.25.20199562> (medrxiv.org 06.10.2020) (2020).
28. Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев и др., *Цитология*, **50** (5), 452 (2008).
29. Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев и др., *Цитология*, **54** (2), 135 (2012).
30. J. L. Harper, Y. Shin, and J. W. Daly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14912 (1997).
31. J. L. Harper and J. W. Daly, *Drug Dev. Res.*, **47**, 107 (1999).
32. S.-Y. Choi, Y.-H. Kim, Y.-K. Lee, et al., *British J. Pharmacol.*, **132**, 411 (2001).
33. L. Wang, L. Zhang, S. Li et al., *Sci. Rep.*, **5**, 1 (2015).
34. M. S. Amer, L. McKeown, S. Tumova, et al., *Brit. J. Pharmacol.*, **168**, 1445 (2013).
35. G. Gasparre, C. Abate, R. Carlucci, et al., *Pharmacol. Rep.*, **69**, 542 (2017).
36. S. F. Flaim, M. D. Brannan, S. C. Swioart et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1237 (1985).
37. J. Church and E. J. Fletcher, *Brit. J. Pharmacol.*, **116**, 2801 (1995).
38. B. Tarabova, M. Novakova, and L. Lacinova, *Gen. Physiol. Biophys.*, **28**, 249 (2009).
39. H. Zhang and J. Cuevas, *J. Neurophysiol.*, **87**, 2867 (2002).
40. C. M. Santi, F. S. Cayabyab, K. G. Sutton, et al., *J. Neurosci.*, **22**, 396 (2002).
41. S.-Y. Tsai, T. Hayashi, T. Mori, et al., *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, **9**, 184 (2009).
42. M. V. Voronin, Y. V. Vakhitova, and S. B. Seredenin, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7088 (2020).
43. J. M. Vela, *Front. Pharmacol.*, **11**, 582310 (2020).
44. K. Hashimoto, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **271**, 249 (2021).
45. D. E. Gordon, G. M. Jang, M. Bouhaddou, et al., *Nature*, **583**, 459 (2020).
46. M. Plaze, D. Attali, A.-C. Petit, et al., *L'Encephale*, **46**, 169 (2020).
47. P. Pandey, K. Prasad, A. Prakash, et al., *J. Mol. Med.*, **98**, 1659 (2020).
48. B. L. Le, G. Andreoletti, T. Oskotsky, et al., *Sci. Rep.*, **11**, 12310 (2021).
49. N. Hoertel, M. Sanchez-Rico, R. Vernet, et al., *PLoS One*, **16**, e0247122 (2021).
50. N. Hoertel, M. Sanchez-Rico, R. Vernet, et al., *Clin. Drug Invest.*, **41**, 221 (2021).
51. Y. Zhoua, T. K. Freyb, and J. J. Yanga, *Cell Calcium*, **46**, 1 (2009).
52. X. Chen, R. Cao, and W. Zhong, *Cells*, **9**, 94 (2019).
53. I. Solaimanzadeh, *Cureus*, **12**, e8069 (2020).
54. L.-K. Zhang, Y. Sun, H. Zeng, et al., *Cell Discovery*, **6**, 96 (2020).
55. J. Miller, C. Bruen, M. Schnaus, et al., *Crit. Care*, **24**, 502 (2020).
56. S. Berlansky, M. Sallinger, H. Grabmayr, et al., *Cells*, **11**, 253 (2022).

Haloperidol, a Sigma-1 Receptor Antagonist, Inhibits Ca^{2+} Responses in Rat Peritoneal Macrophages

L.S. Milenina*, Z.I. Krutetskaya*, V.G. Antonov**, and N.I. Krutetskaya*

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

**Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Litovskaya ul. 2, Saint-Petersburg, 194100 Russia

Sigma-1 receptors are ubiquitous multifunctional ligand-operated molecular chaperones in the endoplasmic reticulum membrane and have a unique history, structure, and pharmacological profile. Sigma-1 receptors modulate a wide range of cellular processes in health and disease and Ca^{2+} signaling processes. Using the Ca^{2+} sensitive fluorescent ratiometric dye Fura-2AM, it has been shown that neuroleptic (haloperidol, an antagonist of sigma-1 receptors) significantly suppresses Ca^{2+} mobilization from intracellular Ca^{2+} stores and subsequent store-dependent Ca^{2+} entry, induced by thapsigargin and cyclopiazonic acid, as inhibitors of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases, and also by glutoxim and molixan, disulfide-containing immunomodulatory drugs, in rat peritoneal macrophages. Findings of the study revealed that sigma-1 receptors are involved in the complex signaling cascade triggered by glutoxim or molixan that leads to the increase in the intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages and participate in regulation of store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages.

Keywords: haloperidol, sigma-1 receptors, intracellular Ca^{2+} concentration, macrophages

СОЛИ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ УСИЛИВАЮТ АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -АКТИВИРУЕМЫХ K^+ -КАНАЛОВ БОЛЬШОЙ ПРОВОДИМОСТИ И СНИЖАЮТ КАЛЬЦИЕВЫЕ ОСЦИЛЛЯЦИИ В ГНЗ-КЛЕТКАХ КРЫСЫ

© 2023 г. И.Ф. Шайдуллов*, Е.В. Ермакова*, Д.М. Сорокина*,
О.В. Яковлева*, Г.Ф. Ситдикова*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет,
ул. Кремлевская, 18, Казань, Республика Татарстан, 420008, Россия

E-mail: guzel.sitdikova@kpfu.ru

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.

После доработки 10.01.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Короткоцепочечные жирные кислоты, к которым относятся уксусная, пропионовая, масляная кислоты, являются метаболитами микробиоты, способными оказывать разнообразные физиологические эффекты как в кишечнике, так и за его пределами, включая центральную нервную систему. Целью нашей работы было исследование влияния ацетата, пропионата и бутирата натрия на активность Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой проводимости и кальциевые осцилляции в культуре ГНЗ-клеток гипоталамуса крысы. Показано, что исследованные жирные кислоты вызывают дозозависимое увеличение амплитуды интегральных выходящих калиевых токов; эти эффекты предотвращаются тетраэтиламмонием, что указывает на участие Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой проводимости в эффектах жирных кислот. Действительно, жирные кислоты повышали вероятность открытия одиночных каналов без изменения амплитуды и среднего времени открытого состояния. Кроме того, они приводили к значительному снижению амплитуды и частоты Ca^{2+} -осцилляций в ГНЗ-клетках. Усиление калиевой проводимости и снижение уровня внутриклеточного Ca^{2+} при действии короткоцепочечных жирных кислот может опосредовать их эффекты в различных возбудимых структурах, такие как снижение сократимости гладкомышечных клеток кишечника и сосудов, гиперполяризация нейронов, регуляция высвобождения гормонов и медиаторов.

Ключевые слова: короткоцепочечные жирные кислоты, Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы большой проводимости, ГНЗ-клетки, кальциевые осцилляции.

DOI: 10.31857/S0006302923040087, EDN: KKCIVI

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), к которым относятся уксусная, пропионовая и масляная кислоты, являются конечными продуктами анаэробной бактериальной ферментации неперевариваемых углеводов или белков в толстой кишке, их суммарная концентрация может достигать 150 мМ [1–5]. КЦЖК поддерживают гомеостаз кишечника через целый ряд локальных эффектов, являясь источником энергии для колоноцитов, способствуя поддержанию целостности кишечного барьера, продукции слизи, защищая от токсического влияния некоторых бактерий, воспаления и снижая риск ко-

лоректального рака [6–9]. Кроме того, КЦЖК участвуют в регуляции перистальтики кишечника, снижая спонтанную и вызванную агонистами холинорецепторов сократительную активность [10–12]. Эффекты КЦЖК на двигательную функцию кишечника могут варьировать при различных патологических состояниях, например, при синдроме раздраженного кишечника, что может быть связано как с изменением концентрации, так и нарушением активности/экспрессии их мишеней действия [12, 13].

Вне желудочно-кишечного тракта КЦЖК проявляют антигипертензивные свойства, вызывая расслабление резистивных артерий и усиливая высвобождение ренина [14–17]. В экспериментальном исследовании гипертензии, вызванной ангиотензином II у мышей, хроническое введение бутирата улучшило индуцированную

Сокращения: КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты, ВК-каналы – Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы большой проводимости, P_o – вероятность открытия одиночного канала.

ацетилхолином вазорелаксацию [18], а добавление ацетата предотвращало развитие гипертонии и сердечной недостаточности [19]. Помимо эффектов в толстой кишке и периферических тканях КЦЖК играют важную роль в оси микробиота–кишечник–мозг, поскольку могут преодолевать гематоэнцефалический барьер с помощью транспортеров монокарбоксилатов, экспрессирующихся в эндотелиальных клетках, как было показано при их инфузии в сонную артерию крысы [20]. Действительно, нарушения микробиоты сопровождаются поведенческими и неврологическими патологиями, такими как депрессии, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, расстройства аутистического спектра, тогда как введение КЦЖК может оказывать позитивное влияние на такие состояния [21].

Механизмы действия КЦЖК включают активацию G-белок-ассоциированных рецепторов GPR41, GPR43 и GPR109a, которые экспрессируются во многих органах, включая тонкий и толстый кишечник, иммунные клетки, жировую ткань, сердце, скелетные мышцы и нейроны [22]. В энтеральных нейронах и гладкомышечных клетках были обнаружены мембранные эффекты КЦЖК – усиление калиевых токов и гиперполяризация, что сопровождалось также повышением уровня внутриклеточного кальция [14, 23–26], однако прямые эффекты на ВК-каналы (Ca^{2+} -активируемые K^{+} -каналы большой проводимости) не были исследованы.

Целью нашей работы был анализ влияния натриевых солей КЦЖК на выходящие K^{+} токи и активность одиночных ВК-каналов и спонтанные Ca^{2+} осцилляции в культуре GN3-клеток гипофиза крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрация активности кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости в культуре GN3 клеток методом патч-кламп. Для исследования активности ВК-каналов использовали линию GN3-клеток (DSMZ, Германия), характеризующуюся высокой экспрессией α -субъединицы ВК-каналов [27]. GN3-клетки культивировали при температуре 37°C, 5% CO_2 и влажности 95% в среде MEM (Sigma, Великобритания), дополненной 7%-й эмбриональной бычьей сывороткой и 3%-й лошадиной сывороткой (обе – Gibco, Новая Зеландия). Клетки культивировали на покровных стеклах, покрытых 0.01% поли-D-лизинном (Sigma, Великобритания). Регистрацию электрических ответов проводили на третьи-четвертые сутки после высаживания. Все эксперименты были выполнены при комнатной температуре при непрерывной перфузии стандартным внеклеточ-

ным раствором, содержащим 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH доводили до 7.2 с помощью NaOH. Патч-кламп-регистрацию в режиме «целая клетка» проводили с использованием внутрипипеточного раствора следующего состава: 145 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 3.63 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, pH 7.2, содержащего 0.5 мкМ свободного Ca^{2+} (рассчитано с помощью расширенного калькулятора Webmaxc, <https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/webmaxc/webmaxcE.htm>). Для анализа эффектов КЦЖК использовали ацетат натрия, пропионат натрия и бутират натрия в концентрациях 1, 3 или 5 mM. Аппликацию исследуемых веществ проводили в течение 3 мин.

Патч-пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров (Sutter Instrument, США) с помощью вытягивающего устройства фирмы Narishigi (Япония). Сопротивление электродов составляло от 3 до 8 МΩ. Далее с помощью микроманипулятора стеклянную пипетку подводили к клетке для формирования гигаомного контакта с мембраной. Значения емкости (C_m) для каждой клетки определяли из параметров «мембранного теста» (pClamp 10.7; Axon Instruments/Molecular Devices, США) через 5–10 мин после установления гигаомного контакта в условиях «whole-cell» («целая клетка») при фиксации потенциала на уровне мембранного потенциала покоя.

Для регистрации выходящих K^{+} -токов использовали конфигурацию «целая клетка», в которой ионные токи вызывались в ответ на серию деполяризующих импульсов длительностью 500 мс от –80 мВ до 80 мВ с интервалом 20 мВ. Активность одиночных каналов регистрировали в конфигурации «outside-out» при потенциале фиксации 30 мВ. Записи в режиме «целая клетка» или «outside-out» были сделаны с помощью усилителя Axopatch-200B, подключенного к интерфейсу Digidata 1440A, с использованием программного обеспечения pClamp 10.7. Частота дискретизации для одноканальной записи составляла 10 кГц. Данные были отфильтрованы с помощью низкочастотного четырехполосного фильтра Бесселя, настроенного на 1 кГц, и проанализированы с помощью программного обеспечения Clampfit (Axon Instruments/Molecular Devices, США).

Флуоресцентная микроскопия. Для анализа влияния КЦЖК на спонтанные кальциевые осцилляции использовали флуоресцентный маркер Fluo-4 AM (1 мкМ). Для окрашивания GN3-клетки инкубировали во внеклеточном растворе, содержащем краситель, в течение 40 мин при температуре 37°C в отсутствие света. Далее клетки промывали внеклеточным раствором 10–20 мин для обеспечения полной деэтерификации слож-

ных эфиров АМ, после чего проводили флуоресцентную визуализацию окрашенных клеток при помощи микроскопа AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного водным иммерсионным объективом PlanNeofluar 63×/0.9NA. Регистрацию проводили с использованием фильтра возбуждения (BP450–490 нм), светоделителя (FT510 нм) и фильтра эмиссии (LP555 нм). Флуоресцентные картины регистрировали с помощью высокоскоростной камеры AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия). Запись флуоресцентных изображений проводили в течение 30 с, время экспозиции – 500 мс. Далее интенсивность свечения анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ.

Анализ данных. Вероятность открытия одиночного канала (P_o) оценивали, как $P_o = NP/n$, где $NP = [(t_o)/(t_o + t_c)]$ – вероятность открытия каналов, t_o – суммарное время открытого состояния, t_c – суммарное время закрытого состояния, а n – количество уровней открытия каналов в патче. Вольтамперные характеристики (I – V) K^+ -токов были построены на основе измерений амплитуд тока в конце тестовых импульсов, нормализованных к емкости клеток (пА/пФ). Среднюю амплитуду, частоту и длительность колебаний Ca^{2+} -осцилляций определяли в пакете MATLAB (MathWorks, США). Флуоресценцию пика выражали как относительное изменение флуоресценции $(F - F_o)/F_o$ для каждого кадра каждого измерения, где F – пиковая флуоресценция окрашенных клеток, а F_o – фоновая флуоресценция вблизи данной клетки. Количественный анализ флуоресцентных изображений проводили с помощью программы OriginPro 2015 (OriginLab, США).

Статистический анализ проводили с помощью стандартных методик, нормальность распределения выборки определяли при помощи F -теста Фишера и критерия Шапиро–Уилка с использованием программы OriginPro 2015 (OriginLab, США). Достоверность различий определяли с помощью параметрического парного t -критерия Стьюдента или дисперсионный анализ (ANOVA) с применением теста Бонферрони для сравнения независимых выборок. Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым. Все результаты были представлены как среднее $\pm$ ошибка средней, n равно количеству клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффекты КЦЖК на выходящие интегральные калиевые токи и активность одиночных ВК-каналов. Регистрацию интегральных K^+ -токов проводили в режиме фиксации потенциала (*voltage-clamp*) в конфигурации «целая клетка» в ответ на серию деполяризующих потенциалов. Апплика-

ция КЦЖК в концентрациях 1, 3 и 5 мМ приводила к дозозависимым изменениям амплитуды интегральных K^+ -токов в GH3-клетках (рис. 1).

Ацетат натрия в концентрации 1 мМ не приводил к достоверному изменению амплитуды токов ($p > 0.05$, $n = 12$; табл. 1), в концентрации 3 мМ увеличивал амплитуду токов на 67% ($p < 0.05$, $n = 12$; рис. 1а,б), а при 5 мМ – на 77% ($p < 0.05$, $n = 6$; табл. 1). Эффекты ацетата натрия в концентрациях 3 и 5 мМ достоверно отличались от его эффекта в концентрации 1 мМ ($p < 0.05$), а отличия между концентрациями 3 и 5 мМ не наблюдались ($p > 0.05$).

Пропионат натрия в концентрации 1 мМ вызывал увеличение амплитуды тока на 41% ($p < 0.05$, $n = 12$; табл. 1), в концентрации 3 мМ – на 111% ($p < 0.05$, $n = 12$; рис. 1в,г), а при увеличении концентрации до 5 мМ – на 147% ($p < 0.05$, $n = 12$; табл. 1). Эффекты пропионата натрия в концентрациях 3 и 5 мМ достоверно отличались от его эффекта в концентрации 1 мМ ($p < 0.05$), отличия между концентрациями 3 и 5 мМ не наблюдались ($p > 0.05$).

Добавление бутирата натрия в концентрации 1 мМ не вызывало достоверных изменений амплитуды K^+ -токов ($p > 0.05$, $n = 12$; рис. 1ж, табл. 1). Повышение концентрации бутирата натрия до 3 мМ и 5 мМ приводило к увеличению амплитуды токов на 73% ($p < 0.05$, $n = 12$) и 142%, соответственно ($p < 0.05$, $n = 12$; рисунок 1д,е, табл. 1). При этом эффекты бутирата натрия в различных концентрациях достоверно различались между собой ($p < 0.05$).

Для выявления роли ВК-каналов в эффектах КЦЖК мы использовали тетраэтиламмоний (1 мМ), который в низких концентрациях специфически блокирует ВК-каналы [28]. Аппликация тетраэтиламмония приводила к значительному снижению амплитуды выходящих K^+ -токов. При этом на фоне его действия эффекты КЦЖК на выходящие K^+ -токи не проявлялись. В качестве примера приведены эффекты ацетата натрия на фоне тетраэтиламмония ($p > 0.05$, $n = 5$; рис. 1з). Было предположено, что усиление выходящих K^+ -токов при действии КЦЖК обусловлено активацией ВК-каналов. Поэтому далее мы анализировали влияние КЦЖК на характеристики одиночных ВК-каналов.

Активность одиночных ВК-каналов регистрировали при потенциале фиксации 30 мВ. В контроле средняя вероятность открытия (P_o) ВК-каналов составила 0.041 ± 0.008 . Аппликация КЦЖК приводило к значительному усилению активности каналов. Так, уже в течение 1 мин применения ацетата натрия и пропионата натрия (3 мМ) P_o увеличивалась на 25% (с 0.053 ± 0.01 до

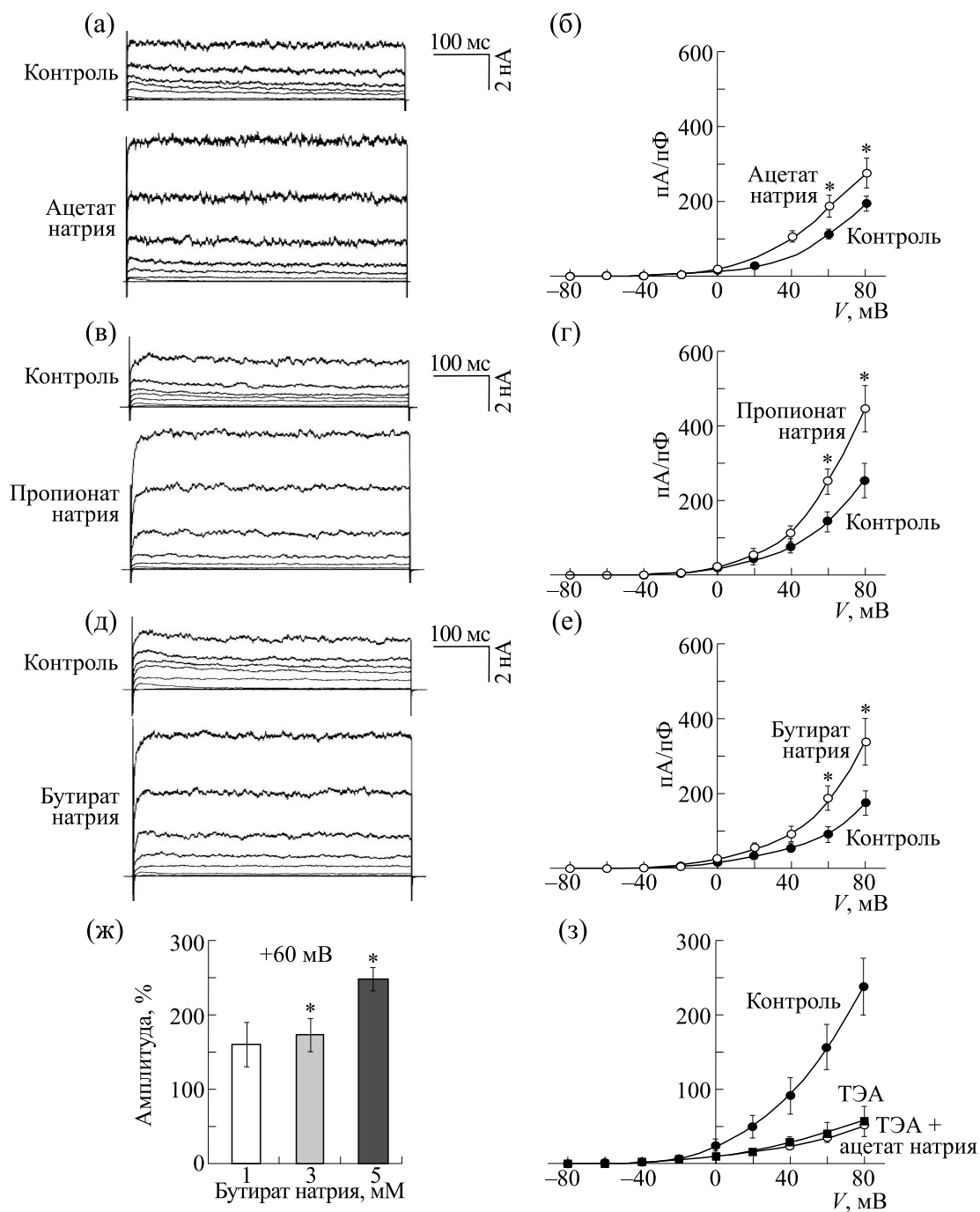


Рис. 1. Эффекты КЦЖК на амплитуду выходящих калиевых токов. Оригинальные записи K^+ -токов в ответ на ступенчатую подачу деполяризующих потенциалов с шагом 20 мВ от -80 до 80 мВ при регистрации в конфигурации «целая клетка» в контроле и при добавлении ацетата натрия (а), пропионата натрия (в) и бутирата натрия (д) в концентрации 3 мМ. Вольтамперная характеристика K^+ -токов в контроле (черные кружки) и в присутствии КЦЖК (белые кружки): ацетата натрия (б), пропионата натрия (г) и бутирата натрия (е). Амплитуда K^+ -токов при действии бутирата натрия в концентрациях 1, 3 и 5 мМ в режиме фиксации потенциала — voltage-clamp при потенциале фиксации 60 мВ (ж). Вольтамперная характеристика K^+ -токов в контроле (черные кружки), при действии тетраэтиламмония (1 мМ; черные квадраты) и ацетата натрия (3 мМ) на фоне тетраэтиламмония (белые кружки) (з). * — $p < 0.05$ — относительно контроля.

Таблица 1. Плотность выходящих K⁺-токов (пА/пФ) при действии КЦЖК в режиме фиксации потенциала

Вещество	Концентрации КЦЖК					
	Контроль	1 мМ	Контроль	3 мМ	Контроль	5 мМ
Ацетат натрия	96.95 ± 12.07	108.97 ± 19.24	112.06 ± 12.49	186.93 ± 28.42*	78.09 ± 19.76	138.78 ± 34.87*
Пропионат натрия	95.32 ± 19.88	134.49 ± 20.35*	89.95 ± 18.21	189.7 ± 32.96*	126.73 ± 18.28	314.12 ± 21.7*
Бутират натрия	96.36 ± 18.27	154.49 ± 28.54	145.29 ± 27.19	251.48 ± 32.96*	137.69 ± 18.69	342.34 ± 21.82*

Примечание. Потенциал фиксации — 60 мВ; * — $p < 0.05$ относительно контроля.

0.067 ± 0.01; рис. 2а,б) и 71% (с 0.04 ± 0.012 до 0.07 ± 0.016; рис. 2в,г) от уровня контроля ($p < 0.05$, $n = 5$). Эффекты бутирата натрия (рис. 2д,е) были более значительными и P_o увеличилась на 221% (с 0.06 ± 0.01 до 0.13 ± 0.02; $p < 0.05$, $n = 5$; рис. 2ж), что было достоверно больше эффектов ацетата и пропионата натрия ($p < 0.05$; рис. 2ж).

При этом амплитуда и среднее время открытого состояния ВК-каналов при действии всех КЦЖК достоверно не изменялись ($p > 0.05$, $n = 5$; рис. 2з,и). Таким образом, КЦЖК увеличивают амплитуду выходящих калиевых токов в ГНЗ-клетках и повышают вероятность открытия ВК-каналов без изменения их амплитуды и временной кинетики.

Эффекты короткоцепочечных жирных кислот на кальциевые осцилляции. Для анализа влияния КЦЖК на Ca²⁺-осцилляции в ГНЗ-клетках использовали флуоресцентный маркер Fluo-4 АМ.

В контроле ГНЗ-клетки демонстрировали регулярные изменения уровня внутриклеточного Ca²⁺ со средней частотой 5.63 ± 0.3 имп/мин. Применение КЦЖК в концентрации 3 мМ приводило к значительному снижению амплитуды и частоты осцилляций (рис. 3). На фоне действия ацетата натрия амплитуда снижалась на 45% (с 0.28 ± 0.02 о.е. в контроле и до 0.15 ± 0.02 о.е. к 5-й минуте добавления; $p < 0.05$, $n = 10$; рис. 3а,б), частота снизилась на 22% (с 6.27 ± 1.03 имп/мин до 4.93 ± 0.75 имп/мин; $p < 0.05$, $n = 10$). Аппликация пропионата натрия снизила амплитуду осцилляций на 30% (с 0.12 ± 0.01 о.е. до 0.08 ± 0.01 о.е.; $p < 0.05$, $n = 7$; рис. 3в,г), частота колебаний достоверно снизилась на 35% (с 4.43 ± 0.55 имп/мин до 2.87 ± 0.44 имп/мин; $p < 0.05$, $n = 7$). Бутират натрия также снижал амплитуду на 45% (с 0.11 ± 0.01 о.е. до 0.06 ± 0.01 о.е.; $p < 0.05$, $n = 10$; рис. 3д,е) и частоту осцилляций на 48% относительно контроля (с 4.69 ± 0.27 имп/мин в контроле до 2.44 ± 0.27 имп/мин; $p < 0.05$, $n = 10$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метаболиты микробиоты играют важную роль в регуляции целостности кишечного барьера, местных иммунных реакций, а также оказывают влияние на перистальтику кишечника и нервную регуляцию функций желудочно-кишечного тракта [29]. Кроме того, все больше данных указывают на регулирующее влияние КЦЖК вне желудочно-кишечного тракта, в том числе в нервной системе [21]. В настоящей работе мы с использованием культуры ГНЗ-клеток впервые показали, что все три исследованные КЦЖК вызывают непосредственную активацию ВК-каналов и угнетают спонтанные Ca²⁺-осцилляции.

Уксусная, пропионовая и масляная кислоты являются продуктами ферментации углеводов и в высоких миллимолярных концентрациях обнаруживаются как в толстой (до 150 мМ), так и в подвздошной кишке (до 40 мМ) [3, 5, 30, 31]. КЦЖК могут абсорбироваться из кишечника пассивно или с помощью транспортеров монокарбоксилатов, экспрессирующихся в эпителии. Бутират является предпочтительным источником энергии для колоноцитов и потребляется локально, тогда как другие абсорбированные КЦЖК попадают в воротную вену и в основном метаболизируются в печени. Однако дистальная часть толстой кишки не входит в систему портальной вены, что увеличивает доступ КЦЖК в системное кровообращение [32]. В физиологических условиях уровень КЦЖК в периферической крови низкий (в пределах микромолярных — низких миллимолярных концентраций) вследствие их метаболизма в печени, с наибольшим распространением ацетата [22, 33, 34]. Тем не менее, диета с высоким содержанием клетчатки повышает общий уровень КЦЖК в крови с преобладанием ацетата — до 300 мкМ [35]. Более того, введение масляной кислоты в рацион или инъекции пропионата повышают уровни КЦЖК до высоких микромолярных или даже миллимолярных концентраций [36–38].

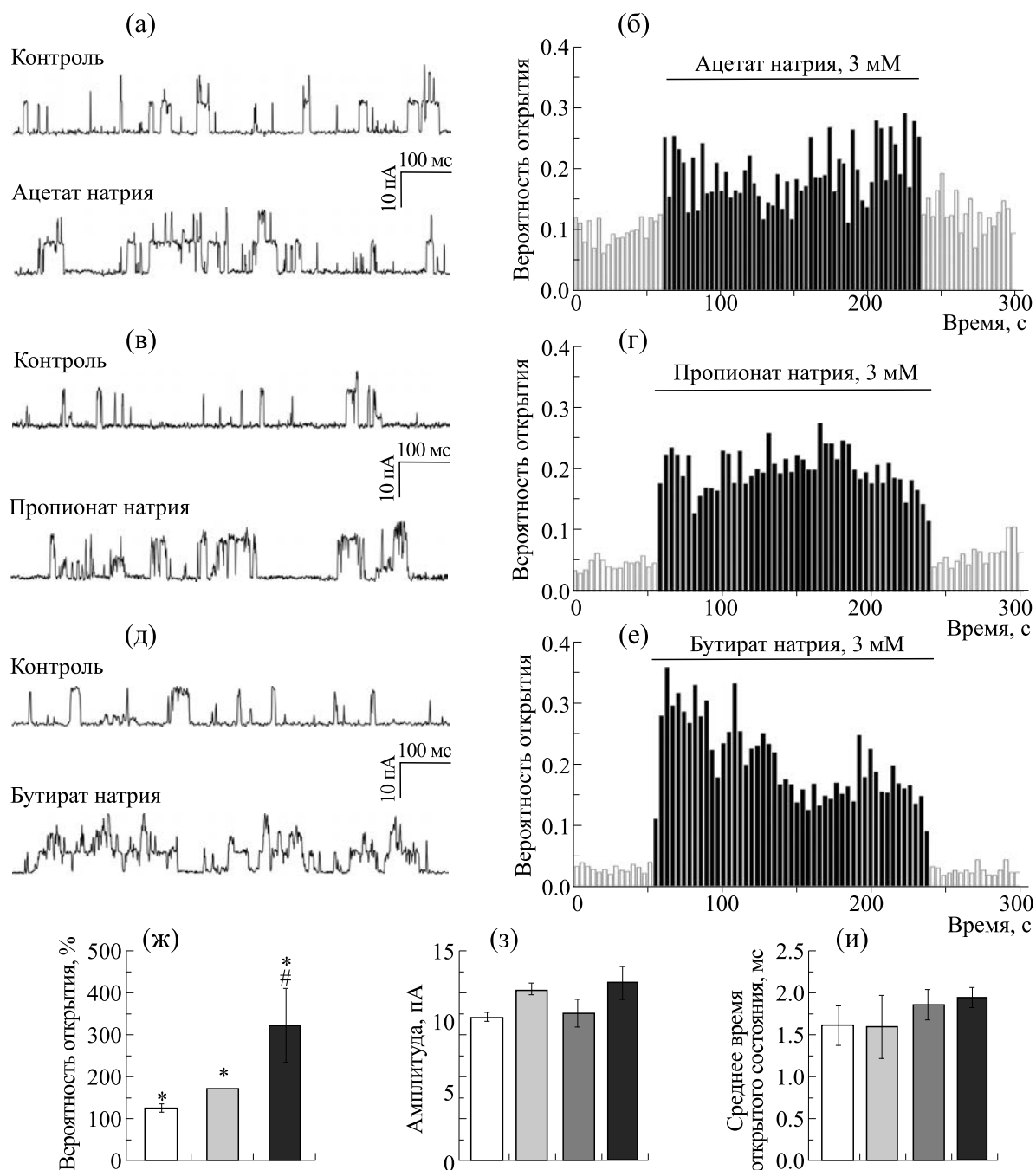


Рис. 2. Эффекты КЦЖК на активность одиночных ВК-каналов. Пример оригинальной записи активности одиночных каналов в контроле и при аппликации ацетата натрия (а), пропионата натрия (в) и бутирата натрия (д) в концентрации 3 мМ. Вероятность открытия ВК-каналов в контроле, в течение 3 мин применения ацетата натрия (б), пропионата натрия (г) и бутирата натрия (е) в концентрации 3 мМ и во время отмычки. Влияние ацетата натрия (белый столбик), пропионата натрия (серый столбик) и бутирата натрия (черный столбик) в концентрациях 3 мМ на вероятность открытия ВК-каналов (ж). За 100% принята величина P_o в контроле. Амплитуда (з) и среднее время открытого состояния (и) ВК-каналов в контроле (белый столбик) и при действии ацетата натрия (серый столбик), пропионата натрия (темно-серый столбик) и бутирата натрия (черный столбик) в концентрациях 3 мМ. *— $p < 0.05$ относительно контроля, # — $p < 0.05$ относительно эффектов ацетата натрия и бутирата натрия.

Транспортеры монокарбоксилатов экспрессируются и в гематоэнцефалическом барьере [39], поэтому ацетат и другие КЦЖК, проникая в мозг,

могут влиять на работу центральной нервной системы, регулируя экспрессию генов, повышая уровень нейротрофического фактора мозга, ней-

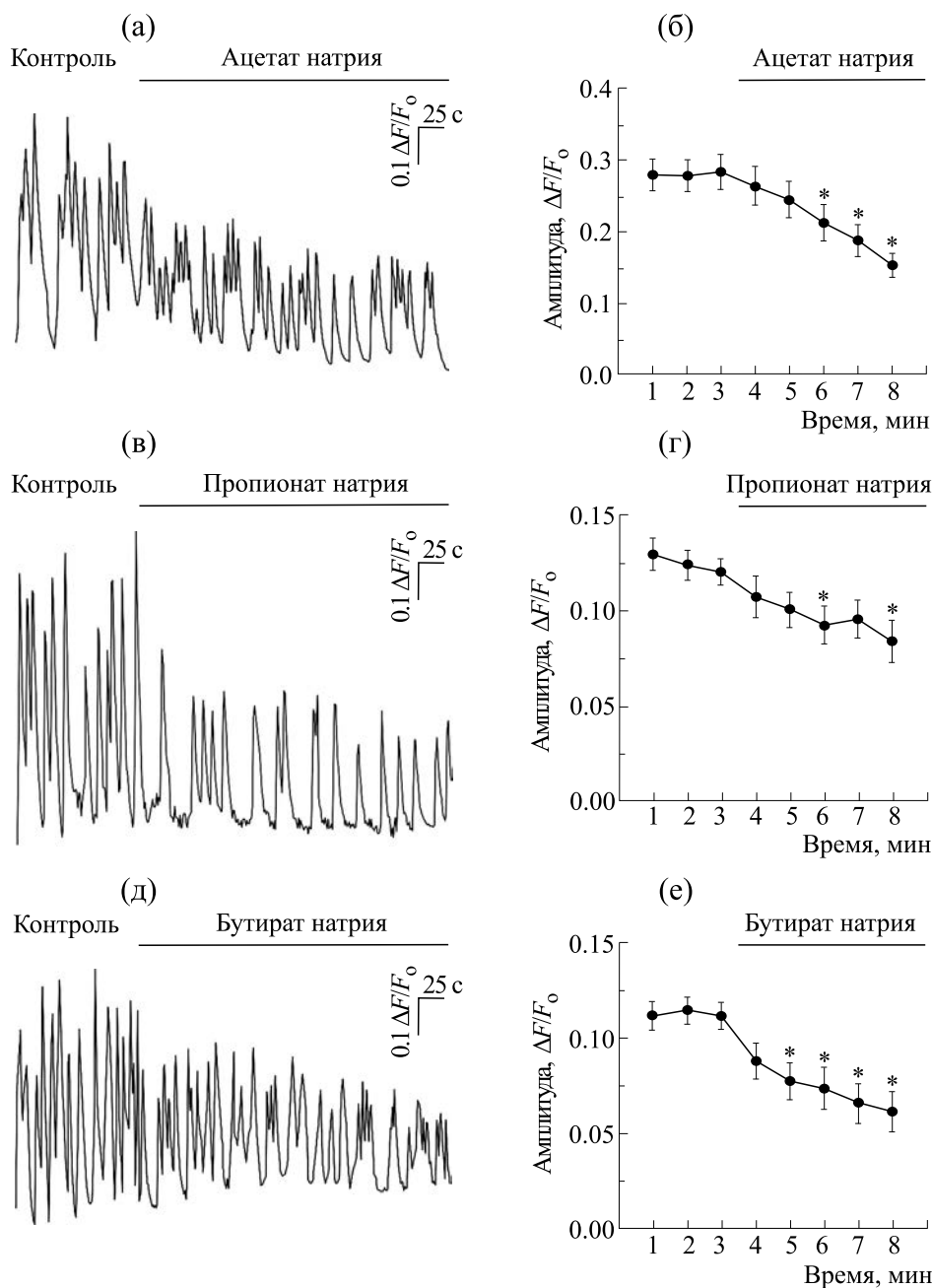


Рис. 3. Эффекты КЦЖК на Ca^{2+} -осцилляции в GH3-клетках. Примеры колебаний свечения флуоресцентного красителя в GH3-клетках в контроле и при действии ацетата натрия (а), пропионата натрия (в) и бутирата натрия (д). Изменение амплитуды Ca^{2+} -осцилляций GH3-клеток в контроле и на фоне аппликации КЦЖК: ацетата натрия (б), пропионата натрия (г) и бутирата натрия (е). * — $p < 0.05$ относительно контроля.

рогенез, синтез и высвобождение нейромедиаторов и нейропептидов [40–42]. Независимо от бактериального метаболизма этанол является источником уксусной кислоты, которая высвобождается в кровеносное русло, и может влиять на различные органы и ткани, включая мозг, при хроническом приеме алкоголя ее концентрации могут увеличиваться до 0.5 мМ [43–45]. Среди известных клеточных механизмов действия

КЦЖК — рецепторы жирных кислот GPR41, GPR43 и GPR109a, однако агонисты этих рецепторов не всегда имитируют эффекты КЦЖК, а антагонисты не предотвращают их действие [46].

ВК-каналы широко распространены в различных тканях, включая нейрональные и гладкомышечные клетки, играют важную роль в регуляции электрической возбудимости, генерации потен-

циалов действия, секреции медиаторов/гормонов или регуляции входящего Ca^{2+} -тока по принципу отрицательной обратной связи [47–51]. Было показано, что уксусная кислота усиливает выходящие K^+ -токи, активируя ВК-каналы в гладкомышечных клетках детрузора морской свинки [26]. В нашей работе мы использовали натриевые соли КЦЖК, которые в концентрации 1, 3 и 5 мМ вызывали повышением амплитуды выходящих K^+ -токов в ГНЗ-клетках. Поскольку ГНЗ-клетки характеризуются высокой экспрессией ВК-каналов, было предположено, что усиление выходящих K^+ -токов связано с активацией ВК-каналов. Действительно, эффекты КЦЖК предотвращались тетраэтиламмонием (1 мМ), который в низких концентрациях является ингибитором ВК-каналов [28].

Активация ВК-каналов зависит от потенциала мембраны и уровня внутриклеточного Ca^{2+} . В энтеральных нейронах бутират натрия вызывал гиперполяризацию мембраны, что блокировалось харибдотоксином, ингибитором ВК-каналов [23, 24]. Авторами было предположено, что этот эффект связан с повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} , однако надо отметить, что в данных работах использовались сверхвысокие концентрации бутирата натрия (50 мМ и более) [23–25]. Усиление активности ВК-каналов в результате высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо вследствие активации G-белок-ассоциированных рецепторов в гладкомышечных клетках брыжеечной артерии было показано и для пропионата натрия в концентрации 25 мМ [14].

Для выявления прямых эффектов КЦЖК на ВК-каналы мы анализировали их влияние на активность каналов в условиях регистрации *outside-out*. Ацетат, пропионат и бутират натрия в концентрации 3 мМ вызывали резкое и значительное повышение вероятности открытия ВК-каналов уже в первые секунды аппликации, эффект сохранялся в течение 3 мин подачи вещества и переставал проявляться при подаче контрольного раствора. Наиболее эффективным действием обладал бутират натрия, который в первую минуту аппликации увеличивал P_o в три раза. КЦЖК при этом не изменяли амплитудно-временные характеристики работы одиночных каналов. Полученные данные впервые указывают на прямые эффекты КЦЖК на ВК-каналы, активация которых будет приводить к гиперполяризации мембраны и/или уменьшению длительности потенциала действия. Эти эффекты могут лежать в основе угнетающего влияния КЦЖК на двигательную активность кишечника, продемонстрированные в ряде исследований [10, 52]. Нами недавно было показано, что КЦЖК, действуя на гладкомышечные клетки и на энтеральные нейроны, вызывают

дозозависимое угнетение спонтанной и вызванной карбахолином сократительной активности препаратов толстой кишки мыши [12, 53]. В нейронах гиппокампа представитель КЦЖК ацетат натрия гиперполяризовал мембрану и снижал частоту потенциалов действия [54].

ГНЗ-клетки по своему происхождению относятся к клеткам переднего гипофиза — соматотрофам, выделяющим гормон роста и пролактин, и характеризуются наличием Ca^{2+} -осцилляций, возникающих вследствие спонтанных потенциалов действия и входа Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы, а активность ВК-каналов в зависимости от локализации определяет как поддержание спонтанной активности, так и ее прекращение [55]. Нами выявлены прямые эффекты КЦЖК на ВК-каналы, значительное усиление активности которых будет приводить в гиперполяризации и инактивации потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов и, соответственно, прекращению Ca^{2+} -осцилляций [56, 57].

Активация ВК-каналов и снижение Ca^{2+} -осцилляций в передней доле гипофиза будет приводить к нарушению высвобождения гормона роста и инсулин-подобного фактора, которые оказывают влияние не только на рост и развитие потомства, но также вовлечены в регуляцию когнитивных функций и нейропротекцию при патологиях нервной системы [58–60].

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате нашего исследования было показано, что соли КЦЖК — ацетат натрия, пропионат натрия и бутират натрия вызывают дозозависимое повышение амплитуды выходящих калиевых токов в культуре ГНЗ-клеток гипофиза крысы. Этот эффект предотвращался тетраэтиламмонием в концентрации 1 мМ, что указывает на участие Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой проводимости. Действительно, в условиях патч-кламп регистрации одиночных ВК-каналов в конфигурации *outside-out* КЦЖК повышали вероятность открытия без изменения амплитуды и среднего времени открытого состояния. Усиление калиевой проводимости при действии КЦЖК может опосредовать их эффекты в различных возбудимых структурах, такие как снижение сократимости гладкомышечных клеток кишечника [12, 53], расслабление сосудов, гиперполяризацию нейронов в периферической и центральной нервной системе, снижение высвобождения гормонов и нейромедиаторов [23, 24, 50, 51, 54]. Угнетение частоты и амплитуды Ca^{2+} -осцилляций в ГНЗ-клетках гипофиза, ответственных за спонтанное высвобождение гормона роста, будет приводить к нарушению регуляции

процессов роста, развития и функциональной пластичности мозга как в пре-, так и постнатальном онтогенезе [58–60].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-20045).

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. G. Den Besten, K. Van Eunen, A. K. Groen, et al., *J. Lipid Res.*, **54**, 2325 (2013).
2. S. Deleu, K. Machiels, J. Raes, et al., *EBioMedicine*, **66**, 103293 (2021).
3. E. Hosseini, C. Grootaert, W. Verstraete, and T. Van de Wiele, *Nutr. Rev.*, **69**, 245 (2011).
4. D. P. Venegas, M. K. De La Fuente, G. Landskron, et al., *Front. Immunol.*, **10**, 277 (2019).
5. E. Stachowska, M. Wiśniewska, A. Dzieżyc, and A. Bohatyrewicz, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **25**, 4570 (2021).
6. D. L. Topping and P. M. Clifton, *Physiol. Rev.*, **81**, 1031 (2001).
7. S. Fukuda, H. Toh, K. Hase, et al., *Nature*, **469**, 543 (2011).
8. A. L. Kau, P. P. Ahern, N. W. Griffin, et al., *Nature*, **474**, 327 (2011).
9. K. M. Maslowski, A. T. Vieira, A. Ng, et al., *Nature*, **461**, 1282 (2009).
10. N. R. Hurst, D. M. Kendig, K. S. Murthy, and J. R. Grider, *Neurogastroenterol. Motil.*, **26**, 1586 (2014).
11. E. Suply, P. de Vries, R. Soret, et al., *Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol.*, **302**, G1373 (2012).
12. I. F. Shaidullov, D. M. Sorokina, F. G. Sitdikov, et al., *BMC Gastroenterol.*, **21**, 1 (2021).
13. F. Fan, Y. Chen, Z. Chen, et al., *Mol. Pain.*, **17** (2021).
14. W. Zhang, X. Feng, Y. Zhang, et al., *J. Cell. Mol. Med.*, **24**, 3192 (2020).
15. N. Natarajan and J. L. Pluznick, *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.*, **307**, C979 (2014).
16. J. L. Pluznick, *Gut Microbes.*, **5**, 202 (2013).
17. N. Natarajan, D. Hori, S. Flavahan, et al., *Physiol. Genomics*, **48**, 826 (2016).
18. S. Kim, R. Goel, A. Kumar, et al., *Clin. Sci.*, **132**, 701 (2018).
19. F. Z. Marques, E. Nelson, P. Y. Chu, et al., *Circulation*, **135**, 964 (2017).
20. W. H. Oldendorf, *Am. J. Physiol.*, **224**, 1450 (1973).
21. Y. P. Silva, A. Bernardi, and R. L. Frozza, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **11**, 25 (2020).
22. B. Dalile, L. Van Oudenhove, B. Vervliet, and K. Verbeke, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 461 (2019).
23. G. Haschke, H. Schäfer, and M. Diener, *Neurogastroenterol. Motil.*, **14**, 133 (2002).
24. S. A. Hamodeh, M. Rehn, G. Haschke, and M. Diener, *Neurogastroenterol. Motil.*, **16**, 597 (2004).
25. R. Nitschke, N. Benning, S. Ricken, et al., *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **434**, 466 (1997).
26. S. Ghatta, I. Lozinskaya, Z. Lin, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **563**, 203 (2007).
27. G. F. Sitdikova, T. M. Weiger, and A. Hermann, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **459**, 389 (2010).
28. K. D. Thornbury, S. M. Ward, and K. M. Sanders, *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.*, **263** (1992).
29. E. Distrutti, L. Monaldi, P. Ricci, and S. Fiorucci, *World J. Gastroenterol.*, **22**, 2219 (2016).
30. J. H. Cummings and G. T. Macfarlane, *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 443 (1991).
31. J. Fernandes, W. Su, S. Rahat-Rozenbloom, et al., *Nutr. Diabetes*, **4**, e121 (2014).
32. D. F. MacFabe, *Microb. Ecol. Heal. Dis.*, **26** (2015).
33. J. H. Cummings, E. W. Pomare, H. W. J. Branch, et al., *Gut*, **28**, 1221 (1987).
34. S. G. Peters, E. W. Pomare, and C. A. Fisher, *Gut*, **33**, 1249 (1992).
35. A. N. Thorburn, C. I. McKenzie, S. Shen, et al., *Nat. Commun.*, **6**, 7320 (2015).
36. M. J. Edelman, K. Bauer, S. Khanwani, et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **51**, 439 (2003).
37. I. Kimura, D. Inoue, T. Maeda, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8030 (2011).
38. Z. Jirsova, M. Heczkova, H. Dankova, et al., *Biomed Res. Int.*, **2019**, ID 7084734 (2019).
39. N. Vijay and M. Morris, *Curr. Pharm. Des.*, **20**, 1487 (2014).
40. G. Frost, M. L. Sleeth, M. Sahuri-Arisoylu, et al., *Nat. Commun.*, **5**, ID 3611 (2014).
41. V. Braniste, M. Al-Asmakh, C. Kowal, et al., *Sci. Transl. Med.*, **6**, 263ra158 (2014), DOI: 10.1126/scitranslmed.3009759
42. R. Mirzaei, B. Bouzari, S. R. Hosseini-Fard, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **139**, 111661 (2021).
43. H. Nuutinen, K. Lindros, P. Hekali, and M. Salaspuro, *Alcohol*, **2**, 623 (1985).
44. R. A. Wanievski and D. L. Martin, *J. Neurosci.*, **18**, 5225 (1998).
45. D. K. Deelchand, A. A. Shestov, D. M. Koski, et al., *Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol.*, **315**, G53 (2018).

46. H. Berkefeld, B. Fakler, and U. Schulte, *Physiol. Rev.*, **90**, 1437 (2010).
47. A. Hermann, G. F. Sitdikova, and T. M. Weiger, *Biomolecules*, **5**, 1870 (2015).
48. И.Ф. Шайдуллов, М.У. Шафигуллин, Д.М. Габитова и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **54** (5), 355 (2018).
49. A. N. Mustafina, A. V. Yakovlev, A. S. Gaifullina, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **465**, 825 (2015).
50. A. S. Gaifullina, A. V. Yakovlev, A. N. Mustafina, et al., *FEBS Lett.*, **590**, 3375 (2016).
51. N. B. Dass, A. K. John, A. K. Bassil, et al., *Neurogastroenterol. Motil.*, **19**, 66 (2007).
52. И. Ф. Шайдуллов, Н. Н. Хаертдинов, Д. Н. Шарфутдинова и др., *Уч. записки КГВАМ им. Н.Э. Баумана*, **249** (1), 240 (2022).
53. N. Cullen and P. L. Carten, *Brain Res.*, **588**, 49 (1992).
54. S. S. Stojilkovic, J. Tabak, and R. Bertram, *Endocr. Rev.*, **31**, 845 (2010).
55. I. Shaidullov, E. Ermakova, A. Gaifullina, et al., *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **473**, 67 (2021).
56. M. N. Yoon, M. J. Kim, H. S. Koong, D. K. Kim, S. H. Kim, H. S. Park, *Alcohol.*, **63**, 53 (2017).
57. V. Andreu-Fernández, A. Bastons-Compta, E. Navarro-Tapia, et al., *Sci. Rep.*, **9** (1), 1562 (2019).
58. N. D. Åberg, K. G. Brywe, and J. Isgaard, *Sci. World J.*, **6**, 53 (2006).
59. F. Nyberg and M. Hallberg, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **9**, 357 (2013).

Salts of Short-Chain Fatty Acids Increase the Activity of the Large Conductance, Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels and Reduce Calcium Oscillations in Rat GH3 Cells

I.F. Shaidullov*, E.V. Ermakova*, D.M. Sorokina*, O.V. Yakovleva*, and G.F. Sitdikova*

**Kazan (Volga region) Federal University, Kremlevskaya ul., 18, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia*

The short-chain fatty acids such as acetic, propionic and butyric acids are microbiota metabolites that can exert a series of physiological effects both in the intestine and other organs, including the central nervous system. The present work aimed to examine the effects of sodium acetate, propionate, and butyrate on the activity of large conductance Ca^{2+} activated K^{+} channels and calcium oscillations in rat pituitary GH3 cells. It has been shown that fatty acids under study cause a dose-dependent increase in the amplitude of total outward potassium currents and these effects are prevented by tetraethylammonium, a Ca^{2+} activated K^{+} channel blocker, indicating the involvement of Ca^{2+} activated K^{+} channels in the effects of fatty acids. It is worthy of note that fatty acids increased open probability of single channels with no changes in the amplitude and the mean channel open time. In addition, fatty acids were associated with a significant reduction in the amplitude and frequency of Ca^{2+} oscillations in GH3 cells. An increase in potassium conductance and a decrease in the intracellular Ca^{2+} level can mediate the effects of short-chain fatty acids in various excitable structures, such as a relaxation of intestinal and vascular smooth muscle cells, hyperpolarization of neurons, and the regulation of hormone and neurotransmitter release.

Keywords: short-chain fatty acids, large conductance Ca^{2+} activated K^{+} channels, GH3 cells, calcium oscillations

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМЫ ОКСИДАТИВНОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АЗО- И ПЕРОКСИДНОГО ИНИЦИАТОРА

© 2023 г. Е.М. Соколова*, Н.А. Дубенская**, Б.Л. Психа*, Н.И. Нешев*,#

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

**Факультет фундаментальной физико-химической инженерии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991

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

Поступила в редакцию 26.12.2022 г.

После доработки 06.02.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

В широком диапазоне концентраций изучена кинетика оксидативного гемолиза 0.2%-й суспензии эритроцитов мыши под действием радикалообразующих инициаторов 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида и *трет*-бутилгидропероксида. Гемолиз эритроцитов протекал при активации пероксидного окисления липидов в мембранах эритроцитов. При этом в случае *трет*-бутилгидропероксида оксидативные процессы развивались также и в растворимой части клетки, приводя к образованию нерастворимых агрегатов гемоглобина. Период индукции гемолиза (время достижения 10%-го гемолиза) под действием 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида убывает обратно пропорционально квадратному корню от концентрации инициатора, что согласуется с классической теорией радикально-цепного окисления углеводов. В случае *трет*-бутилгидропероксида данная закономерность не соблюдается. В качестве инициатора пероксидного окисления липидов в эритроцитарной модели тестирования природных и синтетических соединений на антиоксидантную активность предпочтительнее использовать 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, оксидативный гемолиз, пероксидное окисление липидов.

DOI: 10.31857/S0006302923040099, EDN: KLALFM

В рамках широкого исследовательского направления, берущего свое начало с пионерских работ Б.Н. Тарусова и Н.М. Эмануэля в 50-х годах прошлого века и получивших впоследствии широкое развитие в исследованиях Е.Б. Бурлаковой, были заложены представления о фармакологических перспективах природных и синтетических ингибиторов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) – биоантиоксидантов [1]. Поиск и исследование веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, и последующая разработка на их основе фармакологических препаратов до настоящего времени продолжает оставаться одним из базовых направлений химической биологии и медицинской химии. Это обуславливает актуальность и практическую значимость разработки биологических моделей, на которых осуществляется тестирование новых соединений на антиок-

сидантную активность. Широкое распространение получило использование для этой цели модели индуцированного оксидативного гемолиза эритроцитов [2]. В качестве индукторов гемолиза используют известные в химии полимеров азо- и пероксидные инициаторы радикальной полимеризации [3]. При этом механизмы взаимодействия указанных инициаторов с эритроцитом как сложной биологической системой клеточного уровня остаются до конца не изученными, что затрудняет анализ результатов экспериментальных исследований в данной области.

Целью работы было изучение кинетических закономерностей и физико-химических механизмов оксидативного гемолиза эритроцитов под действием инициаторов пероксидного окисления липидов, 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида (AAPH), относящегося к классу азосоединений, и *трет*-бутилгидропероксида (*t*-BuOOH) из класса органических пероксидов.

Сокращения: ПОЛ – пероксидное окисление липидов, AAPH – 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, *t*-BuOOH – *трет*-бутилгидропероксид.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение эритроцитарной массы. В качестве источника крови были использованы мыши линии С 57 В1/6f (возраст 3 месяца, масса 18–20 г), полученные из питомника ФИЦ ПХФ и МХ РАН (Черноголовка Московской обл., Россия). Забор крови проводили от предварительно наркотизированной эфиром мыши посредством ее декапитации. В качестве антикоагулянта использовали 0.11 М раствор цитрата натрия. Кровь собирали в склянку, куда предварительно добавляли раствор цитрата натрия, соблюдая соотношение цитрат/кровь – 1 : 5.

Кровь центрифугировали в течение 7 мин при 1500 g. Плазму декантировали. Осадок эритроцитов осторожно ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl (0.85% NaCl, содержащий 5 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7.4). Центрифугирование повторяли троекратно. После каждого центрифугирования супернатант декантировали, осадок эритроцитов ресуспендировали в новой порции изотонического раствора NaCl. Эритроцитарную массу, полученную после последнего центрифугирования, хранили в холодильнике при 4°C не более суток.

Гемолиз эритроцитов. В гемолитических экспериментах использовали 0.2% (по объему) суспензию эритроцитов в изотоническом растворе NaCl, которую получали путем разбавления эритроцитарной массы непосредственно перед экспериментом. Эксперимент проводили при 37°C в пластиковой кювете объемом 3 мл при непрерывном слабом помешивании. За ходом гемолиза эритроцитов следили по изменению оптической плотности суспензии при длине волны 700 нм. Указанная длина волны была выбрана за пределами основной области электронного поглощения гемоглобина, в связи с чем ослабление светового потока практически полностью связано с рассеянием света на эритроцитах. Высокий уровень разбавления суспензии позволяет радикально уменьшить влияние эффекта многократного внутреннего отражения света на эритроцитах, это позволяет получить взаимосвязь между степенью гемолиза и оптической плотностью суспензии в удовлетворительном линейном приближении, что было продемонстрировано в работе [4]. Степень гемолиза суспензии (γ) определяли из соотношения:

$$\gamma = \frac{D_0 - D}{D_0 - D_{H_2O}},$$

где D_0 и D – оптические плотности контрольного и опытного образца, соответственно. D_{H_2O} – оптическая плотность образца в условиях полного лизиса всех эритроцитов дистиллированной водой. Во всех экспериментах оптическая плот-

ность контрольного образца (D_0) составляла ~0.8, что соответствовало содержанию клеток 0.2% по объему. Экспериментальные значения, характеризующие изменение степени гемолиза во времени, аппроксимировали в программе Origin сигмоидальной функцией Больцмана. В качестве количественной характеристики гемолитической активности инициаторов ПОЛ использовали величину периода индукции гемолиза, которую определяли графически по времени достижения 10% гемолиза.

Определение малонового диальдегида. Пероксидное окисление липидов мембран эритроцитов характеризовали по уровню образования малонового диальдегида по методу, описанному в работе [5], с модификациями. К 2 мл суспензии эритроцитов 1.4%-го гематокрита добавляли 1 мл 30% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем центрифугировали при 6000 g в течение 30 мин. К 2 мл супернатанта добавляли 0.5 мл раствора 0.8% тиобарбитуровой кислоты в 0.05 М NaOH и инкубировали в течение 20 мин на кипящей водяной бане. После инкубации образцы охлаждали проточной водопроводной водой и определяли оптическую плотность при 532 нм.

Определение нерастворимого гемоглобина. Кинетику образования внутри эритроцитов нерастворимого гемоглобина определяли в предварительно гемолизированных дистиллированной водой аликвотах суспензии эритроцитов по образованию рассеивающей мути при 525 нм – изобестической точке спектров основных молекулярных форм гемоглобина (Hb, HbO₂, MetHb). Содержание нерастворимого гемоглобина (НГ) оценивали по относительному увеличению оптической плотности гемолизата при 525 нм по формуле:

$$НГ = \frac{D - D_0}{D_0} = \frac{\Delta D}{D_0},$$

где D и D_0 – оптические плотности гемолизата опытного и контрольного образца суспензии эритроцитов. Экспериментальные значения $\Delta D/D_0$ аппроксимировали сигмоидной функцией Больцмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ААРН в водной среде (рис. 1) подвергается мономолекулярному разложению с образованием двух алкильных радикалов и выделением молекулярного азота. В кислородной среде алкильные радикалы вступают в быструю реакцию с кислородом с образованием пероксидных радикалов [6, 7]. Последние способны атаковать двойные связи мембранных липидов в биологических субстратах, что приводит к иницированию ПОЛ в мембране. Процесс разложения ААРН протекает с достаточной эффективностью уже при 35–40°C.

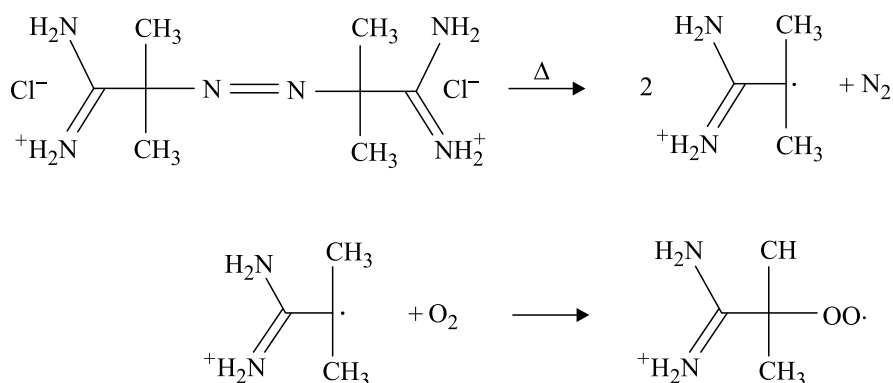


Рис. 1. Схема разложения ААРН в водной среде.

Пероксидный инициатор, *t*-BuOOH, в отличие от ААРН, не способен самопроизвольно распадаться на радикалы при физиологических температурах. Однако благодаря высоколипофильному третбутильному фрагменту *t*-BuOOH легко проникает через плазматическую мембрану внутрь клетки, запуская в ней каскад сложных реакций с каталитическим участием гемоглобина. В ходе этих процессов образуются радикальные продукты, инициирующие оксидативное повреждение клеточных структур [8].

На рис. 2а показаны кинетические кривые гемолиза 0.2%-й суспензии эритроцитов мыши при различных концентрациях ААРН в пределах концентрационного диапазона 10^{-3} – 10^{-2} М. Нижней границей исследованного диапазона концентраций ААРН была концентрация $2 \cdot 10^{-3}$ М. Более низкие концентрации ААРН не исследовались, так как им соответствовали слишком большие периоды индукции гемолиза, пре-

вышающие время стабильности контрольной суспензии эритроцитов. На рис. 2б показана взаимосвязь периода индукции гемолиза с концентрацией ААРН. Если полагать, что гемолиз эритроцита наступает при достижении некоторой пороговой концентрации продуктов ПОЛ в мембране ($[P]_0$) и считать скорость окисления (W_0) постоянной, то значение пороговой концентрации продуктов окисления будет $[P]_0 = W_0 \cdot I_{10}$, откуда $I_{10} = [P]_0 / W_0$. Согласно теории радикально-цепного окисления углеводородов в отсутствие антиоксидантов скорость окисления W_0 должна быть пропорциональной корню квадратному из скорости инициирования. С учетом того, что распад ААРН происходит мономолекулярно, скорость окисления можно считать примерно равной концентрации инициатора, то есть $W_0 \sim C^{0.5}$ и, соответственно, $I_{10} \sim C \cdot I_{10} \approx C^{-0.5}$. Таким образом, взаимосвязь между периодом ин-

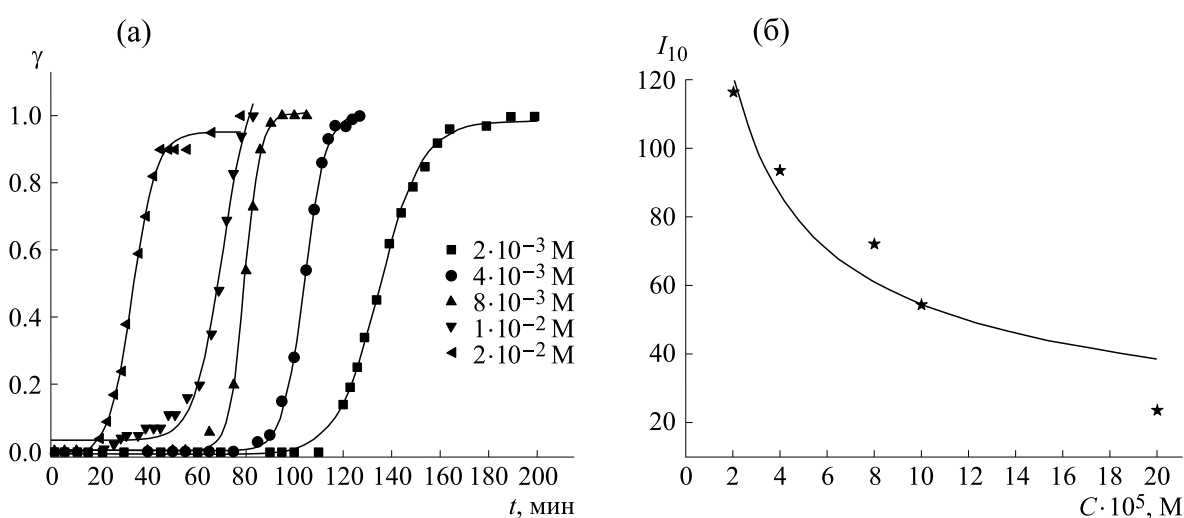


Рис. 2. (а) — Кинетика гемолиза эритроцитов под действием различных концентраций ААРН; (б) — взаимосвязь периода индукции гемолиза с концентрацией ААРН.

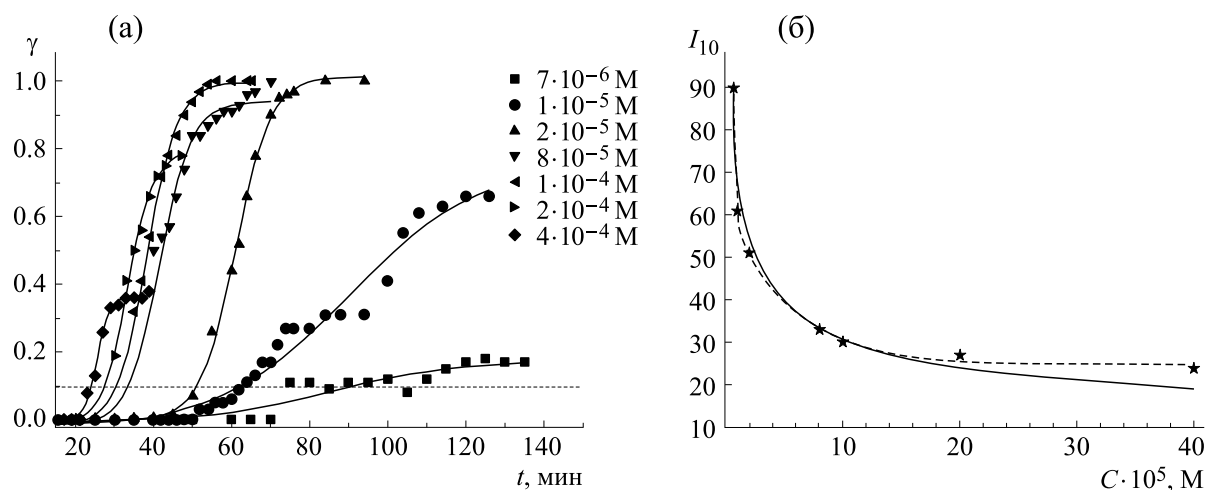


Рис. 3. (а) — Кинетика гемолиза эритроцитов под действием различных концентраций t -BuOOH; (б) — взаимосвязь периода индукции гемолиза с концентрацией t -BuOOH.

дукции гемолиза и концентрацией инициатора должна описываться убывающей степенной функции вида $I_{10} = AC^{-b}$, где $b = -0,5$. Программа Origin дает нам для экспериментальных значений периодов индукции гемолиза на рис. 2, аппроксимирующую кривую, описываемую уравнением $I_{10} = 173 \cdot C^{-0,5}$. Как мы видим, значение показателя степени идеально совпадает с теоретически ожидаемым значением. Таким образом, период индукции гемолиза убывает обратно пропорционально корню квадратному от концентрации ААРН.

На рис. 3а показаны кинетические кривые гемолиза эритроцитов под действием различных концентраций t -BuOOH. Как и в случае с ААРН, гемолитическое действие t -BuOOH является концентрационнозависимым. Аппроксимация экспериментальных значений I_{10} степенной функцией вида $I_{10} = AC^{-b}$ (рис. 3б, сплошная линия) дает значение $b = -0,36$, отклоняющееся от теоретически ожидаемого. Как мы видим, в этом случае убывание периода индукции гемолиза происходит медленнее, приближаясь к обратно пропорциональной зависимости от корня кубического из концентрации инициатора.

В целом сравнение графиков на рис. 2б и 3б выявляет во втором случае характерный тренд к выходу зависимости на плато, что видно по отклонению двух последних точек от аппроксимирующего графика. При этом как раз данным точкам соответствуют кинетические кривые, для которых наблюдалась более ранняя остановка гемолиза, когда часть клеток в системе оставались не разрушенными (рис 3а). Это может прямо указывать на возможное присутствие в системе с t -BuOOH дополнительного фактора, который

тормозит гемолиз. Об этом свидетельствуют также результаты дополнительного анализа экспериментальных результатов на рис. 3б, который формально не связан с теорией радикально-цепного окисления. Значения периодов индукции гемолиза на рис. 3б с высоким приближением (средняя ошибка аппроксимации — 1,44%) удается аппроксимировать биэкспоненциальной функцией

вида $y = A_1 e^{-k_1 C} + A_2 e^{-k_2 C} + y_0$. Результат аппроксимации показан штрихпунктирной линией. Такой характер зависимости может указывать на возможное присутствие в системе двух различных факторов, влияющих на гемолиз.

Хотя в целом окислительные процессы в клетке могут затрагивать различные субстраты и протекать по различным механизмам, их неизменной составляющей является пероксидное окисление липидов мембран. В первую очередь это связано с высокой чувствительностью липидного субстрата к радикальной атаке, а также с цепным самоподдерживающимся характером процесса ПОЛ. Общеизвестным химическим маркером, с помощью которого принято количественно характеризовать уровень ПОЛ в биосубстратах, является образующийся в ходе ПОЛ малоновый диальдегид. Уровень малонового диальдегида оценивали по увеличению оптической плотности при 532 нм. На рис. 4 показан прирост оптического поглощения ΔA_{532} в зависимости от концентрации ААРН (рис. 4а) и t -BuOOH (рис. 4б). Обращает на себя внимание, что ААРН и t -BuOOH действуют в разных концентрационных диапазонах, различающихся примерно на два порядка. При этом в случае с ААРН нарастание уровня малонового диальдегида с ростом концентрации идет практически линейно, тогда как в случае t -BuOOH зависимость быстро выходит на стац-

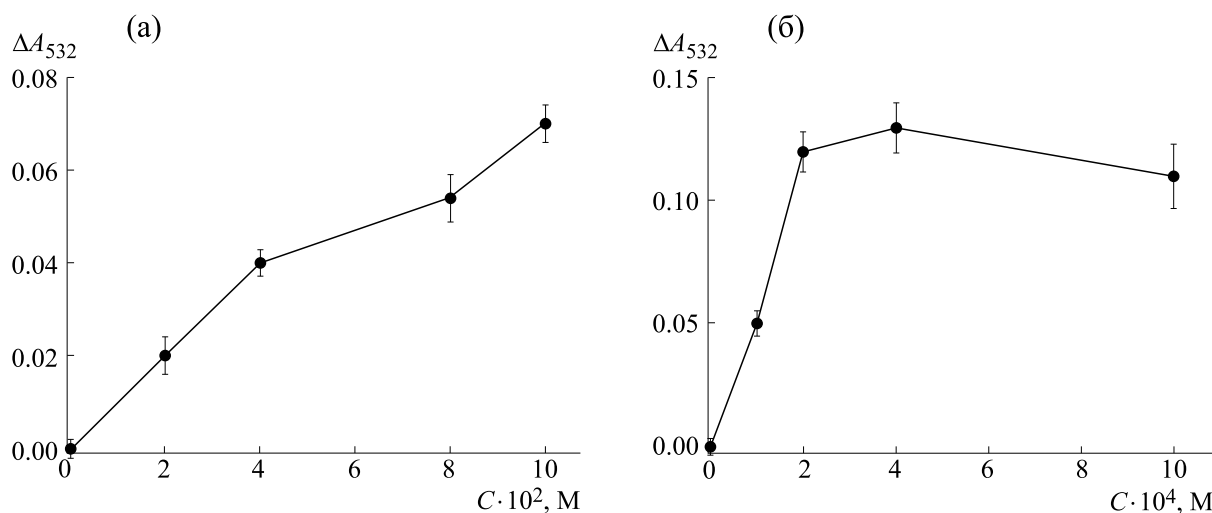


Рис. 4. Образование малонового диальдегида в суспензии эритроцитов под действием ААРН (а) и *t*-BuOOH (б). Содержание эритроцитов – 1.4 об. %; время инкубации – 30 мин; $t = 37^\circ C$.

онарный уровень. Последнее согласуется с имеющимися литературными данными [8].

В то же время анализ содержимого растворимой части клетки позволил обнаружить существенное различие в действии ААРН и *t*-BuOOH. На рис. 5 показано относительное увеличение оптической плотности гемолизата эритроцитов при 525 нм с ростом концентрации исследуемых инициаторов. Длина волны в 525 нм является изобеситической точкой для спектров электронного поглощения присутствующих в системе молекулярных форм гемоглобина. По этой причине увеличение оптической плотности в данной области связано с появлением в системе рассеивающих свет агрегатов гемоглобина, о возможности

образования которых свидетельствуют литературные данные [8, 9]. Как видно из рисунка, под действием *t*-BuOOH в системе наблюдается резкое увеличение рассеивающих свет агрегатов гемоглобина.

Полученные нами результаты показывают, что, хотя оба изученных инициатора способны активировать ПОЛ в мембранах эритроцитов, их гемолитическое действие имеет существенные различия. Как показал проведенный выше анализ, в случае гемолиза эритроцитов под действием ААРН период индукции гемолиза был обратно пропорционален квадратному корню из концентрации ААРН. Это согласуется с положением классической теории радикально-цепного окис-

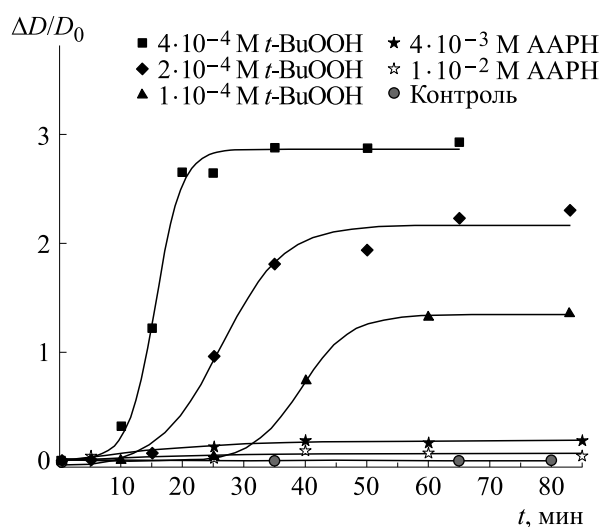
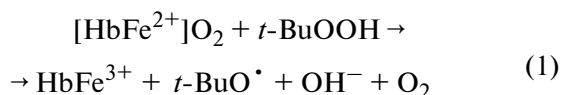


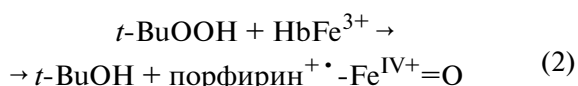
Рис. 5. Образование нерастворимых агрегатов гемоглобина под действием *t*-BuOOH и ААРН.

ления органических субстратов. Молекулярной основой гемолиза в данном случае является развивающийся в мембране процесс ПОЛ.

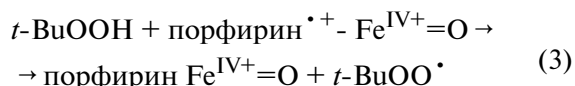
Иначе обстоит дело в случае *t*-BuOOH. Его действие на эритроцит, как свидетельствуют литературные данные, включает ряд различных механизмов [10,11]. Центральной реакцией является взаимодействие *трет*-бутилгидропероксида с двухвалентным железом оксигемоглобина, с образованием алкоксильного радикала и метгемоглобина. Эта реакция аналогична реакции Фентона:



По мере накопления трехвалентного железа на гемоглобине оно может вступать во взаимодействие с новой молекулой *t*-BuOOH:



В этой реакции происходит двухэлектронное восстановление гидропероксида в спирт с образованием высокореакционной формы гемоглобина — оксоферрила (со степенью окисления железа +4). Эта реакция является проявлением пероксидазной активности гемоглобина [12]. Образующаяся в ней структура, катион-радикал оксоферрил-порфирина, аналогична соединению I в классическом цикле пероксидазы. Помимо сверхокисленного гемового железа она имеет неспаренный электрон на периферии порфиринового цикла. Помимо запуска цепного процесса ПОЛ липидов, эта реакционноспособная молекула может отрывать водород от второй молекулы *t*-BuOOH с образованием пероксидного радикала:



Таким образом, в системе образуются по крайней мере два типа радикалов, происходящих из *трет*-бутилгидропероксида: алкоксильный радикал — *t*-BuO[•] (1) и пероксидный радикал — *t*-BuOO[•] (3), которые способны индуцировать ПОЛ в мембране. Плюс к этому образуется катион-радикал оксоферрил-порфирина (2), который способен сам по себе индуцировать ПОЛ [13]. Последний способен также к окислительному взаимодействию с полипептидными цепями соседних молекул гемоглобина, в результате которого неспаренный электрон переходит с порфиринового цикла на боковые фрагменты аминокислот, приводя к образованию долгоживущих радикалов на полипептидных цепях гемоглобина, регистрируемых методом ЭПР [14]. Можно ожидать, что результатом рекомбинации этих радикалов может быть возникновение сшивок между со-

седними молекулами гемоглобина с образованием нерастворимых агрегатов, которые мы наблюдаем в эксперименте. Снижающаяся при этом концентрация растворимого гемоглобина может приводить к уменьшению осмотического давления внутри клетки, что будет снижать скорость поступления воды в клетку. Последнее может быть причиной наблюдаемого в наших экспериментах торможения процесса гемолиза.

Полученные в данной работе результаты согласуются с представлением, что в случае с ААРН основной радикальной формой является образующийся при разложении ААРН в водной среде пероксидный радикал, который атакует клетку снаружи. При этом развивающийся процесс ПОЛ ограничивается областью эритроцитарной мембраны. В то же время под действием *t*-BuOOH, помимо процесса ПОЛ в мембране, окислительные процессы развиваются также в растворимой части клетки. Это не кажется удивительным, так как сам процесс образования радикальных форм связан с гемоглобином, т. е. происходит внутри клетки. В соответствии с этим чисто физическая очередность взаимодействия радикалов с субстратами в эритроците оказывается обратной: вначале модификации подвергается внутриклеточное содержимое и только вслед за этим наступает очередь мембраны. Это делает систему более сложной. Так, в случае с *t*-BuOOH снижение концентрации растворимого гемоглобина приводит к появлению дополнительного фактора, влияющего на осмотическое равновесие клетки, что приводит к торможению процесса гемолиза. В связи с этим ААРН выглядит более предпочтительно в качестве инициатора ПОЛ в эритроцитарной модели тестирования природных и синтетических соединений на антиоксидантную активность.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания (Регистрационный № АААА-А19-119071890015-6).

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. Е. Б. Бурлакова, Успехи химии, **44** (10), 1871 (1975).

2. О. Г. Шевченко и Л. Н. Шишкина, Успехи соврем. биологии, **134** (2), 133 (2014).
3. Ю. Д. Семчиков, *Высокомолекулярные соединения* (Издательский центр «Академия», М., 2010).
4. J. D. Young, L. G. Leong, M. A. DiNome, and Z. A. Cohn, *Anal. Biochem.*, **154** (2), 649 (1986).
5. J. Stocks and T. L. Dormandy, *Br. J. Haematol.*, **20**, 95 (1971).
6. R. U. R. Wahl, L. Zeng, S. A. Madison, et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2009 (1998).
7. C. López-Alarcón, E. Fuentes-Lemus, J. D. Figueroa, et al., *Free Rad. Biol. Med.*, **160**, 78 (2020).
8. B. Deuticke, K. B. Heller, and C. W. Haest, *Biochim. Biophys Acta*, **854**, 169 (1986).
9. R. J. Trotta, S. G. Sullivan, and A. Stern, *Biochem. J.*, **204**, 405 (1982).
10. А. В. Доманский, Е. А. Лапшина, И. Б. Заводник, *Биохимия*, **70** (7), 922 (2005).
11. J. Van der Zee, D. P. Barr, and R. P. Mason, *Free Radic. Biol. Med.*, **20** (2), 199 (1996).
12. A. I. Alayash and M. T. Wilson, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 910795 (2022).
13. О. В. Космачевская и А. Ф. Топунов, *Прикл. биох. микробиол.*, **45** (6), 627 (2009).
14. D. A. Svistunenko, R. P. Patel, S. V. Voloshchenko, and M. T. Wilson, *J. Biol. Chem.*, **272** (11), 7114 (1997).

Kinetics and Mechanisms of Oxidative Hemolysis of Erythrocytes in the Presence of Azo- and Peroxide Initiator

E.M. Sokolova*, N.A. Dubenskaia**, B.L. Psikha*, and N.I. Neshev*

*Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Semenova 1, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

**Faculty of Fundamental Physical and Chemical Engineering, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1, Moscow, 119991 Russia

The kinetics of oxidative hemolysis of a 0.2% suspension of mouse erythrocytes in the presence of radical-forming initiators, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride and *tert*-butyl hydroperoxide, was studied over a wide range of concentrations. Hemolysis of erythrocytes proceeded with the activation of lipid peroxidation in erythrocyte membranes. In the case of *tert*-butyl hydroperoxide, oxidative processes also developed in the soluble part of the cell, leading to the formation of insoluble hemoglobin aggregates. An induction period of hemolysis (the time period required to reach 10% hemolysis) in the presence of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride decreases inversely proportional to the square root of the initiator concentration, that is in accord with the classical theory of radical chain oxidation of hydrocarbons. In the case of *tert*-butyl hydroperoxide, this association was not found. The use of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride as a lipid peroxidation initiator is preferred in the erythrocyte model for testing natural and synthetic compounds for antioxidant activity.

Keywords: erythrocytes, hemoglobin, oxidative hemolysis, lipid peroxidation

К ВОПРОСУ О РОЛИ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧЕ. ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТЬ МЕТАБОЛИЗМА АТФ

© 2023 г. А.Е. Хайруллин*, **, #, Д.В. Ефимова*, Д.В. Иванова*, С.Н. Гришин*, А.У. Зиганшин*

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

**Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия

#E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.05.2023 г.

После доработки 23.05.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

АТФ как посредник в нервно-мышечном синапсе может высвобождаться путем квантовой и не-квантовой секреции из мотонейронов центральной и периферической нервной системы вместе с основным нейромедиатором — ацетилхолином. Последовательное гидролитическое дефосфорилирование АТФ до аденозина в синаптической щели — это каскад реакций, катализируемый эктонуклеотидазами. Большой интерес представляет изучение вклада этих ферментов в сложный сигнальный каскад, так как известно об их двойной функции — лимитирование действия АТФ как нейромедиатора и участие в образовании других нейромодуляторов (АДФ, АМФ и аденозина), причем известно, что АТФ и ее метаболиты могут вызывать совершенно различные физиологические эффекты. В работе определена активность эктонуклеотидаз в различных типах скелетных мышц, показано, что она варьирует в пределах 5–7 МЕ. Понижение температуры до 22°C приводит к многократному снижению энзиматического метаболизма АТФ в тканях скелетных мышц. Предполагается, что энзиматическое лимитирование АТФ и продукции ее метаболитов обеспечивает стабилизацию эффективной холинергической нервно-мышечной передачи в норме и патологии.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, эктонуклеотидазы, метаболизм АТФ, синаптическая сигнализация.

DOI: 10.31857/S0006302923040105, EDN: KLIGJV

Известно, что наиболее эффективным из нативных модуляторов синаптической передачи является котрансмиттер ацетилхолина — АТФ [1]. Выделяясь вместе с основным медиатором, АТФ ингибирует дальнейший экзоцитоз ацетилхолина из терминали мотонейрона по принципу отрицательной обратной связи, формируемой при участии пресинаптических P2-рецепторов. Метаболиты АТФ, в первую очередь аденозин (посредством аденозиновых рецепторов), действуют по такому же принципу [2].

Концентрация пуринов вне клетки зависит от баланса между их высвобождением из клеток, поглощением и внеклеточным метаболизмом [3]. После выхода АТФ во внеклеточное пространство происходит дефосфорилирование данной молекулы различными сывороточными и мембранными ферментами, например, эктонуклеотидазами [4].

Активность этих ферментов обнаружена у всех исследованных живых организмов: растений, бактерий, животных и человека [5]. Все известные эктоферменты, контролирующие концен-

трацию нуклеотидов, принадлежат к нескольким семействам, различающимся по происхождению и механизму действия. Существует четыре семейства нуклеотидаз: NTPDases (нуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы), NPPases (пирофосфогидролазы/фосфодиэстеразы), фосфатазы и экто-5'-нуклеотидазы [6, 7].

Основными нуклеотидазами, участвующими в процессе гидролиза пуринов, являются CD39 и CD73. Первый метаболизирует АТФ до АДФ, пирофосфата и АМФ. Последний, в свою очередь, расщепляется до аденозина и фосфата с помощью поверхностного фермента CD73 [4]. Таким образом, активность эктонуклеотидаз CD39 и CD73 обеспечивает баланс АТФ и аденозина. Эти молекулы экскретируются из клеток многих тканей и органов: сердца, плаценты, легких, печени, кишечника, мозга, почек и др. [4, 8].

Максимальная каталитическая активность этих ферментов достигается при условии содержания во внеклеточной среде двухвалентных катионов, таких как кальций или магний, и щелочного значения pH. Кроме того, они имеют вы-

сокую чувствительность к изменениям температурных показателей: являясь по природе белками, имеют склонность к денатурации и потере активности при повышении температуры выше 70°C. Скорость катализируемой ими реакции также напрямую зависит от температуры: при повышении ее на 10°C реакция ускоряется в два-три раза, а при приближении к 0°C — замедляется до минимума. Таким образом, температурная среда влияет на следующие основные составляющие ферментативной реакции: на белковую часть фермента, на скорость образования фермент-субстратного комплекса и на все этапы преобразования субстрата [9, 10].

Поддержание температуры тела в определенных значениях обеспечивает теплокровным животным способность передвигаться, совершать двигательную активность при широком диапазоне температурных различий окружающей среды [11].

Известно, что при отсутствии значительных колебаний температуры внутренних органов млекопитающих, периферические отделы их тела могут испытывать большие изменения в температуре, в частности, снижение на 15°C у человека [12]. Таким образом, периферические скелетные мышцы теплокровных сохраняют способность к сократительной активности даже при значительном снижении их температуры [13].

По современным представлениям сила, скорость сокращения и расслабления скелетных мышц теплокровных, как правило, увеличиваются с повышением температуры [14]. Это наблюдалось, например, во время физических упражнений, когда температура скелетных мышц на периферии тела человека увеличивалась на несколько градусов по Цельсию [15, 16].

Вместе с тем в указанных работах не придавалось особого значения типам исследованных скелетных мышц. Не подлежит сомнению, что они, различающиеся по самой своей функции — обеспечивающие поддержание позы («медленные» мышцы) и выполняющие «тонкие» движения («быстрые» мышцы) — призваны по-разному реагировать на изменения температуры, что и наблюдается на практике [17].

Определенную сложность в исследовании вносит тот факт, что в физиологических условиях влияние АТФ и ее метаболитов в нервно-мышечном синапсе минимально, но становится более выраженным в некоторых патофизиологических ситуациях, таких как стресс, гипогравитация, травмы, ишемия или гипотермия [18, 19]. Кроме того, существуют данные, демонстрирующие разнонаправленность действия АТФ в нервно-мышечном синапсе разных типах двигательных единиц [20–22].

Исходя из современных представлений о вкладе пуринергической модуляции в процессы синтаптической сигнализации большой интерес вызывает вклад эктонуклеотидаз в пластичность этой сложной, многомодальной системы. В связи с этим целью настоящего исследования явилась оценка уровня ферментативного гидролиза АТФ в нервно-мышечных препаратах крыс при нормальной и пониженной температуре.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовительные процедуры. Исследования проводились на 15 лабораторных крысах линии Wistar, самцах и самках массой 130–190 г, которых содержали в группах по 5 особей, с водой и кормом *ad libitum*.

Животных перед началом манипуляций наркотизировали при помощи ингаляционной анестезии раствором эфира. После наступления наркотического сна проводили декапитацию при помощи гильотины, обескровливание и последовательное выделение мышц, используемых при проведении исследований (m. diaphragma, m. soleus, m. EDL).

Активность фермента эктонуклеотидазы определяется посредством инкубирования кусочков мышечной ткани (m. soleus, m. EDL, m. diaphragma) крыс с АТФ (субстрат реакции) в течение определенного времени с дальнейшей оценкой содержания субстрата и продуктов реакции (АДФ, АМФ) в инкубате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Перед получением материала готовили буферный раствор следующего состава (в мМ) — HEPES — 10, NaCl — 135, KCl — 5, CaCl₂ — 2, MgCl₂ — 2, глюкоза — 10, pH 7.4. Материал укладывали в подготовленную емкость, далее иссекали все остальные ткани, оставляя фрагмент мышечной ткани с культей нерва массой 2–4 мг. Полученные кусочки ткани помещали в ячеистую пластину, заполненную 300 мкл буфера, нагретого до 37°C или 22°C. Встряхивали в течение 10 мин для удаления поврежденных клеток и следов нуклеотидов, далее удаляли буфер, оставляя фрагменты ткани в лунках. После этого в 1-ую и 3-ю вертикали добавляли по 300 мкл буфера, содержащего АТФ (300 мкМ). Как только 1-ая и 3-я вертикали заполнялись, начинали добавлять буферную жидкость во 2-ю вертикаль. По заполнении всех 9 лунок встряхивали пластину в течение 10 мин при 37°C или 22°C. Далее для остановки реакции добавляли по 300 мкл 3%-й хлорной кислоты. По завершении реакции инкубационную жидкость центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин, после этого надосадочную жидкость замораживали для последующего количественного определения АТФ мето-

дом высокоэффективной жидкостной хроматографии. После того, как инкубат помещали в центрифугу, фрагменты ткани взвешивали.

Эксперименты проводили на хроматографе производства Shimadzu (Япония), состоящем из спектрофотометрического детектора SPD-20A, дегазатора DGU-20A3, насоса LC-20AD и термостата CTO-20A, с использованием программного обеспечения LC Solution. Для разделения нуклеотидов использовали колонку Supelco с длиной 15 см и внутренним диаметром 4.6 мм. Мобильная фаза состояла из 0.2 М KH_2PO_4 и 3%-го метанола (pH 6.0), скорость тока 1.5 мл/мин, длина волны 210 нм и объем образца 20 мкл.

При данных условиях нуклеотиды появлялись в следующем порядке: АТФ, АДФ и АМФ. Полное разделение нуклеотидов происходило в течение 5 мин.

Определяли концентрацию АТФ путем сравнения уровня напряжения самой высокой точки с соответствующим уровнем напряжения у контрольного образца. Для нахождения активности эктонуклеотидаз использовали формулу:

$$A = \frac{(v_{\text{АТФконтроль}} - v_{\text{АТФопыт}})}{t * N},$$

где A — активность фермента в МЕ, $v_{\text{АТФконтроль}}$ — количество АТФ в контроле, $v_{\text{АТФопыт}}$ — количество АТФ в опыте, t — время эксперимента в мин., N — масса ткани в мг.

Расчет температурного коэффициента Q_{10} . Из уравнения Вант-Гоффа температурный коэффициент универсально для любого диапазона температур вычисляется по формуле:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\left(\frac{10}{T_2 - T_1} \right)},$$

где R_n — сила сокращения при температуре T_n .

Мы в своих экспериментах для расчета Q_{10} использовали отношение активности эктонуклеотидаз при температурах 22°C и 37°C.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривали как значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В норме активность эктонуклеотидаз в различных типах скелетных мышц примерно равна, варьируется в пределах 5–7 МЕ, что говорит о гомогенном энзиматическом метаболизме внеклеточной АТФ в исследуемых тканях. При понижении температуры до 22°C наблюдается многократное, неравномерное снижение энзиматического метаболизма АТФ в различных тканях (табл. 1).

Оценка температурной зависимости Р2-опосредованных эффектов и эктонуклеотидазной активности. В данном случае температурный коэффициент Q_{10} — это величина, равная отношению эффективности биохимических реакций, сопряженных с механической активностью мышц при повышенной на 10°C температурой окружающей среды к первоначальному значению эффективности.

Температурный коэффициент Q_{10} для эктонуклеотидаз для камбаловидной мышцы составил 3.774 ± 0.490 , для длинного разгибателя пальцев — 4.014 ± 0.521 , для диафрагмы — 2.246 ± 0.291 .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было описано температурозависимое действие АТФ на функциональное состояние скелетной мышцы [20–22]. Так сопоставляя данные коэффициентов термолабильности энзиматических систем и показателей термочувствительности нервно-мышечных соединений, следу-

Таблица 1. Активность эктонуклеотидаз (в МЕ)

	37°C	22°C
m. diaphragma	6.001 ± 1.140 ($n = 12$)	$1.793 \pm 0.340^*$ ($n = 11$)
m. soleus	6.578 ± 1.249 ($n = 10$)	$0.906 \pm 0.172^*$ ($n = 10$)
m. EDL	5.318 ± 1.010 ($n = 12$)	$0.668 \pm 0.126^*$ ($n = 12$)

Примечание. * — Достоверное отличие от контроля при 37°C, $p < 0.05$.

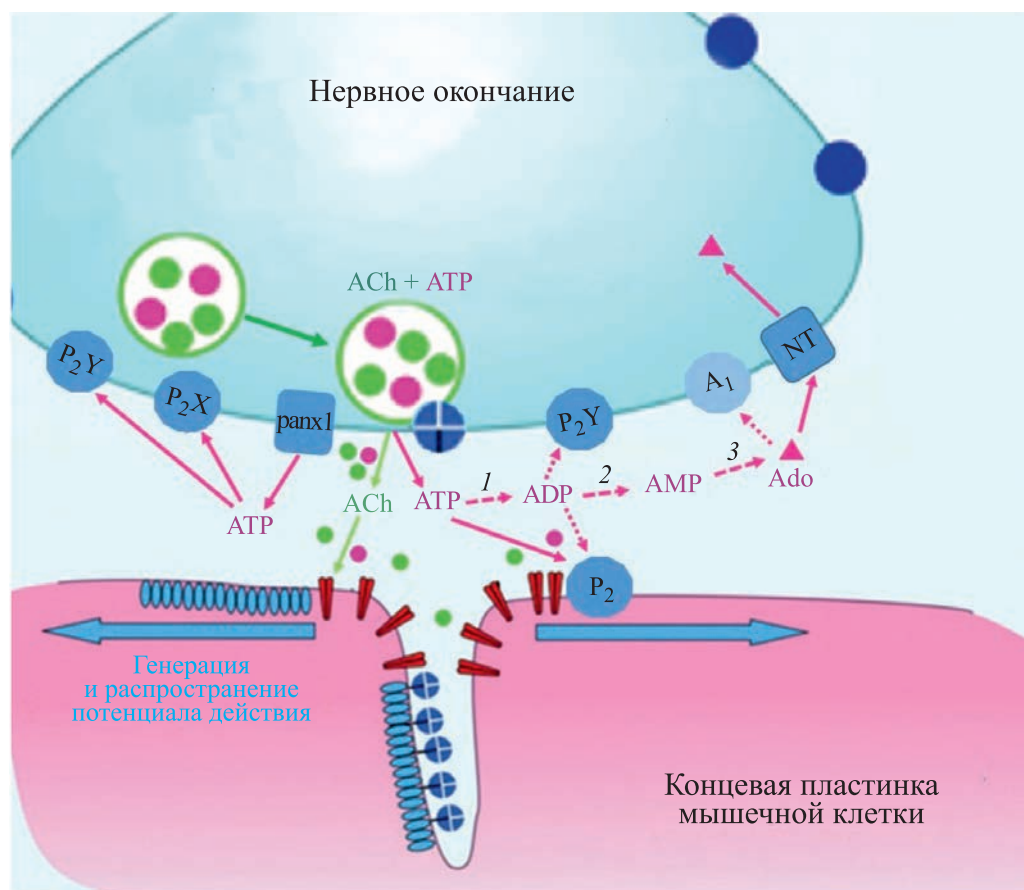


Рис. 1. Нервно-мышечный синапс: A_1 — аденозиновый рецептор, P_2 — пуриновый рецептор, АТФ — аденозинтрифосфат, АДФ — аденозиндифосфат, АМФ — аденозинмонофосфат, Ado — аденозин, ACh — ацетилхолин, 1 — экто-АТФазы (CD39) и экто-аденилаткиназа (ADK), 2 — экто-АТФазы (CD39), 3 — экто-5'-нуклеотидаза (CD73).

ет отметить разнонаправленность в их динамике. Вероятно, снижение активности эктонуклеотидаз в синаптической щели приводит к снижению метаболизма внеклеточной АТФ и, соответственно, к повышению ее количества. Учитывая зависимость физиологических эффектов АТФ от ее концентрации [23], можно было бы предположить их равноэффективное усиление в условиях понижения температуры, однако мы наблюдаем смешанную картину. «Быстрая» (m. EDL) и «медленная» (m. soleus) мышцы, имея разнонаправленный вектор изменений, одинаково демонстрируют прирост эффективности в соответствующем векторе, в противовес им дыхательная мышца стабилизируется и в меньшей степени реагирует на температурные изменения в присутствии АТФ. Значения температурного коэффициента Q_{10} менее единицы, обычно характерные для интенсивных физиологических процессов, протекающих с участием ферментативных и ка-

нальных систем, свидетельствуют о том, что либо указанные системы вовсе не принимают участия в механизме передачи синаптического сигнала, либо могут принимать, но при условии компенсации обычной температурной зависимостью сопряженных с ними процессов, т.е. таких процессов, интенсивность которых с ростом температуры уменьшается и, наоборот, с уменьшением температуры возрастает. Причем обратная температурная зависимость этих процессов должна полностью компенсировать обычную температурную зависимость и перекомпенсировать ее при изменении температуры. Таким образом, можно считать, что и медленная, и быстрая мышцы одинаково чувствительны к изменению температуры окружающей среды, но реакция на такие изменения у них разнонаправленная, в отличие от диафрагмы, имеющей наименьшее значение коэффициента термоллабильности.

Вероятнее всего ключевую роль в адаптации к изменению температуры играют не только эктонуклеотидазы, но и другие участники пуринергической сигнальной цепи — АДФ, АМФ и аденозин.

Путем регуляции уровня АТФ и его производных в межклеточном пространстве эктонуклеотидазы контролируют активность различных подтипов пуринорецепторов и тем самым участвуют в регуляции сократимости мышц (рис. 1).

В некоторых тканях метаболизм внеклеточных нуклеотидов регулирует рецепторную функцию, а в других может преимущественно служить в качестве «спасения» пуринов или даже — как в кишечнике — обеспечивать функцию питания и всасывания микроэлементов. Также имеются и растворимые виды эктонуклеотидаз, что позволяет им диффундировать в ткани и клетки и переноситься жидкостями организма.

Данные ферменты в первую очередь важны для клеток, секретирующих АТФ такие как пуринергические нейроны, тромбоциты и эндотелиальные клетки или клетки, которые активируются АТФ, например, гладкомышечные клетки [8]. Однако нельзя недооценивать и их вклад в регуляцию функции скелетных мышц. Исходя из результатов настоящего исследования, именно активность нуклеотидаз обслуживает особенности функционирования различных типов двигательных единиц млекопитающих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы предполагаем, что роль энзиматического лимитирования АТФ и продукция ее метаболитов, обеспечивает стабилизацию эффективной холинергической нервно-мышечной передачи в норме и патологии. Так, представленные в данной статье результаты экспериментов показали, что известные изменения синаптической эффективности опосредуются в том числе подстройкой функционирования эктонуклеотидаз синаптической щели.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Казанского государственного медицинского университета Минздрава России на проведение научных исследований в рамках Программы развития Университета (грант 2/22-5), а также в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, C. H. V. Hoyle, and S. N. Grishin, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1 (2020).
2. R. A. Giniatullin and E. M. Sokolova, *Br. J. Pharmacol.*, **124** (4), 839 (1998).
3. S. R. Nelson, A. Li, S. Beck-Previs, et al., *Biophys. J.*, **119**, 1050 (2020).
4. A. S. Golovkin, M. K. Serebryakova, E. V. Zhiduleva, et al., *Translat. Medicine*, **4**, 46 (2017).
5. K. Losenkova, M. Paul, H. Irjala, et al., *Methods Mol. Biol.*, **2041**, 107 (2020).
6. N. Zimmermann, P. R. Naeck, J. Neumann, et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **35** (6), 881 (2000).
7. M. Minor, K. P. Alcedo, R. A. Battaglia, and N. T. Snider, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **317** (6), 1079 (2019).
8. G. Burnstock, *Drug Dev. Res.*, **28**, 195 (1993).
9. C. Held and G. Sadowski, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **7**, 395 (2016).
10. D. J. Taylor, N. P. O. Green, and G. W. Stout, *Biological Science* (Cambridge University Press, 1997).
11. R. S. James, *J. Comp. Physiol. B*, **183** (6), 723 (2013).
12. K. W. Ranatunga, *Exp. Physiol.*, **83** (3), 371 (1998).
13. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology*, **11** (1), 1 (2017).
14. J. A. Rall and R. C. Woledge, *Am. J. Physiol.*, **259** (2), 197 (1990).
15. G. P. Kenny, F. D. Reardon, W. Zaleski, et al., *J. Appl. Physiol.*, **94** (6), 2350 (2003).
16. P. Yaicharoen, K. Wallman, A. Morton, and D. Bishop, *J. Sci. Med. Sport*, **15** (5), 451 (2012).
17. S. Racinais and J. Oksa, *Scand J. Med. Sci. Sports*, **20** (3), 1 (2010).
18. A. Ziganshin, R. Kamaliev, A. Gabdrakhmanov, et al., *Int. J. Pharmacol.*, **14** (8), 1198 (2018).
19. A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, S. N. Grishin, et al., *Biophysics*, **64** (5), 812 (2019).
20. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, B. A. Ziganshin, et al., *Muscle and Nerve*, **55**, 417 (2017).
21. A. U. Ziganshin, A. E. Khairullin, A. Y. Teplov, et al., *Muscle and Nerve*, **59** (4), 509 (2019).
22. A. E. Khairullin, A. U. Ziganshin, and S. N. Grishin, *Biophysics*, **65** (5), 858 (2020).
23. W. M. Fu and M. M. Poo, *Neuron*, **6** (5), 837 (1991).

Revisiting the Role of Ectonucleotidases in Synaptic Transmission. Thermal Sensitivities of ATP-Producing Metabolic Pathways

A.E. Khairullin*, **, D.V. Efimova*, D.V. Ivanova*, S.N. Grishin*, and A.U. Ziganshin*

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

**Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

The release of ATP as an intermediate at the neuromuscular junction, and acetylcholine, the chief neurotransmitter, may take place by mechanisms responsible for quantal and non-quantal secretion from the motor neurons of the central and peripheral nervous system. The dephosphorylation pathway of ATP that is completed by the hydrolysis of AMP to adenosine in the synaptic cleft is a cascade of reactions catalyzed by ectonucleotidases. These enzymes are of enormous interest, the research in this field is necessary to clarify their role in a complex signaling cascade, since it is known that they have dual functions: ectonucleotidases limit the action of ATP as a neurotransmitter and participate in the formation of other neuromodulators (ADP, AMP and adenosine). In addition, ATP and its metabolites can cause completely different physiological effects. The activity of ectonucleotidases in different types of skeletal muscles was determined, it varies within 5–7 IU. A decrease in temperature to 22°C leads to a multiple decrease in the enzymatic regeneration of ATP in skeletal muscle tissues. It is assumed that enzymatic limitation of ATP and the production of its metabolites ensures stabilization of effective cholinergic neuromuscular transmission in norm and pathology.

Keywords: neuromuscular junction, ectonucleotidase, ATP-producing metabolic pathways, synaptic signaling

ОТЛИЧИЕ ОТВЕТОВ ПРЕМОТОРНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ НА СЕРОТОНИН И ПРЕДШЕСТВЕННИК ЕГО СИНТЕЗА 5-ГИДРОКСИТРИПТОФАН У ИНТАКТНЫХ И СЕНСИТИЗИРОВАННЫХ УЛИТОК

© 2023 г. Т.Х. Богодвид*, **, #, В.В. Андрианов*, Л.Н. Муранова*, Х.Л. Гайнутдинов*

*Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанского (Приволжского) федерального университета,
Кремлевская ул., 18, Казань, 420008, Россия

*Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма,
Деревня Универсиады, 35, Казань, 420010, Россия

#E-mail: tat-gain@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 20.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Исследованы реакции премоторных интернейронов LPa3 and RPa3 улитки на аппликацию серотонина и предшественника его синтеза 5-гидрокситриптофана в раствор, омывающий препарат центральной нервной системы интактных улиток и улиток, после выработки долговременной сенситизации. Измерения электрических характеристик показали, что при аппликации серотонина мембранный потенциал интернейронов LPa3 and RPa3 интактных улиток достоверно снижается на 3.7 мВ, а пороговый потенциал достоверно увеличивается. Такая же картина наблюдалась и при аппликации 5-гидрокситриптофана: достоверное снижение мембранного потенциала на 3.1 мВ и недостоверное увеличение порога генерации потенциалов действия. Найдено, что аппликация серотонина вызывает достоверное уменьшение мембранного потенциала интернейронов LPa3 and RPa3 сенситизированных улиток на 4.6 мВ (деполяризация) и недостоверное увеличение порогового потенциала премоторных интернейронов на 0.9 мВ. Аппликация 5-гидрокситриптофана, напротив, вызывает недостоверное увеличение на 2.5 мВ мембранного потенциала и также недостоверное увеличение порогового потенциала на 0.8 мВ.

Ключевые слова: серотонин, 5-гидрокситриптофан, долговременная сенситизация, мембранный потенциал, порог генерации потенциалов действия.

DOI: 10.31857/S0006302923040117, EDN: KLJUCJ

Длительные модификации поведенческих реакций, происходящие при обучении, являются следствием пластических изменений нейронов и синаптической передачи [1–3]. Одной из форм пластичности является сенситизация, форма неассоциативного обучения, при которой у животного происходит значительное усиление величины вызванного рефлекса, происходящее вследствие нанесения сильной (или даже повреждающей) стимуляции [4–6]. Если отдельный сильный стимул хвоста у аплизии или головы улитки вызывает кратковременную сенситизацию, длящуюся минуты, то повторение повреждающей стимуляции вызывает долговременную

сенситизацию (ДС), длящуюся дни и недели [7]. Это состояние характеризуется резким усилением оборонительных реакций, сопровождающихся повышением возбудимости основных элементов нейронной сети — сенсорных либо командных нейронов [3, 8–11].

Известно, что долговременное облегчение связей между сенсорным и моторным нейронами рефлекса отдергивания жабер у аплизии опосредуется серотонином (5-НТ), эта форма синаптической пластичности была найдена критичным клеточным механизмом поведенческой сенситизации [1]. Показано, что 5-НТ является основным медиатором, который опосредует оборонительное поведение у моллюсков и обучение и сенситизацию на основе оборонительных рефлексов [12–15]. Было найдено, что когда аплизия получает опасный (сильный) стимул, на-

Сокращения: ДС — долговременная сенситизация, 5-НТ — серотонин (5-гидрокситриптамин), 5-НТР — 5-гидрокситриптофан, V_m — мембранный потенциал, V_t — пороговый потенциал.

пример, электрошок хвоста, то сети серотонинергических нейронов моллюска выделяют эндогенный серотонин [16]. Этот выделенный 5-НТ вызывает целый ряд клеточных изменений, которые ведут к усилению оборонительного рефлекса. Эксперименты продемонстрировали, что для формирования такой формы пластичности, как долговременная сенситизация, 5-НТ необходим как у аплизии [17], так и у виноградной улитки [18]. Применением аппликаций 5-НТ в омывающий центральную нервную систему раствор были воспроизведены электрофизиологические корреляты пластичности [1, 11]. Недавно было показано [19], что у прудовика *Lymnaea stagnalis* одни сутки лишения пищи повышали способность к обучению (аверсии на пищу) за счет снижения содержания 5-НТ в центральной нервной системе. Однако после пяти суток голодания способность к обучению и концентрация 5-НТ возвращалась к исходному уровню. При этом концентрация триптофана в центральной нервной системе была выше у тех улиток, которых не кормили пять суток, чем у улиток, лишенных пищи в течение одних суток. Результаты показывают, что 5-НТ может действовать на внесинаптические серотониновые рецепторы [14, 20]. Ранее мы изучали, как изменяется возбудимость премоторных интернейронов виноградной улитки на аппликацию 5pНТ и предшественника его синтеза 5-гидрокситриптофана (5-НТР) у интактных и обученных моллюсков. Было найдено, что аппликация 5-НТ и 5-НТР вызывала уменьшение мембранного потенциала (V_m) премоторных интернейронов как интактных, так и обученных улиток [21]. В то же время только у обученных улиток, в отличие от интактных, аппликация 5-НТ и 5-НТР вызывала повышение порогового потенциала (V_t) премоторных интернейронов LPa3 и RPa3.

В связи с этим в продолжение предыдущих работ мы провели исследование изменений электрических характеристик, влияющих на возбудимость премоторных интернейронов виноградной улитки в ответ на аппликацию 5-НТ и предшественника его синтеза 5-НТР у интактных улиток и улиток после ДС.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на виноградной улитке *Helix lucorum*, нервная система которой содержит ряд идентифицированных нейронов, позволяя проводить исследования свойств нервных клеток с учетом их позиции в нейронной сети, что делает этот вид улиток одним из модельных для нейробиологических исследований [21]. Для экспериментов выбирали улиток примерно одной массы (около 20–25 г). Перед началом экспериментов улитки не менее двух недель находились в

активном состоянии во влажной атмосфере, при комнатной температуре и избытке пищи. У всех улиток вырабатывали долговременную сенситизацию оборонительного рефлекса. Процедура формирования ДС проходила по отработанной схеме [22]. Улиткам предъявляли электрические стимулы в область головы четыре раза в сутки в течение четырех суток с интервалом в полтора–два часа. Длительность каждого стимула составляла 0.5 с. Характеристики стимула: прямоугольные импульсы тока амплитудой 6–8 мА, длительностью 10 мс, частотой 50 Гц. Действительную амплитуду тока при стимуляции контролировали по экрану осциллографа. Используемый ток не вызывал повреждений кожи улиток, которые могут возникать в виде пигментированных участков при более значительной величине тока [23]. За двое суток до начала эксперимента и во время сенситизации (в течение четырех суток) экспериментальных улиток переставали кормить. Лишение виноградной улитки пищи во время формирования условных рефлексов является стандартным приемом, оно не связано с метаболизмом определенных веществ, а определяется необходимостью активного состояния животного [24, 25]. Улиток контрольных групп на протяжении всего эксперимента содержали в тех же условиях, что и улиток экспериментальных групп.

Критерием выработки ДС служило значительное увеличение времени закрытого состояния пневмостома в ответ на предъявление тестирующего раздражения по сравнению с исходной реакцией. Только полное закрытие пневмостома определялось как положительная реакция на стимул. Выбор реакции закрытия пневмостома был обусловлен тем, что она является начальной компонентой оборонительных реакций, позволяющей проводить объективную регистрацию [26]. Тестирование проводили в специальной установке, состоящей из резервуара с водой, в котором плавал легкий полиэтиленовый шар, и штатива с кронштейном, к которому жестко крепили раковину моллюска. Улитки свободно ползали по шару, вращая его. Такая установка позволяла проводить объективную регистрацию движения мышц легочной полости и раздражать любую точку тела улитки.

Анализ электрических характеристик проводили на премоторных интернейронах оборонительного рефлекса LPa3 и RPa3. Измерения проводили при комнатной температуре (21–25°C) с помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.5 М KCl и имеющих сопротивление 5–15 МОм. Регистрировали следующие параметры нервных клеток: мембранный потенциал покоя – V_m (исходное значение перед началом серии тактильных раздражений или электрической стимуляции и его величина в ходе

эксперимента) и порог генерации потенциала действия — V_t (пороговый потенциал). Пороговый потенциал оценивали как разницу между V_m и значением потенциала во время генерации потенциала действия, при котором скорость его увеличения (первая производная потенциала по времени) достигла определенного значения [27] (для нейронов LPa3 и RPa3 была найдена величина 1 В/с) [28]. Поскольку премоторные интернейроны LPa3 и RPa3 в норме являются молчащими, то для вызова потенциала действия в изолированном препарате через регистрирующий микроэлектрод на клетку подавали импульс тока прямоугольной формы продолжительностью 1 с; величину тока стимуляции подбирали минимальной для генерации двух-пяти потенциалов действия. В проведенных сериях экспериментов эта величина тока варьировала от 1.7 до 3.5 нА.

В основной части экспериментов исследовали величины V_m и V_t нейронов при аппликации в течение 30 мин в раствор, омывающий препарат подглоточного комплекса ганглиев интактных и сенситизированных улиток, следующих веществ: серотонина в концентрации 10^{-3} М и 5-гидрокси-триптофана, предшественника синтеза серотонина, в концентрации 10^{-3} М.

Результаты статистически обработаны и представлены как среднее $\pm$ SEM. Достоверность различий оценивали по t -критерию Стьюдента (с проверками нормальности и равенства дисперсий) и U -критерию Манна-Уитни. Статистическую значимость оценивали по $p < 0.05$.

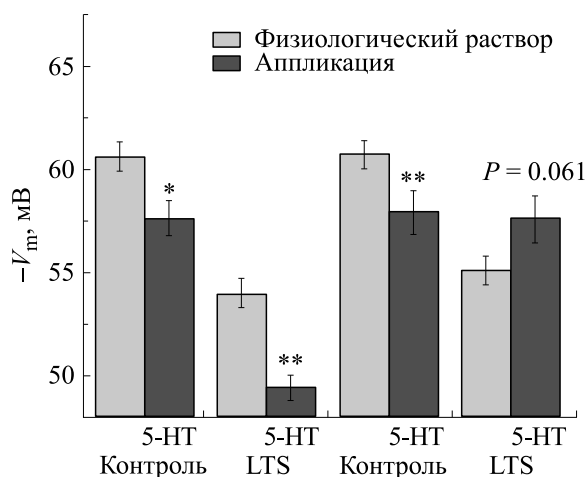


Рис. 1. Влияние аппликации серотонина (5-HT) и предшественника его синтеза 5-гидрокси-триптофана (5-HTP) в раствор на величину мембранного потенциала премоторных нейронов оборонительного рефлекса LPa3 и RPa3 у интактных (Control) и сенситизированных (LTS) улиток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для формирования ДС улиткам предъявляли электрические стимулы в область головы четыре раза в сутки в течение четырех суток с интервалом в полтора-два часа. Тестирование формирования ДС показывает постепенное увеличение времени закрытия пневмостома в процессе выработки ДС у улиток с 16.3 ± 1.1 с до 66.7 ± 3.2 с ($p < 0.01$, $n = 26$). Этот результат демонстрирует формирование ДС у улитки [22, 29].

На следующий день после окончания четырехсуточного формирования ДС и тестирования, подтверждающего формирование ДС, проводили электрофизиологические эксперименты по исследованию изменений возбудимости премоторных интернейронов виноградной улитки на аппликацию 5-HT ($n = 13$) и предшественника его синтеза 5-НТР ($n = 13$) у улиток после ДС. Для сравнения были проведены исследования изменений возбудимости премоторных интернейронов виноградной улитки на аппликацию 5-HT ($n = 15$) и предшественника его синтеза 5-НТР ($n = 15$) у интактных улиток.

Измерения электрических характеристик премоторных интернейронов (LPa3 и RPa3) интактных улиток показали, что V_m у них был равен -60.7 ± 0.6 мВ ($n = 12$), V_t — 19.7 ± 0.5 мВ ($n = 10$). При аппликации 5-HT в раствор, омывающий препарат интактных улиток, было показано достоверное ($p < 0.01$) снижение V_m (деполяризация на 3.7 мВ) до -57.0 ± 1.0 мВ, ($n = 12$) и недостоверное увеличение V_t до 20.5 ± 0.6 мВ ($n = 10$) (рис. 1, 2). Такая же картина наблюдалась и при апплика-

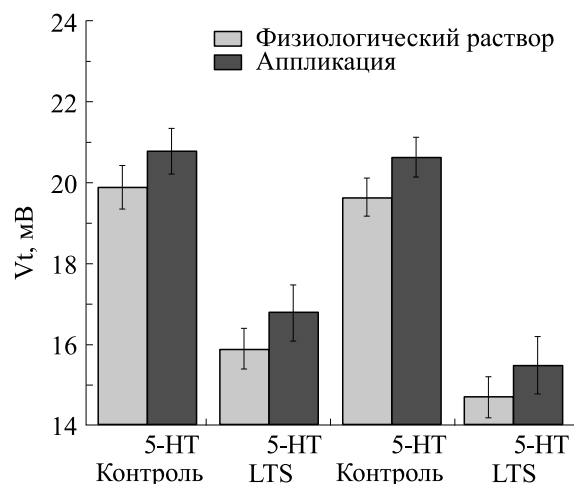


Рис. 2. Влияние аппликации серотонина (5-HT) и предшественника его синтеза 5-гидрокси-триптофана (5-HTP) в раствор на величину порога генерации потенциала действия (V_t) премоторных нейронов оборонительного рефлекса LPa3 и RPa3 у интактных (Control) и сенситизированных (LTS) улиток.

ции 5-НТР: достоверное ($p < 0.05$) снижение (деполяризация на 3.1 мВ) мембранного потенциала (с -61.1 ± 0.7 мВ до -58.0 ± 1.0 мВ, $n = 12$) и недостоверное увеличение порога генерации ПД (с 19.1 ± 0.6 до 20.3 ± 0.5 мВ ($n = 12$) (рис. 1 и 2).

В экспериментальной серии было найдено, что аппликация 5-НТ в раствор, омывающий препарат улиток после формирования ДС, вызывает достоверное уменьшение мембранного потенциала (деполяризация на 4.6 мВ) 5-НТ: с -54.0 ± 0.7 мВ до -49.4 ± 0.6 мВ, $p < 0.01$, $n = 9$) и недостоверное увеличение порогового потенциала 5-НТ: с 15.9 ± 0.5 до 16.8 ± 0.7 мВ, $n = 8$ (рис. 1 и 2). Если рассматривать изменение мембранного потенциала в результате аппликации 5-НТ относительно уровня V_m несенситизированных улиток, то это будет деполяризация на 8.3 мВ.

При аппликации 5-НТР в раствор, омывающий препарат улиток после формирования ДС, наблюдается недостоверное увеличение (гиперполяризация на 2.5 мВ) как мембранного потенциала относительно уровня V_m улиток после сенситизации: с -55.1 ± 0.7 мВ до -57.6 ± 1.1 мВ, $p < 0.05$, $n = 11$, так и порогового потенциала: с 14.7 ± 0.5 до 15.5 ± 0.7 мВ, $n = 10$) (рис. 1 и 2). Если рассматривать изменение мембранного потенциала в результате аппликации 5-НТР относительно уровня V_m несенситизированных улиток, то это будет деполяризация на 3.5 мВ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Серотонин — один из основных медиаторов, обеспечивающих нейромодуляцию [13, 30, 31]. Он является медиатором в синаптической передаче, но, кроме того, может выполнять и интегративные функции при выделении его во внеклеточную среду [32–34]. Существует концепция [31, 35] о том, что важнейшую роль в механизмах памяти у моллюсков играет объемная (внесинаптическая) передача 5-НТ. Д.А. Сахаров с сотрудниками предположил, что динамическими флуктуациями содержания нейроактивных молекул (прежде всего 5-НТ у моллюсков) в локальной межклеточной среде определяются физиологические свойства и рецепторный профиль индивидуальных нейронов и, таким образом, характер их самоорганизации в паттерн-генерирующий ансамбль [32, 35, 36]. Показано также, что значительное количество 5-НТ может выделяться во внесинаптическую среду при долговременной синаптической активности [37]. Известно, что множественные киназные каскады вносят вклад в индуцированное серотонином кратковременное синаптическое облегчение, включая протеинкиназу А и протеинкиназу С [38]. Исследования клеточных культур показали, что серотонин индуцирует фосфорилирование фактора тран-

скрипции CREB-1, который, в свою очередь, индуцирует транскрипцию выбранных генов, ответственных за долговременную память, обеспечивая молекулярную связь между кратковременной и долговременной сенситизацией [39]. Есть предположение, что основной функцией, связанной с активацией серотонинергической системы аппликации, вызванной повреждающими стимулами, является запуск защитной реакции возбуждения [19]. Увеличение высвобождения 5-НТ после воздействия его предшественника 5-НТР проявилось в облегчении сенсомоторных синапсов, увеличении возбуждения серотонинергических нейронов в педальном и брюшном ганглиях и усилении высвобождения 5-НТ, вызванного шоком хвостового нерва. Когда 5-НТР вводили свободно движущимся улиткам, он вызывал сильную реакцию возбуждения, характеризующуюся повышенной локомоцией и увеличением частоты сердечных сокращений, что напоминало защитную реакцию возбуждения, вызванную повреждающей стимуляцией [33].

Известно, что аппликация 5-НТ вызывает эффекты, сходные с облегчением дегабитулирующих и сенситизирующих стимулов на нервную сеть, лежащую в основе оборонительного ответа. Посредством аппликаций 5-НТ в омывающий центральную нервную систему раствор также удается воспроизвести электрофизиологические корреляты пластичности. В ряде экспериментов, в том числе и с нашим участием, были показаны мембранные корреляты пластичности [10, 40–42]. Было высказано предположение, что изменение возбудимости ключевых компонентов (сенсорных и командных нейронов) является одним из важных компонентов обучения и сенситизации [3, 43, 44]. Нами в проведенных исследованиях найдено, что аппликация 5-НТ и 5-НТР вызывает достоверное снижение (на 3.7 и 3.1 мВ как результат аппликации 5-НТ и 5-НТР соответственно) мембранного потенциала премоторных интернейронов интактных улиток, что демонстрирует повышение возбудимости этих нейронов. Это, вероятно, происходит за счет активации серотониновых рецепторов первого типа, которые присутствуют на соме премоторных интернейронов улитки [20, 45]. Также найдено недостоверное увеличение V_t на 1 мВ.

Таким образом, нами было показано, что при аппликации серотонина в раствор, омывающий препарат, происходит деполяризация мембраны премоторных интернейронов одновременно с недостоверным увеличением порогового потенциала как у интактных, так и у сенситизированных улиток. Реакция премоторных интернейронов на аппликацию предшественника синтеза серотонина 5-НТР в раствор, омывающий препарат, противоположная: совершенно другая: деполя-

ризация мембраны у инактивных улиток и гиперполяризация мембраны (недостовверная) у сенситизированных улиток при недостовверном увеличении порогового потенциала.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

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. R. D. Hawkins, E. R. Kandel, and C. H. Bailey, *Biol. Bull.*, **210** (3), 174 (2006).
2. П. М. Балабан и Т. А. Коршунова, *Успехи физиол. наук*, **42** (4), 3 (2011).
3. Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов и Т. Х. Гайнутдинова, *Успехи физиол. наук*, **42** (1), 33 (2011).
4. V. F. Castellucci, W. N. Frost, P. Goelet, et al., *J. Physiol. (Paris)*, **81**, 349 (1986).
5. Н. А. Береговой, Х. Л. Гайнутдинов, О. Г. Сафронова и др., *Журн. высш. нервн. деят.*, **40** (3), 594 (1990).
6. S. Herdegen, C. Conte, S. Kamal, et al., *PLoS One*, **9** (12), e114481 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0114481
7. G. T. Philips, C. M. Sherff, S. A. Menges, et al., *Learning & Memory*, **18** (4), 272 (2011). DOI: 10.1101/lm.212531
8. Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов, Т. Х. Гайнутдинова и др., *Журн. высш. нервн. деятельности*, **48** (6), 1004 (1998).
9. L. J. Cleary, W. L. Lee, and J. H. Byrne, *J. Neurosci.*, **18**, 5988 (1998).
10. R. Mozzachiodi, F. D. Lorenzetti, D. A. Baxter, et al., *Nature Neurosci.*, **11**, 1146 (2008).
11. I. Jin, S. Kassabov, E. R. Kandel, et al., *Learning & Memory*, **28**, 218 (2021). DOI: 10.1101/lm.053124.120
12. P. M. Balaban, A. Vehovzsky, O. A. Maksimova, et al., *Brain Res.*, **404**, 201 (1987).
13. В. Е. Дьяконова, *Успехи физиол. наук*, **38** (3), 3 (2007).
14. J. Il-Han, T. Janes, and K. Lukowiak, *J. Exp. Biol.*, **213**, 3603 (2010).
15. V. V. Andrianov, T. Kh. Bogodvid, I. B. Deryabina, et al., *Front. Behav. Neurosci.*, **9**, 279, (2015).
16. J. Levenson, J. N. Byrne, and A. Eskin, *J. Neurosci.*, **19** (18), 8094 (1999).
17. D. L. Glanzman, S. L. Mackey, R. D. Hawkins, et al., *J. Neurosci.*, **12**, 4200 (1989).
18. Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов и Т. Х. Гайнутдинова, *Журн. высш. нервн. деятельности*, **49** (1), 48 (1999).
19. Y. Totani, J. Nakai, D. Hatakeyama, et al., *Nutr. Neurosci.*, **26** (3), 217 (2023). DOI: 10.1080/1028415X.2022.2033045.
20. М. С. Абрамова, В. Л. Нистратова, А. А. Москвитин и др., *Журн. высш. нервн. деятельности*, **55** (3), 385 (2005).
21. T. Kh. Bogodvid, V. V. Andrianov, I. B. Deryabina, et al., *Front. Cell. Neurosci.*, **11**, 403, (2017). DOI: 10.3389/fncel.2017.00403
22. Т. Х. Гайнутдинова, В. В. Андрианов, Р. Р. Назырова и др., *Журн. высш. нервн. деятельности*, **49** (6), 1063 (1999).
23. Х. Л. Гайнутдинов и Н. А. Береговой, *Журн. высш. нервн. деятельности*, **44** (2), 307 (1994).
24. V.P. Nikitin, S.V.Solntseva, S.A. Kozurev, et al., *Behavioural Brain Res.* **345**, 72 (2018). DOI: 10.1016/j.bbr.2018.02.036
25. I.B. Deryabina, L.N. Muranova, V.V. Andrianov, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2087 (2020). DOI: 10.3390/ijms21062087
26. П. М. Балабан и И. С. Захаров, *Обучение и развитие — основа двух явлений* (Наука, М., 1992).
27. Б. И. Ходоров, *Проблема возбудимости* (Медицина, Л., 1969).
28. Д. И. Силантьева, В. В. Андрианов, Т. Х. Гайнутдинова и Х. Л. Гайнутдинов, *Журн. высш. нервн. деятельности*, **58** (2), 183 (2008).
29. A. W. Chihab, V. V. Andrianov, T. K. Bogodvid, et al., *BioNanoScience*, **11**, 238 (2021). DOI: 10.1007/s12668-020-00814-1
30. R. Gillette, *Integr. Comp. Biol.*, **46**, 838 (2006).
31. В. Н. Иерусалимский и П. М. Балабан, *Журн. высш. нервн. деятельности*, **60** (5), 515 (2010).
32. Д. А. Сахаров, *Журн. общ. биологии*, **51** (4), 437 (1990).
33. S. Marinesco, N. Wickremasinghe, K. E. Kolkman, et al., *J. Neurophysiol.*, **92**, 2487 (2004).
34. K. Bonnick, K. Bayas, D. Belchenko, et al., *PLoS One*, **7** (10), e47378 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0047378
35. Д. А. Сахаров, *Журн. общ. биологии*, **73** (5), 324 (2012).
36. V. Dyakonova, L. Hernádi, E. Ito, et al., *Biophysics*, **11**, 55 (2015).
37. C. Leon-Pinzon, M. G. Cercós, P. Noguez, et al., *Front. Cell. Neurosci.*, **8** (169), 169 (2014). DOI: 10.3389/fncel.2014.00169
38. N. G. Jin and T. Crow, *J. Neurophysiol.* **106**, 2557 (2011).
39. E. R. Kandel, *Science*, **294**, 1030 (2001).

40. Н. А. Береговой и Х. Л. Гайнутдинов, Докл. АН СССР, **301** (4), 989 (1988).
41. D. Debanne and M.-M. Poo, Front. Synap. Neurosci., **2** (21), 1 (2010).
42. J. Farruggella, J. Acebo, L. Lloyd, et al., Behav. Brain Res., **360**, 341 (2019). DOI: 10.1016/j.bbr.2018.12.010
43. W. Zhang and D. J. Linden, Nature Rev. Neurosci., **4**, 885 (2003).
44. E. S. Nikitin, P. M. Balaban, and G. Kemenes, Curr. Biol., **23**, 614 (2013).
45. А. С. Пивоваров и В. Л. Нистратова, Бюл. эксп-рим. биологии и медицины, **136** (2), 114 (2003).

Differences in Responses of Premotor Interneurons to Serotonin and 5-Hydroxytryptophan, a Precursor for Serotonin Synthesis, in Naive and Trained Snails

T.K. Bogodvid*, **, V.V. Andrianov*, L.N. Muranova*, and Kh.L. Gainutdinov*

*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

**Volga Region State University of Physical Culture, Sport and Tourism, Universiade village 35, Kazan, 420010 Russia

This study investigated the responses of premotor interneurons LPa3 and RPa3 of the snails to applications of serotonin and 5-hydroxytryptophan (5-HTP), a precursor for serotonin synthesis, as ingredients of the broth that bathes the central nervous system of naive snails and snails after the formation of long-term sensitization. Measurements of the electrical characteristics have shown that a membrane potential of interneurons LPa3 and RPa3 in naive snails was significantly depolarized (3.7 mV) in the presence of serotonin, while the threshold potential was increased (unsupported hypothesis). The similar pattern was observed in the presence of 5-hydroxytryptophan: true depolarization to 3.1 mV occurred in interneurons until reaching the unreliable rise in the threshold potential inducing an action potential. It was found that application of serotonin causes a significant decrease in the membrane potential of interneurons LPa3 and RPa3 of trained snails (depolarization to 4.6 mV) and the unreliable increase in the threshold potential of premotor interneurons (0.9 mV). In contrast, application of 5-hydroxytryptophan causes an unreliable increase (2.5 mV) of the membrane potential and also an unreliable increase (0.8 mV) in the threshold potential.

Keywords: serotonin, 5-hydroxytryptophan, long-term sensitization, membrane potential, threshold potential

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СТИМУЛЯЦИИ α_2 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ

© 2023 г. А.М. Галиева*,[#], Н.И. Зиятдинова*, Н. Мансур*, Л.И. Фасхутдинов*, Т.Л. Зефилов*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Кремлевская ул., 18, Казань, 420008, Россия

[#]E-mail: galieva_alina94@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 27.03.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Изучено влияние агониста α_2 -адренорецепторов клонидина гидрохлорида на параметры электрической активности миокарда предсердий при навязанном ритме. Клонидин гидрохлорид в рабочих кардиомиоцитах с навязанным ритмом вызывает уменьшение длительности потенциала действия на уровне 50 и 90% у взрослых крыс. У недельных и трехнедельных крыс данный агонист вызывает увеличение длительности потенциала действия на уровне 50 и 90%.

Ключевые слова: α_2 -адренорецепторы, сердце, электрофизиология.

DOI: 10.31857/S0006302923040129, **EDN:** KCLKWEN

Адренергические рецепторы (АР, также известны как адренорецепторы) относятся к суперсемейству гуанин-нуклеотид-связывающих G-белок-связанных рецепторов и являются мембранными рецепторами, которые активируют гетеротримерные G-белки после связывания лиганда. Данные рецепторы состоят из одного внеклеточного N-концевого домена, семи трансмембранных доменов, трех внутри- и трех внеклеточных петель и одного внутриклеточного C-концевого хвоста. Эти гептахелические трансмембранные сенсоры составляют около 4% всего генома, кодирующего белки, и считаются наиболее важными лекарственными мишенями в медицине и физиологии. G-белки обычно стимулируют (через Gs-белок) или ингибируют (через Gi-белок) фермент аденилатциклазу или активируют (через Gq-белок) фосфолипазу C.

Семейство адренорецепторов включает в себя девять членов, которые можно классифицировать по трем различным подгруппам, содержащим три подтипа α_1 -АР (α_{1A} , α_{1B} и α_{1D}), три подтипа α_2 -АР (α_{2A} , α_{2B} и α_{2C}) и три подтипа β -АР (β_1 , β_2 и β_3) [1]. Физиологические и фармакологические функции отдельных подтипов рецепторов в основном были раскрыты путем создания отдельных моделей с целевыми делеция-

ми или трансгенной сверхэкспрессией соответствующих генов *in vivo* [2].

Однако первые препараты, вызывающие фармакологический эффект при воздействии на адренорецепторы, были разработаны и введены в медицинскую терапию еще за несколько десятилетий до этих открытий. Агонист α_2 -адренорецепторов клонидин был разработан в начале 1960-х годов. Он стал первым клинически используемым селективным агонистом α_2 -АР [3]. Клонидин вызывает ряд фармакологических действий, большинство из которых до сих пор используются в современной терапии, включая седативное воздействие, гипноз, симпатическое торможение, гипотензию, анальгезию, снижение внутриглазного давления [4]. Однако большой спектр клинических эффектов клонидина ограничивает его более широкое применение в клинической медицине. В частности, побочные эффекты на сердечно-сосудистую систему, а именно гипотония и брадикардия, а также седативный эффект являются ограничениями для применения клонидина в других областях медицины [5].

В настоящее время выделено три подтипа α_2 -АР: α_{2A} -, α_{2B} - и α_{2C} АР. Существование небольшого количества α_2 АР в сердце человека было продемонстрировано методами молекулярной биологии. Поэтому неудивительно, что рецепторы данного подтипа в сердце человека изучены недостаточно [6].

Сокращения: АР — адренергические рецепторы, ПД — потенциал действия.

Несколько групп исследователей продемонстрировали, что $\alpha 2$ АР играют важную роль в пресинаптической регуляции высвобождения норадреналина в сердце человека. Так, существование пресинаптических $\alpha 2$ АР, ингибирующих высвобождение норадреналина, было прямо продемонстрировано *ex vivo* в изолированном правом предсердии человека и косвенно *in vivo* при системном и внутрикоронарном применении фентоламина [7]. В этом контексте интересно отметить, что влияние фентоламина на уровень норадреналина в плазме крови было гораздо более выраженными у пациентов с сердечной недостаточностью (у которых повышена симпатическая активность), чем у здоровых людей. Однако до сих пор остается спорным утверждение о том, что пресинаптические $\alpha 2$ -АР, присутствующие в сердце человека, являются $\alpha 2_A$ АР или $\alpha 2_C$ АР [8].

В зависимости от расположения $\alpha 2$ -адренорецептора и нейромедиатора, высвобождение которого модулируется этими рецепторами, были введены термины «ауторецепторы» и «гетерорецепторы». Под «ауторецепторами» понимают $\alpha 2$ -адренорецепторы, которые расположены в пресинаптической мембране адренергических нейронов и ингибируют экзоцитоз нейротрансмиттеров, норадреналина или адреналина, действуя как часть петли обратной отрицательной связи [9].

$\alpha 2$ -АР подавляют симпатический и надпочечниковый выброс катехоламинов по короткой обратной связи и, таким образом, в целом ингибируют симпатoadренергические воздействия [10]. Таким образом, $\alpha 2$ -АР в основном участвуют в антиноцицептивном, седативном, центральном гипотензивном, гипотермическом и поведенческом действии специфических агонистов [11].

Поскольку постоянная симпатическая стимуляция сердца была связана с дезадаптивным ремоделированием сердца, а также с развитием и прогрессированием сердечной недостаточности, нарушение функции $\alpha 2$ -АР рассматривается как риск возникновения и развития сердечно-сосудистых заболеваний. Действительно, избыточная смертность у мышей, лишенных изоформ $\alpha 2_A$ и $\alpha 2_C$, объяснялась повышением уровня циркулирующих катехоламинов, усугублением гипертрофии левого желудочка, фиброзом и развитием сердечной недостаточности [12]. Однако целенаправленное восстановление изоформ этих рецепторов в симпатических нейронах обеспечило лишь частичное восстановление реакции левого желудочка на внутривенное введение агонистов $\alpha 2$ -АР [13]. В то же время прекондиционирование с использованием агониста $\alpha 2$ -АР дексмететомидина способствует фосфорилированию Erk1/2, Akt и eNOS в миоцитах левого желудочка и улучшает восстановление сердца после ишемии/ре-

перфузии [14]. Подобные наблюдения указывают на функциональную роль $\alpha 2$ -АР в сердечной ткани, где они могут участвовать в регуляции периферического адренергического ответа. Поскольку вклад постсинаптических $\alpha 2$ -АР остается недостаточно изученным, ряд исследователей считает необходимым переоценку функциональной роли этих рецепторов в клетках миокарда.

В то время как β -АР и $\alpha 1$ -АР непосредственно участвуют в регуляции сократительной активности миокарда [15], традиционно считалось, что $\alpha 2$ -АР играют ограниченную роль в сердце. В первую очередь было обнаружено, что агонисты $\alpha 2$ -АР действуют в коронарных артериях и сердечных нервах, но не в самом миокарде [16].

Фактически экспрессия поли(А)+РНК $\alpha 2_A$, $\alpha 2_B$ и $\alpha 2_C$ в сердце крыс была незначительной по сравнению с уровнем этих рецепторов в нейронах, тканях почек, печени или аорты [17]. Однако более поздние исследования с использованием вестерн-блоттинга выявили экспрессию белков всех трех $\alpha 2$ -рецепторов в сердце крыс, но в желудочковых миоцитах были обнаружены только $\alpha 2_A$ -АР и $\alpha 2_C$ -АР [18]. У человека распределение мРНК $\alpha 2$ -АР в целом отличается от такового у крысы, а ткани желудочков характеризуются преимущественным присутствием $\alpha 2_C$ и отсутствием мРНК $\alpha 2_A$ [19]. Идентифицированная экспрессия изоформ $\alpha 2$ -АР в клетках миокарда безусловно заслуживает внимания и указывает на потенциальный вклад этих рецепторов в регуляцию миокарда.

Вопреки парадигме, согласно которой $\alpha 2$ -АР оказывают минимальное прямое воздействие на кардиомиоциты, недавние исследования с изолированными желудочковыми кардиомиоцитами крысы выявили не только наличие всех трех подтипов $\alpha 2_A$ -АР, $\alpha 2_B$ -АР и $\alpha 2_C$ -АР как на уровне экспрессии мРНК, так и на уровне белка, но также выявили их ранее непризнанный кардиопротекторный потенциал [20]. Кроме того, было определено, что $\alpha 2$ -АР экспрессируются как в процессе эмбрионального развития сердца, так и во взрослом возрасте у мышей, а также в кардиомиоцитах, дифференцированных *in vitro* из эмбриональных стволовых клеток [21]. Экспрессия $\alpha 2$ -адренергических рецепторов ($\alpha 2$ -АР) очень высока в сердце плода крыс, хотя их количество снижается с увеличением срока беременности. Экспрессия $\alpha 2_A$ и $\alpha 2_C$, но не $\alpha 2_B$, была подтверждена в популяции миоцитов с помощью непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии с подтип-специфическими антителами и методом вестерн-блоттинга. Селективный агонист $\alpha 2$ -АР и норадреналин увеличивали организацию актинового цитоскелета, и это увеличение блокировалось селективным антагонистом $\alpha 2$ -АР атипаме-

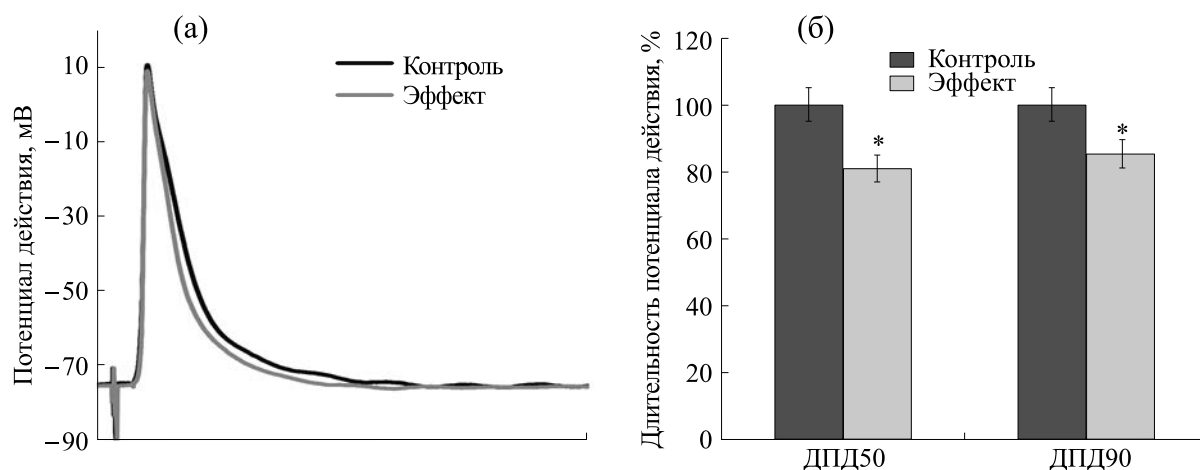


Рис. 1. (а) — Влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия миокарда предсердия с навязанным ритмом у взрослых крыс; (б) — влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия на уровне 50% ($p < 0.05$) и 90% ($p < 0.05$) миокарда предсердия с навязанным ритмом у взрослых крыс.

золом. Кроме того, дексмететомидин ингибировал стимулируемое изопротеренолом накопление цАМФ в изолированном сердце плода крысы, и это блокировалось раувольцином. Следовательно, функциональные подтипы α_2A и α_2B присутствуют в сердце эмбриональной крысы, где они могут играть определенную роль в развитии сердца.

Все вышесказанное указывает на то, что α_2 -АР могут быть вовлечены в механизмы регуляции сердца и могут служить потенциальными мишенями в терапии сердечно-сосудистых заболеваний [22].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на белых лабораторных крысах в возрасте 1 неделя ($n = 7$), 3 недели ($n = 9$) и 16 недель ($n = 7$) с учетом биоэтических норм. В качестве наркоза использовали 25%-й раствор уретана из расчета 1.2 г/кг массы животного, который вводили внутрибрюшинно. Наркотизированному животному вскрывали грудную клетку, сердце быстро извлекали и помещали в чашку Петри с раствором Тироде (Sigma-Aldrich, США), в состав которого входили 7.54 г/л NaCl, 0.3 г/л KCl, 0.134 г/л $CaCl_2$, 0.06 г/л $MgSO_4$, 0.14 г/л NaH_2PO_4 , 1.68 г/л $NaHCO_3$, 0.9 г/л глюкозы ($37^\circ C$, pH 7.4). Раствор обогащали карбогеном в течение всего эксперимента (95% O_2 и 5% CO_2). Сердце препарировали и изготавливали многоклеточный препарат с ушком правого предсердия, поперечным гребешком и фрагментами верхней и нижней полой вен. Электрическую активность кардиомиоцитов изучали с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения на препарате правого предсердия при на-

вязанном ритме с частотой 5 Гц. Внешнее раздражение осуществляли через платиновые электроды. Полученные записи электрической активности миокарда анализировали с помощью оригинальной программы Elph 3.0. Раствор агониста α_2 -адренорецепторов клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) подавали в течение 20 мин. Исследовали следующие параметры потенциала действия (ПД): мембранный потенциал, длительность фазы деполяризации, амплитуда потенциала действия и длительность потенциала действия на уровне 50% (ДПД50%) и 90% (ДПД90%) реполяризации. Длительность фазы реполяризации рассчитывали как время от пика ПД до спада ПД на уровне 50% и 90% [23]. Достоверность различий рассчитывали по t -критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Агонист α_2 -адренорецепторов клонидин гидрохлорид в концентрации 10^{-6} М не вызывал достоверных изменений значений мембранного потенциала, длительности фазы деполяризации и амплитуды потенциала действия во всех исследованных возрастных группах животных.

Аппликация клонидина гидрохлорида в концентрации 10^{-6} М приводила к уменьшению длительности потенциала действия на уровне 50% реполяризации у взрослых крыс с 8.88 ± 0.80 мс до 7.9 ± 0.18 мс ($p < 0.05$), что составило 19.12% (рис. 1а,б). У трехнедельных и однонедельных крысят указанная концентрация, наоборот, вызывала удлинение ДПД50% с 6.18 ± 0.74 мс до 8.12 ± 0.94 мс ($p < 0.05$) у трехнедельных и с 20.15 ± 3.27 мс до 23.98 ± 2.98 мс ($p < 0.05$) у не-

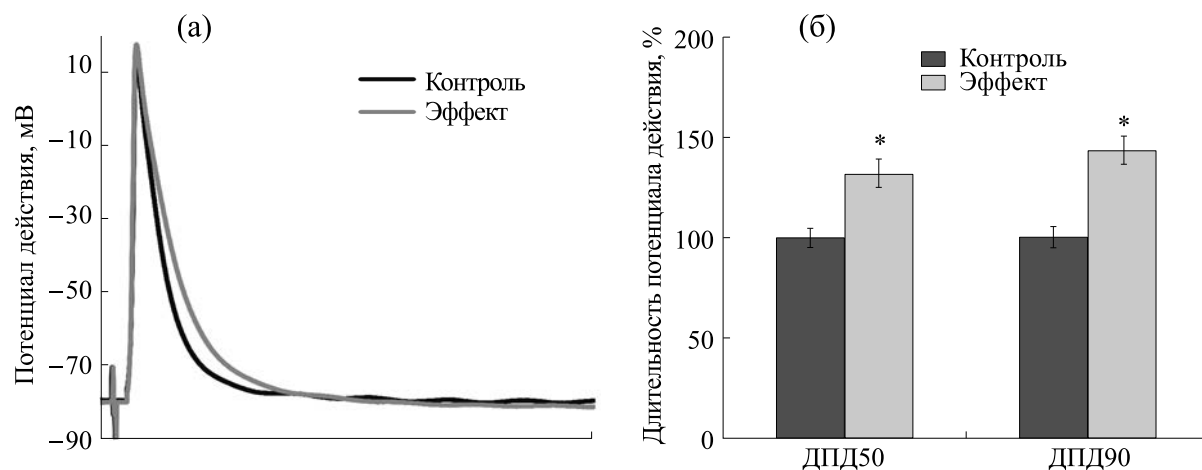


Рис. 2. (а) — Влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия миокарда предсердия с навязанным ритмом у трехнедельных крысят; (б) — влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия на уровне 50% ($p < 0.05$) и 90% ($p < 0.05$) миокарда предсердия с навязанным ритмом у трехнедельных крысят.

дельных крысят, т.е. на 32.47% (рис. 2а,б) и 22.24% (рис. 3а,б) соответственно.

Также было выявлено, что длительность потенциала действия на уровне 90% у взрослых крыс уменьшилась с 26.47 ± 6.43 мс на 22.24 ± 2.69 мс ($p < 0.05$), что составило 14.79% (рис. 1а,б). Но у трехнедельных и однонедельных было выявлено удлинение данного параметра при введении клонидина гидрохлорида в концентрации 10^{-6} М. У трехнедельных животных ДПД90% увеличивался с 16.63 ± 1.41 мс до 23.41 ± 1.57 мс ($p < 0.05$) мс, а у однонедельных крысят значение данного показателя возрастало с 50.48 ± 8.28 мс до 66.41 ± 9.40 мс ($p < 0.05$). Таким образом, длительность потенциала действия на уровне 90% ре-

поляризации в данных возрастных группах увеличивалась соответственно на 44.32% (рис. 2а,б) и 35.03% (рис. 3а,б).

ВЫВОДЫ

В раннее проведенных исследованиях нами было рассмотрено влияние клонидина гидрохлорида на параметры изолированного сердца и выявлено, что агонист α_2 -АР изменял частоту сердечных сокращений и коронарный поток изолированного сердца трехнедельных крыс. Возможно, что стимуляция α_2 -АР приводит к активации ингибирующих G-белков и, как следствие, к возникновению брадикардии. Кроме того, разнонаправленная динамика показателей ча-

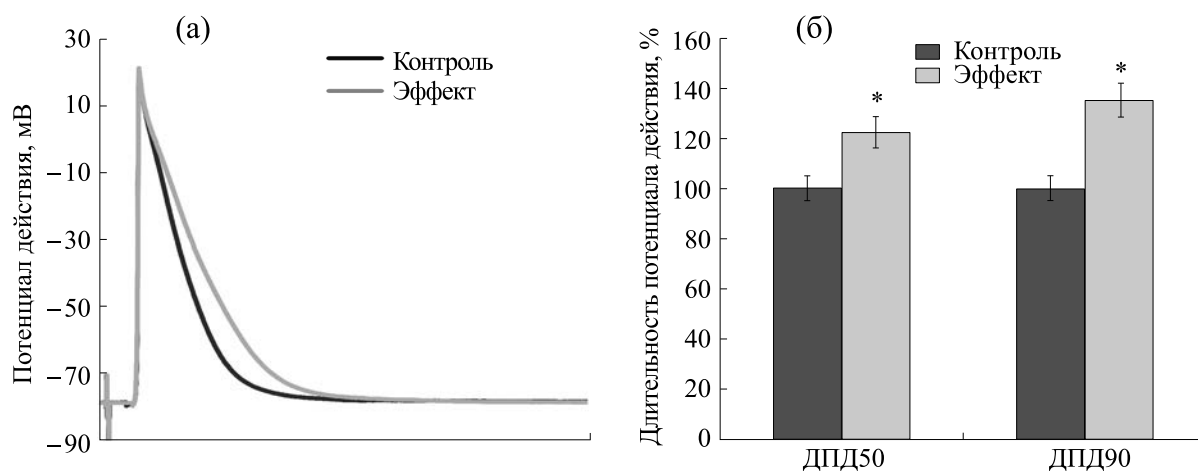


Рис. 3. (а) — Влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия миокарда предсердия с навязанным ритмом у недельных крысят; (б) — влияние клонидина гидрохлорида (10^{-6} М) на длительность потенциала действия на уровне 50% ($p < 0.05$) и 90% ($p < 0.05$) миокарда предсердия с навязанным ритмом у недельных крысят.

стоты сердцебиения и коронарного потока изолированного сердца при введении клонидина имеет концентрационную зависимость [24].

В исследованиях влияния стимуляции $\alpha 2$ -АР на сократимость полосок миокарда предсердий новорожденных, трехнедельных и взрослых крыс было показано, что агонист $\alpha 2$ -АР в концентрации 10^{-6} М оказывал отрицательный инотропный эффект [25].

Проведенные электрофизиологические исследования с постоянным навязанным ритмом позволяют сделать вывод о существенной роли $\alpha 2$ -АР в регуляции электрической активности рабочих кардиомиоцитов. Стимуляция $\alpha 2$ -адренорецепторов неселективным агонистом в кардиомиоцитах однедельных, трехнедельных и взрослых крыс с навязанным ритмом в концентрации 10^{-6} М приводила к разнонаправленному эффекту длительности фазы реполяризации потенциала действия, что, возможно, связано с возрастными особенностями каскадов внутриклеточных посредников данного типа адренорецепторов сердца. Согласно литературным данным, семисуточные крысята характеризуются отсутствием симпатической иннервации в сердце, у 21-суточных животных наблюдается пик частоты сердечных сокращений и начало формирования адренергической иннервации сердца, а у 100-суточных животных симпатическая иннервация сердца является полностью сформированной и симпатические регуляторные воздействия приобретают черты, характерные для взрослых животных. Таким образом, нами рассматриваются животные с различными уровнями развития симпатической иннервации сердца [26].

Известно, что длительность фазы реполяризации ПД в кардиомиоцитах зависит от выходящих калиевых токов — I_{Kur} (сверхбыстрый выходящий ток задержанного выпрямления), I_{to} (транзиторный выходящий ток), I_{Kr} и I_{Ks} (быстрый и медленный компоненты токов задержанного выпрямления) [27], I_{K1} (ток аномального выпрямления) и некоторые другие. Токи задержанного выпрямления протекают через потенциалзависимые калиевые каналы. У человека и крысы длительность фазы реполяризации ПД в основном определяется током I_{Kr} . Калиевые каналы играют важную роль в формировании потенциала покоя и потенциала действия в кардиомиоцитах. Калиевые каналы, по сравнению с натриевыми и кальциевыми, наиболее разнообразны как в кардиомиоцитах, так и в мембранах других клеток. Стимуляция $\alpha 2$ -АР может активировать протеинкиназу С, что приводит к высвобождению ионов Ca^{2+} . Повышение внутриклеточного Ca^{2+} активирует Ca^{2+} /кальмодулин-зависимую киназу и протеинкиназу С; это приводит к усиле-

нию K^{+} -тока, что может служить объяснением укорочения длительности реполяризации у взрослых животных [28]. Особенности механизмов удлинения реполяризации у крысят одно- и трехнедельного возраста могут служить предметом дискуссии. Так или иначе, полученные результаты показывают, что эффекты стимуляции $\alpha 2$ -АР зависят от активации различных уровней регуляции сердечной деятельности, что, безусловно, следует учитывать при применении этих препаратов в терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00121, <https://rscf.ru/project/21-15-00121>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. Bylund, D. C. Eikenberg, J. P. Hieble, et al., *Pharmacol. Rev.*, **46**, 121 (1994).
2. M. Philipp and L. Hein, *Pharmacol. Ther.*, **101**, 65 (2004).
3. W. Hoefke and W. Kobinger, *Arzneimittelforschung*, **16**, 1038 (1966).
4. R. D. Sanders and M. Maze Adrenergic and cholinergic compounds. In *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 177. *Analgesia*, Ed. by C. Stein (Springer, Heidelberg, 2007), pp. 251–264.
5. R. Gilsbach, J. Albarran-Juarez, and L. Hein, *Curr. Topics in Membranes*, **67**, 139 (2011).
6. O.-E. Brodde and M. C. Michel, *Pharmacol. Rev.*, **51**, 651 (1999).
7. S. Minatoguchi, H. Ito, K. Ishimura, et al., *Am. Heart J.*, **130**, 516 (1995).
8. O.-E. Brodde, H. Bruck, and K. Leineweber, *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 323 (2006).
9. K. Starke, *J. Neurochem.*, **78**, 685 (2001).
10. A. U. Trendelenburg, W. Klebroff, L. Hein, and K. Starke, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **364** (2), 117 (2001).
11. J. Lähdesmäki, J. Sallinen, E. MacDonald, et al., *Neuroscience*, **113** (2), 289 (2002). DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00185-9

12. M. Brede, G. Nagy, M. Philipp, et al., *Mol. Endocrinol.*, **17** (8), 1640 (2003).
13. R. Gilsbach, J. Schneider, A. Lothar, et al., *Cardiovasc. Res.*, **86** (3), 432 (2010).
14. Y. Yoshikawa, N. Hirata, R. Kawaguchi, et al., *Anesthesia & Analgesia*, **126** (2), 443 (2018).
15. B.-E. Myagmar, J. M. Flynn, P. M. Cowley, et al., *Circ. Res.*, **120** (7), 1103 (2017).
16. M. Hongo, S. Fujisawa, T. Adachi, et al., *J. Pharmacol. Sci.*, **131** (2), 118 (2016).
17. W. Lorenz, J. W. Lomasney, S. Collins, et al., *Mol. Pharmacol.*, **38** (5), 599 (1990).
18. M. Ibacache, G. Sanchez, Z. Pedrozo, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Molecular Basis of Disease*, **1822** (4), 537 (2012).
19. D. E. Berkowitz, D. T. Price, E. A. Bello, et al., *J. Am. Soc. Anesthesiol.*, **81** (5), 1235 (1994).
20. Y. M. Kokoz, E. V. Evdokimovskii, A. V. Maltsev, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **100**, 9 (2016).
21. A. Martinez-Fernandez, T. J. Nelson, S. Reyes, et al., *Circulation. Cardiovasc. Genetics*, **7** (5), 667 (2014).
22. A. E. Alekseev, S. Park, O. Y. Pimenov, et al., *Pharmacol. Therapeut.*, **197**, 179 (2019).
23. A. A. Zverev, T. A. Anikina, N. G. Iskakov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **165** (5), 610 (2018).
24. А. М. Купцова, И. И. Хабибрахманов, А. М. Галиева и др., в *Сб. тезисов III Международного конгресса «Фундаментальная и клиническая электрофизиология. Актуальные вопросы аритмологии»* (2019), сс. 65–66.
25. Л. И. Фасхутдинов, Н. И. Зиятдинова, Р. С. Кобзарев и Т. Л. Зефилов, *Рос. кардиол. журн.*, № 27 (S5), 113 2022.
26. Ф. Г. Ситдинов и Т. Л. Зефилов, *Лекции по возрастной физиологии сердца* (ТГГПУ, Казань, 2006).
27. С. А. Кодиров, В. Л. Журавлев, Т. А. Сафонова и др., *Обзоры по клинич. и лекарств. фармакологии* **3** (4), 27 (2004).
28. C. M. J. Tan, P. Green, N. Tapoulal, et al., *Front. Physiol.*, **9**, 1 (2018).

Age Peculiarities in the Effect of Stimulation of $\alpha 2$ -Adrenergic Receptor on Electrical Activity of Rat Cardiomyocytes

A.M. Galieva*, N.I. Ziyatdinova*, N. Mansour*, L.I. Fashutdinov*, and T.L. Zefirov*

**Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia*

Clonidine hydrochloride, an agonist of the $\alpha 2$ -adrenergic receptor, was tested for its effect on the parameters of the electrical activity of the atrial myocardium induced by pacing. In the experimental rat cardiomyocyte pacing model, clonidine hydrochloride caused a decrease (approximately 50% and 90%) in action potential duration in adult rats. Treatment of one- and three-week-old rats with this agonist led to an increase (around 50% and 90%) in action potential duration

Keywords: $\alpha 2$ -adrenergic receptors, heart, electrophysiology

УДК 577.3.0

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА В РАСТЕНИЯХ *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin МЕТОДОМ ЭПР СПИНОВОГО ЗОНДА

© 2023 г. Л.Ю. Мартиросян*, **, #, В.М. Гольдберг*, И.И. Барашкова**, В.В. Каспаров*, Ю.Ц. Мартиросян*, **, М.В. Мотякин*, ***, С.А. Гайдамака****, С.Д. Варфоломеев*, ****

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

**Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Тимирязевская ул., 42, Москва, 127550, Россия

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

****Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Воробьевы горы, 1/11Б, Москва, 119991, Россия

#E-mail: levon-agro@mail.ru

Поступила в редакцию 16.01.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Предложен метод количественного анализа содержания натурального каучука в кок-сагызе *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin по концентрации нитроксильного радикала ТЕМПО, адсорбированного в образцах корня растения. Метод основан на сравнительном анализе интегральных интенсивностей сигналов ЭПР в эталонном и диагностируемом образцах. Разработанный способ анализа позволяет быстро и с хорошей точностью определять содержание каучука в тканях растений без его выделения из каучук-содержащей биомассы.

Ключевые слова: ЭПР-спектроскопия, натуральный каучук, спиновый зонд ТЕМПО, агропони фитотрон, кок-сагыз *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin.

DOI: 10.31857/S0006302923040130, EDN: KLNBLV

Натуральный каучук является стратегически важным сырьем во всем мире. Его мировое потребление составляет почти 11 миллионов тонн в год, и спрос быстро растет. В настоящее время доля натурального каучука, применяемого в шинной промышленности, составляет примерно 50% от всех используемых видов каучуков [1–3]. В странах Юго-Восточной Азии — монополистов в производстве натурального каучука — существует реальная биологическая опасность поражения пальмы гевеи, которая является единственным промышленным источником натурального каучука. В течение последних лет проводятся исследования по выращиванию альтернативных каучуконосов, в том числе кок-сагыза *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin, в условиях умеренного климата [1, 4]. Однако развитие растений и скорость синтеза каучука в них происходит слишком медленно, чтобы производство было рентабельным. Научно-техническая проблема заключается и в мак-

симальной интенсификации процесса роста растений-каучуконосов, и в существенном увеличении выхода целевых продуктов. Ключевым направлением в решении проблем продуктивности кок-сагыза являются генно-инженерные работы по модификации его генома с целью получения растений достаточно высокой производительности по каучуку [5]. Для ускорения селекционных работ по отбору и размножению экземпляров с высокой скоростью биосинтеза и накопления натурального каучука требуется методика ускоренного анализа содержания каучука в корнях растений.

Разработки методов качественного и количественного анализа натурального каучука имеют давнюю и обширную историю, обусловленную огромным объемом его практического использования [6]. Наибольшее распространение получил гравиметрический метод. Он состоит в экстракции каучука из высушенных и диспергированных частей растения-каучуконоса, выделения каучука из экстракта и взвешивания его после сушки. Публикации на эту тему можно встретить

Сокращение: ТЕМПО — 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксид.

в 30-х годах XX века [7]. В последующие годы метод был существенно усовершенствован [8–11]. Очевидное достоинство гравиметрического метода заключается в том, что он является абсолютным методом. Существенным недостатком этого метода является длительное время анализа и необходимость иметь значительное количество исходного материала. В последнее время для количественного анализа натурального каучука интенсивно развивается метод инфракрасной спектроскопии в ближнем ИК-диапазоне (русская аббревиатура БИК, английская — NIRS) [12, 13]. Использование переносных БИК-спектрометров оказалось весьма продуктивным для оценки качества каучуконосов при их выращивании на грунте. Метод, однако, обладает невысокой точностью, что требует значительного количества измерений (до сотни) для набора статистики и получения надежного результата. По этим причинам для научных исследований, например, в генно-инженерной области, использование метода ИК-спектроскопии встречает серьезные затруднения. К настоящему времени разработаны спектроскопический метод в ближнем ИК-диапазоне и метод с использованием ЯМР-релаксометра [14]. Однако они требуют значительного времени и объема исследуемого материала и отличаются большой трудоемкостью.

Разработка достаточно быстрого способа определения содержания малых количеств каучука непосредственно в корнях растения значительно упростила бы оценку эффективности различных приемов по интенсификации роста и производительности растений по целевым продуктам. Эта проблема может быть решена с помощью метода ЭПР спиновго зонда. Метод спиновго зонда широко используется для исследования различных соединений [15–19]. Спектр ЭПР нитроксильного радикала предоставляет информацию о химических реакциях, локальной молекулярной подвижности, полярности, молекулярной организации исследуемой системы. В настоящей работе данный метод был использован для определения количества каучука в корнях кок-сагыза.

Цель настоящей работы — разработка метода количественного микроанализа каучука в корнях кок-сагыза, выращенного *in vitro* и в фитотроне аэропонной модификации [20]. В качестве реперов для градуировки метода использовались образцы корня кок-сагыза, в которых содержание каучука было определено традиционным гравиметрическим способом, — экстракцией из корня. Принципиальное отличие предложенного в настоящей работе метода от гравиметрического заключается в том, что разработанный способ анализа не требует выделения каучука из растения, а проводится непосредственно в образцах высу-

шенного корня — места его биосинтеза и накопления.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растения кок-сагыза выращивали 70 суток в условиях *in vitro* и 35 суток в аэропонном фитотроне [20]. Образцы корней высушивали при 60°C в сушильном шкафу в течение 16 ч, после чего измельчали на шаровой мельнице КМ1 (MLW, ГДР) (3000 об/мин, масса шара 0.2 кг, прилагаемая нагрузка 20–30 Н, регулировка нагрузки за счет подачи тока 173–272 мА) до получения частиц размером примерно 20 мкм. Размер частиц контролировали, просеивая их через сито 20 мкм. Экспериментальным путем установлено, что такая степень дисперсности субстрата необходима и для полноты экстракции и для оптимальной адсорбции стабильного радикала на частицах корня кок-сагыза.

Для проведения гравиметрического анализа каучук экстрагировали из диспергированного сухого корня. В качестве экстрагента использовали хлороформ. Экстракцию проводили в аппарате Сокслета в течение 3 ч при 60°C. Каучук высаживали из экстракта трехкратным избытком этилового спирта, промывали водой, ацетонитрилом и этиловым спиртом. Образцы доводили до постоянного веса в процессе сушки в течение суток при температуре 60°C.

Процентное содержание каучука ($W_{\text{кауч}}$, %) в сухом корне определяли по формуле

$$W_{\text{кауч}} = \left(\frac{V_{\text{общ}} \times M_{\text{кауч}}}{V_{\text{аликв}} \times M_{\text{корня}}} \right) \times 100\%,$$

где $V_{\text{общ}}$ — общий объем сконцентрированного хлороформенного экстракта (мл), $V_{\text{аликв}}$ — объем аликвоты хлороформенного экстракта (мл), $M_{\text{кауч}}$ — масса каучука в пробирке (г), $M_{\text{корня}}$ — вес образца сухого корня, взятого на экстракцию (г).

Стабильный нитроксильный радикал 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО) (Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве спиновго зонда. В ампулах для ЭПР-спектроскопии взвешивали по 7 мг порошкообразного корня кок-сагыза. ТЕМПО вводили из газовой фазы при комнатной температуре. Для этого ампулы помещали в эксикатор объемом 200 мл, в котором находилось примерно 7 мг ТЕМПО. Оптимальное время экспозиции, обеспечивающее получение наиболее точных и хорошо воспроизводимых результатов, составляло 7 мин, при этом концентрация радикала ТЕМПО в образцах не превышала $1 \cdot 10^{-5}$ М. После введения радикала ампулы с образцами запаивали.

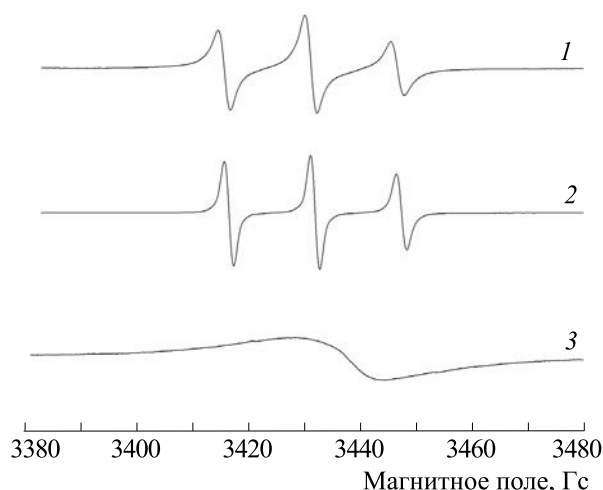


Рис. 1. Спектры ЭПР нитроксильного радикала в кок-сагызе (спектр 1), в натуральном каучуке (спектр 2) и инулине (спектр 3). Температура 20°C.

Спектры ЭПР ТЕМПО регистрировали на спектрометре EMX (Bruker, Германия) в Центре коллективного пользования «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН. Значение микроволновой мощности в резонаторе составляло 2 мВт, амплитуда модуляции — 0.5 Гс. Для определения магнитно-резонансных параметров спектров ЭПР использовали программы WINEPR и SIMPHONIA (Bruker, Германия). Время корреляции вращения τ зонда рассчитывали по следующей формуле [16]:

$$\tau = 6.65 \times 10^{-10} \Delta H^+ \left(\sqrt{\frac{I^+}{I^-}} - 1 \right),$$

где ΔH^+ — ширина низкочастотной компоненты спектра, I^+/I^- — отношение интенсивностей низкочастотной и высокочастотной компонент соответственно. Ширину линии и константы сверхтонкого взаимодействия определяли непосредственно из спектров ЭПР радикала.

Для получения корректных результатов в каждом эксперименте насыщение радикалом ТЕМПО анализируемых образцов и эталонов проводили одновременно в одних и тех же условиях, а спектры ЭПР всех образцов записывали с одинаковыми параметрами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего отметим, что исследованные образцы корней кок-сагыза содержат собственный нативный сигнал ЭПР: синглет с g -фактором 2.0044 ± 0.0001 и шириной линии $\Delta H = 7.0 \pm 0.5$ Гс. Данный сигнал обусловлен, по-видимому, радикалами, возникающими в растениях в результате биохимических реакций. Как будет показано ни-

же, именно этот синглет накладывается на центральную компоненту ЭПР-сигнала нитроксильного радикала и не позволяет проводить анализ по интегральной интенсивности всего спектра.

Спектр ЭПР ТЕМПО в кок-сагызе представлен на рис. 1 (спектр 1). Аналогичные спектры были зарегистрированы для нитроксильного радикала, введенного в эластомеры [15]. На рис. 1 также представлен спектр ТЕМПО в натуральном каучуке (спектр 2). Времена корреляции вращения ТЕМПО и его изотропные константы сверхтонкого взаимодействия в кок-сагызе составляют $\tau = 3.0 \cdot 10^{-10}$ с и $a_N = 15.5$ Гс, в натуральном каучуке $\tau = 2.0 \cdot 10^{-10}$ с и $a_N = 15.4$ Гс. Спектр ЭПР нитроксильного радикала в инулине — втором основном компоненте растения — представляет собой широкий синглет (рис. 1, спектр 3). Очевидно, что ТЕМПО не распределяется в среде инулина. Широкий синглет возникает вследствие высоких локальных концентраций радикала на поверхности этого соединения.

Близость величин основных параметров нитроксильных радикалов (время корреляции и константа сверхтонкого взаимодействия и отсутствие триплета в инулине) дает возможность предполагать, что в кок-сагызе ТЕМПО локализуется исключительно в каучуковых доменах, и таким образом позволяет их обнаружить. Факт избирательной сорбции радикала ТЕМПО на частицах каучука подтверждается еще и тем, что после удаления каучука из образца биомассы экстракцией неполярным растворителем в оставшемся материале триплетные спектры ЭПР вновь введенного ТЕМПО не регистрируются.

Используя данную особенность локализации нитроксильного радикала в кок-сагызе, мы предлагаем метод анализа количественного содержания каучука в этом растении: чем больше каучуковых областей содержит образец, тем больше мест для локализации нитроксильного радикала, тем выше его концентрация в образце и, соответственно, тем больше интенсивность сигнала ЭПР. В данном рассмотрении предположено, что распределение каучуковых доменов на поверхности точно такое же, как и в объеме образца.

Для проверки предложенного метода анализа были выполнены несколько серий экспериментов с разным содержанием каучука в образцах. В качестве иллюстрации на рис. 2 сопоставлены спектры ЭПР ТЕМПО в образцах, полученных из высушенной измельченной ткани корня растения кок-сагыз в двух сериях «А» и «В». Серии выполнены в разное время и с разным шагом по процентному содержанию каучука в образцах. Процентное содержание каучука было определено с помощью экстракции органическими растворителями (гравиметрический метод).

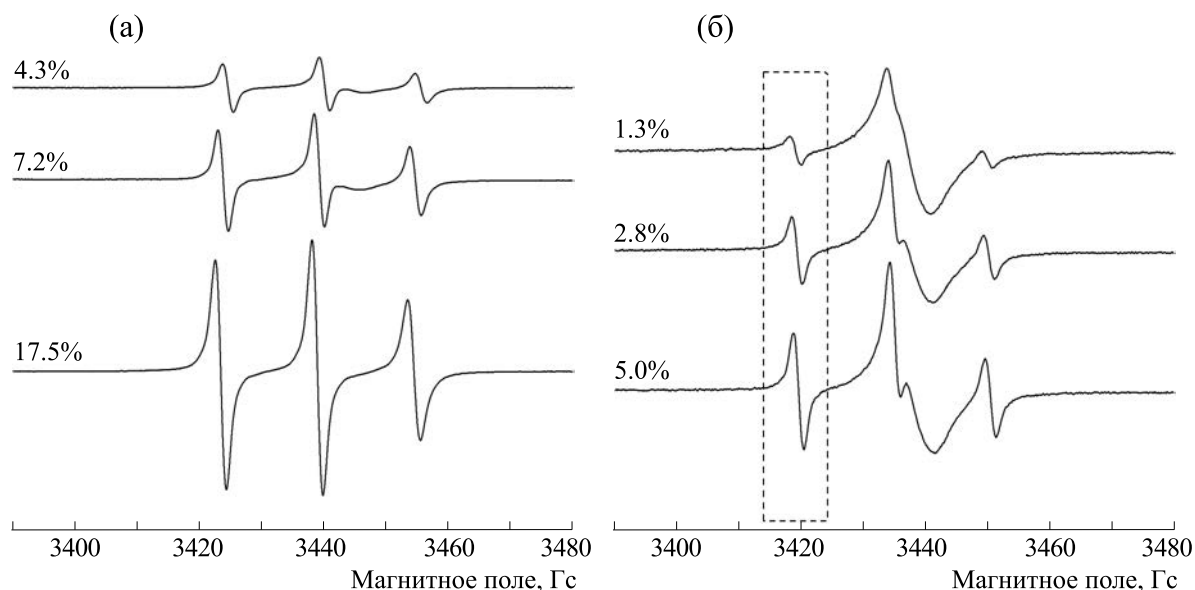


Рис. 2. Спектры ЭПР нитроксильного радикала ТЕМПО, введенного в серии «А» и «В» образцов кок-сагыза с различным содержанием натурального каучука. Цифрами указано процентное содержание каучука в образце, определенное гравиметрическим способом.

Спектры на рис. 2 представлены в одинаковом масштабе для сравнения. Отметим, что время корреляции вращения нитроксильного радикала во всех исследованных образцах кок-сагыза одинаково. Как видно из этих спектров, большему процентному содержанию каучука соответствуют более интенсивные спектры.

Для количественного определения содержания каучука в образцах кок-сагыза использовали низкопольную компоненту спектра ТЕМПО, поскольку на нее не накладываются дополнительные нативные сигналы, заметно искажающие спектр при малых концентрациях каучука

(серия «В»). На рис. 2 в серии «В» низкопольные компоненты спектров обведены пунктиром. В качестве сравнительного параметра была выбрана ее интегральная интенсивность I_{In} :

$$I_{\text{In}} = I \cdot \Delta H^2,$$

где I – интенсивность низкопольной компоненты спектра, ΔH – ее ширина.

Содержание каучука определяли, сравнивая величины интегральной интенсивности низкопольной компоненты сигнала ЭПР ТЕМПО в анализируемом образце и в эталоне. В табл. 1

Таблица 1. Процентное содержание каучука в образцах кок-сагыза, определенное гравиметрическим методом и методом спинового зонда по интенсивности сигнала

№ образца	Каучук, % (гравиметрический метод)	Интенсивность I_{In} , усл. ед.	Каучук, % (ЭПР-метод)
Серия А			
1	4.3	3900	3.5
2	7.2	7700	6.8
3	17.5	20100	17.5*
Серия В			
1	1.3	4746	1.4
2	2.8	9327	2.7
3	5	16846	5*

* – Процентное содержание каучука, относительно которого рассчитывались значения в других образцах в ЭПР методе.

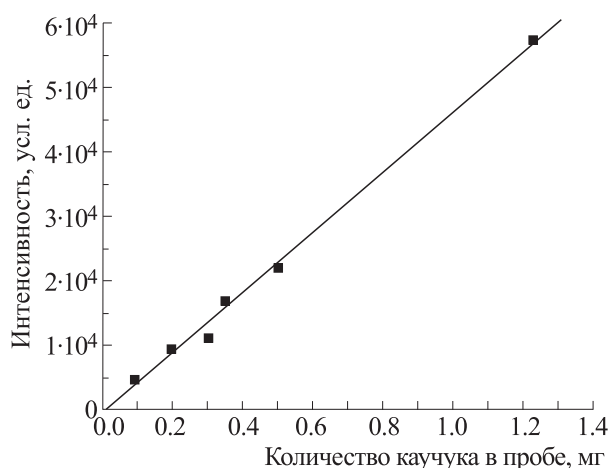


Рис. 3. Зависимость интегральной интенсивности сигнала ЭПР ТЕМПО от количества натурального каучука в образцах объединенной («А» + «В») серии.

представлены результаты расчета, а также показано изменение интегральной интенсивности в спектрах ЭПР ТЕМПО для двух серий при изменении концентрации каучука в образце.

В каждой из представленных серий измерения проводили в одном цикле работы, но показания самих серий снимали в разных соответствующих циклах. Следует отметить, что одинаковым количествам каучука в разных сериях соответствуют различные интенсивности. Это объясняется тем, что концентрация адсорбированных нитроксильных радикалов в образцах зависит от многих параметров, в частности, от давления паров нитроксильного радикала и времени их нахождения в эксикаторе. Даже небольшие изменения в данных параметрах сказываются на интенсивности ЭПР-линий. Поскольку внутри серий отношение интенсивность/масса каучука сохраняется постоянной, то результаты измерения интенсивностей в обеих сериях могут быть приведены к единому масштабу (рис. 3). Интенсивность серии «А» была приведена к масштабу серии «В» с использованием вычисленного коэффициента $k = 2.86$ (отношение угловых коэффициентов линейных зависимостей серий «А» и «В»).

На рис. 3 показана зависимость приведенной интенсивности сигнала ЭПР от количества каучука в образцах для обеих серий. Как видно из рисунка, интегральная интенсивность прямо пропорциональна количеству каучука, по крайней мере до 17.5%, т.е. в тех пределах, в которых он содержался в исследованных образцах кок-сагыза. Расчет среднеквадратичного отклонения в представленной зависимости дает величину 0.01 мг. Это означает, что ширина доверительного интервала 95% надежности результатов составляет ± 0.02 мг. Отметим достаточно хорошую точность

и чувствительность предложенного метода количественного анализа натурального каучука. Так, если в сухом корне концентрация натурального каучука составляет 1%, то в 7 мг корня будет содержаться 0.07 мг каучука. Таким образом, даже такое малое количество каучука может быть определено предлагаемым методом.

ВЫВОДЫ

Предложен метод количественного анализа натурального каучука без его экстрагирования из образца *Taraxacum kok-saghyz* L. E. Rodin по интегральной интенсивности сигнала ЭПР нитроксильного радикала ТЕМПО, адсорбированного на частицах высушенных корней растения. Использование данного метода позволяет ускорить работы по отбору и размножению экземпляров с высокой скоростью биосинтеза и накопления натурального каучука.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-316-90032\20.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salehi M., et al., *Industrial Crops and Products*, **170**, 113667 (2021).
2. А. Ю. Америк и др., *С.-х. биология*, **57** (1), 3 (2022).
3. Б. Р. Кулуев, Р. Р. Гарафутдинов, И. В. Максимов и др., *Биомика*, 2015, Том 7, № 4, С. 224-283.
4. *Goodyear to develop domestic source of natural rubber*, <https://www.prnewswire.com/news-releases/goodyear-to-develop-domestic-source-of-natural-rubber-301519783.html>
5. A. Y. Amerik, et al., *Rus. J. Plant Physiol.*, **68** (1), 31 (2021).
6. M. Salehi, et al., *Industrial Crops and Products*, **178**, 114562 (2022).
7. А. А. Прокофьев, *Анализ каучуконосных растений*, под ред. А. А. Ничипоровича (Всесоюз. науч.-иссл. ин-т каучука и гуттаперчи, Глав. ред. хим. лит-ры, Москва, 1936), т. 1.
8. L. T. Black, et al., *Rubber Chemistry and Technology*, **56** (2), 367 (1983).
9. M. E. Salvucci, T. A. Coffelt, and K. Cornish, *Industrial Crops and Products*, **30** (1), 9 (2009).

10. C. H. Pearson, K. Cornish, and D. J. Rath, *Industrial crops and products*, **43**, 506 (2013).
11. S. Azadi, et al., *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **26** (10) 2047 (2020).
12. K. Cornish, M. D. Myers, and S. S. Kelley, *Industrial Crops and Products*, **19** (3), 283 (2004).
13. M. Taurines, et al., *Industrial Crops and Products*, **134**, 177 (2019).
14. M. C. Davis and Y. Huang, *Methods for quantifying rubber content in a plant with NMR*: пат. 10578567 США (2020).
15. А. М. Вассерман и А. Л. Коварский, *Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров* (Наука, М., 1986).
16. А. Н. Тихонов, *Соросовский образоват. журн.*, № 1, 8 (1998).
17. I. I. Barashkova, et al., *Appl. Magn. Resonance*, **46** (12), 1421 (2015).
18. M. A. Uddin, et al., *J. Polymer Sci.*, **58** (14), 1924 (2020).
19. В. В. Птушенко, *Природа*, № 6, 53 (2011).
20. Ю. Ц. Мартиросян и др., *Аэропонный фитотрон*. Патент № RU 196013 U1 (2020).

Quantitative Determination of Natural Rubber Content of *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin Plants Using Spin Probe Method of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy

L.Yu. Martirosyan^{*, **}, V.M. Goldberg^{*}, I.I. Barashkova^{**}, V.V. Kasparov^{*}, Yu.Ts. Martirosyan^{*, **},
M.V. Motyakin^{*, ***}, S.N. Gaydamaka^{****}, and S.D. Varfolomeev^{*, ****}

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

^{**}*All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya ul. 42, Moscow, 127550 Russia*

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

^{****}*Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Vorobyovy Gory 1/11B, Moscow, 119991 Russia*

The paper presents a method to carry out a quantitative analysis of the content of natural rubber of *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin by measuring adsorption of the nitroxide radical TEMPO in root preparations of the said plant. The method is based on a comparison between the integrated intensity of an EPR signal of interest and a standard. The developed method of analysis makes it possible to quickly and with good accuracy determine the content of rubber of plant tissues without its extraction from rubber-containing biomass.

Keywords: *EPR spectroscopy, natural rubber, spin probe TEMPO, aeroponic phytotron, Taraxacum kok-saghyz E. Rodin*

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ГРЕБНЕВИКА *Pleurobrachia pileus* (O.F. Müller, 1776) В ЛЕТНИЙ СЕЗОН

© 2023 г. А.В. Темных^{*,#}, М.И. Силаков^{*}, О.В. Машукова^{*}

^{*}ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О.Ковалевского РАН»,
просп. Нахимова, 2, Севастополь, 299001, Россия

[#]E-mail: atemnykh@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.12.2022 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Способность к биолюминесценции обнаружена у многих морских гидробионтов, в том числе практически все представители типа гребневики (*Stenophora*) обладают способностью излучать свет. Свечение видов и биолюминесцентных субстратов, выделенных из них, активно используется в биологии, экологии и медицине для исследования физиологического состояния организма или выявления неблагоприятных параметров среды. Параметры свечения представителей гребневики Черного моря *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (*Lobata*) и *Beroe ovata* Bruguière, 1789 (*Beroida*) используются в изучении влияния токсикантов, таких, как жидкие углеводороды, полихлорированные бифенилы, тяжелые металлы. Способность к биолюминесценции автохтонного обитателя Черного моря – гребневика *Pleurobrachia pileus* (O.F. Müller, 1776) – вызывала сомнение у некоторых исследователей. Целью данной работы являлось подтверждение способности свечения данного вида и выбор оптимального времени для проведения экспериментов с ним. Было выявлено, что биолюминесцентную реакцию на механическую и химическую стимуляцию проявляют все размерные группы данного вида в любое время суток. При химической стимуляции величины энергии сигнала выше в несколько раз, чем при механической стимуляции. Выявлено, что оптимальное время для проведения биофизических исследований – период с 20:00 до 6:00, так как энергетические показатели биолюминесцентного сигнала в это время максимальны в пределах суток.

Ключевые слова: *Stenophora*, люминесценция, циркадный ритм, Черное море.

DOI: 10.31857/S0006302923040142, EDN: KМУНУХ

Способность испускать свет в результате биохимической реакции называется биолюминесценцией и, в отличие от других видов люминесценции, таких как флуоресценция, термохемилюминесценция и т.д., присуща только живым организмам, имеющим специализированный ферментативный аппарат или биосубстрат [1]. В ходе химической реакции люциферин (субстрат) окисляется с помощью молекулярного кислорода под действием люциферазы (фермента) с образованием органических пероксидных соединений, распад которых приводит к возбуждению молекул вещества, ответственных за светоизлучение [2].

Биолюминесценция встречается у эволюционно разнородных групп организмов [2–4], в том числе у некоторых бактерий, грибов, водорослей, кишечнополостных, червей, моллюсков, насекомых и рыб, но не наблюдается у более высокоорганизованных животных. Биолюминесцентные системы возникали у организмов независимо

друг от друга и не закреплялись эволюционно [2]. Это привело к тому, что ферменты и субстраты этих систем различны и сейчас известно уже о тридцати типах биолюминесцентных систем, только десять из которых хорошо изучены [5]. Кроме того, отличаются по характеру и люминесцентные структуры (фотофоры) и фотоциты – клеточные типы, ответственные за эти процессы. Это влияет на длину волны испускаемого света, которая находится в синем диапазоне у морских микроводорослей динофлагеллят, в зеленом – у желтоголового зоопланктона [6] и т.д. Соответствующие этим цветам энергии фотонов составляют от 40–70 ккал на 1 эйнштейн, что значительно превышает энергию большинства биохимических реакций, в том числе и распад высокоэнергетической молекулы АТФ (7 ккал). Большинство морских биолюминесцентных организмов в природе генерируют световые вспышки в ответ на внешние, в основном, механические либо химические воздействия.

Биолюминесценция является важным элементом функционирования пелагических сообществ [3, 4, 7]. Это связано с экологической ролью света в жизни гидробионтов. Биолюминесценция используется для внутривидовой и межвидовой коммуникации, для привлечения жертвы и отпугивания хищников. Так, для фитопланктонных организмов биолюминесценция выполняет защитную функцию. Светящиеся виды микроводорослей выедаются в меньшей степени, чем несветящиеся [8]. Это также относится и к некоторым видам копепод, например *Metridia lucens* Voesck, 1865 [9]. Кроме того, неравномерное затухание и рассеивание различных длин волн оптического спектра в водной среде снижают эффективность света на глубинах, превышающих уже первые десятки метров [10, 11]. Таким образом, ниже фотического слоя биолюминесценция может служить средством обмена информацией между гидробионтами.

В настоящее время уже выявлены зависимости временных и энергетических параметров светового излучения от физиологического состояния ряда организмов [12–14]. Выяснилось, в частности, что влияние может оказывать отклонение температуры от оптимальной для жизнедеятельности данного организма [15, 16], изменение уровня и оптического спектра освещенности [17–21], солености среды [22] и т.д. При этом, как считается, естественные колебания перечисленных факторов не являются для организма экстремальными, поскольку составляют экологическую нишу вида и определяют его популяционный гомеостаз.

Способность к биолюминесценции, обнаруженная у многих морских гидробионтов [2, 4, 18, 23], выявлена и у представителей желетелого макропланктона — гребневиков (*Stenophora*). Практически все представители гребневиков являются биолюминесцентными видами с хорошо изученными параметрами светового сигнала [6, 24]. Представители этого типа животных светятся зелеными вспышками. В этом случае стимулятором, как и у большинства кишечнорастворимых, является ион Ca^{2+} , реагирующий с люциферин-люциферазным пероксидным комплексом — экворинном.

Три вида гребневиков, играющих важную роль в экосистеме Черного моря и являющиеся доминирующими по биомассе видами, принадлежат к трем отрядам: *Lobata*, *Beroida*, *Cidippida*. Наиболее полно изучена биолюминесценция двух видов-вселенцев — *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (*Lobata*) и *Beroe ovata* Bruguière, 1789 (*Beroida*) [24–28]. Параметры свечения этих видов используются для оценки влияния токсических веществ на состояние организма в биофизических исследованиях [26–28]. Светимость третьего аборигенного вида — *Pleurobrachia pileus* (O. F. Müller, 1776)

(*Cidippida*), как и других видов рода *Pleurobrachia* (*Cidippida*), является спорным моментом. Так, для акватории Средиземного моря и берегов Северной Америки возможность излучать свет для *P. bachei* A. Agassiz, 1860, *P. rhodopsis* Chun, 1879 и *P. pileus* не только ставится под сомнение, но и категорически заявляется о невозможности этих видов к биолюминесценции [29]. Другие исследователи [14, 23, 30] полагают, что *P. pileus* является биолюминесцентным видом. Так, проведенные лабораторные исследования над черноморской популяцией *P. pileus* в холодное время года показали, что стимулирование химическим и механическим способом представителей этого вида вызывает биолюминесцентный отклик [30]. Таким образом, биолюминесцентный сигнал этого вида также может быть использован для анализа состояния организма при влиянии на него различных абиотических и антропогенных факторов. На данный момент многие аспекты биолюминесценции *P. pileus* не известны.

Целью данной работы являлось выявление энергетических и временных параметров биолюминесцентного сигнала и его циркадного ритма у *Pleurobrachia pileus* в летний период для выбора оптимального времени проведения исследований по влиянию различных факторов на его физиологическое состояние.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал для исследования параметров свечения *Pleurobrachia pileus* собран на 26 станциях в научном рейсе №102 НИС «Профессор Водяницкий» в период с 10.06.18 г. по 01.07.18 г. (рис. 1). Для сбора проб использовали планктонную сеть Джеди (ячей 115 мкм, входное отверстие 0.1 м²) и макропланктонную сеть Богорова—Раса (ячей 400 мкм, входное отверстие 0.5 м²).

Из планктонной пробы изымали не помятые, активные экземпляры *Pleurobrachia pileus*, измеряли их и ранжировали по размеру в стеклянные стаканы емкостью 0.5–1.0 л, наполненные морской водой, взятой с поверхности на той же станции и профильтрованной через сито ячей 35 мкм. Через 1 ч после вылова объекты помещали в темное помещение. Экспозиция проводилась через 2 ч после пребывания в темноте при температуре 21°C.

Исследование параметров свечения проводили на лабораторном биофизическом комплексе «Свет» [4] методом механической и химической стимуляции отдельного объекта, помещенного в теневую камеру комплекса в кювете объемом 50 мл [14]. Приборный лабораторный комплекс «Свет» включал высоковольтный блок питания (BC-22), люминескоп, состоящий из приемника

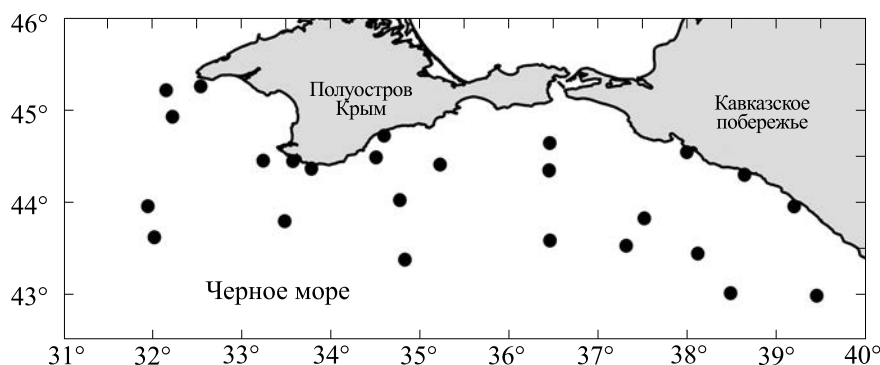


Рис. 1. Карта станций научного рейса № 102 НИС «Профессор Водяницкий», на которых выполнялся сбор *Pleurobrachia pileus* для проведения эксперимента.

светового излучения (ФЭУ-71) и темновой камеры для объекта, а также регистрирующего устройства — цифрового интерфейса.

В качестве механического стимулятора использовали морскую воду (объем 2 мл), вводимую с помощью поршневого устройства с созданием турбулентного течения жидкости в кювете. Химическую стимуляцию проводили добавлением 2 мл 96%-го этанола ламинарным течением.

Основными энергетическими параметрами биолюминесцентного сигнала являются амплитуда (A) — максимальная энергия сигнала в единицу времени отсчета, общая энергия сигнала (E) и суммарная энергия сигнала, превышающая порог 0.1 от амплитуды ($E_{0.1A}$). Временными параметрами выбраны общая длительность сигнала (L) и суммарная длительность отдельных импульсов биолюминесцентного сигнала ($l_{0.1A}$) [3, 4, 12] (рис. 2).

Были исследованы 498 объектов размером 4.0–21.0 мм (орально-аборальная длина), ранжированных на 9 размерных групп: 4.5 ± 0.5 , 6.5 ± 0.5 , 8.5 ± 0.5 , 10.5 ± 0.5 , 12.5 ± 0.5 , 14.5 ± 0.5 , 16.5 ± 0.5 , 18.5 ± 0.5 , 20.5 ± 0.5 мм. Размеры каждой особи определяли под бинокулярным микроскопом МБС-10 с точностью до 0.1 мм. Для визуального удобства в таблицах и графиках группы названы по размеру меньших в них особей в мм (размерная группа 4.5 ± 0.5 обозначена как группа 4 мм и т.д.). Исследование диапазона изменения параметров биолюминесцентного сигнала у каждой размерной группы проводили в четные часы суток: 02:00, 04:00, 06:00, ..., 24:00. Эксперименты по сравнению величин основных параметров биолюминесцентного сигнала между размерными группами проводили в утренние часы (8:00) и темное время суток (22:00).

Детально суточную динамику параметров биолюминесценции исследовали у самых многочис-

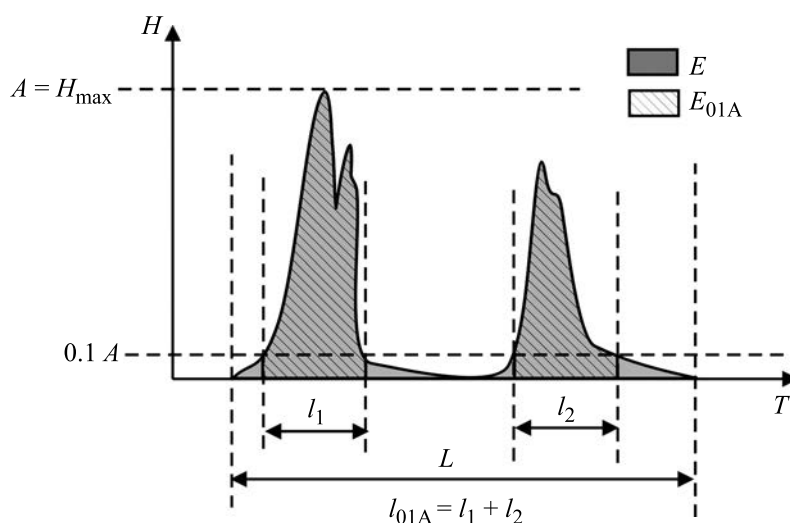


Рис. 2. Параметры биолюминесцентного сигнала.

Таблица 1. Обозначения анализируемых параметров биолюминесцентного сигнала и их расшифровка

№	Обозначение	Расшифровка
1	$A_{\text{ср.}}$	Средняя по группе одноразмерных особей амплитуда биолюминесцентного сигнала, мкВт·см ⁻²
2	$A_{\text{инд.}}$	Амплитуда биолюминесцентного сигнала отдельной особи в группе, мкВт·см ⁻²
3	$L_{\text{ср.}}$	Средняя по группе одноразмерных особей длительность сигнала, с
4	$L_{\text{инд.}}$	Длительность сигнала отдельной особи в группе, с
5	$E_{\text{ср.}}$	Средняя по группе одноразмерных особей энергия сигнала, мкВт·с·см ⁻²
6	$E_{\text{инд.}}$	Энергия сигнала отдельной особи в группе, мкВт·с·см ⁻²

ленных экземпляров размером 10 мм каждые два часа в течение 24 ч.

Для анализа полученных результатов составляли матрицы данных, вычисляли минимальные, максимальные и средние величины энергетических и временных параметров в каждой размерной группе, а также медианы амплитуд размерных групп в программе MS Excel 2007 с помощью надстройки «Анализ данных».

Расшифровка обозначений приведена в табл. 1.

Достоверность различия средних величин каждого параметра биолюминесцентного сигнала между двумя видами стимуляции оценивали путем вычисления критерия достоверности различия:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}},$$

где t — критерий достоверности различия, $\bar{x}_1$ — среднее значение параметра при механической стимуляции, $\bar{x}_2$ — среднее значение параметра при химической стимуляции, $S_{\bar{x}_1}$ — средняя ошибка значение параметра при механической стимуляции, $S_{\bar{x}_2}$ — средняя ошибка значение параметра при химической стимуляции.

Если значение $t < 2$, то различие между двумя выборками считается недостоверным, если $t \geq 2$, то различие между двумя выборками достоверно на 95%.

Расчет доверительных интервалов проводили по доверительной вероятности. Ширина доверительного интервала при доверительной вероятности 0.95 составила $1.96 \cdot S_{\bar{x}}$, где $S_{\bar{x}}$ — средняя ошибка значения параметра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Форма биолюминесцентного импульса. Форма и типы биолюминесцентного сигнала у индивидуумов *P. pileus* при обоих видах стимуляции пред-

ставлены на рис 3, приведены данные для размерной группы 16 мм.

При механической стимуляции наблюдали два типа сигнала *P. pileus*, в первом случае регистрировали резкий фронт нарастания амплитуды до максимума, иногда с последующим вторым, существенно меньшим пиком, после чего шел такой же резкий краткий по времени спад (рис. 3а). Во втором случае сначала регистрировалось слабое увеличение амплитуды, низкие величины которой сохранялись некоторое время, затем импульс большой длительности со множественными пиками-вершинами (рис. 3б).

При химической стимуляции, после которой особь погибала, сигнал по форме напоминал второй упомянутый выше тип при механической стимуляции, однако без первичного слабого увеличения, амплитуда сразу достигала существенных величин, при этом последний импульс часто имел пологий и длительный фронт затухания (рис. 3в).

Четкая связь между формой импульса и размерами экземпляров не обнаружена.

Амплитуда и длительность биолюминесцентного сигнала у разноразмерных групп. Было выявлено, что величины амплитуды биолюминесцентного сигнала различаются при механическом и химическом типах стимуляции. Средняя по всем размерным группам амплитуда $A_{\text{ср}}$ при механической стимуляции колебалась от 0.2 до $1.4 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻² (табл. 1). При этом в группах с размерами 4–5 мм и 8–19 мм величина $A_{\text{ср}}$ находилась в пределах $(0.6–0.9) \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻², а минимальное и максимальное значение $A_{\text{ср}}$ зарегистрированы в группе самых крупных особей и группе 6–7 мм соответственно. При химической стимуляции минимальная по группам средняя амплитуда $A_{\text{ср}}$ зарегистрирована в группе с наименьшими размерами — 1.21, максимальная — $2.26 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻² — в группе с размерами 6–7 мм. У самых крупных экземпляров амплитуда сигнала

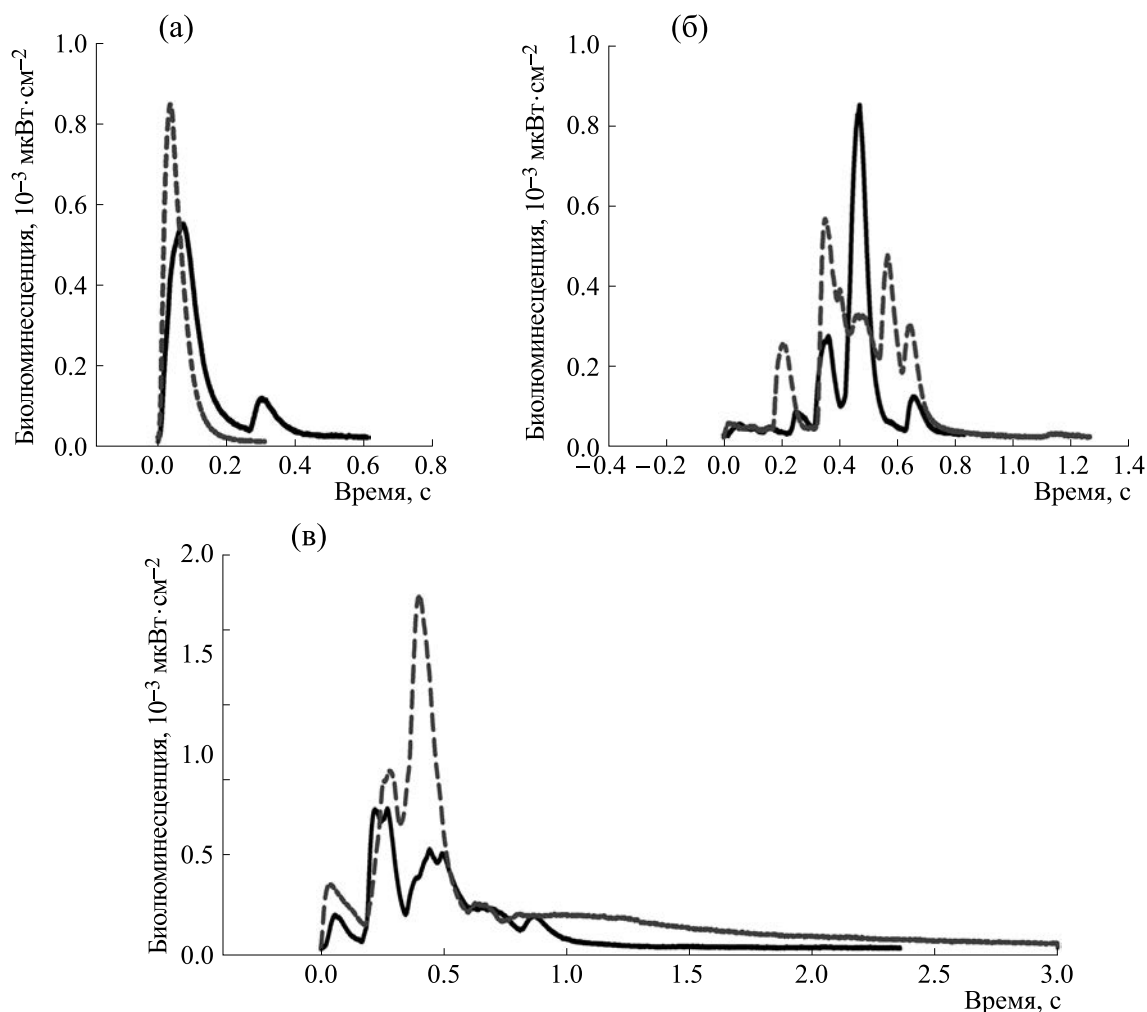


Рис. 3. Формы биолюминесцентных импульсов *P. pileus*: (а) и (б) — при механическом типе стимуляции, (в) — при химическом типе стимуляции. Сплошной и пунктирной линией обозначены разные формы сигнала для особей размером 16 мм.

у отдельных особей достигала $8.3 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{см}^{-2}$, но при наличии в группе слабо высветившихся особей средняя величина сигнала в этой группе составила $A_{\text{ср}} = 1.79 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{см}^{-2}$ (табл. 2).

Средняя для всех размерных групп длительность сигнала $L_{\text{ср}}$ при механической стимуляции варьировала от 1.3 до 2.8 с (табл. 3). Наибольшие величины средней длительности сигнала зарегистрированы у размерных групп с самыми маленькими и самыми крупными размерами, а минимальная — у группы с размерами 6–7 мм. Максимальная индивидуальная длительность сигнала зарегистрирована в группе с размерами 16–17 мм ($L_{\text{инд. max}} = 7 \text{ с}$).

При химическом типе стимуляции максимальные длительности сигнала в разных группах достигали $L_{\text{инд. max}} = 5\text{--}6 \text{ с}$, средняя по каждой размерной группе длительность $L_{\text{ср}}$ изменялась

от 1.0 с (для группы 20–21 мм) до 2.4 с (для группы 4–5 мм), во всех остальных размерных группах $L_{\text{ср}}$ составляла 1.6–1.9 с.

Энергия биолюминесцентного сигнала при механической стимуляции у разных групп слабо отличалась друг от друга (рис. 4). Минимальные значения зарегистрированы у группы самых крупных особей, наибольшие — у экземпляров размером 18–19 мм. Энергия биолюминесцентного сигнала при химической стимуляции, напротив, сильно различалась по группам. Наибольшие средние значения, выявленные у особей размером 6–7 мм, превышали минимальные, зарегистрированные у группы самых крупных *P. pileus*, в семь раз. Величины энергии биолюминесцентного отклика при химической стимуляции, за исключением группы 20–21 мм, превышали таковые при механической стимуляции в полтора-четыре раза (рис. 4).

Таблица 2. Амплитуда биолюминесцентного сигнала, $\times 10^{-3}$ мкВт см $^{-2}$

Размерная группа	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Механическая стимуляция									
Среднее, A_{cp}	0.59	1.37	0.80	0.73	0.76	0.89	0.62	0.94	0.20
Стандартная ошибка	0.09	0.18	0.11	0.07	0.09	0.09	0.08	0.20	0.03
Медиана	0.45	0.88	0.41	0.56	0.57	0.75	0.54	0.74	0.16
Максимум, $A_{инд.мах}$	1.21	4.81	3.34	2.56	2.81	2.47	1.60	2.72	0.35
Химическая стимуляция									
Среднее, A_{cp}	1.21	2.26	2.08	1.44	2.11	1.36	1.62	2.00	1.79
Стандартная ошибка	0.25	0.31	0.24	0.15	0.29	0.18	0.28	0.44	0.88
Медиана	0.94	1.63	1.38	0.84	1.32	0.77	0.91	0.99	0.31
Максимум, $A_{инд.мах}$	4.30	8.41	7.10	6.56	7.10	5.63	6.35	6.59	8.31
Критерий достоверности различия									
	2.3	2.4	4.9	4.3	4.5	2.4	3.5	2.2	1.8

Параметры сигнала у разноразмерных групп в светлое и темное время суток. Были проведены исследования параметров биолюминесцентного сигнала у разных размерных групп в утреннее время после восхода солнца (8:00) и ночное время суток (22:00).

Амплитуда биолюминесцентного сигнала у всех групп при механической стимуляции и в утреннее, и в ночное время была ниже, чем при

химической (табл. 4). Наибольшие величины амплитуды отмечены у групп с размерами 12–13 мм (утром) и 18–19 мм (ночью) при химической стимуляции.

В светлое время суток при механической стимуляции средняя по всем группам амплитуда составляла $0.8 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см $^{-2}$, максимальная была зарегистрирована в группе 6–7 мм, и составила $1.4 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см $^{-2}$, в этой же группе наблюдали

Таблица 3. Длительность биолюминесцентного сигнала, с

Размерная группа	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Механическая стимуляция									
Среднее, L_{cp}	2.37	1.25	1.85	1.87	1.71	1.36	2.08	1.76	2.82
Стандартная ошибка	0.51	0.18	0.25	0.23	0.26	0.21	0.41	0.44	0.87
Медиана	1.43	0.78	0.97	0.81	0.81	0.69	1.02	0.94	2.10
Максимум, $L_{инд.мах}$	5.99	4.99	5.99	5.99	5.99	5.99	6.99	5.19	5.61
Химическая стимуляция									
Среднее, L_{cp}	2.39	1.93	1.75	1.76	1.56	1.77	1.67	1.72	0.97
Стандартная ошибка	0.40	0.25	0.19	0.16	0.18	0.22	0.28	0.39	0.37
Медиана	1.79	1.27	1.14	1.33	1.07	1.16	1.15	0.95	0.54
Максимум, $L_{инд.мах}$	4.99	5.71	5.59	5.64	4.99	5.26	5.77	5.99	2.96
Критерий достоверности различия									
	0.0	2.2	0.3	0.4	0.5	1.3	0.8	0.1	2.0

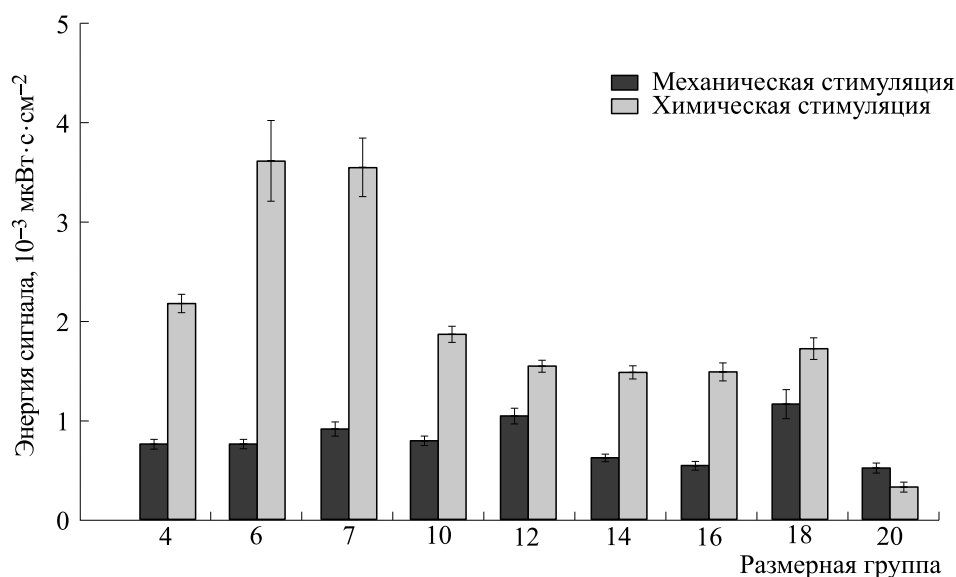


Рис. 4. Средняя энергия билюминесцентного сигнала каждой размерной группы при разных способах стимуляции.

максимальную индивидуальную амплитуду сигнала $A_{\text{инд.мах}} = 3.8 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$.

В темное время суток при механической стимуляции средняя по всем группам амплитуда бы-

ла незначительно выше утренней величины и составила $0.9 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$. Максимальная средняя и индивидуальная величины амплитуды, как и утром, зарегистрированы в группе 6–7 мм. В группе с самыми крупными экземплярами ам-

Таблица 4. Амплитуда билюминесцентного сигнала, $\times 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$

Размерная группа	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Механическая стимуляция (8 ч)									
Среднее, $A_{\text{ср}}$	0.65	1.42	0.76	0.57	1.22	0.76	1.10	—	—
Стандартная ошибка	0.02	0.12	0.05	0.02	0.05	0.03	0.00	—	—
Максимум, $A_{\text{инд.мах}}$	1.21	3.76	2.80	2.77	1.95	1.20	1.14	—	—
Механическая стимуляция (22 ч)									
Среднее, $A_{\text{ср}}$	0.45	1.54	0.76	1.04	0.84	0.53	0.43	0.83	0.33
Стандартная ошибка	0.00	0.05	0.04	0.04	0.03	0.02	0.02	0.05	0.00
Максимум, $A_{\text{инд.мах}}$	0.45	4.81	4.39	3.76	3.76	1.21	1.24	1.89	0.35
Химическая стимуляция (8 ч)									
Среднее, $A_{\text{ср}}$	1.18	1.49	1.31	1.42	2.43	1.69	1.16	—	—
Стандартная ошибка	0.03	0.07	0.04	0.03	0.12	0.02	0.10	—	—
Максимум, $A_{\text{инд.мах}}$	2.12	3.76	2.97	4.10	4.34	1.93	3.11	—	—
Химическая стимуляция (22 ч)									
Среднее, $A_{\text{ср}}$	1.41	1.96	1.48	0.79	2.15	1.13	1.63	2.27	1.57
Стандартная ошибка	0.00	0.04	0.04	0.02	0.08	0.04	0.04	0.16	0.12
Максимум, $A_{\text{инд.мах}}$	1.41	3.64	3.76	2.73	7.10	4.08	3.47	5.48	2.73
Критерий достоверности различия при разных типах стимуляции									
8 ч	16.0	0.5	8.9	22.5	9.4	26.0	0.6	—	—
22 ч	1.0	6.5	13.5	5.7	15.2	13.2	25.3	8.5	10.7

Таблица 5. Длительность биолюминесцентного сигнала, с

Размерная группа	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Механическая стимуляция (8 ч)									
Минимум, $L_{\text{инд. min}}$	0.11	0.14	0.37	0.85	0.65	0.68	0.54	—	—
Максимум, $L_{\text{инд. max}}$	4.99	2.43	5.99	6.99	4.94	5.99	1.33	—	—
Среднее, $L_{\text{ср}}$	2.24	2.32	5.05	4.80	4.63	5.47	5.96	—	—
Механическая стимуляция (22 ч)									
Минимум, $L_{\text{инд. min}}$	0.53	0.36	0.26	0.23	0.18	0.68	0.27	0.44	0.21
Максимум, $L_{\text{инд. max}}$	0.53	4.99	4.99	4.99	4.99	4.99	4.99	2.43	0.60
Среднее, $L_{\text{ср}}$	0.53	1.22	1.34	1.01	1.88	2.03	3.43	1.14	0.41
Химическая стимуляция (8 ч)									
Минимум, $L_{\text{инд. min}}$	0.03	0.02	0.03	0.04	0.02	0.13	0.01	—	—
Максимум, $L_{\text{инд. max}}$	0.21	0.38	0.30	0.41	0.43	0.19	0.31	—	—
Среднее, $L_{\text{ср}}$	0.12	0.15	0.13	0.14	0.24	0.17	0.12	—	—
Химическая стимуляция (22 ч)									
Минимум, $L_{\text{инд. min}}$	0.14	0.04	0.26	0.15	0.35	0.42	0.23	0.23	0.32
Максимум, $L_{\text{инд. max}}$	0.14	0.36	5.99	9.35	4.96	9.98	6.15	5.51	0.54
Среднее, $L_{\text{ср}}$	0.14	0.20	1.85	3.28	1.58	3.13	1.68	2.76	0.43
Критерий достоверности различия									
8 ч	0.89	2.30	0.19	1.28	0.39	1.01	2.05	—	—
22 ч	1.00	0.90	0.74	2.54	0.37	1.00	1.33	0.97	0.12

плитуда была минимальной по сравнению с другими размерными группами.

При химическом типе стимуляции утром и ночью средняя по группам амплитуда составляла $1.5 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻², максимальные величины при этом наблюдались в размерной группе 12–13 мм.

Таким образом, при химической стимуляции ночью зарегистрированы более высокие величины индивидуальной амплитуды, чем в утреннее время, однако на средних величинах это не отразилось, и они были равны утренним, либо ниже их.

Средняя длительность сигнала по всем группам утром при механическом типе стимуляции составляла 3.1 с (максимум отмечен в группе с размерами 8–9 мм — 4.5 с). При химическом типе стимуляции средняя длительность составляла 3.3 с, максимальная среди особей длительность сигнала также зарегистрирована в группе с размерами 8–9 мм ($L_{\text{инд. max}} = 11.9$ с), а максимальная средняя по группе длительность отмечена для размеров 16–17 мм (табл. 5).

Почти для всех групп утром длительность сигнала значительно (в два-четыре раза) превышала таковую в ночное время как при механической стимуляции, так и при химической (табл. 5).

В ночное время при механическом типе стимуляции средняя по всем группам длительность

сигнала составляла 1.6 с, при этом максимальные величины наблюдали в группе с размерами 16–17 мм, средняя длительность в которой составила 3.4 с, максимальная индивидуальная — 5 с. При химическом типе стимуляции средняя по группам длительность сигнала составляла 2.14 с. Максимальная длительность биолюминесцентного сигнала отдельных индивидуумов $L_{\text{инд. max}}$ ночью достигала 5 и 10 с при механической и химической стимуляции, соответственно; в среднем по группам максимумы зарегистрированы для групп с размерами 14–17 мм.

Средняя энергия сигнала в утреннее время при механической стимуляции составляла $1.0 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻², при этом максимальные величины отмечены в группах с размерами 8–11 мм (рис. 5а). Величины энергии сигнала при химической стимуляции были значительно выше, чем при механическом типе стимуляции. Средняя по группам энергия при химической стимуляции утром составила $3.1 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻², а максимальная индивидуальная энергия сигнала, зарегистрированная в группе с размерами 8–9 мм, — $22.6 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻² (средняя по этой размерной группе составила $4.9 \cdot 10^{-3}$ мкВт·с·см⁻² и также была максимальной среди средних других размерных групп (рис. 5б)).

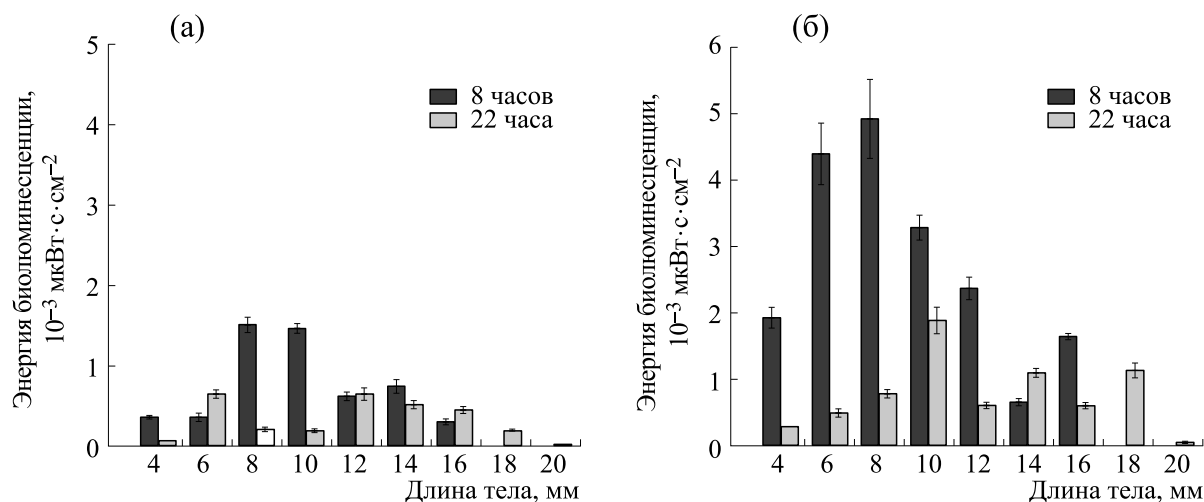


Рис. 5. Средняя энергия биоломинесцентного сигнала утром (8:00) и ночью (22:00) при различных видах стимуляции: (а) — механической, (б) — химической.

В ночное время энергия сигнала была ниже, средняя величина при механической стимуляции составила $0.4 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, а максимальная отмечена в группе 12–13 мм (средняя энергия сигнала составила $0.7 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, индивидуальная достигала $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$).

При химической стимуляции средняя энергия сигнала $E_{\text{ср}}$ ночью также была ниже, чем в 8 часов утра, и в итоге средняя по группам величина составила $1.0 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$.

Длительность и энергия сигнала ночью в большинстве размерных групп были ниже утренних величин, эта закономерность нарушалась иногда лишь для групп с размерами 14–17 мм.

Суточная динамика параметров биоломинесценции у группы размером 10 мм. Детально суточную динамику параметров биоломинесценции исследовали у экземпляров размерами 10 мм, эксперименты по высвечиванию проводили каждые два часа в течение 24 ч. Было выявлено, что при механическом типе стимуляции амплитуда биоломинесцентного сигнала достигала наибольших значений в период с 18:00 до 6:00, в это время ее средние величины достигали $A_{\text{ср}} = 0.9$ – $2.9 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, а индивидуальные — $A_{\text{инд} \cdot \text{max}} = 4.3 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$. Максимум $A_{\text{ср}}$ зарегистрирован в 2:00 (рис. 5) и составлял $3.0 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$.

Суточная динамика длительности сигнала в основном находилась в противофазе с изменениями амплитуды, так, высоким величинам амплитуды соответствовали низкие величины длительности, и наоборот, при минимальных амплитудах отмечались максимальные величины длительности сигнала (рис. 6). Высокие величины при меха-

нической стимуляции регистрировали с 04:00 до 16:00, длительность сигнала отдельных особей в эти часы достигала 5–7 с. Средняя длительность сигнала в течение суток составляла 2 с.

При химическом типе стимуляции в течение суток средние величины амплитуды в основном были выше, чем при механическом типе, наибольшие величины зафиксированы в 06:00, 10:00 и в полночь (3.0 – 3.8) $\cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, амплитуда отдельных экземпляров достигала $6.6 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$ (в 24:00).

Наибольшие величины длительности сигнала при химической стимуляции отмечены в 8:00 и 22:00 (у отдельных индивидуумов достигая 8.0–9.4 с), а среднее время составило 2.26 с. Как и при механической стимуляции, суточная динамика длительности сигнала в основном находилась в противофазе с изменениями амплитуды. С 18:00 до 02:00 длительность превышала таковую при механическом типе стимуляции.

Средняя энергия биоломинесцентного сигнала в течение суток при механической стимуляции составляла $0.7 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$, при химической — $1.7 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$. Максимальная индивидуальная энергия при механической стимуляции составляла $6.0 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$ и зарегистрирована в 18:00, при химической — $14.0 \cdot 10^{-3} \text{ мкВт} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-2}$ (в 22:00).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на утверждения об отсутствии биоломинесценции у *P. pileus* [29], для Черного моря ранее было показано, что особи размером 7–9 мм являются биоломинесцентными, по крайней мере, в холодный сезон [30].

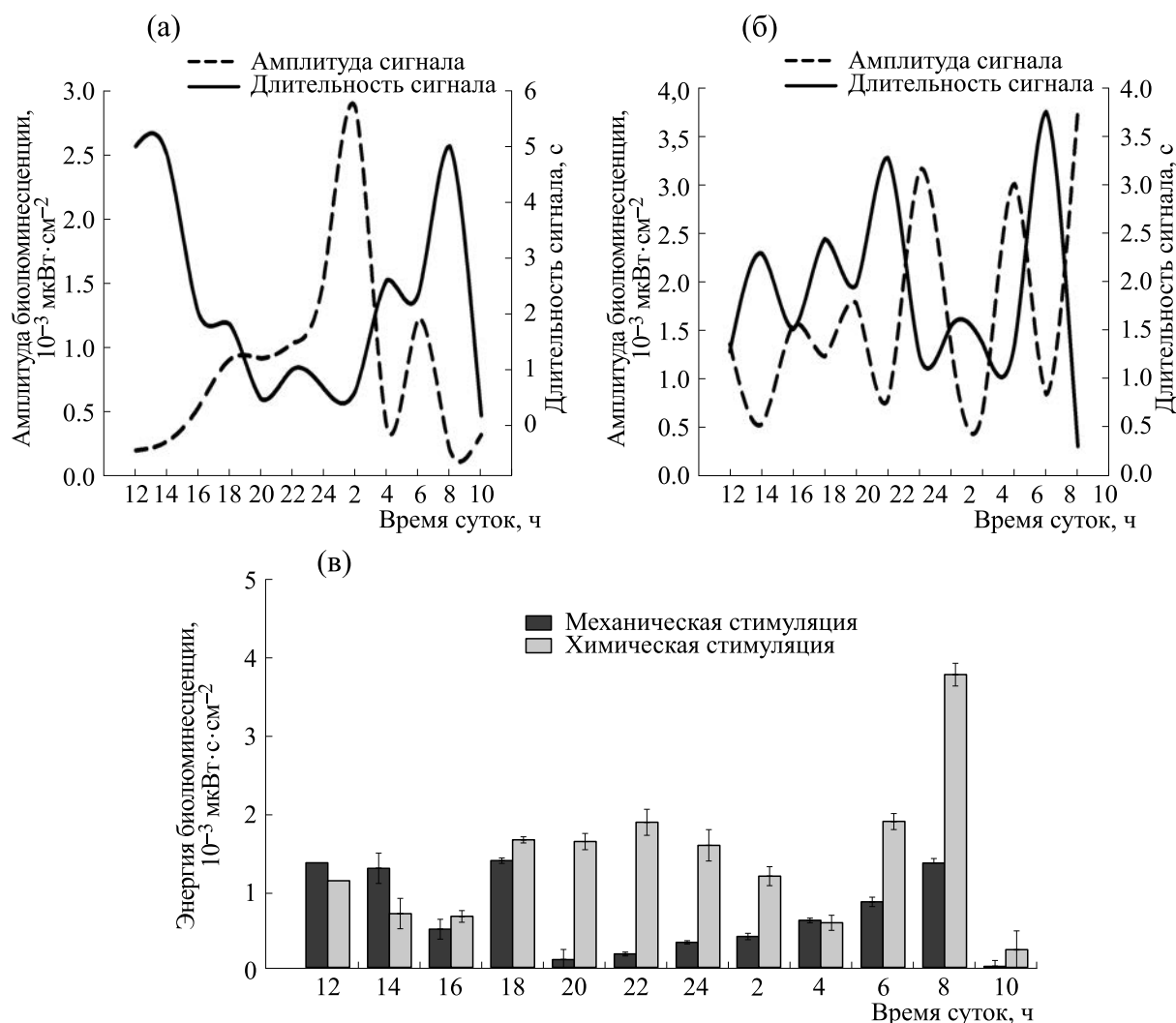


Рис. 6. Суточная динамика средних по исследуемой размерной группе (длина тела 10 мм) величин амплитуды и длительности при механической (а) и при химической (б) стимуляции; энергии (в) при механическом и химическом типе стимуляции.

По нашим данным, в летний сезон наблюдалось три типа биOLUMИНЕСЦЕНТНОГО сигнала *P. pileus*, первые два регистрировали при механической стимуляции, третий — при химической (см. рис. 3), Форма сигналов отличалась от такового у других представителей ктенофор — *B. ovata* и *M. leidy*. Так, биOLUMИНЕСЦЕНТНЫЙ сигнал при механической стимуляции у *P. pileus* представлял собой один или несколько объединенных четко выраженных импульсов (рис. 3а,б), у других видов гребневиков импульсы слиты в единый сигнал, выглядящий как острые зубцы гребенки, с постепенным нарастанием до максимального значения и спадом. При химической стимуляции у *P. pileus* последний импульс часто имел, в отличие от *B. ovata*, пологий и длительный (1.5–2.5 с) фронт спада. У *M. leidy* при химической стимуляции могли появляться дополнительные импульсы после небольшой паузы (0.1–0.5 с), по форме

они походили на первый импульс, хотя интенсивность излучения у них была в несколько раз меньше.

Анализируя параметры биOLUMИНЕСЦЕНЦИИ *P. pileus* в дневное и ночное время, можно заметить, что при механической стимуляции практически нет отличий в значениях амплитуды и явной зависимости длительности сигнала от размера особи. При химической стимуляции наблюдается слабый рост этих параметров при увеличении размера особи. В темное время суток (22:00) выявлен незначительный спад значений амплитуды при механической стимуляции и рост длительности сигнала при увеличении размера особи.

В результате наших экспериментов выявлено, что среди групп с разными размерами и возрастом особей максимальная амплитуда биOLUMИНЕСЦЕНТНОГО сигнала, как индивидуальная, так и

средняя по группе, при механической и химической стимуляции отмечена в размерной группе 6–7 мм. Что касается длительности сигнала, максимальные величины отмечены у самых маленьких (4–7 мм) и самых крупных (16–21 мм) особей. Это позволяет выбрать эти размерные группы для проведения экспериментальных исследований по влиянию токсических веществ.

В суточной динамике амплитуды замечена следующая закономерность: при механической стимуляции в темное время суток (с 18:00 до 6:00) и при химической стимуляции с 20:00 до 10:00 отмечаются повышенные величины, максимумы регистрировали с 22:00 до 02:00 при механической и в полночь при химической стимуляции. Таким образом, оптимальным временем (при постоянной температуре 21°C на всех этапах эксперимента) в летний сезон для проведения экспериментальных работ по воздействию на физиологическое состояние вида с использованием анализа параметров биолюминесцентного отклика является темное время суток с 20:00 до 6:00.

Сравнивая значения основных параметров биолюминесцентного сигнала *P. pileus* с *B. ovata* [14, 20] и *M. leidy* [14], можно заметить сходство в суточной динамике амплитуды биолюминесцентного сигнала. Так, у *B. ovata* минимум приходится на 10:00, а максимум — на 01:00, у *M. leidy* минимум выпадает на 7:00–10:00, а максимум на 13:00 и 01:00, что соответствует и минимуму, и максимуму в значениях амплитуд у *P. pileus*.

На данный момент для Черного моря список биолюминесцентных насчитывает 8 видов бактериопланктона родов *Vibrio* и *Photobacterium*, 36 видов фитопланктона (родов *Ceratium*, *Gonyaulax*, *Lingulodinium*, *Noctiluca*, *Protoperidinium* и *Pyrocystis*) и 9 видов зоопланктона [4]. Биолюминесценция большинства видов зоопланктона для Черного моря подтверждена визуально, инструментально получены результаты только для гребневиков. Сравнивая параметры биолюминесценции одиночного экземпляра *P. pileus* и исследованных ранее биолюминесцентных [4], можно увидеть, что амплитуда биолюминесцентного сигнала этого вида — $(0.8–4.3) \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻² — близка к амплитуде *Noctiluca scintillans* (Macartney) Kofoed & Swezy, 1921 (до $4 \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻²) и некоторым видам рода *Protoperidinium* ($(1.1–2.5) \cdot 10^{-3}$ мкВт·см⁻²), но превосходит на один-два порядка остальные виды фитопланктона, на семь порядков выше значения амплитуды бактерий ($4.95 \cdot 10^{-10}$ мкВт·см⁻² у *Vibrio indicus*) и на два-три порядка меньше, чем у других гребневиков (до 1.0 мкВт·см⁻² у *M. leidy*).

Виды *B. ovata* и *M. leidy* активно используются в экспериментальных биофизических исследованиях по выявлению влияния токсических веществ на организм [26–28]. *P. pileus* также широко

представлена в Черном море и встречается не только в глубоководных слоях [31], но и в бухтах и на небольших глубинах [32], тем самым доступ к особям данного вида не затруднен, что позволяет его использовать в экспериментах. Размеры *P. pileus* позволяют исследовать влияние различных факторов на биолюминесценцию всех размерных групп этого вида, в то время как проведение исследований с особями *B. ovata* и *M. leidy* более 60 мм затруднено инструментально.

ВЫВОДЫ

Было выявлено, что биолюминесцентную реакцию *P. pileus* в летнее время на механическую и химическую стимуляцию проявляют все размерные группы данного вида. В летний сезон при химическом типе стимуляции в среднем у всех размерных групп амплитуда была выше примерно в два раза, чем при механическом. Наибольшие значения амплитуды биолюминесцентного сигнала выявлены у особей размера 6–7 мм. Наибольшая длительность зарегистрирована у особей *P. pileus* размером 4–7 и 16–21 мм. Величины амплитуды биолюминесцентного сигнала в темное время суток выше, чем в утреннее время. На основании полученных результатов можно заключить, что биолюминесценцию вида *P. pileus* можно использовать в исследованиях влияния различных факторов на физиологию организма. Оптимальным временем проведения экспериментов в летнее время является период с 20:00 до 6:00. Уровень биолюминесцентного сигнала отдельной особи *P. pileus* ниже, чем у гребневиков-вселенцев Черного моря *B. ovata* и *M. leidy*, на один-два порядка и сравнима с некоторыми представителями динофлагеллят, такими, как *Noctiluca scintillans* и некоторыми видами рода *Protoperidinium*, но при этом значительно выше, чем у остальных светящихся видов фитопланктона Черного моря.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания № 121041400077-1 «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом». Проведенные исследования были выполнены в Центре коллективного пользования «НИС Профессор Водяницкий» Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН».

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. А. И. Журавлев, В. А. Веселовский и Н. Н. Кошеченко, Труды МОИП, **21**, 19 (1965).
2. S. H. D. Haddock, M. A. Moline, and J. F. Case, *Annu. Rev. Mar. Sci.*, **2** (1), 443 (2010).
3. J. G. Morin, *Bull. Marine Sci.*, **33** (4), 787 (1983).
4. Ю. Н. Токарев, *Основы биофизической экологии гидробионтов* (ЭКОСИ-Гидрофизика, Севастополь, 2006).
5. O. Shimomura, *Bioluminescence: chemical principles and method* (World Scientific, 2012).
6. S. H. D. Haddock and J. F. Case, *Marine Biol.*, **133**, 571 (1999).
7. Э. П. Битюков, В. И. Василенко, И. М. Серикова и др., *Экология моря*, **46**, 19 (1996).
8. W. E. Esaias and H. C. Curl, *Limnol. Oceanogr.*, **17** (6), 901 (1972).
9. С. А. Пионтковский и С. А. Серегин, *Поведение копепода* (ЭКОСИ-Гидрофизика, Севастополь, 2006).
10. В. Б. Цейтлин и Ю. А. Рудяков, Докл. АН СССР, **38** (4), 978 (1989).
11. E. Pennisi, *Science*, **235** (3), 1060 (2012).
12. П. В. Евстигнеев, в сб. *Биологические ресурсы водоемов в условиях антропогенного воздействия* (Наук. думка, Киев, 1985), сс. 29–31.
13. Э. П. Битюков, П. В. Евстигнеев и Ю. Н. Токарев, *Гидробиол. журн.*, **29** (4), 27 (1993).
14. Ю. Н. Токарев, П. В. Евстигнеев и О. В. Машукова, *Планктонные биолюминесцентные Мирового океана: видовое разнообразие, характеристики светового излучения в норме и при антропогенном воздействии* (Нижняя Ореанда, Симферополь, 2016).
15. P. V. Tett, *J. Mar. Boil. Ass. UK*, **49** (1), 245 (1969).
16. Ю. Н. Токарев, Дис. ... канд. биол. наук (ИнБЮМ, Севастополь, 1990).
17. Э. П. Битюков, Зоол. журн., **47**(1), 36 (1968).
18. И. И. Гительзон, Л. А. Левин, Р. Н. Утюшев и др., *Биоллюминесценция океана* (Гидрометеиздат, СПб., 1992).
19. П. В. Евстигнеев и Э. П. Битюков, *Экология моря*, **24**, 87 (1986).
20. О. В. Машукова, *Экология моря*, **79**, 15 (2009).
21. О. В. Машукова, в сб. *Экологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление прибрежной зоной: Материалы молодежной научно-практической конференции* (ЭКОСИ-Гидрофизика, Севастополь, 2014), сс. 89–94.
22. П. В. Евстигнеев, *Экология моря* **42**, 31 (1992).
23. E. N. Harvey, *Bioluminescence* (Acad. Press, N.-Y., 1952).
24. Ю. Н. Токарев, О. В. Машукова и В. И. Василенко, *Экология моря*, **76**, 61 (2008).
25. Yu. N. Tokarev and O. V. Mashukova, *Luminescence*, **14**, 351 (2016).
26. O. Mashukova, Y. Tokarev, and E. Skuratovskaya, *Ecol. Montenegrina*, **14**, 109 (2017).
27. О. В. Машукова и М. И. Силаков, Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника РАН, **4** (16), 58 (2020).
28. О. В. Машукова, М. И. Силаков, Л. В. Малахова и др., *Системы контроля окружающей среды*, **3** (45), 39 (2021).
29. S. H. D. Haddock and J. F. Case, *Biol. Bull.*, **189** (3), 356 (1995).
30. О. В. Машукова, *Вестн. Прикаспия*, **3** (22), 15 (2018).
31. E. Mutlu and F. Bingel, *Marine Biol.*, **135**, 589 (1999).
32. М. Е. Виноградов, М. В. Флинт и Э. А. Шушкина, в сб. *Современное состояние экосистемы Черного моря* (Наука, М., 1987), сс. 172–186.

Bioluminescence of Ctenophore *Pleurobrachia pileus* (O. F. Müller, 1776) in the Summer Period

A.V. Temnykh*, M.I. Silakov*, and O.V. Mashukova*

*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, prosp. Nakhimova 2, Sevastopol, 299001 Russia

The capability of bioluminescence has been found in many marine hydrobionts, including almost all representatives of the phylum Ctenophora. The glow of species and bioluminescent substrates isolated from them is actively used in biology, ecology, and medicine to study the physiological state of an organism or to identify unfavorable environmental parameters. The parameters of luminescence of the Black Sea ctenophores *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (Lobata) and *Berce ovata* Bruguière, 1789 (Beroida) are used to study the effects of toxicants, such as liquid hydrocarbons, PCBs, and heavy metals. Some researchers casted doubt on the capability of the Black Sea autochthonous inhabitant, ctenophore *Pleurobrachia pileus* (O. F. Müller, 1776) to produce bioluminescent light. The objective of this work was to ensure scientific support for the light-producing ability of species under study and to choose the optimal time for conducting experiments on the factors that affect bioluminescence. It was found that mechanical and chemical stimulation triggered a bioluminescent response in all size groups of species under study at any time of day. Upon chemical stimulation of the studied species, the signal energy value was several times greater than that observed after mechanical stimulation. It was revealed that the optimal time interval for conducting biophysical research is the time from 8 pm to 6 am, because the values of luminescence activity are the greatest in this time interval within a day.

Keywords: *Ctenophora*, luminescence, circadian rhythm, the Black Sea

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ $\alpha 1$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРЕДСЕРДИЙ КРЫСЫ

© 2023 г. Н. Мансур*,#, Н.И. Зиятдинова*, А.М. Галиева*, Р.Р. Шакиров*, Т.Л. Зефирова*

*Казанский федеральный университет, Кремлевская ул., 18, Казань, 420008, Россия

#E-mail: nourm94@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Изучено влияние агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов метоксамина на частоту спонтанной активности и параметры электрической активности миокарда предсердий в условиях навязанного ритма и с сохраненным синусовым узлом у крыс. Метоксамин оказывал двоякое влияние на длительность реполяризации рабочих кардиомиоцитов. При навязанном ритме метоксамин увеличивал длительность фазы реполяризации потенциала действия, при собственном ритме — уменьшал.

Ключевые слова: $\alpha 1$ -адренорецептор, метоксамин, потенциал действия, сердце.

DOI: 10.31857/S0006302923040154, EDN: KMWXBE

Адренергические рецепторы (АР) представляют собой гликопротеины клеточной поверхности, которые распознают и избирательно связывают катехоламины, высвобождаемые из окончаний симпатических нервов и мозгового вещества надпочечников [1]. Всего существует три семейства АР и девять подтипов ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$, $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$), которые демонстрируют сходную аффинность связывания, но вызывают разные физиологические эффекты для одних и тех же эндогенных катехоламинов. Избирательность передачи сигналов достигается за счет связывания с различными G-белками и эффекторными системами как во времени, так и в пространстве [2]. В 1948 г Р. Ахлакиест ввел понятие различных типов адренергических рецепторов и присвоил им подтипы α и β [3]. Первоначально существовала классификация α -адренорецепторов на $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -подтипы. Затем на основе фармакологических данных подтип $\alpha 1$ -АР дополнительно подразделили на $\alpha 1A$ - и $\alpha 1B$ -АР [4]. Несколько лет спустя был клонирован другой рецептор, который показал новую фармакологию по сравнению с двумя предыдущими подтипами и был назван $\alpha 1D$ -АР [5]. Альтернативная классификация $\alpha 1$ -адренорецепторов в гладких мышцах, основанная на их сродстве, в частности, к празозину, подтвердила существование $\alpha 1L$ -ад-

ренорецептора, который представляет собой просто нативный $\alpha 1A$ -адренорецептор с низким сродством к празозину и является вариантом модификации $\alpha 1A$ [6].

Текущие данные о связывании радиолиганда АР в сердце предполагают доминирование β -АР, включающее 90% β -АР, присутствующих в соотношении 8 : 2 ($\beta 1$: $\beta 2$), и 10% $\alpha 1$ -АР, присутствующих в соотношении 6 : 4 ($\alpha 1A$: $\alpha 1B$). [7, 8]. Первоначально $\alpha 1$ -АР были идентифицированы как постсинаптические α -адренорецепторы на основании их уникальных фармакологических характеристик [9]. АР регулируют как сократительную способность, так и рост миокарда. В то время как β -АР преобладают в регуляции функции сердца в нормальных физиологических условиях, считается, что $\alpha 1$ -АР играют более важную роль при патологических состояниях и заболеваниях, таких как гипертрофия, сердечная недостаточность и ишемическая болезнь [10]. Все три подтипа $\alpha 1$ -адренорецепторов ($\alpha 1A$ -, $\alpha 1B$ -, $\alpha 1D$ -) связаны с Gq/11-белком. Внутриклеточные механизмы передачи сигнала при активации мембранных $\alpha 1$ -адренорецепторов хорошо изучены. Согласно общей классической схеме, Gq/11-субъединица активированного адренорецептора связывается с фосфолипазой C (PLC- β) и стимулирует ее, что ведет к гидролизу фосфолипидного компонента клеточной мембраны фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата на инозитолтрифосфат и диацилглицерин.

Сокращения: АР — адренергические рецепторы, ДПД — длительность потенциала действия.

перол, которые известны как вторичные посредники [11].

Активация $\alpha 1$ -АР затрагивает большое число компонентов регулирующих работу миокарда, в том числе, происходит увеличение Ca^{2+} -тока L-типа, также увеличивается активность $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника [12, 13] и Na^+-H^+ -обменника [14], депо-зависимого входа Ca^{2+} [15]. На основании полученных результатов исследователи отмечают, что физиологические функции подтипов $\alpha 1$ -АР могут существенно отличаться при развитии механизмов регуляции сердца [16].

В целом следует отметить что активация $\alpha 1$ -АР может приводить к разнонаправленным изменениям как силы сокращений в препаратах сердца так и их частоты, в зависимости от видовых, тканевых и возрастных особенностей животных а также от фармакологических свойств используемых агонистов [12, 14, 17, 18]. Таким образом, исследование механизмов $\alpha 1$ -АР сигнализации в сердце остается актуальной задачей.

Целью нашего исследования было изучение роли агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов метоксамин-а в регуляции электрической активности миокарда предсердий у взрослых крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на белых беспородных крыс. Подопытные животные находились в одинаковых условиях, по три-четыре крысы в клетке со свободным доступом к воде и корму. Эксперименты проводились на взрослых крысах. Для наркоза внутрибрюшинно вводили 25%-й раствор уретана из расчета 1.2 г/кг массы животного. После инъекции уретана вскрывали грудную клетку, вырезали сердце и перемещали его в чашку Петри с раствором Тироде, содержащим (в mM) NaCl – 133.47, KCl – 4.69, NaH_2PO_4 – 1.35, NaHCO_3 – 16.31, MgSO_4 – 1.18, CaCl_2 – 2.5, глюкоза – 7.77, и насыщали карбогеном (95% O_2 , 5% CO_2), pH при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ поддерживали на уровне 7.3–7.4 добавлением к раствору основного буфера Trizma и кислотного буфера. В чашке Петри готовили изолированный миокард правого предсердия с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью. Влияние стимуляции альфа-1-адренорецепторов изучали на предсердиях с собственным и навязанным ритмом. Длительность периода адаптации препарата составляла 40 мин. В ходе экспериментов с навязанным ритмом стимулировали предсердия платиновыми электродами (150 имп/мин). Внутриклеточный

потенциал действия регистрировали стеклянными микроэлектродами сопротивлением 25–60 МОм. Сигналы записывали с помощью программы Elph 3.0. Данные обрабатывались с помощью Excel. Регистрацию мембранного потенциала, потенциала действия, длительности деполяризации, амплитуды потенциала действия, длительности потенциала действия (ДПД) определяли при уровнях реполяризации 20% (ДПД 20%), 50% (ДПД 50%) и 90% (ДПД 90%). Использовали неселективный агонист альфа-1-адренорецепторов метоксамин (Токрис) в концентрации 10^{-8} М и 10^{-7} М. Его растворяли в растворе Тироде и наносили после записи контроля.

Результаты экспериментов выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость оценивали по критерию Стьюдента для сравнения двух групп. Достоверными считались значения при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние метоксамин на параметры электрической активности рабочих кардиомиоцитов взрослых крыс с сохраненным синусовым узлом, обладающих спонтанной активностью.

Метоксамин в концентрации 10^{-7} М (рис. 1) уменьшал длительность потенциала действия на уровне ДПД 20%, ДПД 50% и ДПД 90% на 17.0% ($p < 0.05$), 14.0% ($p < 0.05$), и 13.0% соответственно, при этом длительность фазы деполяризации не изменялась. Также не изменялись значения амплитуды потенциала действия, мембранного потенциала и овершута. Метоксамин в концентрации 10^{-7} М у взрослых крыс вызывал увеличение частоты генерации потенциала действия на 10,3% ($p < 0.05$).

Аппликация метоксамин в концентрации 10^{-8} М (рис. 2) у взрослых животных вызывала увеличение частоты возникновения потенциала действия на 10.9% ($p < 0.05$), при этом достоверно не изменялись мембранный потенциал и амплитуда потенциала действия. Длительность потенциала действия на уровне 20, 50 и 90% реполяризации уменьшалась на 27.4% ($p < 0.05$), 23% ($p < 0.05$) и 16% ($p < 0.05$) соответственно.

Далее было изучено влияние метоксамин на параметры электрической активности работающих кардиомиоцитов при навязанном ритме взрослых крыс.

Метоксамин в концентрации 10^{-7} М (рис. 3) увеличивал длительность потенциала действия на уровне ДПД 20%, ДПД 50% и ДПД 90% на 29.0% ($p < 0.05$), 23.9% ($p < 0.05$) и 10.0% соответственно, при этом длительность фазы деполяризации не изменялась. Также не изменялись значения ам-

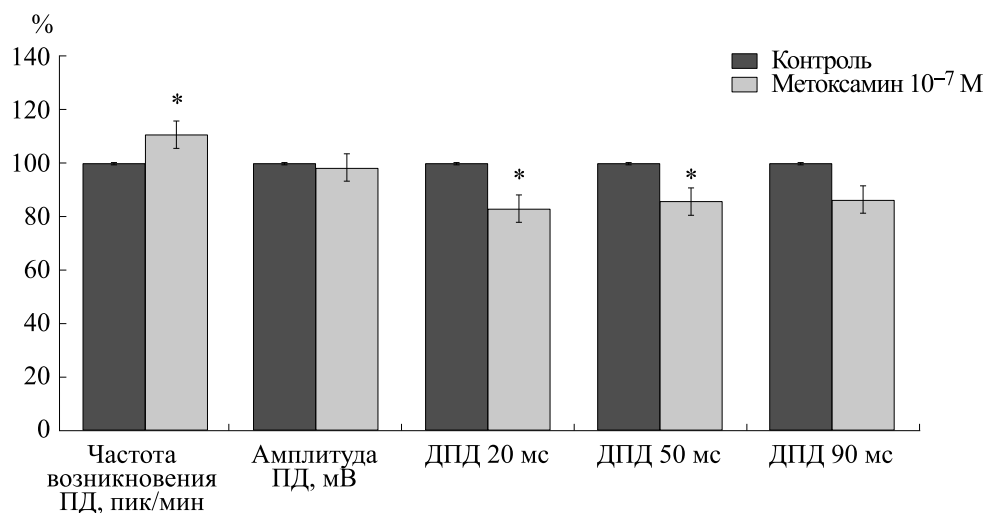


Рис. 1. Влияние метопролола (10^{-7} М) на амплитудно-временные параметры ПД у взрослых крыс с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью; * — $p < 0.05$ ($n = 10$).

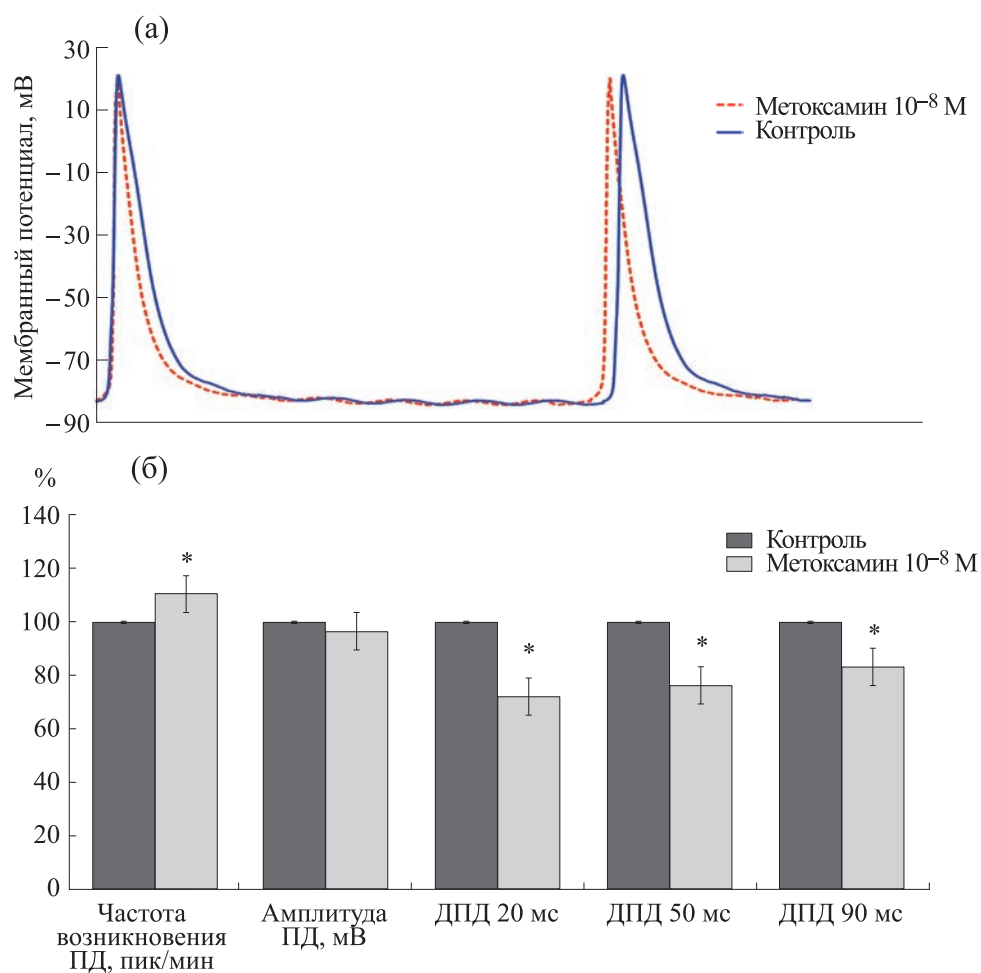


Рис. 2. Влияние метопролола (10^{-8} М) на амплитудно-временные параметры у взрослых крыс с сохраненным синусовым узлом и спонтанной активностью: (а) — оригинальная запись; (б) — величина эффекта в процентах, * — $p < 0.05$ ($n = 10$).

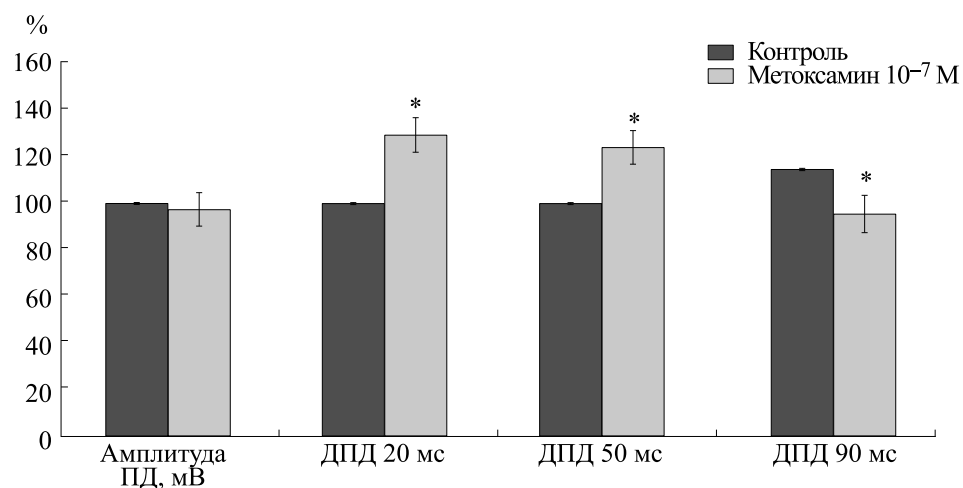


Рис. 3. Влияние метоксалина (10^{-7} М) на амплитудно-временные параметры у взрослых крыс с навязанным ритмом; * — $p < 0.05$ ($n = 10$).

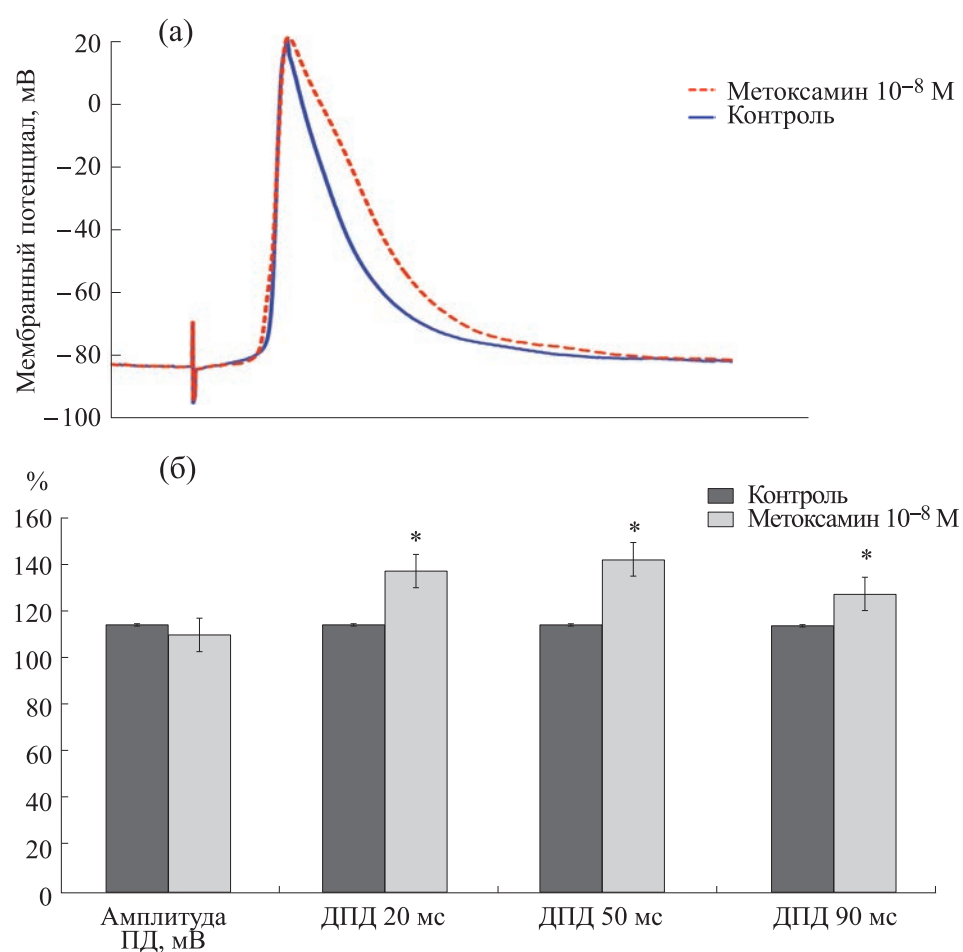


Рис. 4. Влияние метоксалина (10^{-8} М) на амплитудно-временные параметры у взрослых крыс с навязанным ритмом: (а) — оригинальная запись; (б) — величина эффекта в процентах, * — $p < 0.05$ ($n = 10$).

плитуды потенциала действия и мембранного потенциала.

Применение метоксамина в концентрации 10^{-8} М (рис. 4) у взрослых животных не изменяло мембранный потенциал и амплитуду потенциала действия. Длительность потенциала действия на уровне 20, 50 и 90% реполяризации увеличивалась на 20.0% ($p < 0.05$); 24.0% ($p < 0.05$); 11.0% ($p < 0.05$) соответственно.

Итак, в наших экспериментах мы наблюдали двоякое влияние метоксамина на длительность реполяризации рабочих кардиомиоцитов. При навязанном ритме метоксамин увеличивал длительность фазы реполяризации потенциала действия, при собственном ритме — уменьшал. Возможно, что в экспериментах с собственным ритмом, именно частота генерации потенциала действия регулировала длительность фазы реполяризации. Таким образом, было обнаружено, что стимуляция $\alpha 1$ -адренорецепторов метоксamiном влияет на электрическую активность сердца взрослых крыс и увеличивает частоту генерации потенциалов действия, приводя к изменению длительности реполяризации на препаратах миокарда предсердий. Электрическая активность миокарда проявляется в виде потенциалов действия, отражающих активацию (и инактивацию) деполяризующих (Na^+ , Ca^{2+}) и реполяризующих (K^+) каналов тока. Существует несколько типов миокардиальных K^+ -каналов, которые вносят вклад в региональные различия в форму волн потенциала действия и в генерацию нормальных сердечных ритмов [19]. Известно, что длительность фазы реполяризации ПД в кардиомиоцитах определяется выходящими калиевыми токами: I_{Kur} (сверхбыстрый выходящий ток задержанного выпрямления), I_{to} (транзиторный выходящий ток), I_{Kr} и I_{Ks} (быстрый и медленный компоненты токов задержанного выпрямления), I_{K1} (ток аномального выпрямления) и некоторыми другими [20]. У человека и крысы длительность фазы реполяризации ПД в основном определяется током I_{Kr} и I_{Ks} [21, 22]. Данные изменения могут быть связаны с влиянием метоксамина на кинетику K^+ -токов, в первую очередь I_{Kr} и I_{Ks} . Изменения длительности фазы реполяризации рабочих кардиомиоцитов непременно сказываются на их сократительной функции, что подтверждается литературными данными, согласно которым метоксамин в концентрации 10^{-8} М, 10^{-7} М у взрослых крыс снижал силу сокращения полосок предсердного миокарда [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что стимуляция $\alpha 1$ -адренорецепторов рабочих кардиомиоцитов правого предсердия крыс с собственным и навязанным ритмом не вызывает изменений мембранного потенциала, амплитуды и длительности фазы деполяризации потенциала действия. В то же время метоксамин оказывал влияние на длительность реполяризации потенциала действия взрослых крыс. Необходимо отметить, что в экспериментах с навязанным ритмом метоксамин приводил к увеличению длительности фазы реполяризации потенциала действия, а при собственном ритме — к ее уменьшению.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00121, <https://rscf.ru/project/21-15-00121>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. M. Graham, Cleve Clin. J. Med., **57** (5), 481 (1990).
2. D. M. Perez, Front. Pharmacol., **29**, 11 (2020).
3. R. P. Ahlquist, Am. J. Physiol., **153** (3), 586 (1948).
4. A. L. Morrow and I. Creese, Mol. Pharmacol., **29** (4), 321 (1986).
5. D. M. Perez, M. T. Piascik, and R. M. Graham, Mol. Pharmacol., **40** (6), 876 (1991).
6. J. R. Docherty, Eur. J. Pharmacol., **855**, 305 (2019).
7. A. J. Baker, Pflugers Arch., **466** (6), 1139 (2014).
8. T. L. Zefirov, et al., Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki, **160** (4), 613 (2018).
9. S. Z. Langer, Biochem. Pharmacol., **23** (13), 1793 (1974).
10. K. B. Lai, J. E. Sanderson, and C. M. Yu, Cardiovasc. Drugs Ther., **23** (4), 271 (2009).
11. T. D. O'Connell, B. C. Jensen, A. J. Baker, and P. C. Simpson, Pharmacol. Rev., **66** (1), 308 (2014).
12. K. Nishimaru, M. Kobayashi, T. Matsuda, et al., AJP Heart Circ. Physiol., **280** (1), H132 (2001).

13. M. Stengl, K. Mubagwa, E. Carmeliet, and W. Flameng, *Cardiovasc. Res.*, **38** (3), 703 (1998).
14. G. Gambassi, H. A. Spurgeon, E. G. Lakatta, et al., *Circ. Res.*, **71**(2), 870 (1992).
15. A. S. Averin, L. A. Andreeva, S. S. Popova, et al., *J. Comp. Physiol. B*, **191**, 927 (2021).
16. S. H. Woo and C. O. Lee, *Pflugers Arch.*, **437** (3), 335 (1999).
17. T. L. Zefirov, I. I. Khabibrakhmanov, N. I. Ziyatdinova, and A. L. Zefirov, *Bul. Exp. Biol. Med.*, **162** (1), 4 (2016).
18. S. Zhang, R. Takahashi, N. Yamashita, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **839**, 82 (2018).
19. J. M. Nerbonne and R. S. Kass, *Physiol. Rev.*, **85** (4), 1205 (2005).
20. S. A. Kodirov, V. L. Zhuravlev, T. A. Safonova, et al., *Rev. Clin. Pharmacol. Drug Therapy*, **3** (4), 27 (2004) [in Russian].
21. L. Virág, N. Iost, M. Opincariu, et al., *Cardiovasc. Res.*, **49** (4), 790 (2001).
22. E. Grandi, M. C. Sanguinetti, D. C. Bartos, et al., *J. Physiol.*, **595** (7), 2209 (2017).
23. I. I. Khabibrakhmanov, N. I. Ziyatdinova, and T. L. Zefirov, *Russ. J. Cardiol.*, **26** (5), 53 (2021).

Effect of $\alpha 1$ -Adrenoreceptors Stimulation on Electrical Activity of Rat Atria

N. Mansour*, N.I. Ziyatdinova*, A.M. Gallieva*, R.R. Shakirov*, and T.L. Zefirov*

**Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia*

The effect of methoxamine, an agonist at $\alpha 1$ -adrenergic receptors, on the frequency of spontaneous activity and parameters of the electrical activity of the atrial myocardium was investigated in rats with normal sinus rhythm and in normal rats under continuous electrical pacing. Methoxamine exerted dual effects on the duration of repolarization of working cardiomyocytes. Methoxamine increased the duration of the repolarization phase of the action potential in normal rats under continuous electrical pacing but decreased it in rats with normal sinus rhythm.

Keywords: $\alpha 1$ -adrenoreceptor, methoxamine, frequency of spontaneous activity, heart

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРА ОКСИДА АЗОТА L-NAME НА ИЗОЛИРОВАННОЕ СЕРДЦЕ КРЫС ПОСЛЕ ГИПОКИНЕЗИИ

© 2023 г. М.И. Сунгатуллина*, Р.И. Зарипова*., Н.И. Зиятдинова*, Г.Г. Яфарова*, **, В.В. Андрианов*, **, Х.Л. Гайнутдинов*, **, Т.Л. Зефирова*

*Казанский федеральный университет, 420008 Казань, ул. Кремлевская, д. 18; Россия

**Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского — обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», ул. Сибирский тракт, 10/7, Казань, 420034, Россия

#E-mail: ratno1992@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 15.02.2023 г.

Принята к публикации 18.06.2023 г.

Проведено исследование влияния неселективного блокатора NO-синтазы L-NAME на функциональные показатели деятельности изолированного сердца крыс после 30-суточной гипокинезии. Методом электронного парамагнитного резонанса анализировалось влияние L-NAME на интенсивность продукции оксида азота в тканях сердца крыс. Продукцию оксида азота оценивали по интенсивности сигнала, принадлежащего комплексу $(\text{DЭТК})_2\text{—Fe}^{2+}\text{—NO}$. Обнаружено, что применение L-NAME приводило к снижению продукции оксида азота в среднем на 69%. Для анализа деятельности изолированного сердца по Лангендорфу измерялись следующие показатели: давление, развиваемое левым желудочком, частота сердечных сокращений и коронарный поток. Добавление блокатора оксида азота L-NAME приводило к увеличению инотропной функции и нормализации частоты сердечных сокращений.

Ключевые слова: изолированное сердце; гипокинезия; оксид азота; электронный парамагнитный резонанс; давление, развиваемое левым желудочком; частота сердечных сокращений; коронарный поток.

DOI: 10.31857/S0006302923040166, EDN: KMXWGG

В связи с урбанизацией, автоматизацией и механизацией труда, являющимися неотъемлемой частью прогресса, тяжелой эпидемиологической обстановкой и самоизоляция у современного человека снижается уровень ежедневной физической активности. Гипокинезия (ограничение подвижности) приводит к морфофункциональным сдвигам в основных физиологических системах до патологических состояний, выраженность которых зависит от продолжительности и степени ограничения подвижности [1–6]. Уменьшение центростремительной импульсации вызывает снижение тонуса центральной нервной системы, изменение структуры и функции синапсов, трофики мышц [6]. Ограничение подвижности оказывает свое влияние практически на все системы

организма. В состоянии сердечно-сосудистой системы выявлены следующие перемены: изменение сократительной функции сердечной мышцы, ослабление миокарда, коронарных сосудов, снижение энергетического потенциала сердца, сокращение минутного объема [2, 7]. Также гипокинезия подавляет защитные системы организма, снижает устойчивость кровеносной системы к повреждающим факторам, что может привести к заболеваниям сердечно-сосудистой системы [8]. Нарастающее ограничение подвижности, увеличивая риск сердечно-сосудистых заболеваний, становится серьезной угрозой для здоровья.

Многими исследователями показано влияние гипокинезии на активацию свободных радикалов в организме и свободнорадикальное повреждение сердца, индуцируемое стрессовыми факторами. При длительном ограничении подвижности активация системы оксида азота (NO) может рассматриваться как компонент стресс-реакции [9, 10]. Накоплен огромный экспериментальный и клинический материал о физиологическом и патофизиологическом эффектах оксида азота, а

Сокращения: NO — оксид азота, NOS — NO-синтаза, цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат, AP — адренергический рецептор, XP — холинергический рецептор, L-NAME — NG-нитро-L-аргинин метиловый эфир, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат, ДРЛЖ — давление, развиваемое левым желудочком, ЧСС — частота сердечных сокращений.

также о сопряженности его эффектов с супероксидным радикалом в реализации окислительного стресса [11, 12].

NO был впервые обнаружен как маркер воспаления и регулятор сосудистого тонуса. Однако следующие исследования показали, что спектр регуляторных влияний этой молекулы значительно шире. С начала 80-х годов прошлого века NO считается важной молекулой, полученной из эндотелия, имеющей решающее значение для поддержания сердечно-сосудистого гомеостаза. NO известен как один из важнейших биологических медиаторов, который вовлечен в различные физиологические и патофизиологические процессы [13–20]. NO биологически генерируется в результате окисления L-аргинина под влиянием фермента NO-синтазы (NOS). Все изоформы NO-синтазы было принято подразделять на конститутивную (cNOS) и индуцибельную (iNOS). В 1990 г. из мозга крысы выделили нейрональную форму фермента (nNOS), позже в клетках иммунной системы (макрофагах) обнаружили индуцибельную NOS (iNOS), а в эндотелии – эндотелиальную NOS (eNOS). Еще одна изоформа NOS локализуется в митохондриях – митохондриальная (mtNOS), она регулирует процессы клеточного дыхания. Вопрос о том, что представляет собой mtNOS – отдельную изоформу фермента или же модифицированную во время трансляции или после нее индуцибельную NOS, остается открытым [21, 22].

NO легко диффундирует (не нуждаясь в рецепторах) через клеточные мембраны и проникает в соседние клетки. Важнейшая клеточная мишень NO – это внутриклеточная растворимая гуанилатциклаза: активация гуанилатциклазы приводит к образованию циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) который и опосредует все эффекты NO. Образующийся цГМФ снижает уровень свободного Ca^{2+} и активирует киназу легкой цепи миозина, вызывая расслабление гладких мышц сосудов. Ослабление действия этого механизма приводит к развитию гипертонии.

Роль NO в сердечно-сосудистой системе хорошо известна и заключается в регуляции множества клеточных процессов. Сердечно-сосудистые расстройства связаны с усилением или снижением синтеза NO. Дисбаланс в биодоступности NO вовлечен в патологию нескольких сердечных заболеваний, и понимание процессов, лежащих в основе этих процессов является предметом интенсивных исследований. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что ишемическая болезнь сердца и сердечная недостаточность связаны с нарушениями в обмене NO или в его действии на организм [23]. В патологических условиях NO-синтаза может разъединяться, что приводит к увеличению производства активных форм

кислорода, а не к физиологической продукции NO [24]. NO синтезируется всеми типами клеток, составляющими миокард, и регулирует функции сердца через сосудисто-зависимые и сосудисто-независимые эффекты. Первые включают регуляцию тонуса коронарных сосудов, тромбообразование, пролиферативные и воспалительные свойства, поддержание регенерации тканей. Вторые объясняют прямые эффекты NO на некоторые аспекты сократимости кардиомиоцитов, от тонкой регуляции процесса сопряжения возбуждения и сокращения до модуляции (пресинаптической и постсинаптической) симпатических и парасимпатических влияний. Оксид азота обладает выраженным влиянием на сердце, вызывая уменьшение частоты сердечных сокращений, ударного объема крови, увеличение длительности интервала PQ и периода изгнания крови. Его действие реализуется через различные подтипы адренергических (AP) и холинергических (XP) рецепторов. Отрицательное инотропное и хронотропное действие оксида азота на сердце осуществляется через модуляцию адренергических и холинергических влияний, реализуемых β_1 -AP, β_2 -AP, α_1 -AP и м-XP [25]. Известно, что при активации α_2 -AP происходит существенная стимуляция эндотелиальной NOS, и как следствие – увеличение уровня NO [26]. α_2 -AP (A, B и C) ответственны за синтез NO и снижение уровня ионов внутриклеточного кальция из цитозоля с помощью Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматической сети [27]. NO и цГМФ являются центральными внутриклеточными мессенджерами α_2 -AP-сигнализации в вентрикулярных миоцитах [28].

NO является ключевым модулятором различных механических сил в кардиомиоцитах. Эндотелиальные клетки синтезируют и высвобождают NO, который опосредует различные эффекты, включая тонус сосудов, гемостаз, кровяное давление и ремоделирование сосудов. NO может также активировать натрий-калиевый насос наружной клеточной мембраны, что приводит к ее гиперполяризации. Именно этот механизм приводит к дилатации сосуда при увеличении тока крови и напряжения (например, пульсового) сосудистой стенки. NO поддерживает активную вазодилатацию, регулирует кровоток, контролирует базальное артериальное давление.

Различные аналоги L-аргинина, являющиеся конкурентными ингибиторами NOS, могут тормозить синтез NO. NG-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) конкурирует с L-аргинином за места связывания с ферментом, блокируя его активность. Блокада NO-синтазы хроническим введением L-NAME вызывает уменьшение частоты сердечных сокращений, ударного объема крови, минутного объема кровообращения, объемной скорости изгнания крови, увеличение пе-

риода изгнания крови, повышение артериального давления, общего периферического сопротивления сосудов, мощности сердечных сокращений, расхода энергии на перемещение 1 литра крови. Установлено, что под влиянием L-NAME происходит увеличение холинергических влияний на частоту сердечных сокращений (ЧСС). Снижение ударного объема крови у крыс обусловлено уменьшением регуляторных влияний, реализуемых α_1 -АР и повышением роли m_2 -ХР. Эти эффекты при блокаде синтеза NO могут быть связаны с ингибированием предполагаемой способности NO уменьшать чувствительность миофиламентов к Ca^{2+} . Снижение инотропной функции сердца может быть также связано с устранением ингибиторного влияния NO на тонус сосудистой мускулатуры и соответственно увеличением ее тонического напряжения и резким уменьшением коронарного потока [25].

Исследователи указывают на связь гипокинезии со значительным повышением уровня NO в сердце. NO участвует при адаптации в стрессовых условиях. Было установлено, что при 30-суточном ограничении двигательной активности происходит увеличение продукции NO в тканях сердца в полтора раза по сравнению с животными, находящимися в обычных условиях вивария (три-четыре крысы в клетке) [29]. Повышение интенсивности образования NO при гипокинезии позволяет сделать вывод о наличии тесных связей продукции NO в организме с режимом двигательной активности. NO — активный участник процессов метаболизма и резкое изменение его генерации может привести к нарушению функциональной активности многих биосистем. Поскольку рассмотрение литературных данных показывает, что ограничение подвижности приводит к значительным изменениям в сердечно-сосудистой системе, в системе кровотока и снабжения организма кислородом, можно предположить, что часть этих изменений вызвана увеличением продукции NO в данных структурах. Исходя из этого, одной из перспективных мишеней терапевтических вмешательств при гипокинезии является система NO. С учетом повышения продукции NO при ограничении подвижности актуальным вопросом является определение количественного содержания NO в сердце в условиях блокады NO-синтаз, также важны исследования, связанные с изучением влияния L-NAME на функциональные показатели деятельности изолированного сердца при гипокинезии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на белых беспородных взрослых лабораторных крысах, находящихся в условиях ограничения двигательной актив-

ности в течение 30 суток (гипокинезия). Экспериментальные животные были разделены на две группы: первая группа — животные после 30-суточной гипокинезии; вторая группа — животные после 30 суточной гипокинезии на фоне введения неселективного блокатора NO-синтаз (L-NAME). В каждой группе было по 15 животных. Для симуляции гипокинетического эффекта крыс содержали в индивидуальных клетках-пеналах, изготовленных из органического стекла, в течение 30 суток. В первые сутки животных подвергали гипокинезии 1 ч, на вторые и третьи сутки — 2 ч, далее также через каждые двое суток время ограничения двигательной активности увеличивалось на 2 ч. Подробности данного метода были описаны нами ранее [30]. Особенности данной модели гипокинезии (в горизонтальном положении) является уменьшение влияния иммобилизационного стресса, что достигается постепенным увеличением времени нахождения животных в условиях ограничения двигательной активности. Данная модель также позволяет исключить влияние дополнительного изменения гидростатического давления крови животных, по сравнению с антиортостатической моделью (когда крысы подвешиваются за хвост).

Неселективный блокатор NO-синтаз L-NAME вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг предварительно, за 60 мин до декапитирования. В качестве наркоза использовали уретан из расчета 1200 мг/кг массы животного, его вводили внутрибрюшинно.

Для обнаружения и количественного определения NO в образцах сердца был применен метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР-спектроскопии) с использованием спиновой ловушки. Метод спинового захвата основан на реакции радикала NO со спиновой ловушкой. Был применен комплекс Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) для захвата NO и формирования устойчивого тройного комплекса $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$. Для образования в организме данного комплекса животным вводили водный раствор ДЭТК-Na в дозе 500 мг/кг в 2.5 мл воды внутрибрюшинно и раствор цитрата железа (сульфат железа (II) ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Sigma, США) в дозе 37.5 мг/кг + цитрат натрия, 187.5 мг/кг) внутримышечно. Подробности метода описаны нами ранее [31, 32]. Ловушку оксида азота вводили за 30 мин до вскрытия. Комплекс ДЭТК- $Fe(II)$ взаимодействует с NO, в результате чего образуется стабильный радикал $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$. Данный комплекс является парамагнитным

($S_{Fe} = 1/2$, и $I_N = 3/2$) и может быть зарегистрирован методом ЭПР [32]. Комплексы характеризуются легко распознаваемым спектром ЭПР со значением g -фактора 2.035 и триплетной сверхтонкой структурой. Количество NO оценивали по интенсивности характерного сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу $(D\dot{E}TK)_2-Fe^{2+}-NO$. Сигналы сравнивали по величине интегральной интенсивности, так как интегральная интенсивность сигнала ЭПР прямо пропорциональна концентрации парамагнитных комплексов [32]. Через 30 мин после введения препаратов наркотизированную уретаном крысу фиксировали на операционном столе, вскрывали, извлеченные органы быстро просушивали и замораживали в жидком азоте в капиллярах для измерений. Регистрацию спектров ЭПР приготовленных образцов проводили на ЭПР-спектрометре X-диапазона ER-200E-SRC (Bruker, США) с температурной приставкой ER 4112HV при 77 К. Во всех экспериментах сохраняли постоянными следующие параметры: СВЧ мощность — 30 мВт, модуляция — 5 Гс, усиление — $4 \cdot 10^4$, постоянная времени — 100 мс, время записи спектра — 50 с, число накоплений — 8. При накоплениях и регистрации спектров использовали компьютер спектрометра Aspect 3000 (Bruker, США). Непосредственно перед измерением готовый образец, усеченный по форме кюветы для измерений, взвешивали; масса образцов составляла около 100 мг. Амплитуду спектров ЭПР нормировали на массу образца и на амплитуду сигнала ЭПР эталонного образца (подробности методики измерений сигналов ЭПР детально изложены ранее [33, 34]).

Для анализа деятельности изолированного сердца был использован метод изолированного сердца по Лангендорфу (подробности метода описаны нами ранее [35]). У наркотизированных крыс вскрывали грудную клетку, извлекали сердце и помещали в холодный рабочий раствор Кребса—Хензеляйта (pH 7.4). Сердце фиксировали на канюлю установки Лангендорфа и перфузировали рабочим раствором. Раствор насыщали кислородом и поддерживали температуру 37°C. Внутривентрикулярное давление определяли при помощи латексного баллончика, который был введен в полость левого желудочка.

В течение 15 мин после начала перфузии происходила адаптация работы сердца, далее 20 мин записывали параметры его деятельности. Измеряли следующие показатели: давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ), ЧСС и коронарный поток. Оценивали долю изменений функциональных показателей деятельности изо-

лированного сердца крыс от показателей первой группы на фоне действия L-NAME. Значения показателей деятельности изолированного сердца крыс контрольной группы принимали за 100%. Изменение силы сокращения сердца оценивалось по показателю давления, развиваемого левым желудочком, а коронарный поток — по количеству (объему) раствора, протекающего через сосуды сердца. ДРЛЖ выражается в мм рт. ст., ЧСС — в уд/мин, коронарный поток — в мл/мин. Эксперименты *ex vivo* были проведены на изолированном сердце на установке Power Lab 8/35 (AD instruments, Новая Зеландия), запись данных осуществляли в программе LabChart Pro. Статистическую обработку осуществляли в программе MS Excel, достоверность была определена с помощью t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна—Уитни. При статистической обработке получали среднее значение измеряемой величины и стандартную ошибку среднего ($M \pm SEM$). Статистически значимыми считались данные при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активация NO-системы — один из тех механизмов, за счет которого организм предупреждает стрессорные повреждения. В организме на протяжении 30 суток действия гипокинезии активируются локальные стресс-лимитирующие системы, и система генерации оксида азота — одна из них. Ранее нами было показано, что длительная гипокинезия вызывает значительное увеличение содержания NO в органах крыс [36, 37]. Учитывая повышение продукции NO в этих условиях, является актуальным применение блокатора NO для предотвращения возможных патологических изменений при гипокинезии связанных с метаболизмом системы NO. С другой стороны, применение в клинике и экспериментальных исследованиях доноров NO и блокаторов NOS не сопровождается измерением истинного содержания оксида азота в тканях сердца, хотя оно имеет чрезвычайно важное значение, поскольку эти вещества могут обладать собственным эффектом, не связанным с оксидом азота. Метод ЭПР позволил определить изменение количественного содержания NO в сердце в условиях блокады NOS. Наш коллектив методом ЭПР-спектроскопии изучал количественное изменение продукции NO в тканях сердца крыс, подверженных ограничению подвижности, при предварительном введении неспецифического блокатора NO-синтазы L-NAME. Продукцию NO оценивали по интенсивности сигнала ЭПР, принадлежащего комплексу $(D\dot{E}TK)_2-Fe^{2+}-NO$. Обнаружено, что содержание комплекса $(D\dot{E}TK)_2-Fe^{2+}-NO$ у крыс, находящихся в условиях 30-суточной гипокинезии

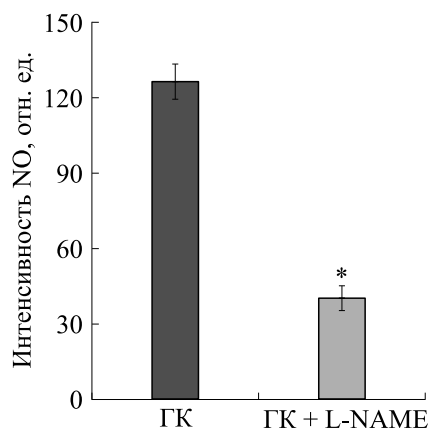


Рис. 1. Изменение количества NO-содержащего парамагнитного комплекса $(\text{DЭТК})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ в тканях сердца у гипокинезированных крыс (ГК) и на фоне неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME. По оси ординат — интегральная интенсивность спектра ЭПР, отн. ед.; * — достоверность по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$.

зии, которым предварительно был введен блокатор NO-синтаз L-NAME (крыс второй группы,) было ниже в среднем на 69% по сравнению с показателями у животных в первой группе ($p < 0.05$) (рис. 1). Полученные методом ЭПР данные подтверждают, что блокатор L-NAME действительно снижал продукцию NO в тканях сердца у животных второй группы.

В следующей серии экспериментов на установке Лангендорфа были изучены показатели деятельности сердца взрослых крыс после 30-суточной гипокинезии (рис. 2). Коронарный поток у крыс первой группы составлял 10.33 ± 0.51 мл/мин, во второй же группе он был равен 6.84 ± 1.16 мл/мин ($p < 0.05$). У крыс после 30-суточной гипокинезии ДРЛЖ достоверно было ниже нормы и составляло в среднем 43.77 ± 3.16 мм рт.ст. ($p < 0.05$); у группы животных которым после гипокинезии вводили блокатор NO-синтаз L-NAME, наблюдалась нормализация ДРЛЖ (в среднем — 67.76 ± 11.18 мм рт.ст., что достоверно отличается от показателя первой группы, $p < 0.05$). Ранее было показано, что L-NAME влияет на артериальное давление: он вызывал увеличение среднего артериального давления у самок на 25% и уменьшение ЧСС на 18% в условиях неограниченной подвижности [38]. В наших экспериментах у гипокинезированных крыс в условиях блокады NO-синтаз показатели ДРЛЖ восстанавливались, это свидетельствует о том, что ингибирование NOS при гипокинезии оказывает положительный инотропный эффект. ЧСС у крыс первой группы повышалась и в среднем составила 188.42 ± 5.33 уд/мин, что согласуется с классическими представлениями о развитии тахикардии при длительном ограничении двигательной

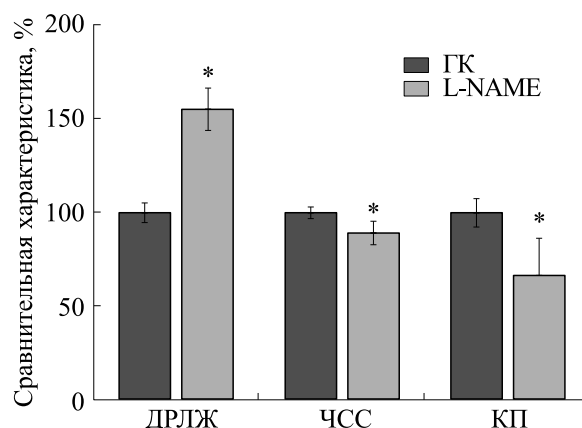


Рис. 2. Сравнительная характеристика показателей изолированного сердца крыс после гипокинезии и после гипокинезии с предварительным введением неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME. ГК — гипокинезированные крысы, ДРЛЖ — давление, развиваемое левым желудочком, ЧСС — частота сердечных сокращений, КП — коронарный поток. Достоверность указана по сравнению с исходными значениями: * — $p < 0.05$.

активности. Данный показатель у второй группы был достоверно ниже и составил 168.05 ± 11.55 уд/мин ($p < 0.05$). Следовательно, у крыс с блокадой NO-синтаз при гипокинезии происходит нормализация ЧСС.

Анализ литературных данных показывает, что в течение гипокинетического периода наблюдается негативное влияние на сократимость миокарда, и поэтому происходят изменения в систолу сердечного цикла (период напряжения увеличивается, период изгнания уменьшается). Это было подтверждено нашими проведенными ранее исследованиями, в которых после ограничения двигательной активности наблюдалось увеличение ЧСС, снижение силы сокращения и коронарного кровообращения [39]. Данные, представленные в настоящей работе, показывают, что после введения неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME показатели меняются совершенно в другую сторону, то есть наблюдаются увеличение инотропной функции и нормализация ЧСС. Таким образом, за счет блокады системы NOS L-NAME показатели деятельности изолированного сердца после гипокинезии нормализуются. Полученные данные расширяют представления о роли оксида азота и NO-синтаз в деятельности сердечно-сосудистой системы крыс, находящихся в стрессовых условиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00121, <https://rscf.ru/project/21-15-00121>).

Измерения спектров ЭПР образцов проводились в КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН в рамках выполнения государственного задания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят В.С. Июдина за измерение спектров ЭПР.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводили в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями локального биоэтического комитета Казанского федерального университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Г. Кочетков и Т. И. Васягина, *Морфология*, **119** (3), 62 (2001).
2. Н. Г. Мальцева и Т. Г. Кузнецова, *Проблемы здоровья и экологии*, **2** (16), 113 (2008).
3. Т. Н. Руденко: Дис. ... канд. биол. наук (Санкт-Петербург, 2004).
4. А. Я. Тизул, *Болезни человека, обусловленные дефицитом двигательной активности, и здоровье* (Сов. спорт, М., 2001).
5. А. И. Усов, Т. И. Васягина и И. Г. Стельникова, *Морфология*, **127** (2), 47 (2005).
6. О. А. Хлущевская и Г. З. Химич, *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*, **6**, 110 (2014).
7. М. Е. Евсеева, *Бюл. эксперим. биол. медицины*, **130** (10), 378 (2000).
8. N. T. L. Duijnhoven, M. W. P. Bleeker, P. C. E. Groot, et al., *Eur. J. Appl. Physiol.*, **104** (6), 991 (2008).
9. А. Ф. Ванин, О. И. Писаренко, И. М. Студнева и др., *Кардиология*, **12**, 43 (2009).
10. A. F. Vanin, *Nitric Oxide*, **54**, 15 (2016).
11. Е. В. Пожилова и В. Е. Новиков, *Вестн. Смоленской гос. мед. академии*, **14** (4), 29 (2015).
12. Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков и О. С. Левченкова, *Вестн. Смоленской гос. мед. академии*, **14** (4), 13 (2015).
13. В. В. Андрианов, Ф. Г. Ситдинов, Х. Л. Гайнутдинов и др., *Онтогенез*, **39** (6), 437 (2008).
14. Л. Л. Гудков, К. Б. Шумаев, Е. И. Каленикова и др., *Биофизика*, **52** (3), 503 (2007).
15. Г. Ф. Ситдинова и А. Л. Зефилов, *Рос. физиол. журн.*, **92**, 872 (2006).
16. B. Casadei and C. E. Sears, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **82** (1–3), 67 (2003).
17. T. A. Heinrich, R. S. da Silva, K. M. Miranda, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **169**, 1417 (2013).
18. V. L. Lakomkin, A. F. Vanin, A. A. Timoshin, et al., *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **16** (4), 413 (2007).
19. J. R. Steinert, T. Chernova, and I. D. Forsythe, *Neuroscientist*, **16** (4), 435 (2010).
20. R. I. Zaripova, N. I. Ziyatdinova, and T. L. Zefirov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **161** (2), 215 (2016).
21. В. Т. Ивашкин и О. М. Драпкина, *Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока* (ГЭО-ТАРМедиа, М., 2011).
22. K. Qingdong and M. Costa, *Mol. Pharmacol.*, **70** (5), 1469 (2006).
23. K. T. Navin, et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **39** (2), 298 (2002).
24. N. D. Roe and J. Ren, *Vascul. Pharmacol.*, **57**, 168 (2012).
25. Р. Р. Нигматуллина, А. Г. Насырова и Ф. Ф. Рахматуллина, *Бюл. экспер. биол. и мед.*, **134** (7), 40 (2002).
26. А. В. Мальцев и Ю. М. Коккоз, *Кардиология*, **59** (4), 52 (2019).
27. A. V. Maltsev, M. N. Nenov, O. Yu. Pimenov, et al., *Biol. Membranes: Journal of Membrane and Cell Biology*, **30** (2), 92 (2013).
28. О. Ю. Пименов, М. Х. Галимова, Э. В. Евдокимовский и др., *Биофизика*, **64** (5), 917 (2019).
29. Р. И. Зарипова, Х. Л. Гайнутдинов и Т. Л. Зефилов, *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **157** (5), 554 (2014).
30. Р. И. Зарипова, Г. Г. Яфарова, В. В. Андрианов и др., *Журн. техн. физики*, **92** (7), 999 (2022).
31. V. V. Khramtsov and L. B. Volodarsky, *Biol. Magn. Resonance*, **14**, 109 (1998).
32. В. Д. Микоян, Л. Н. Кубрина и А. Ф. Ванин, *Биофизика*, **39**, 915 (1994).
33. Kh. L. Gainutdinov, S. A. Gavrilova, V. S. Iyudin, et al., *Appl. Magn. Resonance*, **40** (3), 267 (2011).
34. Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов, В. С. Июдин и др., *Биофизика*, **58** (2), 276 (2013).
35. M. I. Sungatullina, R. I. Zaripova, and Kh. L. Gainutdinov, *Archivos Venezolanos de Farmacologia y Terapeutica*, **39** (7), 808 (2020).
36. Р. И. Зарипова, В. В. Андрианов, Г. Г. Яфарова и др., *Рос. физиол. журн.*, **100** (8), 926 (2014).
37. Р. И. Зарипова, Г. Г. Яфарова, В. В. Андрианов и др., *Биофизика*, **66** (3), 572 (2021).
38. А. Н. Павлов, О. В. Семячкина-Глушковская и С. В. Капралов, *Фундаментальные исследования*, **2**, 112 (2010).
39. M. I. Sungatullina, R. I. Zaripova, Kh. L. Gainutdinov, et al., *J. Exp. Biol. Agric. Sci.*, **8** (2), S303 (2020).

Effect of the Nitric Oxide Synthesis Inhibitor L-NAME on the Isolated Rat Heart after Hypokinesia

M.I. Sungatullina*, R.I. Zaripova*, N.I. Ziyatdinova*, G.G. Yafarova*, **, V.V. Andrianov*, **,
Kh.L. Gainutdinov*, **, and T.L. Zefirov*

**Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia*

*Zavoisky Physical-Technical Institute — Subdivision of Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
ul. Sibirskii Tract 10/7, Kazan, 420034 Russia*

The effects of a non-selective nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on the functional parameters of the isolated rat heart after a 30-day period of hypokinesia were studied. Electron paramagnetic resonance spectroscopy was employed in the analysis of a role for L-NAME in the intensity of nitric oxide production in rat heart tissues. The intensity of nitric oxide synthesis was assessed by the intensity of the signal belonging to the (DETC) $_2$ -Fe $^{2+}$ -NO complex. It was found that L-NAME decreased nitric oxide production on average by 69%. The Langendorff isolated perfused heart was used to evaluate cardiac activity, and the following parameters were measured: pressure generated by the left ventricle, heart rate, and coronary flow. Addition of the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME induced an increase in inotropic function and normalization of heart rate.

Keywords: isolated heart; hypokinesia, nitric oxide; electron paramagnetic resonance; pressure generated by the left ventricle; frequency of heart rate; coronary flow

УДК 577.334

РАДИОМИТИГАТОРНЫЕ СВОЙСТВА α -ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ И СОЧЕТАННОМ С МЕТФОРМИНОМ ИЛИ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТОМ (МЕКСИДОЛОМ) ПРИМЕНЕНИИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

© 2023 г. Е.Е. Карманова*, **, #, А.В. Черников*, А.М. Усачева*, В.И. Брусков*

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

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

#E-mail: silisti@bk.ru

Поступила в редакцию 21.12.2022 г.

После доработки 21.12.2022 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Исследованы радиомитигаторные свойства α -липоевой кислоты и использование ее совместно с метформином и мексидолом (этилметилгидроксипиридина сукцинатом) при остром рентгеновском облучении животных. Изучение радиационных повреждений ДНК полихроматофильных эритроцитов красного костного мозга мышей с помощью микроядерного теста показало, что α -липоевая кислота обладает генопротекторными и радиомитигаторными свойствами *in vivo*. Исследование 30-суточной выживаемости мышей при облучении в летальной дозе подтвердило, что α -липоевая кислота обладает радиомитигаторными свойствами. Радиомитигаторное действие α -липоевой кислоты является концентрационно-зависимым, причем более эффективны низкие дозы препарата. При сочетании с мексидолом и метформином действию радиомитигаторные свойства α -липоевой кислоты ослабляются.

Ключевые слова: липоевая (тиоктовая) кислота, рентгеновское излучение, генопротектор, радиомитигатор.

DOI: 10.31857/S0006302923040178, EDN: KMZJNH

С началом использования ядерных технологий и в настоящее время актуальной является проблема защиты человека от облучения ионизирующим излучением. Активное развитие атомной энергетики и ядерной медицины, исследование космоса требуют наличия различных способов предупреждения радиационного поражения человека. Кроме того, существование ядерного оружия и риск радиологического терроризма делают проблему поиска эффективных противолучевых препаратов еще более важной. В настоящее время существует несколько групп радиомодулирующих веществ: радиопротекторы, радиомитигаторы [1, 2], терапевтические агенты и радиосенси-

билизаторы [2]. Из этих групп наиболее изучены радиопротекторы, которые являются перехватчиками свободных радикалов, генерируемых ионизирующим излучением, и уменьшают его повреждающее действие. Их вводят в момент облучения или незадолго до него. Радиомитигаторы являются терапевтическими соединениями, применяемыми для нейтрализации и компенсации повреждений после облучения, как в ближайшее время, так и в отдаленный от облучения период. Известных радиомитигаторов гораздо меньше, чем радиопротекторов, и большинство из них находится только на начальных стадиях клинических испытаний. Кроме того, они не всегда достаточно эффективны или имеют побочные эффекты [2].

Критическими характеристиками эффективного радиомитигатора являются его антиоксидантные, иммуномодулирующие, противовоспа-

Сокращения: ЛК — α -липоевая (тиоктовая) кислота, ЭМГПС — этилметилгидроксипиридина сукцинат (мексидол), МФ — метформин, ПХЭ — полихроматофильные эритроциты, LD — летальная доза, СПЖ — средняя продолжительность жизни.

лительные, антистрессорные свойства и эффективность перехвата свободных радикалов [2–4]. Актуальным является поиск радиозащитных терапевтических средств среди лекарственных препаратов, которые уже широко применяются в медицинской практике для лечения различных заболеваний. Токсичность таких препаратов, возможные побочные эффекты их применения хорошо изучены, для них также известны терапевтические дозы и противопоказания.

В основе негативного действия ионизирующего излучения на биообъекты лежат повреждения макромолекул, образование активных форм кислорода [5, 6], нарушение антиоксидантной защиты клеток и редокс-гомеостаза. Это, в свою очередь, приводит развитию окислительного стресса, который является одной из основных причин развития мутагенеза, онкогенеза, метаболического синдрома, нейродегенеративных процессов и старения. Поэтому перспективен поиск потенциальных радиомитигаторов среди препаратов, для которых показано системное редокс-модулирующее и плейотропное действие на организм.

Одним из таких препаратов является α -липоевая кислота (ЛК, тиоктовая кислота, (R-5-(1,2-дителиолан-3-ил)пентановая кислота) — восьмиуглеродный дисульфид, являющийся антиоксидантом, митохондриальным метаболитом и коэнзимом [7]. Тиоловые группы ЛК могут быть окисленными (липоевая кислота) или восстановленными (дигидролипоевая кислота), и этот окислительно-восстановительный процесс происходит *in vivo*. Как дигидролипоевая, так и липоевая кислота обладают способностью к хелатированию ионов металлов и перехвату активных форм кислорода, но только дигидролипоевая кислота способна регенерировать эндогенные низкомолекулярные антиоксиданты и способствовать восстановлению окислительных повреждений биомолекул. Дигидролипоевая кислота может восстанавливать витамины Е и С, а также метионинсульфоксидредуктазу, а через нее — окисленные белки [8].

В настоящее время ЛК используется в терапии многих патологий, в том числе сахарного диабета, болезней Альцгеймера и Паркинсона, заболеваний печени, ожирения [7], рассеянного склероза [9] и нейропатий [10, 11]. ЛК также обладает системным положительным эффектом на функции головного мозга и является эффективным геропротектором [12]. ЛК модулирует уровни 5'-АМФ-активированной протеинкиназы в тканях [13, 14], повышает экспрессию цАМФ [15]. Она также запускает экспрессию множества белков антиоксидантного ответа [16, 17]. При фармакологическом применении ЛК снижает уровни С-реактивного белка [18] и триглицеридов в крови, улучшает показатели гликемических

и воспалительных биомаркеров [19]. Ранее в ряде работ было продемонстрировано радиозащитное действие липоевой кислоты [20–23]. ЛК как *in vitro*, так и *in vivo* проявляет антиоксидантную [20, 24] и генопротекторную [21, 24] активности. Показано радиомитигаторное действие ЛК *in vivo* как при монотерапии [22, 23], так и в комплексе с другими антиоксидантами [20], но не в тесте на выживаемость [21].

При поиске потенциальных радиомитигаторов среди лекарственных препаратов нами ранее были исследованы этилметилгидроксипиридина сукцинат и метформин. Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, мексидол) — отечественное лекарственное средство, обладающее антиоксидантной и антигипоксической активностью [25]. Есть данные о его успешном применении в комбинированной терапии опухолей [26], нейродегенеративных процессов [27] и в качестве радиозащитного агента [28]. Метформин (МФ, 1,1-диметилбигуанидина гидрохлорид) — фармацевтический препарат, давно и успешно применяемый для лечения сахарного диабета 2 типа, в последнее время предлагается в качестве радиомодулятора при лучевой терапии опухолей и других патологий [29, 30]. Ранее нами были получены данные об антиоксидантных и генопротекторных свойствах ЭМГПС и МФ на различных моделях *in vitro* и на мышах *in vivo* [31, 32]. Целью данной работы было исследование радиомитигаторных свойств ЛК при совместном ее использовании с МФ и ЭМГПС при остром рентгеновском облучении животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали: 1,1-диметилбигуанида гидрохлорид (метформин) (Sigma-Aldrich, США), масло иммерсионное, краситель Гимзы—Романовского (Panreac, Испания), аптечные препараты: раствор для инъекций «Натрия хлорид буфус» (АО ПФК «Обновление Ренвал», Россия), раствор для внутримышечного и внутривенного введения «Мексидол» (этилметилгидроксипиридина сукцинат) («Фармасофт», Россия), концентрат для приготовления раствора для инфузий «Берлитион 600» (тиоктовая кислота) (Berlin-Chemie, Германия). Все реагенты использовали без дополнительной очистки.

Рентгеновское облучение. Тотальное облучение животных проводили на рентгеновской терапевтической установке РУТ-15 («МосРентген», Россия) при мощности дозы 1 Гр/мин (фокусное расстояние 0.375 м, 20 мА, 200 кВ). Рентгеновское облучение проводили в Центре коллективного пользования ИБК РАН.

Животные. В экспериментах использовали самцов аутбредных мышей Kv:SHK в возрасте 6–

8 недель и массой 29 ± 4 г (питомник «Крюково» РАН). Животных содержали в виварии при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$. У мышей был постоянный доступ к коммерческому гранулированному корму для грызунов («Лабораторкорм», Россия) и питьевой воде. Умерщвляли животных методом цервикальной дислокации. Препараты для парентерального введения готовили в растворе для инъекций или разбавляли им аптечные препараты (ЭМГПС, ЛК) до нужной концентрации. Контрольные животные получали 0.9%-й раствор NaCl без добавок. Растворы вводили внутривентально в объеме 0.3 мл/мышь или перорально с помощью пипетки (20 мкл/мышь). В контрольных группах были интактные животные и облученные мыши, которым вводили физиологический раствор.

Микроядерный тест. Цитогенетические повреждения клеток красного костного мозга мышей определяли по образованию полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ), содержащих микроядра. Мышей умерщвляли через 28 ч после рентгеновского облучения (1.5–2.0 Гр), поскольку максимальный выход ПХЭ с микроядрами наблюдается примерно через сутки [33]. Гистологические слайды изготавливали по стандартной методике с некоторыми изменениями [34]. При подсчете ПХЭ, содержащих микроядра, использовали световой микроскоп «МикМед-2» (ЛОМО, Россия) с иммерсионным объективом при увеличении 1000 $\times$. Подсчитывали не менее 2000 ПХЭ на мышь, по пять животных в каждой группе.

Тест на выживаемость. Радиомитигаторные свойства препаратов *in vivo* исследовали на мышях с помощью теста на 30-тисуточную выживаемость после острого облучения в сублетальной или абсолютно летальной дозе (LD). Всего было проведено четыре типа испытаний: № 1 — кривая «доза—эффект» (проверка радиочувствительности используемых животных и подтверждение летальных доз), № 2 — первичное исследование радиомитигаторных свойств, № 3 — эксперимент по комбинированию ЛК с другими потенциальными радиомитигаторами, № 4 — подбор «концентрационного окна». Препараты вводили животным внутривентально через 15 мин после острого тотального рентгеновского облучения в дозе 6.5 (LD_{95/30}) или 7.0 Гр (LD_{100/30}) и перорально в течение следующих 10 суток. В испытании № 1 было использовано 20 мышей на группу, в группах 6.5 и 7.0 Гр испытания № 3 — по 20 и 14 животных соответственно, во всех остальных группах было по 10 мышей.

Статистическая обработка данных. Данные представлены как средние значения и их стандартные отклонения (для микроядерных тестов, $n = 5$). Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Данные подвергали одностороннему

дисперсионному анализу (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Бонферрони. Процентное соотношение указано для средних значений. Для статистической и графической обработки данных применяли программное обеспечение Origin 8.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние α -липоевой кислоты на образование повреждений ДНК *in vivo*. Система кроветворения является одной из наиболее уязвимых к действию ионизирующего излучения, и радиочувствительность клеток красного костного мозга чрезвычайно высока. Микроядерный тест клеток красного костного мозга позволяет *in vivo* определить повреждения ядерной ДНК после облучения животных. Микроядерный тест является одним из распространенных методов изучения генотоксичности ионизирующего излучения [33].

Влияние ЛК на частоту образования ПХЭ с микроядрами при введении препарата мышам до или после облучения в дозе 1.5 Гр представлено на рис. 1. Установлено, что ЛК в дозах 5.0 и 40 мг/кг веса животного снижает частоту образования микроядер в ПХЭ костного мозга мышей на 70 и 75% соответственно (рис. 1а). ЛК в дозе 100 мг/кг не оказывает статистически достоверного влияния на частоту образования микроядер. Дополнительный тест показал, что ЛК в дозе 40 мг/кг при введении мышам сразу после облучения снижает процент образования микроядер в ПХЭ на 65%, а при введении за 15 мин до облучения и через 6 ч после — на 40% (рис. 1б). При введении ЛК через 24 ч после облучения статистически значимый положительный эффект не зафиксирован.

Таким образом, показаны как радиопротекторные, так и радиомитигаторные свойства ЛК. Данные эффекты сильно зависят от концентрации ЛК, при избытке которой наблюдаются радиосенсибилизирующее и слабое токсическое действие *in vivo*. Отсутствие эффекта ЛК в дозе 100 мг/кг на мышах хорошо согласуется с литературными данными о токсичности высоких (от 50 мг/кг) доз ЛК, наблюдающейся при многократном приеме препарата [35, 36].

Влияние α -липоевой кислоты на выживаемость мышей после облучения в летальной дозе. Тест на 30-тисуточную выживаемость является стандартным методом исследования в радиобиологии. Он позволяет на модели острого облучения животных в летальной дозе оценить эффективность радиозащитных свойств исследуемых препаратов. Предварительно для мышей Kv:SHK была получена кривая «доза—эффект» в диапазоне доз от 5.0 до 7.0 Гр (рис. 1). В диапазоне от 5.0 до 6.5 Гр зависимость имела форму, близкую к линейной (рис. 1, прямая 2). При дозе 5.0 Гр смертность бы-

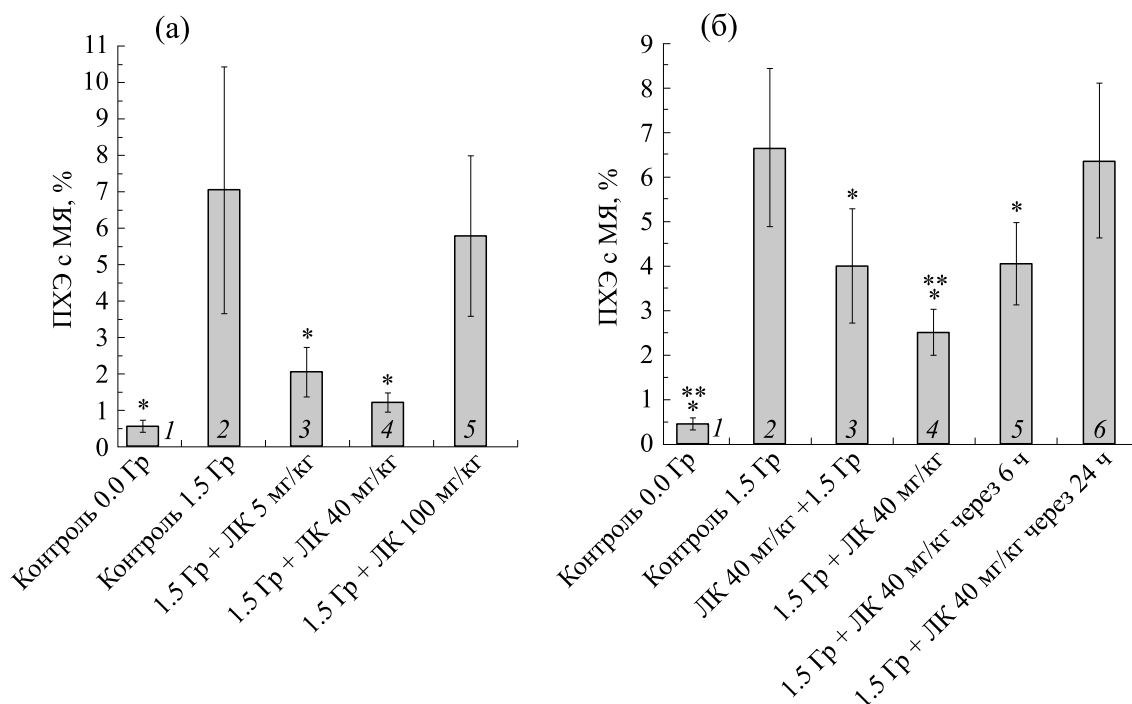


Рис. 1. Влияние введения α -липоевой кислоты на образование микроядер (МЯ) в полихроматофильных эритроцитах красного костного мозга мышей под действием рентгеновского излучения в дозе 1.5 Гр. (а) — Зависимость от дозировки α -липоевой кислоты; * — отличия от облученного контроля статистически достоверны (ANOVA, $p < 0.05$). (б) — Зависимость от времени введения α -липоевой кислоты (40 мг/кг) при облучении; * — отличия от облученного контроля статистически достоверны, ** — отличия от групп 3 и 5 статистически достоверны (ANOVA, $p < 0.05$).

ла на уровне 35%, а при 6.5 Гр составляла 95% (полуметальная доза $LD_{50/30} = 5.4$ Гр). В диапазоне от 6.5 до 7.0 Гр смертность достигает максимума — 100%. В дальнейшем в качестве сублетальной ($LD_{95/30}$) для данных животных была использована доза 6.5 Гр, а доза 7.0 Гр была взята в качестве минимальной абсолютно летальной дозы ($LD_{100/30}$).

Для начального теста на выживаемость (рис. 3) подбирали дозировку ЛК, исходя из результатов микроядерного теста и литературных данных [36]. ЛК вводили мышам в дозе 40 мг/кг однократно. Дополнительно в группе курсового применения ЛК на протяжении 10 дней давали перорально 1 раз в сутки по 7 мг/кг, поскольку, согласно литературным данным, ЛК чаще применяют в виде курсовой терапии. Для сравнения мышам контрольной группы вводили известный радиозащитный препарат — перехватчик свободных радикалов аскорбиновую кислоту (витамин С) в дозе 100 мг/кг. В группе облученных мышей, которым вводили изотонический раствор, средняя продолжительность жизни (СПЖ) составила 11.8 сут, а выжило к 30-м суткам 10% животных. ЛК при однократном введении увеличивала выживаемость до 40%, что на 10% ниже, чем в случае

получения витамина С, при этом СПЖ увеличилась до 18.1 сут. При курсовом применении ЛК наблюдался радиосенсибилизирующий эффект. СПЖ мышей при курсовом применении ЛК со-

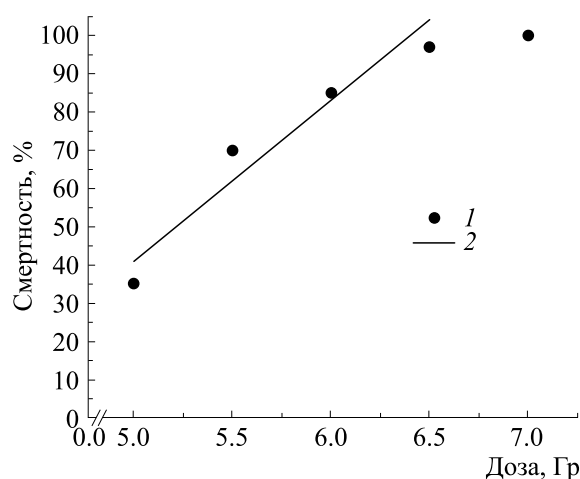


Рис 2. Смертность мышей Kv:SHK при остром тотальном однократном рентгеновском облучении в диапазоне доз от 5.0 до 7.0 Гр с шагом 0.5 Гр: 1 — смертность в группе ($n = 20$), 2 — линейная аппроксимация.

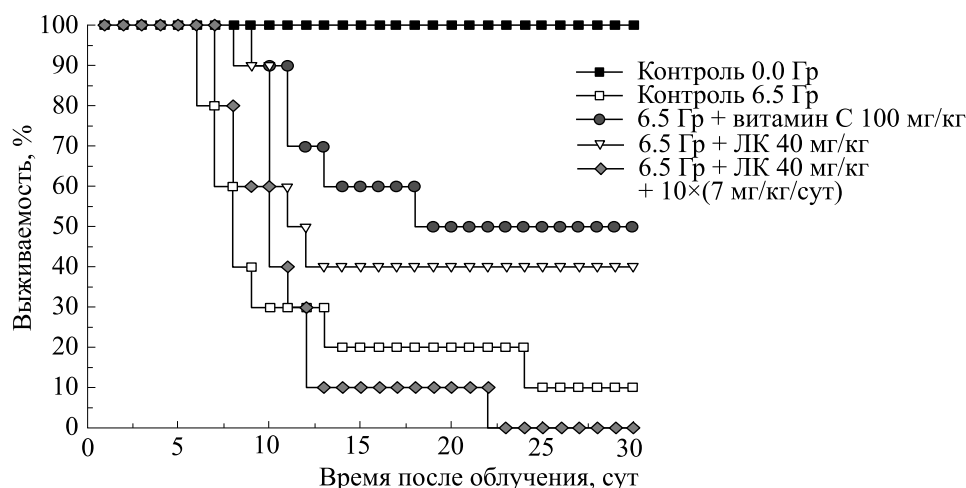


Рис. 3. Влияние α -липоевой кислоты на выживаемость мышей при внутрибрюшинном введении после рентгеновского облучения в дозе 6.5 Гр.

ставила 9.6 суток, а 100%-я смертность наступила на 23-е сутки.

Далее было исследовано использование ЛК в сочетании с ЭМГПС и МФ (рис. 4). Так как исходно предполагалось, что ЭМГПС и МФ усилят радиомитигаторные свойства ЛК, то для эксперимента выбрали минимальную абсолютно летальную дозу (7.0 Гр) и дополнительный контроль — 6.5 Гр. В группе 6.5 Гр выжило 5% животных, в группе 7.0 Гр — 0%, но СПЖ различалась незначительно: 8.5 и 8.9 сут соответственно. Опытные группы, облученные в дозе 7.0 Гр, были следующими: группа 1 — ЛК 40 мг/кг + МФ 30 мг/кг,

группа 2 — ЛК 40 мг/кг + ЭМГПС 10 мг/кг *per os* в течение 10 суток после облучения и группа 3 — ЛК 40 мг/кг + МФ 30 мг/кг + ЭМГПС 10 мг/кг *per os* в течение 10 суток после облучения. Полученные результаты не подтвердили выдвинутую гипотезу. В группах 1–3 ненулевая выживаемость (10%) была только в группе 2 — в сочетании ЛК с курсом ЭМГПС, а СПЖ в группах 1–3 распределилась следующим образом: 8.3, 11.3 и 10.7 сут соответственно.

Следующей целью был подбор «концентрационного окна» для ЛК и проверка радиомитигаторных свойств ЛК в сочетании с МФ и ЭМГПС

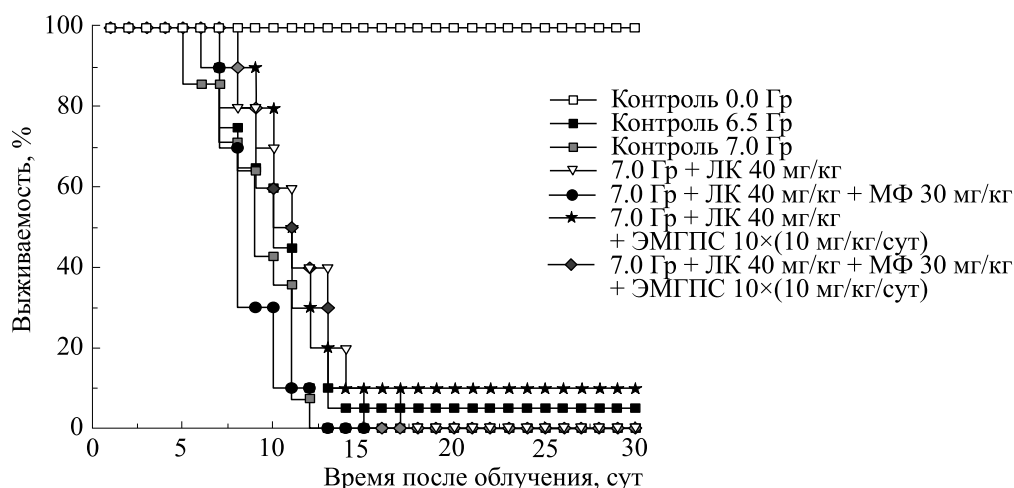


Рис. 4. Влияние α -липоевой кислоты в сочетании с метформином и/или этилметилгидроксипиридина сукцинатом на выживаемость мышей при внутрибрюшинном введении после рентгеновского облучения в дозе 7.0 Гр.

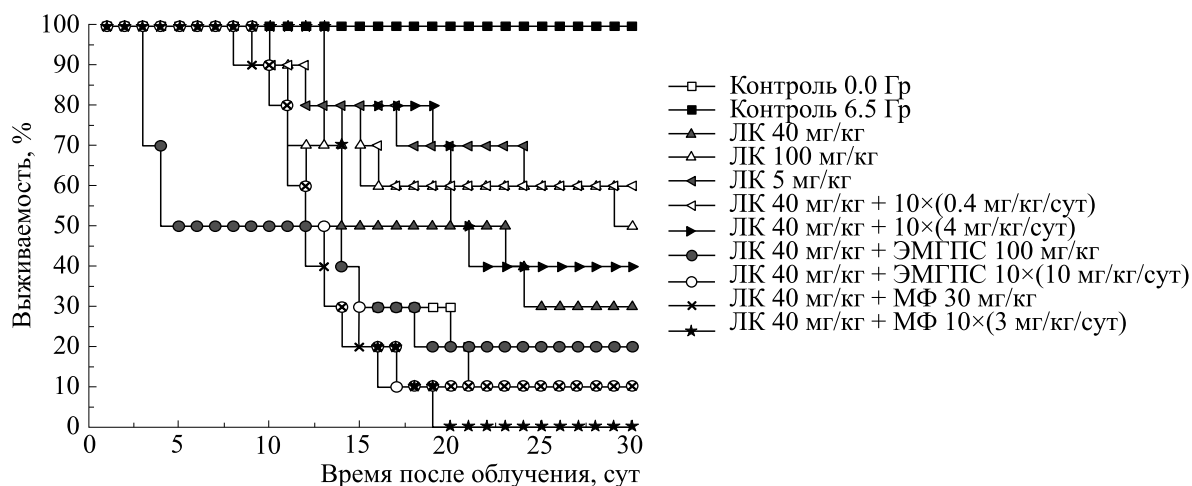


Рис. 5. Влияние α-липовоей кислоты в различных дозировках в сочетании с метформином или этилметилгидроксипиридина сукцинатом на выживаемость мышей при внутрибрюшинном введении после рентгеновского облучения в дозе 6.5 Гр.

при дозе 6.5 Гр (рис. 5). В табл. 1 представлены полученные значения СПЖ и процент выживаемости животных. Из результатов следуют два вывода. Во-первых, радиомитигаторный эффект ЛК сильно зависит от ее дозировки, причем более

эффективны низкие дозы: наилучший показатель выживаемости наблюдается в группах 5 и 6. Во-вторых, использование ЛК совместно с ЭМГПС ослабляет радиомитигаторный эффект ЛК (группы 8 и 9), а совместно с МФ — нейтрализует его

Таблица 1. Влияние α-липовоей кислоты в различных дозировках и в сочетании с метформином или этилметилгидроксипиридина сукцинатом на выживаемость мышей при внутрибрюшинном введении после рентгеновского облучения в дозе 6.5 Гр

№ группы	Группа	Средняя продолжительность жизни, сут	Выживаемость, %
1	Контроль 0.0 Гр	30	100
2	Контроль 6.5 Гр	16.8	10
3	ЛК 40 мг/кг	19.2	30
4	ЛК 100 мг/кг	22.6	50
5	ЛК 5 мг/кг	24.2	60
6	ЛК 40 мг/кг + 10×(0.4 мг/кг/сут)	23.2	60
7	ЛК 40 мг/кг + 10×(4 мг/кг/сут)	22.6	40
8	ЛК 40 мг/кг + ЭМГПС 100 мг/кг	12.3	20
9	ЛК 40 мг/кг + ЭМГПС 10×(10 мг/кг/сут)	14.1	10
10	ЛК 40 мг/кг + МФ 30 мг/кг	13.8	10
11	ЛК 40 мг/кг + МФ 10×(3 мг/кг/сут)	14.7	0

(группа 10), и даже вызывает радиосенсибилизацию (группа 11).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты можно объяснить предполагаемыми механизмами действия ЛК, которые были рассмотрены нами ранее [24] и подтверждаются литературными данными. Известно, что ЛК является перехватчиком свободных радикалов, регенерирует низкомолекулярные антиоксиданты и повышает уровни антиоксидантных ферментов. При этом сигнальный компонент ее действия считают основным *in vivo* [35]. Он подавляет передачу сигналов окислительного стресса через ядерный фактор- κ B/трансформирующий фактор роста- β (NF- κ B/TGF- β) [22, 23], снижает уровни интерлейкина-6 и циклооксигеназы-2 и повышает содержание γ -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом и противовоспалительного интерлейкина-10, подавляющих окислительный стресс [23]. Кроме того, есть данные о прооксидантных свойствах ЛК за счет образования тиолового радикала и дисульфидного анион-радикала из дигидролипоевой кислоты [8]. При этом можно предполагать, что радиомитигаторное действие ЛК в низких дозах обеспечивается через сигнально-регуляторные пути и «добавочное» опосредованное влияние на антиоксидантную систему организма. При повышении доз ЛК начинают превалировать механизмы, которые могут усугублять редокс-стресс либо за счет восстановительного стресса, либо путем усиления окислительного стресса тиоловыми радикалами, причем первое можно ожидать при курсовом лечении, а второе — при однократном введении ЛК после облучения.

При комбинировании ЛК с ЭМГПС и МФ происходит ослабление ее радиомитигаторных свойств, предположительно, из-за влияния всех трех препаратов на митохондриальные процессы. При окислительном стрессе митохондрии действуют как сигнальные регуляторные органеллы, приводя к крупномасштабному производству свободных радикалов [37] и окислительным повреждениям ДНК [38]. Наиболее значимы окислительные повреждения и мутации генов мтДНК, кодирующих структуру субъединиц ферментов дыхательной цепи. Этот процесс снижает продукцию АТФ, необходимой для процессов репарации, что приводит к дальнейшему повреждению самих митохондрий и мтДНК [39].

Все исследованные препараты реализуют системное действие на организм через модуляцию

функционирования митохондрий. ЛК существенно влияет на метаболизм митохондрий в целом [40] и способна уменьшать окислительное повреждение митохондрий, поскольку она действует как кофактор для α -кетоглутаратдегидрогеназы, сенсора митохондриального редокс-статуса, который регулирует высвобождение митохондриального цитохрома *c* и гибель клеток [41]. ЛК способствуют изменению проницаемости мембран митохондрий, может быть связана с продукцией активных форм кислорода и истощением антиоксидантного резерва митохондрий [8]. Основное действие МФ связывают с ингибированием комплекса I в митохондриях [42, 43], активацией 5'-АМФ-активированной протеинкиназы и последующим развитием сигнально-регуляторного каскада [29, 30]. Сукцинат, содержащийся в составе ЭМГПС, модулирует митохондриальную активность через сукцинатоксидазный путь [44, 45].

Однозначно определить схему влияния комбинации препаратов сложно, так как, помимо многофакторного влияния непосредственно на метаболизм митохондрий, для каждого препарата существует еще и сигнально-регуляторный компонент воздействия на организм в целом. При этом сигнальные каскады могут быть сходны. Например, все три препарата влияют на активность ядерного фактора- κ B и циклооксигеназы-2 [23, 46, 47]. Таким образом, наблюдаемый эффект может быть обусловлен как совокупным воздействием на митохондриальный метаболизм, так и влиянием на сигнально-регуляторные пути целого организма.

ВЫВОДЫ

ЛК обладает радиомитигаторными свойствами у мышей при их рентгеновском облучении в летальной дозе. Данный эффект зависит от концентрации ЛК, причем более эффективны низкие дозы препарата. При сочетании с ЭМГПС и МФ действию радиомитигаторные свойства ЛК ослабляются.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с мышами проводились с учетом международных правил работы с лабораторными животными и требований Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН (Протокол заседания Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН № 25/2021 от 09 февраля 2021 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. В. Гудков, Н. Р. Попова и В. И. Брусков, *Биофизика*, **60** (4), 801 (2015).
2. E. Obrador, R. Salvador, J. I. Villaescusa, et al., *Bio-medicines*, **8**, 461 (2020).
3. M. Srinivasan, N. Devipriya, K. B. Kalpana, and V. Menon, *Toxicology*, **262**, 43 (2009).
4. M. Cheki, A. Shirazi, A. Mahmoudzadeh, et al., *Mut. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutagenesis*, **809**, 24 (2016).
5. V. I. Bruskov, A. V. Chernikov, V. E. Ivanov, et al., *Physics of Wave Phenomena*, **28** (2), 91 (2020).
6. V. I. Bruskov, E. E. Karmanova, A. V. Chernikov, et al., *Physics of Wave Phenomena* **29** (2), 94 (2021).
7. K. P. Shay, R. F. Moreau, E. J. Smith, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1790** (10), 1149 (2009).
8. U. Cakatay, *Med. Hypotheses*, **66** (1), 110 (2006).
9. C. Waslo, D. Bourdette, N. Gray, et al., *Curr. Treat. Options Neurol.*, **21** (6), 26 (2019).
10. Л. Ю. Моргунов, *Мед. совет*, **17**, 90 (2014).
11. О. В. Курушина, А. Е. Барулин и Е. П. Черноволонко, *Мед. совет*, **1**, 58 (2019).
12. С. Ю. Калинченко, Л. О. Ворслов, И. А. Тюзиков и др., *Фарматека*, **6** (279), 43 (2014).
13. Y. Wang, N. Everaert, Z. Song, et al., *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.*, **211**, 34 (2017).
14. L. Zhou and Y. Cheng, *Neuropharmacology*, **155**, 98 (2019).
15. S. Salinithone, V. Yadav, R. V. Schillace, et al., *PLoS One*, **5** (9), e13058 (2010).
16. J. K. Lee, D. Samanta, H. G. Nam, and R. N. Zare, *J. Am. Chem. Soc.*, **141** (27), 10585 (2019).
17. Y. Koriyama, Y. Nakayama, S. Matsugo, and S. Kato, *Brain Res.*, **1499**, 145 (2013).
18. S. Saboori, E. Falahi, E. Eslampour, et al., *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **28**(8), 779 (2018).
19. M. Rahimlou, M. Asadi, N. B. Jahromi, and A. Mansoori, *Clin. Nutr. ESPEN*, **32**, 16 (2019).
20. S. L. Brown, A. Kolozsvary, J. Liu, et al., *Radiat Res.*, **173** (4), 462 (2010).
21. L. Ramachandran, C. Krishnan, and K. Nair, *Mut. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutagenesis* **724**, 52 (2011).
22. S. H. Ryu, E. Y. Park, S. Kwak, et al., *Oncotarget*, **7** (13), 15554 (2016).
23. R. S. Said, A. Mohamed and D. H. Kassem, *Toxicology*, **442**, 152536 (2020).
24. Е. Е. Карманова, А. В. Черников, А. М. Усачева и В. И. Брусков, *Хим.-фармацевт. журн.*, **56** (3), 3 (2022).
25. Т. А. Воронина, *Рос. мед. журн.*, **24** (7), 434 (2016).
26. Л. А. Балыкова, А. В. Сипров, В. И. Инчина и др., *Вестн. «Биомедицина и Социология»*, **6** (3), 4 (2021).
27. M. Ostrovskyi, *ScienceRise: Med. Sci.*, **3** (42), 20 (2021).
28. А. Н. Гребенюк, В. А. Башарин, Р. А. Тарумов и др., *Вестн. Росс. воен.-мед. акад.*, **1** (41), 102 (2013).
29. K. Mortezaee, D. Shabeeb, A. E. Musa, et al., *Cur. Clin. Pharm.*, **14** (1), 41 (2019).
30. V. Piskovatska, K. B. Storey, A. M. Vaiserman, and O. Lushchak, in *Reviews on New Drug Targets in Age-Related Disorders. Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1260, Ed. By P. Guest (Springer, Cham. 2020), pp. 319–332.
31. Е. Е. Карманова, S. A. Abdullaev, V. E. Ivanov, et al., *IOP Conf. Ser. Mat. Sci. Eng.* **487**, 012023 (2019).
32. Е. Е. Карманова, А. В. Черников, А. М. Усачева и В. И. Брусков, *Хим.-фармацевт. журн.*, **54** (7), 10 (2020).
33. A. Vral, M. Fenech, and H. Thierens, *Mutagenesis*, **26** (1), 11 (2011).
34. N. R. Asadullina, A. M. Usacheva, V. S. Smirnova and S. V. Gudkov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **29**, 786 (2010).
35. A. Piechota-Polanczyk, M. Zielińska, D. Piekielny, and J. Fichna, *Biomed. Pharmacother.*, **84**, 470 (2016).
36. А. М. Усачева, А. В. Черников, Е. Е. Карманова и В. И. Брусков, *Хим.-фармацевт. журн.*, **55** (11), 9 (2021).
37. N. S. Chandel, *BMC Biology*, **12**, 34 (2014).
38. D. C. Henstridge, M. Whitham, and M. A. Febbraio, *Mol. Metabol.*, **3**, 781 (2014).
39. I. N. Todorov, *Ros. Khimich. Zhurn.*, **51**, 93 (2007).
40. L. Rochette, G. Steliana, R. Carole, et al., *Mol. Nutr. Food Res.*, **57**, 114 (2013).
41. S. Dragomanova, S. Miteva, F. Nicoletti, et al., *Antioxidants*, **10**, 1294 (2021).
42. M. R. Owen, E. Doran, and A. P. Halestrap, *Biochem. J.*, **348**, 607 (2000).
43. M.-Y. El-Mir, V. Nogueira, E. Fontaine, et al., *J. Biol. Chem.*, **275**, 223 (2000).
44. Г. В. Бузник, В. В. Востриков и П. Д. Шабанов, *Вестн. Смоленской гос. мед. академии*, **19** (4), 22 (2020).
45. Н. А. Жаркинбекова, *Медицина (Алматы)*, **3-4**, 64 (2020).
46. R. Yahyapour, P. Amini, H. Saffar, et al., *Cur. Drug Res. Rev.*, **11**, 111 (2019).
47. И. Ю. Торшин, О. А. Громова, И. С. Сардарян и др., *Фармакокинетика и фармакодинамика*, № 4, 19 (2016).

Radio-Mitigation Properties of α -Lipoic Acid when Used alone and in Combination with Metformin or Ethylmethylhydroxypyridine Succinate (Mexidol) in Mice after Exposure to X-ray Radiation

E.E. Karmanova*, **, A.V. Chernikov*, A.M. Usacheva*, and V.I. Bruskov*

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

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

This study explored the radio-mitigation properties of α -lipoic acid and combination of α -lipoic acid with metformin and mexidol in animals during the process of X-ray irradiation. The results of the micronucleus test for measuring radiation-induced DNA damage of polychromatophilic red blood cells in the bone marrow of mice showed that α -lipoic acid has gene-protective and radio-mitigation properties in vivo. A study on the survival rate of the lethal dose-irradiated mice within 30 days confirmed that α -lipoic acid has radio-mitigation properties. The radio-mitigation effect of α -lipoic acid is dose-dependent, the effect increases with decreasing dose. α -lipoic acid in combination with mexidol and metformin exhibited a weaker radio-mitigation effect.

Keywords: lipoic (thioctic) acid, X-ray radiation, antioxidant, genoprotector, radiomitigator

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ДИСФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ОСТРОМ ПОРАЖЕНИИ ПОЧЕК

© 2023 г. А.Е. Гордеева*, Э.А. Курганова**, В.И. Новоселов*.,#

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

**Пушкинский государственный естественно-научный институт, просп. Науки, 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: novoselov-vi@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.01.2023 г.

После доработки 23.01.2023 г.

Принята к публикации 01.02.2023 г.

Острое поражение почек провоцирует нарушение функций печени, что является отягощающим фактором для эффективного лечения. В настоящей работе в качестве модели было использовано ишемически-реперфузионное поражение почек. Так как при этом основным поражающим фактором является гиперпродукция активных форм кислорода, для предотвращения повреждения печени при поражении почек в работе использовали экзогенный фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6, который способен нейтрализовать гиперпродукцию широкого спектра активных форм кислорода. Поражение почки было инициировано 45-минутной ишемией с одновременной левосторонней нефрэктомией. Печень не подвергалась манипуляциям. Пероксиредоксин 6 вводили внутривенно за 15 мин до ишемии. Состояние печени оценивали через 2, 5 и 24 ч после реперфузии почки методами гистологии и биохимии. Максимально признаки поражения печени выявлены через 5 ч реперфузии почки. Использование пероксиредоксина 6 приводит к снижению выраженности сосудистой реакции и лейкоцитарной инфильтрации в печени; уменьшению степени дистрофии и апоптоза гепатоцитов; отсутствию роста концентрации ТБК-реактивных продуктов и стабилизации уровня цитокинов ИЛ-6, ИЛ-10 в печеночной ткани, а также к нормализации активности внутриклеточных трансфераз в крови с началом реперфузии. Протекторный эффект пероксиредоксина 6 связан прежде всего с его антиоксидантными свойствами, которые позволяют нейтрализовать гиперпродукцию активных форм кислорода уже в начальный период реперфузии почки, однако не стоит исключать вклад сигнально-регуляторной функции белка в его протекторный эффект.

Ключевые слова: пероксиредоксины, ишемически-реперфузионное поражение почки, активные формы кислорода, печень.

DOI: 10.31857/S000630292304018X, EDN: KNAIRU

Острое поражение почек (ОПП) при ишемии-реперфузии (И-Р) характеризуется быстрым нарушением функций почек различной степени выраженности. Главная опасность этой патологии заключается в ее влиянии на функцию отдаленных органов. ОПП может приводить к дисфункции легких, печени, сердца и мозга [1, 2]. В частности, поражение печени и развитие острой почечно-печеночной недостаточности является одной из наиболее распространенных форм полиорганной недостаточности [1–4]. Повреждение печени в послеоперационном периоде при

ишемическом поражении почек является наиболее социально значимой патологией в силу ее широкой распространенности и провоцируемой ею высокой смертности [1, 2]. Вероятность летального исхода при сочетанном остром почечно-печеночном поражении в три раза выше, чем при изолированном остром печеночном поражении [4]. Поражение печени наряду с поражением почек усложняет эффективное лечение, так как печень играет важную роль в метаболизме лекарств при критических состояниях [1, 3]. Точный механизм повреждения печени при почечной И-Р до сих пор остается мало изученным. Тем не менее, были предложены потенциальные пути, провоцирующие это поражение, включающие активацию воспалительного каскада и системных цитокинов, гиперпродукцию и транспорт активных

Сокращения: ОПП — острое поражение почек, И-Р — ишемия-реперфузия, АФК — активные формы кислорода, Prx6 — пероксиредоксин 6, АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатамино-трансфераза.

форм кислорода (АФК) и лейкоцитов в другие органы и активацию проапоптотических путей [1–3, 5–8].

Триггером в развитии всех патобиологических процессов при остром поражении почек является гиперпродукция АФК [9], которые выступают сигнальными молекулами, приводящими, в свою очередь, к активации воспалительных путей. Воспаление вносит значительный вклад в дисфункцию печени и играет важную роль в патофизиологии ОПП [6–8]. При ОПП признаки дисфункции печени появляется на ранних стадиях повреждения почек – в первые часы реперфузии [3, 5, 6]. К основным источникам гиперпродукции АФК в печени относят лейкоцитарную НАД(Ф)Н-оксидазу, рост активности ксантиоксидазы и миелопероксидазы [10, 11]. Хотя АФК необходимы для внутриклеточной передачи сигналов и иммунного ответа, их избыточное количество не может быть полностью устранено клеточными антиоксидантами вследствие снижения активности ферментов эндогенной антиоксидантной системы в печени на фоне ОПП. В итоге это приводит к развитию окислительного повреждения клеток, разрушению органелл, клеточных мембран и ядерной ДНК [3, 8, 11]. Роль окислительного стресса в патофизиологии поражения печени при ОПП подтверждается исследованиями, показывающими защитный эффект от применения антиоксидантных веществ, нейтрализующих АФК или реакции с их участием при И-Р почек [3, 10–14]. Повреждение клеток происходит уже в начальный период реперфузии почки [15], поэтому для успешной защиты необходимо блокировать раннюю стадию реперфузионного повреждения, приводящую к поражению тканей, а именно стадию выработки активных форм кислорода. Среди всех антиоксидантов ферменты семейства пероксиредоксинов способны нейтрализовать АФК при их минимальной концентрации (5–200 мкМ) и предотвратить их гиперпродукцию в начальный момент их образования [16]. Среди представителей семейства следует выделить пероксиредоксин 6 (Prx6). Он обладает широкой субстратной специфичностью по отношению к АФК, высокими показателями антиоксидантной активности при малых концентрациях АФК, при которых другие ферменты антиоксиданты малоэффективны, также обладает хорошей биодоступностью и способностью проникать в клетки [17, 18]. В рамках настоящего исследования данные характеристики Prx6 послужили ключевыми для его выбора в качестве потенциального протектора печеночной ткани при остром поражении почки на фоне И-Р.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В экспериментах были использованы крысы-самцы линии Вистар массой 230 г, всего 30 особей.

Пероксиредоксин 6. Использовали рекомбинантный человеческий Prx6, содержащий His-tag-домен. Белок был получен в лаборатории механизмов рецепции ИБК РАН. Пероксидазная активность экзогенного белка составляла 200 нмоль/мг/мин по H_2O_2 и 100 нмоль/мг/мин по *трет*-бутилпероксиду. His-tag-домен не влияет на пероксидазную активность и субстратную специфичность белка и выступает маркером для экзогенного Prx6.

Модель ишемически-реперфузионного поражения почки. Крыс наркотизировали внутривенным введением 0.5 мл 3.5%-го Золетила 100 (Zoletil 100, Virbac Sante Animale, Франция). И-Р-поражение почки проводили путем окклюзии правой почечной ножки атравматичным зажимом в течение 45 мин с предварительной нефрэктомией левой почки. Период реперфузии наступал после снятия зажима и составлял 2, 5 и 24 ч. Печень не подвергали никаким манипуляциям. Для выявления эффектов Prx6 крысам через хвостовую вену за 15 мин до ишемии вводили 2 мл физиологического раствора, содержащего Prx6, из расчета 10 мг/кг веса животного. Экспериментальные животные были разделены на четыре группы: группа № 1 – интактный контроль ($n = 3$); группа № 2 – группа нефрэктомии (крысы только с правой почкой, через 2, 5 и 24 ч после левосторонней нефрэктомии) ($n = 9$); группа № 3 – ишемия-реперфузия правой почки + левосторонняя нефрэктомия (реперфузия 2, 5 и 24 ч) ($n = 9$); группа № 4 – ишемия-реперфузия правой почки + левосторонняя нефрэктомия + введение Prx6 перед ишемией (реперфузия 2, 5 и 24 ч) ($n = 9$). Период ишемии в группах № 3 и № 4 составил 45 мин. По окончании периода реперфузии крыс выводили из эксперимента путем декапитации и использовали образцы печени для исследования.

Гистологический анализ. Гистологический анализ ткани печени проводили на парафиновых срезах ткани, с окраской гематоксилин-эозином («Biovitrum», Россия). Микроскопический анализ проводили на микроскопе DM 6000 с цифровой камерой DFC 490 (Leica, Германия).

Иммуногистохимический анализ. Анализ проводили на парафиновых срезах печени. Для определения распределения маркера апоптоза каспазы-3 срезы инкубировали с первичными поликлональными антителами кролика к каспазе-3 (1 : 50) (ab52293, Abcam, Великобритания). Для исследования распределения эндогенного Prx6 срезы инкубировали с первичными поликлональными антителами кролика к Prx6 (1 : 1000), антитела были получены в лаборатории механизмов

рецепции ИБК РАН. Для исследования распределения экзогенного Prx6-His-tag срезыв инкубировали с первичными поликлональными антителами кролика к His-tag-домену (1 : 100) (ab9108, Abscam, Великобритания). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при 4°C. В качестве контрольного теста (для исключения неспецифического окрашивания) использовали негативный контроль, в котором исключали инкубацию с первичными антителами. Микроскопический анализ проводили на микроскопе DM 6000 с цифровой камерой DFC 490. Итоговый уровень иммуноокрашивания независимо оценивали два эксперта.

Иммуноферментный анализ. Образцы печени гомогенизировали и лизировали с 2 мМ фенилметилсульфонилфторида. Гомогенаты печени центрифугировали, супернатант сорбировали на 96-луночный планшет и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Использовали моноклональные мышинные антитела к цитокинам IL-6 (1 : 500) (10E5, Santa Cruz Biotechnology, США); и поликлональные кроличьи антитела к IL-10 (1 : 1000) (Ab9969, Abscam, Великобритания). Инкубацию проводили в течение ночи при 4°C. Измеряли оптическую плотность при 450 нм на приборе Multiskan (Labsystems Plus, Финляндия).

Определение уровня ТБК-реактивных продуктов в печени. К гомогенату ткани печени добавляли 1% H_3PO_4 и 0.8% водного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Для экстракции продукта реакции (окрашенного триметинового комплекса) использовали *n*-бутанол. Оптическую плотность определяли при длине волны 535 нм.

Биохимический анализ. Биохимический анализ крови включал в себя измерение активности печеночных ферментов — аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) на биохимическом экспресс-анализаторе Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Швейцария) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ. Статистический анализ выполняли с использованием программы SigmaPlot 11.0 Software (Systat Software Inc, США). Результаты выражали как среднее значение (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистическую значимость между отдельными экспериментальными группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, $P < 0.05$ принимали статистически достоверной.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние экзогенного Prx6 на морфологию печени при ренальной ишемии-реперфузии. Оценка морфологии печени показала, что нефрэктомия не приводит к повреждению структур паренхимы, однако через 5 ч после нефрэктомии наблю-

дается слабовыраженная сосудистая реакция: расширение центральных вен и синусоидных капилляров в прицентральной зоне, мелкоочаговая инфильтрация лейкоцитов в зоне портальных трактов (рис. 1б). Через 24 ч после нефрэктомии такие изменения не были отмечены (рис. 1в). При реперфузии почки изменения в печени отмечаются через 2 ч: мелкоочаговое расширение синусоидных капилляров и сосудов портальных трактов, инфильтрация лейкоцитов в перипортальной зоне (рис. 1г). Через 5 ч реперфузии почки в печени наблюдается развитие мелкоочаговой деструкции гепатоцитов в центрилобулярной зоне и выраженная сосудистая реакция: расширение центральных вен и синусоидных капилляров, полнокровие центральных вен и сосудов портальных трактов, отек в перипортальной зоне с выраженной очагово-диффузной лейкоцитарной инфильтрацией (рис. 1д). Через 24 ч отмечается гидрорическая дистрофия и некроз гепатоцитов центрилобулярной зоны, полнокровие центральных вен, вен портальных трактов, а также мелкоочаговое полнокровие и дилатация синусоидных капилляров с эритростазами. Сосуды портальных трактов расширены, в строме ряда из них отмечается очаговая лейкоцитарная инфильтрация (рис. 1е). При использовании Prx6 дистрофические изменения гепатоцитов не отмечены. Через 5 ч реперфузии почки в печени выявлена слабо-выраженная сосудистая реакция и очагово-диффузная лейкоцитарная инфильтрация в портальной зоне (рис. 1з), с сохранением последней через 24 ч реперфузии (рис. 1и).

При исследовании уровня маркера апоптоза каспазы-3 при поражении почки в паренхиме печени были отмечены очаги апоптоза в центрилобулярной и портальной зонах максимально через 5 ч реперфузии почек (рис. 2г), со снижением очагов апоптоза через 24 ч реперфузии (рис. 2д). Напротив, при использовании Prx6 отмечено значительное снижение иммуносигнала каспазы-3 в паренхиме печени (рис. 2е,ж).

В связи с тем, что для протекции печени от И-Р-поражения почки будет использован экзогенный Prx6, введенный внутривенно перед И-Р-поражением, было проведено иммуногистохимическое исследование его распределения в печени. Так, при внутривенном введении экзогенный Prx6 имеет внутрисосудистую локализацию в печени и отмечен сосудах портальной зоны. Напротив, эндогенный Prx6 отмечен в цитоплазме и мембране гепатоцитов (рис. 3).

Морфологические изменения в печени при поражении почки отразились на изменении в активности печеночных ферментов в крови (табл. 1). Нефрэктомия привела к росту активности этих метаболитов в крови, особенно АСТ, относительно контрольных значений. При ишемии

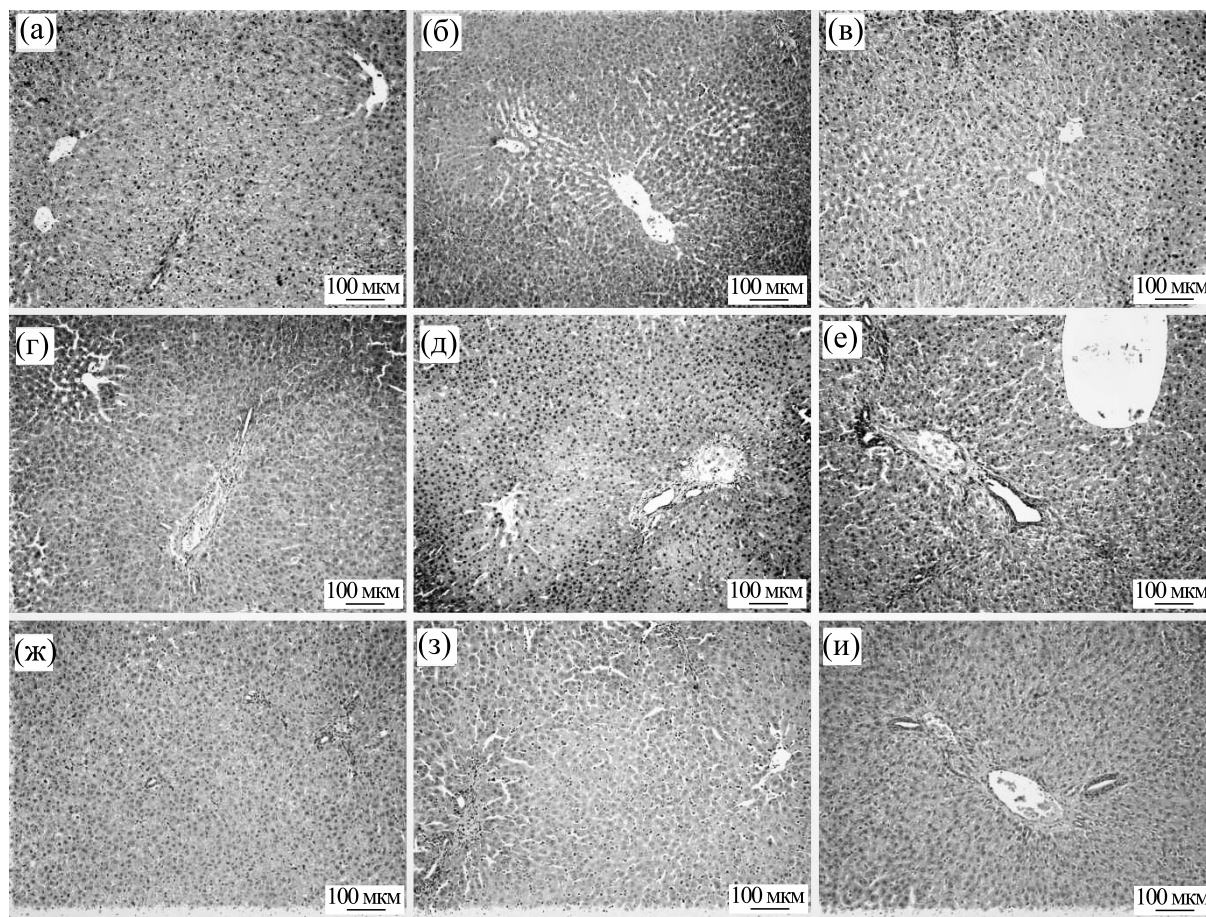


Рис. 1. Морфология печени при И-Р почки. (а)–(в) – Печень после нефрэктомии (группа № 2): (а) – через 2 ч, (б) – через 5 ч, (в) – через 24 ч; (г)–(е) – печень после И-Р почки (группа № 3): (г) – реперфузия 2 ч, (д) – реперфузия 5 ч, (е) – реперфузия 24 ч; (ж)–(и) – печень после И-Р почки в условиях введения Prx6 (группа № 4): (ж) – реперфузия 2 ч, (з) – реперфузия 5 ч, (и) – реперфузия 24 ч. Окраска гематоксилин-эозином.

почки через 5 ч реперфузии отмечено максимальное увеличение активности печеночных метаболитов в крови: АЛТ в 1.6 раза, АСТ – в 2.0 раза относительно показателей при нефрэктомии. Использование Prx6 нормализует ситуацию с активностью печеночных ферментов в крови: через 5 ч реперфузии почки эти метаболиты соответствуют показателям при нефрэктомии, однако остаются выше контрольных значений.

Определение механизма гепатопротекторного действия экзогенного Prx6 при ренальной ишемии-реперфузии. И-Р-поражение почек приводит к росту концентрации интерлейкинов в ткани печени и их повышенному уровню в течение 24 ч. Напротив, использование Prx6 не приводит к росту концентрации провоспалительного цитокина ИЛ-6 в печени при И-Р почки, ее уровень не отличается от контрольных значений в течение 5 ч реперфузии. Рост уровня ИЛ-6 в 2.0 раза отмечен через 24 ч реперфузии, тем не менее, он в 1.3 раза ниже показателя при И-Р. Для противовоспалительного цитокина ИЛ-10 использование Prx6 не

оказывает влияния, его уровень не отличается от показателей при И-Р (рис. 4).

Степень перекисного окисления липидов в печени при И-Р почки оценивали по изменению концентрации ТБК-реактивных продуктов в печеночной ткани. На рис. 5 показано, что концентрация ТБК-реактивных продуктов в интактной печени находится на уровне 0.24 ± 0.05 нмоль/мг белка. И-Р-поражение почек приводит к росту уровня перекисного окисления липидов в печени, о чем свидетельствует увеличение концентрации ТБК-реактивных продуктов максимально в 10 раз через 5 ч реперфузии ишемизированной почки. Через 24 ч реперфузии отмечен резкий спад в концентрации ТБК-реактивных продуктов в печени до уровня контрольных значений. Использование Prx6 не приводит к росту концентрации ТБК-реактивных продуктов в печени в течение всего периода реперфузии ишемизированной почки. Их концентрация остается на уровне контрольных значений (рис. 5).

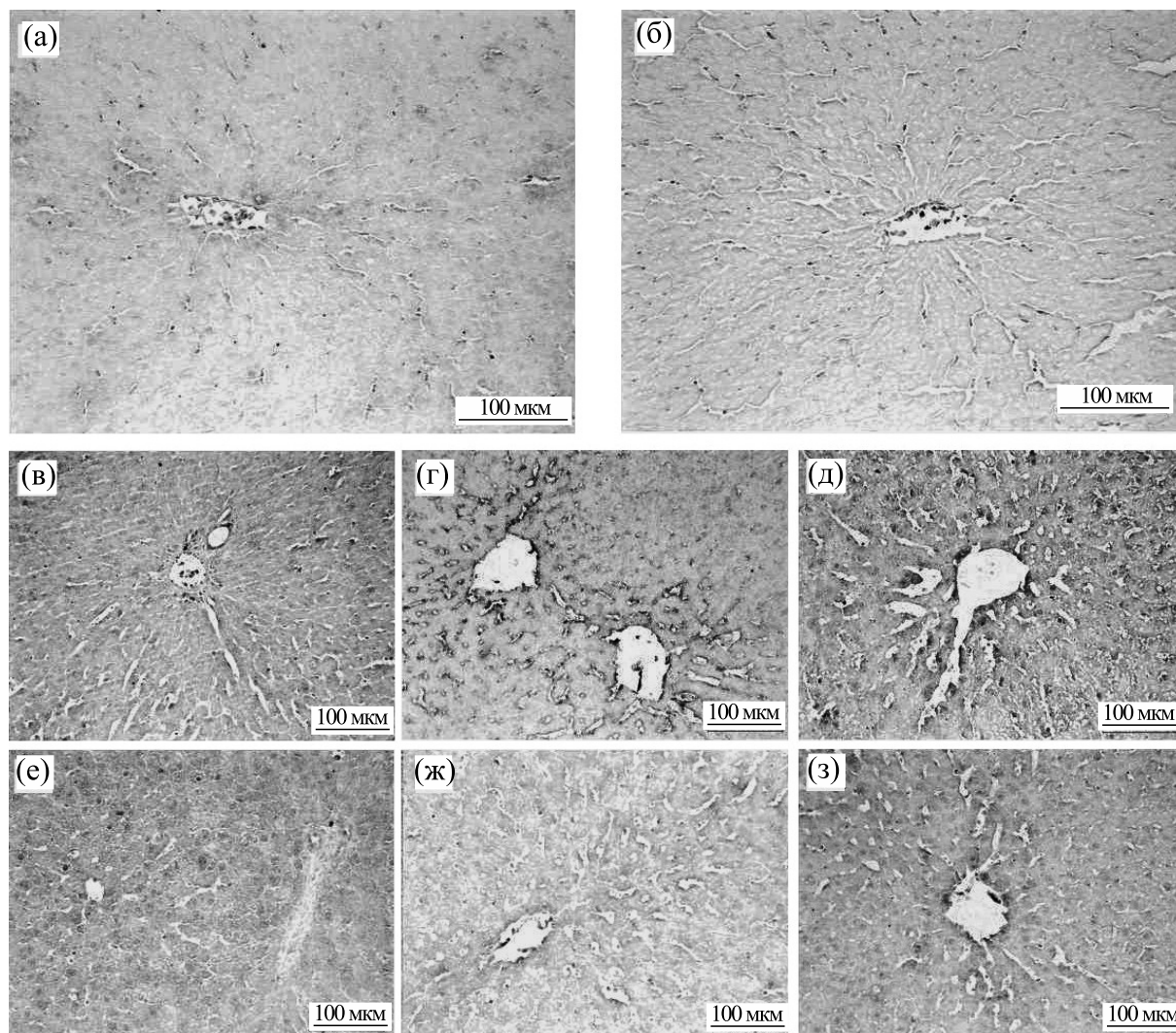


Рис. 2. Локализация каспазы-3 в печени при И-Р почки: (а) — интактная печень, положительный контроль; (б) — интактная печень, отрицательный контроль; (в)—(д) — печень после И-Р почки (группа № 3); (е)—(з) — печень после И-Р почки в условиях введения Ргх6 (группа № 4); (в) и (е) — реперфузия 2 ч, (г) и (ж) — реперфузия 5 ч, (д) и (з) — реперфузия 24 ч; Поликлональные антитела против каспазы-3.

ОБСУЖДЕНИЕ

ОПП — совокупность механизмов, связанных с повреждением ренальных структур и приводящих к дисфункции органа, в результате нарушения процессов клубочковой фильтрации и экскреции, с последующими нарушениями системного гомеостаза. Смертность от ОПП составляет 11% и возрастает до 45–60%, если оно сопровождается дисфункцией других органов [19]. Распространенным и опасным осложнением при ОПП является дисфункция печени, которое в 80–90% случаев приводит к летальному исходу [1–4]. Точные механизмы поражения печени при ОПП пока неизвестны. Предполагается, что поражение может происходить посредством индукции воспаления за счет роста уровня провоспалительных факторов, инфильтрации цитотоксических Т-кле-

ток и нейтрофилов в интерстиций печени, увеличения экспрессии фактора адгезии мРНК ICAM-1 и экспрессии фермента спермин/спермидин-N1-ацетилтрансферазы, активность которого повышается на ранних стадиях повреждения печени, роста активности источников АФК — ксантиноксидазы, миелопероксидазы, НАДФ-оксидазы, циклоксигеназы, NO и активации проапоптотических путей [1–3, 5–8, 10, 11]. Среди механизмов повреждения печени при ОПП также выделяют развитие метаболического ацидоза [20], аккумуляцию индоксилсульфата, который активизирует НАДФ-оксидазу [21], повышение концентрации мочевины, снижение синтеза аргинина и нарушение орнитинового цикла в печени [22], гиперфосфатемия [23]. Тем не менее, исследователи указывают, что среди всех меха-

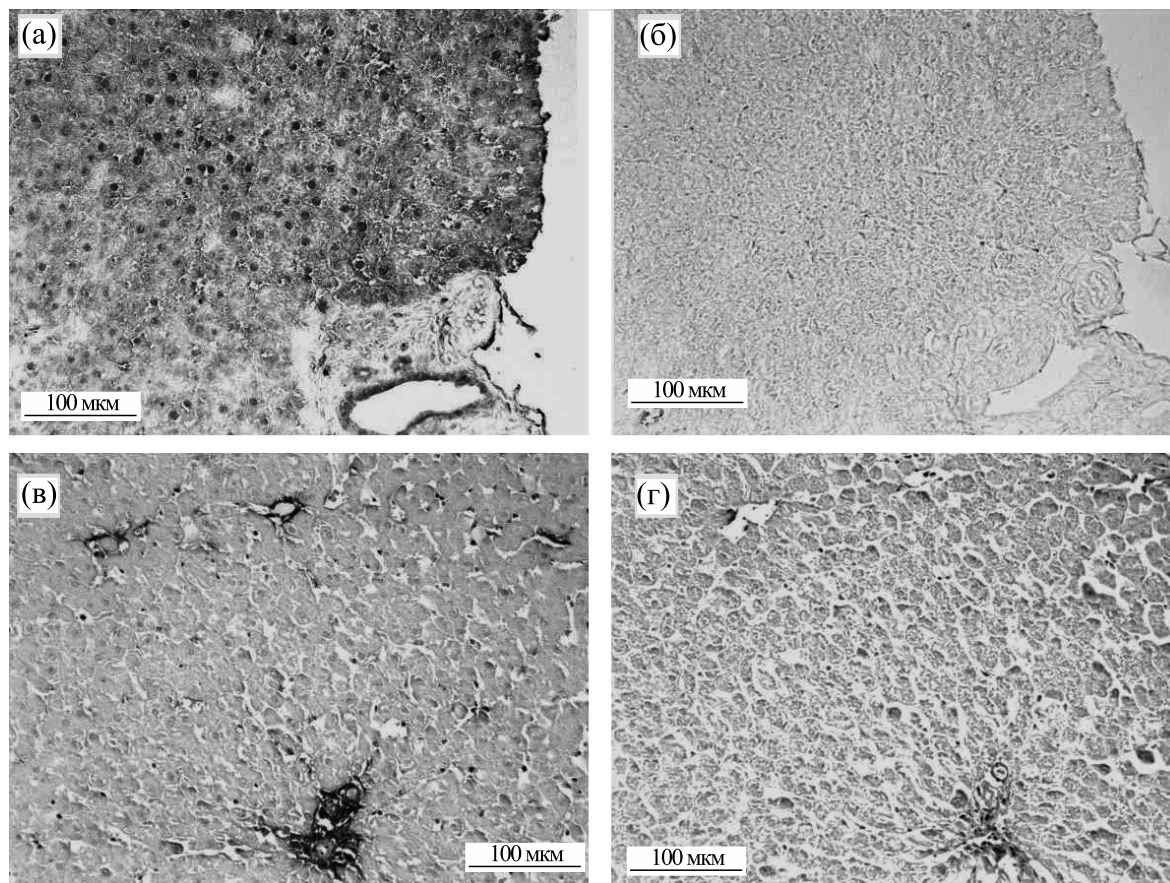


Рис. 3. Локализация эндогенного и экзогенного Prx6 в печени. (а) – Эндогенный Prx6, положительный контроль; (б) – отрицательный контроль; кроличьи антитела против Prx 6. (в) – Экзогенный Prx6-His-tag, положительный контроль; (г) – отрицательный контроль; кроличьи антитела против His-tag.

низмов поражения печени при ОПП первостепенную роль играет гиперпродукция АФК и окислительный стресс на фоне снижения резервов эндогенной антиоксидантной системы [3, 8, 10–14].

В связи с ключевой ролью нарушения окислительного гомеостаза при ОПП для предупреждения дисфункции печени используют вещества, нейтрализующие АФК или реакции с их участием при И-Р почек [3, 10–14]. Например, описано

Таблица 1. Активность печеночных ферментов в крови после И-Р почки

Время, ч	Нефрэктомия	И-Р	И-Р + Prx6
Аланинаминотрансфераза, Ед/л			
2	71 ± 6	65 ± 2	61 ± 8
5	70 ± 10	111 ± 11*	68 ± 6 [#]
24	52 ± 8	72 ± 7*	79 ± 8
Аспаратаминотрансфераза, Ед/л			
2	275 ± 35	343 ± 100	225 ± 18
5	382 ± 60	819 ± 89*	518 ± 155 [#]
24	270 ± 13	258 ± 70	252 ± 24

Примечание. Установлены статистически значимые отличия между группами: * – $p < 0.05$ относительно групп нефрэктомии в пределах одного времени реперфузии, [#] – $p < 0.05$ относительно групп ишемия-реперфузия в пределах одного времени реперфузии. В крови интактных крыс активность АЛТ – 42 Ед/л, АСТ – 96 Ед/л.

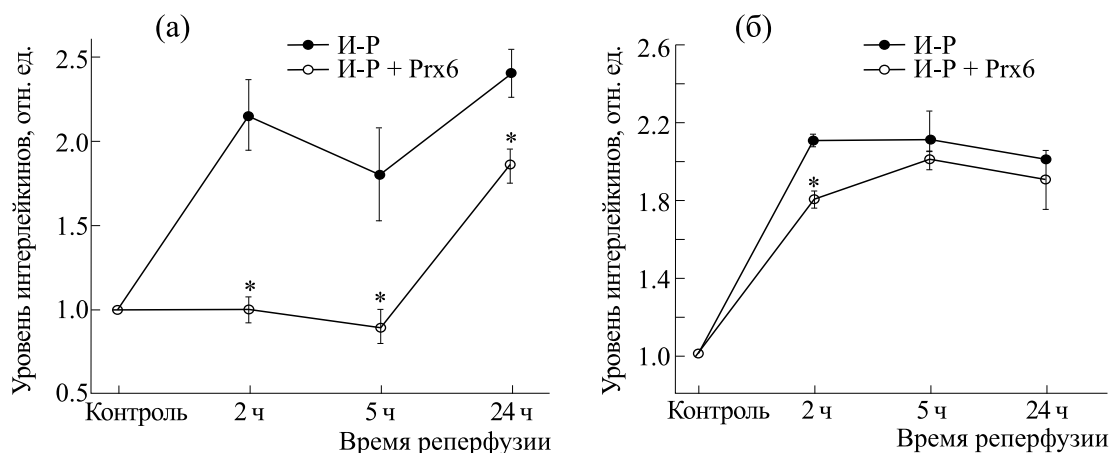


Рис. 4. Уровень интерлейкинов в печени при И-Р почки: (а) — Ab IL-6 (1 : 500) (Santa Cruz Biotechnology); (б) — Ab IL-10 (1 : 1000) (Abscam). Установлены статистически значимые отличия между группами: $*p < 0.05$. Относительные значения, контроль принят за единицу, $N = 9$ для каждой группы.

применение наноантиоксидантов, которые успешно используются при И-Р почек [24, 25]. Однако при выборе потенциальных антиоксидантных протекторов необходимо учитывать тот факт, что опасность реперфузионного поражения заключается в молниеносности нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза, когда концентрации АФК растут, а системы их элиминации еще не активированы, что обуславливает повреждение клеток уже в начальный период реперфузии [16]. Следует отметить, что активация ферментов антиоксидантного ответа (GPx1-8, GST) происходит при концентрации АФК 200 мкМ и выше, когда уже инициирован окислительный стресс и происходит гибель клеток.

Этот аспект требует использования антиоксидантных протекторов, которые способны защитить клетки уже с началом реперфузии в начальный момент образования АФК и предотвратить тем самым развитие окислительного поражения и гибели клеток. Среди таких протекторов можно выделить ферменты-антиоксиданты семейства пероксиредоксинов, которые проявляют антиоксидантную активность при минимальной концентрации АФК от 1 мкМ [16].

В настоящей работе для предупреждения дисфункции печени при ОПП был использован представитель семейства пероксиредоксинов — экзогенный рекомбинантный Prx6 и изучен его гепатопротекторный эффект в начальный репер-

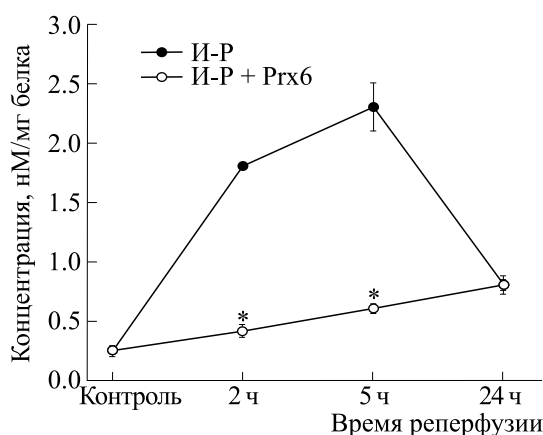


Рис. 5. Концентрация ТБК-реактивных продуктов в печени при И-Р почки. Установлены статистически значимые отличия между группами: $*p < 0.05$. Абсолютные значения, $N = 9$ для каждой группы.

фузионный период после ишемии почки. ОПП было инициировано ренальной И-Р с одновременной левосторонней нефрэктомией у крыс. Было показано, что только нефрэктомия одной почки не приводила к изменениям в печени, за исключением сосудистой реакции, которая носила временный характер и пропадала через 24 ч нефрэктомии, что связано с оперативным вмешательством. Напротив, ОПП вызванное И-Р почки и нефрэктомией второй почки, приводило к повреждению печени, которое развивалось с началом реперфузионного периода. Через 2 ч реперфузии в печени был зафиксирован значительный рост ТБК-реактивных продуктов, который достигал максимума через 5 ч, что указывает на развитие перекисного окисления липидов под действием АФК. Источником гиперпродукции АФК в печени служат лейкоциты, которые были активированы кислородными радикалами при реперфузии почки. Активированные лейкоциты и макрофаги служат не только источниками АФК, но и цитокинов. На фоне гиперпродукции АФК наблюдался рост концентрации ИЛ-6 и ИЛ-10 в ткани печени и их повышенный уровень в течение 24 ч. Печеночные ИЛ-6 и ИЛ-10 вместе с другими цитокинами (фактор некроза опухолей α , ИЛ-17A, MCP-1) связаны с воспалительными изменениями в печени [3, 5, 8]. ИЛ-6 является главным цитокином в реакции печени на воспаление, он стимулирует синтез компонентов острофазового ответа, активирует пролиферацию и дифференцировку В- и Т-клеток. В пользу участия воспалительных процессов в развитии дисфункции печени указывает тот факт, что мыши дикого типа, получавшие цитокин-нейтрализующие антитела, и мыши с нокаутом по фактору некроза опухолей α и ИЛ-6 имеют менее тяжелое повреждение печени вследствие ишемического ОПП [5]. Первыми с избытком АФК и воспалительными компонентами встречаются сосуды, что приводит к их изменениям. При реперфузии почки в печени отмечалась выраженная сосудистая реакция — дилатация, полнокровие и отек в портальной и центральной зонах — в местах повышенной инфильтрации лейкоцитов. В этих зонах через 5 ч реперфузии были обнаружены очаги деструкции и апоптоза гепатоцитов, а через 24 ч — гидропическая дистрофия и некроз. Отмечается, что И-Р почки увеличивает экспрессию молекул ICAM-1 на мембране эндотелия, которые обеспечивают адгезию лейкоцитов к сосудам, что приводит к активации, а затем к дисфункции эндотелия [7]. Поражение гепатоцитов приводило к росту активности в крови внутриклеточных печеночных ферментов АЛТ и АСТ. Рост активности печеноч-

ных ферментов в крови прямо указывает на повреждение клеток печени [1]. Пик активности ферментов был зафиксирован через 5 ч реперфузии. Аналогичная картина описана в работе [3] — И-Р почки в печени приводит к цитоплазматическим дегенеративным изменениям гепатоцитов, апоптозу, некрозу, повышению сосудистой проницаемости и лейкоцитарной инфильтрации.

Таким образом, ОПП, вызванное И-Р почки, приводит к активации окислительного стресса и воспалительного ответа в печени, повышению инфильтрации лейкоцитов в интерстиций печени, к гистопатологическим повреждениям гепатоцитов и сосудов, к росту активности АСТ и АЛТ в крови, а в итоге — к дисфункции печени. Пик патологических изменений наблюдался через 5 ч реперфузии почки с тенденцией к уменьшению с увеличением времени реперфузии, что может говорить о включении компенсаторно-приспособительных резервов организма в стрессовой ситуации. Тем не менее, в ранний реперфузионный период происходит поражение не только ишемизированного органа, но и удаленных органов, что в итоге может привести к недостатку эндогенных резервов адаптации и привести к критическим изменениям в системах организма.

Использование экзогенного Prx6 изменяет характер развития патологических изменений как в почке, так и в печени. Следует подчеркнуть, что при внутривенном введении Prx6 до ишемии почки последний проникает как в ткани почки, так и в ткани печени, причем в печени экзогенный Prx6 обнаружен в сосудах портальной и центральной зон, что позволяет ему оказывать свой протекторный эффект в этих местах. Таким образом, в обоих органах происходит усиление антиоксидантного статуса. В почке отмечено снижение интенсивности окислительного стресса и нормализация профиля экспрессии маркерных генов антиоксидантного ответа, что приводит к сохранению функциональной активности почки [26]. В печени также отмечено отсутствие роста концентрации ТБК-реактивных продуктов в печени, что указывает на предотвращение перекисного окисления липидов. Такой эффект объясняется мощными антиоксидантными свойствами Prx6, которые позволяют ему нейтрализовать гиперпродукцию кислородных радикалов в начальный момент их образования [15, 16, 26].

На фоне снижения интенсивности окислительного стресса в печени был отмечен также рост провоспалительного цитокина ИЛ-10, однако не зафиксировано увеличение концентрации для воспалительного цитокина ИЛ-6 и выраженной лейкоцитарной инфильтрации в портальной и

центральной зоне, что может указывать на уменьшение индукции воспаления. В то же время в этих зонах наблюдалась слабовыраженная сосудистая реакция: наблюдается снижение деструкции гепатоцитов, их апоптоза и некроза в перипортальной и прицентральной зонах печени. В совокупности снижение поражения печеночной ткани приводит к снижению активности в крови внутриклеточных ферментов печени АЛТ и АСТ, что прямо указывает на уменьшение поражения гепатоцитов.

Стоит предположить, что снижение поражения клеток печени обусловлено не только антиоксидантным протекторным действием экзогенного R α х6 но и его сигнально-регуляторной функцией. Так, было показано, что в почке экзогенный R α х6 приводит к нормализации профиля экспрессии маркерных генов иммунного ответа [26]. С этой позиции не стоит исключать влияние R α х6 на снижение экспрессии молекул ICAM-1 в печени и таким образом на предотвращение дисфункции эндотелия.

Таким образом, использование R α х6 в условиях окислительного стресса, вызванного И-Р-повреждением почки способствует коррекции окислительно-восстановительного баланса и обрыву каскада повреждений уже с началом реперфузии почки, что, в свою очередь, предотвращает развитие дисфункции печени при остром поражении почек.

БЛАГОДАРНОСТИ

Микрофотографии, представленные в публикации, были получены с использованием оборудования Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ФИЦ ПНЦБИ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00041).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей. Основным документом, регламентирующим проведение настоящего исследования, являлось «Руководство по работе с лабораторными животными ИБК РАН» № 57 от 30.12.2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Lane, J. J. Dixon, I. MacPhee, et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **28** (17), 1634 (2013).
2. M. E. Grams and H. Rabb, *Kidney Int.*, **81** (10), 942 (2012).
3. F. Golab, M. Kadkhodaei, M. Zahmatkesh, et al., *Kidney Int.*, **8**, 783 (2009).
4. А. Ю. Николаев, Эффективная фармакотерапия, **44**, 22 (2013).
5. S. W. Park, S. W. C. Chen, M. Kim, et al., *Lab. Invest.*, **91**, 63 (2011).
6. Y. Shang, S. M. Hewage, Ch. U. B. Wijerathne, et al., *Front. Med. (Lausanne)* **7**, 201 (2020).
7. J. V. Bonventre and A. Zuk, *Kidney Int.*, **66**, 480 (2004).
8. M. Serteser, T. Koken, A. Kahraman, et al., *FACS J. Surg. Res.*, **107**, 234 (2002).
9. E. Y. Plotnikov, A. V. Kazachenko, M. Y. Vyssokikh, et al., *Kidney Int.*, **72** (12), 1493 (2007).
10. E. Fadillioglu, Z. Kurcer, H. Parlakpinar, et al., *Arch. Pharm. Res.*, **31** (6), 705 (2008).
11. M. H. Emre, H. Erdogan, and E. Fadillioglu, *Gen. Physiol. Biophys.*, **25**, 195 (2006).
12. А. Е. Гордеева, Э. А. Курганова и В. И. Новоселов, *Биофизика*, **66** (5) 985 (2021).
13. Z.-Y. Fu, Z.-J. Wu, J.-H. Zheng, et al., *Drug Design Dev. Therapy*, **14**, 175 (2020).
14. J. Kaur, T. Kaur, et al., *Drug Dev. Res.*, **82**, 412 (2021).
15. М. Г. Шарапов, А. Е. Гордеева и др., *Биофизика*, **62**, 1208 (2017).
16. М. Г. Шарапов, Е. Е. Фесенко, В. И. Новоселов, *Биофизика*, **63**, 734 (2018).
17. Y. Manevich, T. Shuvaeva, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **485**, 139 (2009).
18. M. G. Sharapov, P. V. Glushkova, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830 (2021).
19. R. L. Metha, J. Bouchard, et al., *Intensive Care Med.*, **37**, 241 (2011).
20. Ostermann and R. W. Chang, *Crit. Care*, **13**, 142 (2009).
21. T. Shoji, A. Wada, K. Inoue, et al., *Nephron*, **105**, 99 (2007).
22. N. Salem, E. A. Salem, A. M. Maarouf, et al., *Ren. Fail.*, **32** (8), 959 (2010).
23. A. Baquerizo, D. Anselmo, and C. Shackleton, *Transplantation*, **75** (12) 2007 (2003).
24. Z. T. Rosenkrans, T. Sun, D. Jiang, et al., *Adv. Sci.*, **7**, 2000420 (2020).
25. K. Minami, S. Bae, H. Uehara, et al. *Am. J. Transpl.*, **20**, 1527 (2020).
26. R. G. Goncharov, K. A. Rogov, A. A. Temnov, et al., *Cell Tissue Res.*, **378** (2), 319 (2019).
27. X. Wang, S. A. Phelan, K. Forsman-Semb, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 25179 (2003).

Use of Peroxiredoxin 6 to Prevent Liver Dysfunction in Acute Kidney Injury

A.E. Gordeeva*, E.A. Kurganova**, and V.I. Novoselov*

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

***Pushchino State Natural Science Institute, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Acute kidney injury causes deterioration of liver function, that is a confounding factor affecting treatment outcomes. In this work, renal ischemia reperfusion injury was used as a model. Taking into account that hyperproduction of reactive oxygen species is the major risk factor for kidney damage, the exogenous antioxidant enzyme peroxiredoxin 6, able to neutralize reactive oxygen species, has been used to prevent liver damage when kidneys are damaged. Kidney injury was initiated by a 45-minute ischemia simultaneously with a left-sided donor nephrectomy without manipulations of the liver. Peroxiredoxin 6 was administered intravenously 15 minutes before ischemia. The functional state of the liver was assessed after 2, 5 and 24 hours of reperfusion using histological and biochemical analysis. The signs of liver damage were detected in the best possible way after 5 hours of kidney reperfusion. It was found that peroxiredoxin 6 helps reduce the severity of the vascular reaction and leukocyte infiltration in the liver; lower the level of dystrophy and apoptosis of hepatocytes; keep the concentration of TBA-reactive products even and stabilize the level of cytokines, IL-6 and IL-10, in the liver tissue, as well as normalize the activity of intracellular transferases in the blood at the onset of reperfusion. The protective effect of peroxiredoxin 6 is associated primarily with its antioxidant properties, due to which hyperproduction of reactive oxygen species can be neutralized in the early phase of kidney reperfusion, but the signal-regulatory function of the protein can also contribute to a protective role peroxiredoxin 6.

Keywords: peroxiredoxins, renal ischemia reperfusion injury, reactive oxygen species, liver

ПАНДЕМИЯ SARS-CoV-2 КАК СИСТЕМА «ХИЩНИК–ЖЕРТВА»: БИОФИЗИЧЕСКИЕ, СОЦИАЛЬНЫЕ И ГЕЛИОФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ ЛОКАЛЬНЫХ ЭПИДЕМИЙ

© 2023 г. М.В. Рагульская*,#

**Институт земного магнетизма и распространения радиоволн им. Н.В. Пушкова РАН,
Калужское шоссе, 4, Троицк, Москва, 108840, Россия*

#E-mail: ra_mary@mail.ru

Поступила в редакцию 29.12.2022 г.

После доработки 17.01.2023 г.

Принята к публикации 01.02.2023 г.

Рассматриваются особенности развития пандемии коронавируса в различных странах, в рамках системы «хищник–жертва» под внешним модулирующим воздействием солнечной активности. Обсуждается, что в условиях глобального минимума солнечной активности генетический состав населения оказался главным фактором различия динамики локальных эпидемий SARS-CoV-2. Страны с максимальным значением относительной смертности от коронавируса имеют доминантное население с гаплогруппой R1b. Показано совпадение динамики заболеваемости и смертности в странах с близким генетическим составом, вне зависимости от введения или отсутствия локдауна на их территории. Выявлено возникновение автоколебательных волн в небольших странах с жестким локдауном в первую волну пандемии, что привело к существенному увеличению количества жертв в последующие волны. Обсуждается, что для стран с гаплогруппой R1b всеобщая вакцинация понизила уровень относительной смертности в пять-восемь раз. Однако для стран с гаплогруппой N и R1a + N к середине 2022 года относительная смертность возросла в два-четыре раза по сравнению с 2020 годом.

Ключевые слова: пандемия SARS-CoV-2, коронавирусные заболевания, солнечная активность, система «хищник–жертва», генетический состав популяции, автоколебательные волны смертности.

DOI: 10.31857/S0006302923040191, EDN: KNJSGK

Сосуществование и взаимное изменение вирусов и людей происходит в течение всей истории человечества. Каждая следующая эпидемия вносит генетическое разнообразие, как в популяцию вирусов, так и в популяцию людей. Система динамического взаимодействия вирусов и человечества является классической системой «хищник – жертва». В этой системе вирусы проявляют себя в качестве хищников, а человечество является для них кормовой базой. В зависимости от начальных и граничных условий, нелинейности системы, а также вариативности хищников и жертв в течение пандемии каждая локальная эпидемия протекает по-разному.

Вирусы быстрее реагируют на изменения внешней среды и параметров космической погоды из-за высокой скорости изменения. Циклы солнечной активности и космической погоды оказывают модулирующее воздействие на мутации вирусов и динамику инфекционных заболеваний. В результате число инфекционных заболеваний от минимума к максимуму 11-летнего цик-

ла солнечной активности возрастает в два раза [1]. При этом число обычных заболеваний изменяется не более чем на 20–30%.

В минимуме солнечной активности основное воздействие на биосферу оказывают галактические космические лучи [2–4]. В максимуме солнечной активности возрастает биоэффективное воздействие солнечных космических лучей и вспышечной активности. Такая схема адаптации заложена в живых организмах на клеточном уровне еще с момента формирования биосферы в условиях слабого молодого Солнца, сильного экранирования солнечного излучения атмосферой ранней Земли, и высокого уровня галактических космических лучей в первый миллиард лет существования жизни на нашей планете [5, 6]. Как показали наблюдения за солнцеподобными звездами, эволюционная адаптация первых живых систем происходила в условиях пониженной светимости и повышенной радиационной опасности молодого Солнца [7, 8]. Примерно через 2 миллиарда лет Солнце вышло на режим цикли-

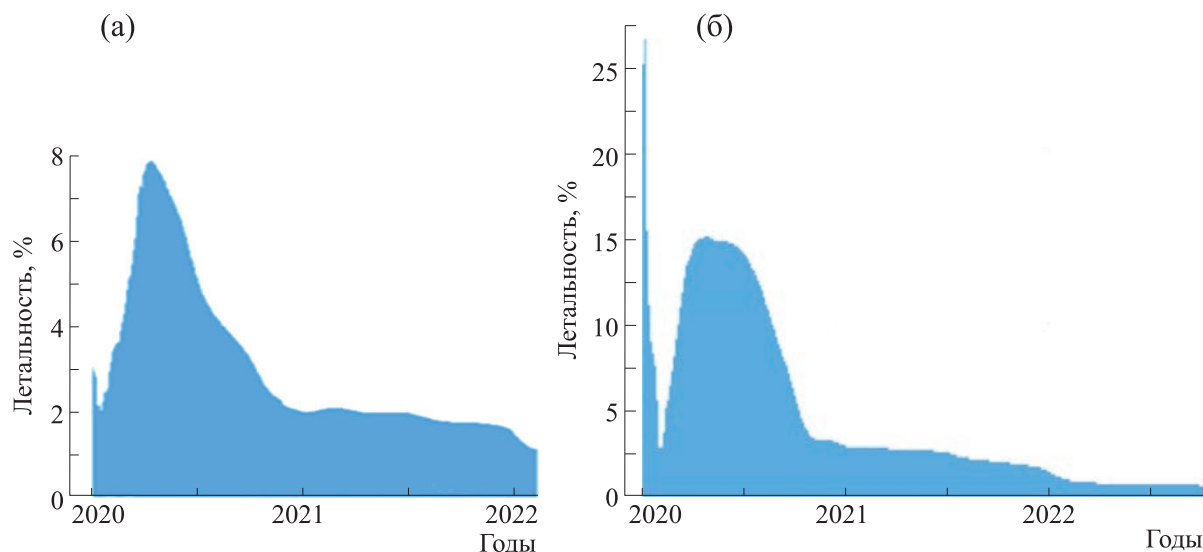


Рис. 1. Летальность от коронавирусных заболеваний за 2020–2022 годы по данным ВОЗ: (а) — данные на февраль 2022 г, (б) — данные на сентябрь 2022 г. (<https://www.who.int>).

ческой динамики. Однако эволюционные адаптационные механизмы проявляются и в современных живых системах, от дрожжевых клеток до человека [5, 9].

В настоящее время вирусные пандемии в основном происходят в экстремумах солнечной активности, в зависимости от соотношения фаз 11-летнего цикла и столетнего цикла. За последние 270 лет развитие пандемий характерно в максимумах 11-летнего цикла солнечной активности при высоких значениях чисел Вольфа (выше 140), если при этом наблюдается фаза роста или максимум квазистолетнего цикла солнечной активности. В низких циклах солнечной активности (значения 100–120 средних годовых чисел Вольфа), развитие пандемий наблюдается как в максимумах, так и в минимумах 11-летнего цикла солнечной активности [10]. Пандемии SARS 2002–2003 гг. и пандемия SARS-Cov-2 2019–2022 гг. являются яркими представителями пандемий при низкой общей солнечной активности в минимуме квазистолетнего цикла. Солнечная активность 2018–2019 гг. была крайне низкой, наблюдался глубокий общий минимум. Пятенная активность Солнца иногда отсутствовала в течение нескольких недель. В феврале 2019 г. уровень коротковолнового излучения Солнца упал ниже порога чувствительности приборов, уменьшившись на два порядка (почти в 100 раз). Существенно сократилась толщина озонового слоя. Атмосфера и биосфера находились под активным воздействием галактических космических лучей. Новый 25-й цикл принято отсчитывать от декабря 2019 г., однако весь 2020 г. число солнечных пятен не превышало 10.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы данные о солнечной и геомагнитной активности с сайта ИЗМИРАН (<https://www.izmiran.ru/data>).

Также использованы открытые данные об относительной заболеваемости и смертности от коронавируса по различным странам с сайта Университета Джона Хопкинса (<https://coronavirus.jhu.edu>).

ПАНДЕМИЯ SARS-Cov-2. ГЕНОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Для обсуждения локальных эпидемий коронавируса нужно выбрать статистические параметры, позволяющие максимально объективно провести сравнение данных по разным странам. До окончания пандемии сложно использовать для этих целей такой общепринятый параметр как летальность.

Данные ВОЗ по летальности за 2020 г., выложенные в открытый доступ в феврале 2022 г. и в сентябре 2022 г., отличаются между собой более чем в два раза (рис. 1).

Так, судя по графику февраля 2022 г., максимальная летальность наблюдалась в середине 2020 г. и имела значение 8% (летальность — отношение числа умерших от определенного заболевания за определенный период времени к общему числу людей, имевших тот же диагноз в рамках того же периода времени). А в графике, представленном в сентябре 2022 г., максимальная летальность регистрировалась в первые дни пандемии и составляла более 25%. Пик летальности в середине 2020 г. тоже присутствует и составляет уже 15%

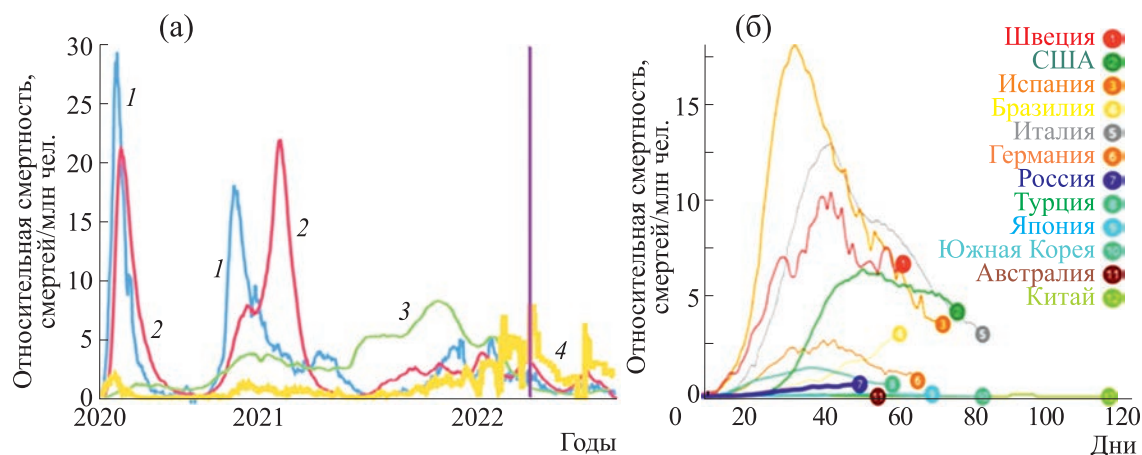


Рис. 2. (а) — Относительная смертность по европейским странам с гаплогруппами R1b, R1a и N от начала пандемии и до настоящего времени. Цифрами отмечены страны: 1 — Бельгия (гаплогруппа R1b, пиковая относительная смертность 30); 2 — Великобритания (гаплогруппа R1b, пиковая относительная смертность 22); 3 — Россия (гаплогруппы R1a + N, пиковая относительная смертность 8); 4 — Финляндия (гаплогруппа N, пиковая относительная смертность 7). Вертикальной линией отмечена пиковая смертность в Финляндии. (б) — Относительная смертность в разных странах мира первые 80 дней со времени регистрации в каждой стране более 10 смертей.

вместо 8%, декларируемых полугодом ранее (напомним, что столь существенные расхождения касаются не текущих данных, а данных событий двухлетней давности). Проводить аналитику, опираясь на столь не совпадающие данные о летальности, весьма затруднительно. Поэтому для исследования автором были выбраны более стабильные данные медицинской статистики: относительная заболеваемость и относительная смертность в отдельных странах (число случаев на миллион человек).

При рассмотрении динамики этих параметров за 2020–2022 гг. выяснилось, что динамика заболеваемости и смертности от коронавируса сильно зависит от степени варибельности жертв, в частности, от генетического состава населения. На рис. 2б представлена относительная смертность в разных странах мира уже в первые 80 дней локальных эпидемий коронавируса от момента регистрации в каждой стране более 10 смертей.

Как видно из графика, значения смертности в России, Финляндии, Германии, Китае, Южной Корее, Японии, Австралии не превышали 4. В это же время показатели в западноевропейских странах (Испания, Швеция, Италия, Испания, Великобритания) и США доходили до значений 18–20, а в Бельгии достигли 30. Эта тенденция сохранилась до середины 2021 г. На рис. 2а представлена динамика относительной смертности в Бельгии, Великобритании, России и Финляндии. Великобритания и Бельгия имеют население с доминантной гаплогруппой R1b, для Финляндии характерно население с гаплогруппой N. Население европейской части России представляет собой сложную смесь гаплогрупп. Однако основ-

ными являются гаплогруппы R1a и N, в сумме их носителями являются более 50% российских мужчин. Наблюдается преобладание гаплогруппы R1a на юге и в центре, а также увеличение удельной доли гаплогруппы N на северо-западе европейской части страны.

В работе [11] приведена карта распределения гаплогрупп в Европе, а также относительная смертность по странам. В работе показано, что относительная смертность убывает при перемещении на северо-восток Европы, а страны с максимальным значением относительной смертности от коронавируса имеют доминантное население с гаплогруппой R1b. Таким образом, в пандемию Covid-19 разница в относительной смертности на 1 млн человек в основных европейских гаплогруппах R1b, R1a, I, N составляла более десяти раз в первую волну и до трех-пяти раз в течение последующих волн (рис. 2б). Надо отметить, что для обычного гриппа различия в смертности этнических групп составляют не более двух раз. По-видимому, такое существенное геногеографическое различие локальных эпидемий характерно именно для пандемий глобального минимума солнечной активности [1, 11].

Население Восточной Европы и европейской части России имеет преимущественное население с гаплогруппой R1a. Иран, Индия, Германия и Швеция также имеют часть населения с гаплогруппой R1a. В этих странах наблюдалось большое количество заболевших без смертельных исходов болезни, а также бессимптомных больных. Средний уровень относительной смертности для стран с R1a составлял около 5, а максимальные значения не превышали 8. При этом еще раз не-

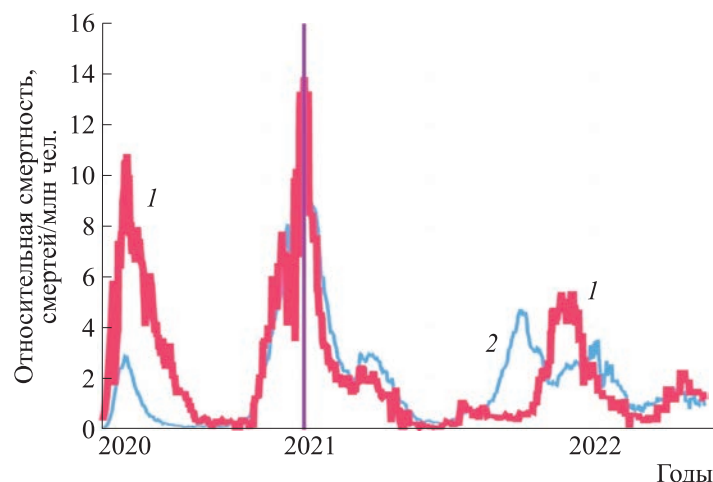


Рис. 3. Относительная смертность по странам с близким генетическим составом населения с гаплогруппами R1b+R1a+I за 2020–2022 гг.: 1 – Швеция, без локдауна; 2 – Германия, локдаун вводился дважды.

обходимо подчеркнуть, что уровень медицины и доступность медицинского обслуживания в странах Западной Европы значительно выше, чем в Иране или Индии, однако уровень смертности от Covid-19 в неевропейских странах был ниже до пяти раз. На северо-западе России население с гаплогруппой R1a наполовину замещается населением с гаплогруппой N. Население Финляндии также имеет население с гаплогруппой N. В гаплогруппе N наблюдалась самая низкая относительная смертность среди европейских стран. До начала массовой вакцинации ее значения не превышали 2–4 [11].

На рис. 2а представлена относительная смертность по европейским странам с гаплогруппами R1b, R1a и N от начала пандемии и до настоящего времени (2020–2022 гг.). Пиковые значения относительной смертности в странах с гаплогруппой R1b многократно превышали эти значения в странах с R1a и N (до начала всеобщей вакцинации). Соотношение заболеваемости в гаплогруппах R1b : R1a : N в первую и вторую волны коронавируса (до начала всеобщей вакцинации в декабре 2020 г.) составляло примерно 7 : 2 : 1 и практически не зависело от строгости карантинных мер и уровня медицинского обслуживания населения [11].

Итак, пандемия Covid-19 наиболее серьезна в странах с доминирующей гаплогруппой R1b. В первые две волны коронавируса разница в относительной смертности между странами с гаплогруппой R1b и R1a различалась в пять-семь раз (значения 16–30 в Португалии, Бельгии, Великобритании, Италии, Испании, Франции, Швейцарии против значений 3–6 в России, Иране, Индии) [11].

Выраженные геногеографические различия в динамике заболеваемости и смертности от Covid-

19 могут быть обусловлены эволюционными процессами адаптации различных этнических групп к коронавирусу в различных регионах земного шара. В работе [12] рассматриваются генетические мутации в легких, кишечнике и сосудах, приобретенные населением Азии после постоянного контакта с коронавирусами во время пандемий от 20 до 5 тыс. лет назад. В работе [13] показано, что лейкоцитарные антигены носителей гаплогруппы R1a более эффективно предотвращают репликацию коронавируса, чем антигены гаплогруппы R1b. Это может быть связано с тем, что гаплогруппа R1b первой ушла из Азиатского региона более 20 тыс. лет назад, и не успела приобрести эволюционные мутации, найденные в работе [12].

ПАНДЕМИЯ SARS-Cov-2. ГЕНОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛОКДАУНОВ

По данным ВОЗ, попытки контролировать распространение пандемии Covid-19 с помощью локдаунов оказались крайне неэффективными (менее 1% в первую волну). Непосредственное сравнение развития локальных эпидемий в странах, вводивших локдаун, и в странах без локдауна показывает идентичность динамики заболеваемости и смертности при условии схожести генетического состава населения. На рис. 3 представлена относительная смертность в Швеции (основные гаплогруппы I1+R1b+R1a) и Германии (основные гаплогруппы R1b+ I1 +R1a), порядок гаплогрупп приведен в соответствии с убыванием удельного веса гаплогрупп в составе населения. Вертикальной линией выделен пик относительной смертности в начале 2021 г. со значением 12–14 для обеих стран. Нужно отметить, что страны

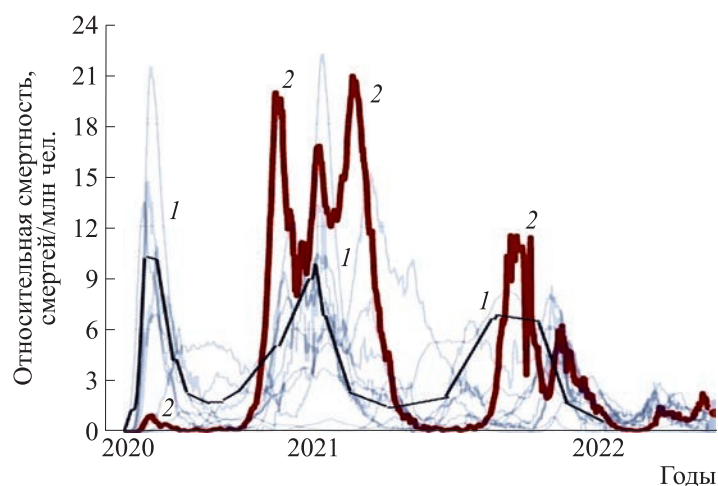


Рис. 4. Динамика относительной смертности в Чехии (кривая 2) и усредненная кривая динамики смертности для стран со смешанным населением гаплогрупп R1a и R1b (кривая 1).

не являются соседями, при этом Германия вводила локдаун дважды, Швеция не вводила локдаунов. Но эти страны очень близки по генетическому составу населения. В результате динамика относительной смертности в Швеции и Германии оказалась практически идентичной после первой волны коронавируса. Более того, она в два-четыре раза ниже, чем у ближайших соседей Германии (Франции, Бельгии, и Италии).

Сравним динамику смертности в европейских странах с доминантной гаплогруппой R1b (рис. 2а) и в Швеции со смешанным населением (рис. 3). Относительная смертность в Швеции (гаплогруппы I1+R1b+R1a) без введения локдауна даже в первую волну Covid-19 оказалось меньше в полтора-два раза, чем в странах с доминантной гаплогруппой R1b (Италия, Великобритания, Франция, Бельгия, Португалия, Испания).

Эти факты подтверждают вывод о существенной исторической роли генетического разнообразия жертв коронавируса в динамике пандемии, происходящей в глобальном минимуме солнечной активности.

ПАНДЕМИЯ SARS-CoV-2. АВТОВОЛНЫ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ И СМЕРТНОСТИ КАК ПРИМЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ «ХИЩНИК—ЖЕРТВА»

Еще одним классическим эффектом взаимодействия в системе «хищник—жертва» является возникновение усиленных автоколебательных волн (вместо волн затухания) при введении ограничений перемещения жертв (при не слишком большой территории проживания жертв). Во время пандемии коронавируса этот эффект проявился в небольших странах, которые смогли полностью предотвратить проникновение коронавиру-

са на свою территорию в первую волну благодаря жестким локдаунам. В результате во вторую и последующие волны пандемии, вместо острого короткого всплеска заболеваемости и смертности наблюдались наложенные друг на друга длительные самоподдерживающиеся осцилляции. При этом их высота примерно в два раза превышала уровень смертности в странах с родственным генетическим составом.

Примером того, как жесткий карантин и небольшая территория порождают автоколебательные волны заболеваемости и смертности вместо волн затухания, являются Грузия, Израиль, Португалия. Автоволны увеличенной продолжительности и высоты наблюдаются также для Чехии. На рис. 4 приведена динамика реальной относительной смертности в Чехии с смешанным населением гаплогрупп R1a и R1b за 2020–2022 годы (кривая 2) и усредненная условная кривая динамики смертности, характерная для стран со смешанным населением гаплогрупп R1a и R1b (кривая 1).

Реальная величина относительной смертности для Чехии составила 18–23 против ожидаемых значений 6–12 для идентичного по генетическому составу населения других стран.

Из рис. 3 можно сделать приблизительную оценку излишних людских потерь. Чехия и Грузия с жестким локдауном потеряли примерно в три раза больше населения в течение локальных эпидемий коронавируса в течение 2020–2022 гг., чем страны аналогичного генетического состава. В результате Грузия, Чехия и Словакия вошли в первую десятку стран мира по количеству умерших от коронавируса и коронавирусных осложнений на 1 миллион населения.

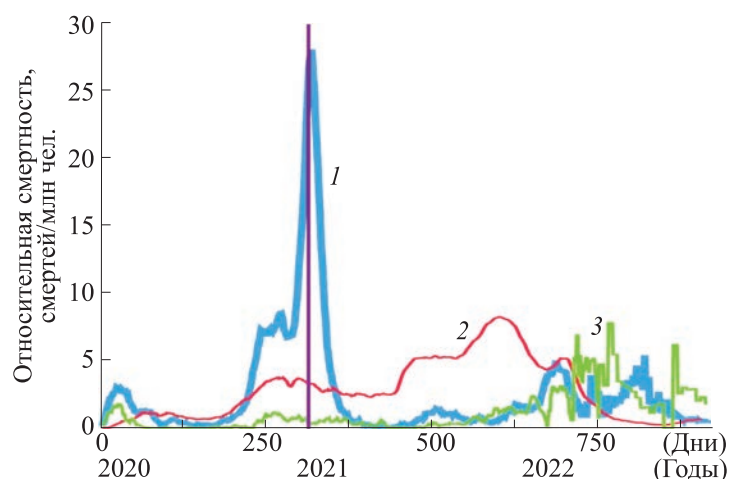


Рис. 5. Относительная смертность в Португалии (R1b), России (гаплогруппа R1a + N) и Финляндии (гаплогруппа N) в 2020–2022 гг.: кривая 1 – Португалия, кривая 2 – Россия, кривая 3 – Финляндия. Вертикальной чертой выделен anomalно высокий пик смертности в Португалии.

Таким образом, социальное регулирование в виде введения жестких локдаунов оказалось не самым эффективным способом борьбы с распространением заболевания и минимизацией жертв. Более того, в небольших странах с жестким локдауном наблюдалось возникновение автоколебательных волн заболеваемости и смертности. Предотвращение проникновения коронавируса на территорию страны в первую волну пандемии обернулось увеличением высоты и продолжительности последующих волн коронавируса, с возможным увеличением совокупных потерь среди населения до двух-четырех раз.

ВАКЦИНАЦИЯ. ГЕНОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Генетические и популяционные особенности населения существенно сказались и на успешности массовой вакцинации от коронавируса. На рис. 2а вертикальной чертой выделен уровень смертности в Великобритании, Бельгии, Финляндии и России в середине 2022 г.. Основным фактором, повлиявшим на динамику заболеваемости и смертности в различных странах, безусловно, является приобретение человечеством коллективного иммунитета к заболеванию, путем массовой вакцинации и увеличением числа успешно переболевших граждан.

Видно, что вакцинация положительно сказалась на динамике относительной смертности населения большинства европейских стран, значительно уменьшив ее в третью и последующие волны для территорий с доминантной гаплогруппой R1b (до пяти-восьми раз). Однако относительная смертность для регионов с преобладанием населения гаплогруппы N (Финляндия, северные

районы России) возросла в два-четыре раза (рис. 2а и 5). На рис. 5 представлены данные по относительной смертности за 2020–2022 гг. в еще одной стране с доминантной гаплогруппой R1b – Португалии. Они интересны тем, что соединили в себе оба рассматриваемых в предыдущих параграфах процесса. Страна продемонстрировала anomalно высокую относительную смертность в 2021 г. (даже для своей гаплогруппы R1b), причем уже после успешного подавления первой волны коронавируса в 2020 г. путем жесткого локдауна.

После массовой вакцинации к середине 2021 г. относительная смертность в Португалии упала более чем в десять раз. Однако к началу 2022 г. опять наметился подъем до значений, характерных для родственной гаплогруппы R1a в начале пандемии до вакцинации. При этом уровень вакцинации населения и в Финляндии, и в большинстве европейских стран, и в рассматриваемых Португалии, Бельгии и Великобритании практически совпадают (и составляют более 80%). Однако если в Великобритании уровень смертности к концу 2021 г. упал почти в восемь раз, то в Финляндии он, наоборот, вырос. При этом вакцинация населения осуществлялась одними и теми же вакцинами. И наоборот, Финляндия и Россия проводили массовую вакцинацию своих граждан различными вакцинами. Страны имеют разную плотность и возрастной состав населения, но динамика смертности в обеих странах совпадает, и имеет тенденцию к двукратному увеличению относительной смертности к 2022 г. по сравнению с 2020 г. Единственный совпадающий фактор: обе эти страны имеют в составе населения гаплогруппу N. Этот факт еще раз подтверждает вывод о существенной роли генетического состава населения для достижения коллективного иммунитета и

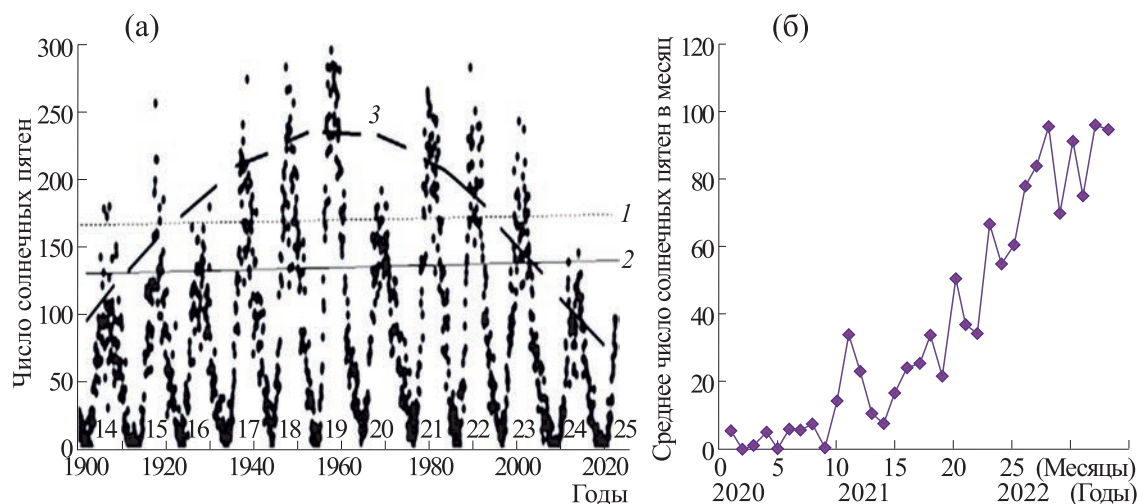


Рис. 6. (а) — Число солнечных пятен. Цифрами обозначены условные кривые: 1 — высокие циклы солнечной активности с развитием пандемий в максимуме 11-летнего цикла; 2 — низкие циклы солнечной активности с развитием пандемий и в максимуме, и в минимуме 11-летнего цикла; 3 — квазистолетний цикл солнечной активности. (б) — Среднее число солнечных пятен по месяцам в 2020–2022 гг., развитие 25-го цикла солнечной активности.

успешности массовой вакцинации. Вакцинация также сместила контингент заболевших с активно вакцинированного возрастного населения на невакцинированный контингент более младшего возраста и детей.

В объяснении нуждается и еще один момент: к середине 2022 г. относительная смертность в европейских странах с гаплогруппой R1b опять выросла (рис. 2а и 5). Ее уровень поднялся до значений, характерных для гаплогрупп R1a и R1a+N до начала массовой вакцинации. Разброс в относительной смертности выровнялся на уровне разницы в два-три раза в различных странах к концу 2022 года (вместо первоначальных десяти-пятнадцати раз в апреле 2020 г.). Одним из факторов, способствующих такому «выравниванию», могла оказаться солнечная активность.

ПАНДЕМИЯ SARS-Cov-2 И СОЛНЕЧНАЯ АКТИВНОСТЬ

Солнечная активность, резко возросшая к концу 2022 г., может являться фактором возможного выравнивания относительной смертности по различным странам. Как обсуждалось выше, при значениях чисел Вольфа выше 150 пандемии в основном развиваются в максимумах 11-летнего цикла, а в циклах солнечной активности со значениями ниже 120 пандемии могут начаться как в максимуме, так и в минимуме цикла. На рис. 6а представлен последний квазивековой цикл солнечной активности с 1900 г. Горизонтальными линиями отмечены значения чисел Вольфа, критические для смены режима возникновения пандемий. Как видно из рис. 6, начало пандемии SARS-Cov-2 пришлось на глубокий минимум

солнечной активности, когда совпали минимумы и квазистолетнего цикла, и 11-летнего цикла. В этих условиях основная биоэффективная регуляторная роль принадлежит галактическим космическим лучам и процессам взаимодействия этих лучей с атмосферой Земли. Однако к концу 2021 г. солнечная активность возросла более чем в десять раз (рис. 6а), и существенное воздействие на биосферу начали оказывать солнечные вспышки. Этот фактор тоже мог оказать некоторое влияние на эффективность вакцин, разработанных и протестированных в условиях низкого уровня солнечной активности. С ростом солнечной активности для стран с доминантной гаплогруппой R1b эффективность массовой вакцинации снижается в два-три раза. В настоящее время относительная смертность в странах с доминантной гаплогруппой R1b (например, в Великобритании и Бельгии) приближается к значениям смертности в странах с доминантными гаплогруппами (N, R1a и N+R1a) в первую-вторую волны коронавируса.

Рассмотренные процессы геногеографических различий локальных эпидемий, массовая вакцинация населения и смена глобального биотропного фактора внешней среды к 2022 г. привели к выравниванию соотношения относительной смертности в различных гаплогруппах до стандартного коэффициента около двух, характерного для обычного гриппа.

Таким образом, факторы космической погоды в основном влияют на динамику размножения и мутаций хищников (вирусов), а успех медицины в борьбе с болезнями проявляется в дополнительном контролирующем факторе числа жертв. Ак-

тивное медицинское вмешательство является безусловным благом для отдельных людей. Однако на уровне человечества как вида такое вмешательство искусственно снижает естественную конкуренцию среди жертв, и ускоряет эволюцию вируса. Так, вирус SARS-Cov-2 в течение 2020–2022 г., в ходе борьбы с массовой вакцинацией, набрал количество мутаций, сравнимое с его естественной эволюцией за 5 тыс. лет. В ближайшие два года предполагается усиление солнечной активности и достижение максимума 11-летнего цикла солнечной активности. Однако в долгосрочной перспективе общая солнечная активность скорее всего останется низкой еще несколько циклов, возможно вплоть до 2050–2060 гг. [11]. В этих условиях возможно возникновение пандемий каждые пять–шесть лет, в максимуме и в минимуме 11-летнего цикла солнечной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Начало пандемии SARS-Cov-2 пришлось на глобальный минимум солнечной активности, когда совпали и минимум квазистолетнего цикла солнечной активности, и минимум 11-летнего цикла. Как показала статистика заболеваемости и смертности от коронавируса 2020–2022 гг., развитие пандемии в этих условиях внешней среды сильно зависит от генетического состава населения. Уровень заболеваемости, смертности и эффективности вакцинации в пандемии Covid-19 в основном определяется не медицинскими или карантинными мерами, а доминирующей гаплогруппой населения конкретной страны. В 2020–2022 гг. регистрируется совпадение динамики заболеваемости и смертности в странах с близким генетическим составом. Заболеваемость и смертность населения на территориях со схожим генетическим составом практически совпадает, причем вне зависимости от введения или отсутствия локдауна в стране (например, идентична в Германии с локдауном и в Швеции — без локдауна). Пандемия Covid-19 оказалась наиболее тяжелой в странах с доминирующей гаплогруппой R1b. В первые две волны коронавируса разница в относительной смертности между странами с гаплогруппой R1b и R1a различалась в пять–семь раз (значения 16–30 в Португалии, Бельгии, Великобритании, Италии, Испании, Франции, Швейцарии против значений 3–6 в России, Иране, Индии). Возможно, что геногеографические особенности локальных эпидемий Covid-19 зависят от эволюционных мутаций в лейкоцитарных антигенах различных гаплогрупп, а также от частоты встреч каждой из гаплогрупп с коронавирусами в глубоком историческом прошлом.

Социальное регулирование в виде локдаунов оказалось не самым эффективным способом

борьбы с распространением заболевания и минимизацией жертв. Более того, в небольших странах с «жестким» локдауном наблюдалось возникновение автоколебательных волн. Строгие локдауны активируют негативные последствия для человеческой популяции в системе «коронавирус — человечество» (система «хищник — жертва»), с увеличением совокупных дополнительных потерь населения до трех–четырех раз. К 2022 г. вместо ожидаемых затухающих волн сформировались устойчивые автоколебательные волны заболеваемости и смертности от Covid-19. Особенно ярко эта тенденция проявилась в странах с ограниченным размером территории и жестким локдауном в первую волну коронавируса (Португалия, Чехия, Грузия, Израиль). При этом последующие волны коронавируса были примерно в 3 раза дольше, а смертность — в два раза выше, чем в странах с генетически родственным населением в условиях мягкого локдауна.

Успешность вакцинации в каждой стране также зависит от доминантной гаплогруппы населения. Для стран с гаплогруппой R1b всеобщая вакцинация оказалась очень эффективной, она понизила уровень относительной смертности в пять–восемь раз в течение года после начала. Однако для стран с гаплогруппой N и R1a + N к середине 2022 г. относительная смертность возросла в два–четыре раза по сравнению с 2020 г. К сожалению, эффект от вакцинации в странах с гаплогруппой R1b также снизился к середине 2022 г. Возможно, это связано, в том числе, и с ростом солнечной активности в процессе развития 25-го цикла. Влияние этих разнонаправленных процессов на пандемию коронавируса в максимуме 25-го цикла солнечной активности требует дальнейшего изучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Ragulskaia, J. Nov. Physiother. Phys. Rehabil., 7 (1), 031 (2020).
2. D. Atri and A. Melot, Astroparticle Physics, 53, 186 (2012).
3. V. Obridko, M. Ragulskaia, and E. Khramova, J. Atmospher. Solar-Terrestr. Physics, 208, 105395 (2020).

4. N. Belisheva, H. Lammer, H. Biernat, and E. Vashenuyk, *Trans. Astrophys. Space Sci.*, 8, 7 (2012).
5. M. V. Ragulskaya, V. N. Obridko, and E. G. Khramova, *Biophysics*, 65 (4), 686 (2020).
6. V. Obridko and Yu. Nagovitsyn, *Solar activity, cyclicity and forecasting methods* (VVM, Saint-Petersburg, 2017).
7. M. M. Katsova, B. A. Nizamov, A. A. Shlyapnikov, *Geomagnetism and Aeronomy*, 62 (7), 903 (2022).
8. M. Güdel, *Living Rev. Solar Phys.*, 4 (3), 137 (2007).
9. E. Gromozova, et al., *Sun and Geosphere*, 7 (2), 117 (2012).
10. M. H. Nasirpour, A. Sharifi, M. Ahmadi, and S. J. Ghouschi, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 28, 38074 (2021).
11. M. Ragulskaya, *Open Astronomy*, 30 (1), 149 (2021).
12. A. Nguyen, et al., *J. Virol.* 94 (13), e00510 (2020).
13. Y. Souilmi, et al., *Curr. Biol.*, 31 (16), 3504 (2021).
14. V. Ishkov, *Space Research*, 55 (6), 391 (2017).

SARS-CoV-2 Pandemic as a “Predator–Prey” Model: Biophysical, Social and Heliophysical Factors of the Spread of Local Epidemics

M.V. Ragulskaya

Pushkov Institute of Terrestrial Magnetism, Ionosphere and Radio Wave Propagation, Russian Academy of Sciences, Kaluzskoe shosse 4, Troitsk, Moscow, 108840 Russia

This paper considers the peculiarities of the spread of the coronavirus pandemic in different countries within a “predator–prey” model under the influence of external modulation of solar activity. This paper presents a discussion focusing on the genetic composition of the population that turned out to be the main factor in differentiation of the dynamics underlying local transmissions of SARS-CoV-2 spreading under the influence of the global minimum of solar activity. In countries where relative mortality due to coronavirus is the highest, there is a tendency of dominance of haplogroup R1b among the population. It was shown that the dynamics of morbidity and mortality in countries the populations of which are genetically similar, irrespective of the introduction or absence of COVID-19 lockdowns on their areas, are the same. As the first wave of the pandemic progressed, the emergence of self-oscillatory waves in small countries with a hard lockdown was revealed leading to a significant increase in the number of victims in subsequent waves. This paper discusses the results of universal vaccination in countries with haplogroup R1b after which the level of relative mortality lowered by 5–8 times. However, in countries with haplogroup N and R1a + N, by mid-2022, relative mortality increased by 2–4 times compared to 2020.

Keywords: SARS-CoV-2 pandemic, coronavirus disease, solar activity, “predator–prey” model, genetic composition of the population, self-oscillatory waves of mortality

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕЖКАНАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММАХ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С ДЕПРЕССИЕЙ МЕТОДОМ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ОТНОШЕНИЙ

© 2023 г. М.Е. Соболев*, #, А.Л. Горелик**, ***, О.Л. Власова*

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

**Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева,
ул. Бехтерева, 3, Санкт-Петербург, 192019, Россия

***Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
просп. Тореза, 44, Санкт-Петербург, 194223, Россия

#E-mail: m.e.sobolev@mail.ru

Поступила в редакцию 17.12.2022 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 07.06.2023 г.

К клиническому материалу, полученному в ходе исследования больных с депрессией, применен подход, основанный на проведении анализа взаимосвязей каналов электроэнцефалограмм с использованием корреляционных отношений, способных объективно оценивать свойства связей при любых их моделях (линейных и нелинейных). На основе построенных матриц корреляционных отношений показана возможность анализа парных связей с определением различающихся для нормы и патологии параметров. Установлена также направленность связей между отведениями. Наиболее значимыми отличиями, на наш взгляд, являются отличия в межполушарных затылочных взаимодействиях. Данный подход может стать основой для определения уникальных количественных маркеров как депрессивных состояний, так и других нервно-психических расстройств.

Ключевые слова: количественная электроэнцефалография, межканальные взаимодействия, депрессия, коэффициенты когерентности, корреляционные отношения.

DOI: 10.31857/S0006302923040208, EDN: KOCXFAQ

Метод электроэнцефалографии (ЭЭГ) позволяет анализировать функциональное состояние головного мозга в реальном времени. В настоящее время очень актуальной становится проблема объективизации результатов ЭЭГ и поиска новых форм интерпретации данных, позволяющих раскрыть их физиологическую сущность. Все чаще для нахождения различных количественных диагностических критериев исследователи применяют новые математические методы обработки массива данных и современные программные пакеты. Предпринимаются попытки связать количественные характеристики, отражающие различные показатели в заданных областях головного мозга, с конкретными заболеваниями для определения количественных маркеров социально значимых нервно-психических расстройств. Одним из таких заболеваний является депрессия.

Депрессия — психическое расстройство, являющееся одной из ведущих причин нетрудоспособности и смертности в мире [1]. Проявления этого заболевания включают (код F32 по МКБ-10) снижение настроения, упадок сил, психомоторную заторможенность, тревожность, суицидальные мысли, снижение концентрации внимания и половой мотивации, нарушение сна и аппетита [2]. Депрессия — многофакторное психическое расстройство, обусловленное широким спектром психологических, социальных, нейрохимических и наследственных факторов и их взаимодействием [3].

Нейрофизиологический подход, используемый при изучении депрессии, предполагает важную роль выявления первичных нарушений в структурах головного мозга, участвующих в регуляции эмоциональных процессов и мотивации. Однако данные о таких нейрофизиологических маркерах на сегодняшний день немногочислен-

Сокращение: ЭЭГ — электроэнцефалография.

ны в связи со значительной клинической и этиологической гетерогенностью этого заболевания, а также с недостаточной изученностью вопросов его патогенеза.

В мировой литературе имеются описания изменений в головном мозге у пациентов с депрессией при сравнении со здоровыми испытуемыми, обнаруженные различными методами. Функциональные, структурные и патологоанатомические исследования свидетельствуют об уменьшении объема субгенуальной части поясной извилины [4], уменьшении объемов орбитофронтальной и префронтальной коры, гиппокампа, скорлупы и хвостатого ядра [5]. Отмечается увеличение количества нейронов, продуцирующих кортикотропин-рилизинг-гормон, возрастание концентрации которого приводит к усилению токсического поражения моноаминергических нейронов, снижая их количество при депрессивных состояниях [6]. При депрессии были также обнаружены укорочения дендритов нервных клеток, снижения числа шипиков и синапсов. Кроме того, сообщается о гибели части нейронов и глиальных клеток в коре и лимбических структурах [7].

Данные нейровизуализации продемонстрировали аномально повышенную связность и повышенную активацию миндалины у пациентов с большим депрессивным расстройством [8]. Однако также сообщалось о сниженной связности [9] и аномальной субрегиональной функциональной связности миндалевидного тела в состоянии покоя [10]. Авторы другой работы высказали предположение [11], что неспособность левой дорсолатеральной префронтальной коры вызывать активацию структур левой височной доли является решающим фактором в склонности к депрессивным мыслям. Помимо этого, сообщалось [11] о различиях между исследуемыми группами испытуемых в левой височной коре, передней части поясной извилины и левой дорсолатеральной префронтальной коре — структурах, которые ответственны за управление эмоциями.

Кроме того, у депрессивных больных сообщается об изменениях, обнаруженных с помощью ЭЭГ. По мнению большинства специалистов, в области ЭЭГ убедительных специфических показателей депрессии при визуальном анализе ЭЭГ не существует. Также считается, что серьезного прогресса в этом направлении можно ожидать от исследований в области количественной ЭЭГ, в частности — вопросов пространственной организации ЭЭГ-сигналов. Для изучения пространственной организации ЭЭГ в основном применяются коэффициенты кросс-корреляции и коэффициенты когерентности. Коэффициенты когерентности изменяются от 0 (отсутствие связи) до 1 (полная согласованность активности) и отражают количественную меру сходства био-

электрической активности разных областей коры головного мозга. Они вычисляются как коэффициенты корреляции значений спектральной мощности определенных частотных диапазонов ЭЭГ в любых парах ЭЭГ-отведений [12]. Согласно рекомендациям М.Н. Ливанова [13], коэффициенты когерентности меньше 0.5 принято называть «слабыми», от 0.5 до 0.7 — «средними», больше 0.7 — «сильными».

Обобщенные данные по коэффициентам когерентности представлены в табл. 1. Данная таблица состоит из четырех столбцов: диапазон частот ЭЭГ; отличие коэффициентов когерентности у испытуемых с депрессией от здоровых испытуемых; ссылки на статьи, где такие отличия упоминаются; комментарии к ссылкам. В столбце «Комментарии» подробнее указано, о какой когерентности идет речь (внутриполушарной или межполушарной) и между какими отведениями были обнаружены отличия. Указанные отличия и сравнение их с полученными в данной научной работе результатами подробнее представлены в разделе «Обсуждение» настоящей статьи. Как видно из обзора литературных источников и табл. 1, имеются достаточно разнородные данные, демонстрирующие отличия между здоровыми испытуемыми и пациентами с депрессией.

Дальнейшее развитие количественного анализа и обработки электроэнцефалограмм становится возможным только с помощью применения соответствующих математических подходов и методов, так как возможности визуального анализа ЭЭГ практически исчерпаны. Для исследования электроэнцефалограмм существуют различные методы количественного анализа: коэффициенты кросс-корреляции, коэффициенты когерентности, метод вызванных потенциалов и многие другие.

В настоящей статье для обработки данных ЭЭГ у здоровых испытуемых и пациентов с депрессией используется метод корреляционных отношений. Он основан на предположении о нелинейности связи между различными участками головного мозга. Ранее для изучения межканальных взаимодействий использовался преимущественно линейный подход (линейная математическая функция). Но такой подход может не всегда верно интерпретировать сверхсложные биоэлектрические процессы головного мозга или упустить какое-то взаимодействие, которое можно обнаружить только с помощью нелинейного подхода (нелинейная математическая зависимость).

Целью настоящей работы является определение диагностически значимых количественных отличий в межканальных взаимодействиях различных функционально значимых участков головного мозга у здоровых испытуемых и у паци-

Таблица 1. Обобщенная информация об отличиях коэффициентов когерентности между здоровыми испытуемыми и пациентами с депрессией (пояснения в тексте)

Диапазон частот	Отличие от «Нормы»	Ссылки	Комментарии
Дельта	Уменьшение	[22, 23, 33, 35, 39, 40]	[22] – межполушарная в лобных отведениях, [23] – межполушарная, [33] – межполушарная, [35] – межполушарная в лобных отведениях, [39] – внутриполушарная по всей коре при открытых глазах, [40] – внутриполушарная во время сна
	Увеличение	[22]	[22] – межполушарная и внутриполушарная в задних отделах коры
Тета	Уменьшение	[22, 23, 24, 28, 33, 40]	[22] – межполушарная в лобных отведениях, [23] – межполушарная, [28] – внутриполушарная височная, [33] – межполушарная, [40] – межполушарная во время сна
	Увеличение	[22, 25, 28, 35]	[22] – межполушарная и внутриполушарная в задних отделах коры, [28] – межполушарная, [35] – межполушарная в задних отделах коры
Альфа	Уменьшение	[23, 26, 27, 28, 33, 34]	[23] – межполушарная, [28] – межполушарная и внутриполушарная, [33] – межполушарная, [34] – височно-теменные отведения
	Увеличение	[24, 34]	[24] – внутриполушарная, [34] – лобно-височные отведения
Бета	Уменьшение	[23, 28, 33, 35, 40]	[23] – межполушарная, [28] – внутриполушарная задневисочные отведения, [33] – межполушарная, [35] – межполушарная и внутриполушарная в лобных отведениях, [40] – межполушарная и внутриполушарная во время сна
	Увеличение	[24, 25, 26, 27]	[24] – внутриполушарная

ентов с депрессией с помощью обработки данных ЭЭГ по методу корреляционных отношений, а также определение по методу корреляционных отношений направленности связи между отведениями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При патологиях головного мозга в мировой литературе описаны нарушения амплитудно-частотных соотношений в ЭЭГ [14–16]. Для развития этой идеи авторами данной статьи была разработана физико-математическая модель, адекватно описывающая амплитудно-частотные

характеристики электроэнцефалограмм человека [17], которая позволяет количественно сравнивать различные психоневрологические расстройства.

Р.И. Ивановский и М.А. Новожилов предложили метод корреляционных отношений и разработали программу, размещенную на портале [18] в разделе «Математика в приложениях», которая применялась для исследований в настоящей статье. Данная программа вычисляет матрицу корреляционных отношений (матрица **R**) для диапазонов частот: дельта (0.5–4.0 Гц), тета (4–8 Гц), альфа (8–13 Гц) и бета (13–30 Гц).

При вычислении корреляционного отношения используется результат решения задачи регрессии методом наименьших квадратов. Ниже приведем предложенную методику вычисления корреляционных отношений, подробно описанную в [19].

Пусть запись электроэнцефалограммы ведется с m отведений электроэнцефалограммы в течение некоторого времени, значит за это время будет получено n значений для каждого канала, которые можно представить в виде матрицы $\mathbf{F}$ размерностью $(n \times m)$. Для вычисления связи между двумя каналами (данные по которым находятся в двух соответствующих столбцах матрицы $\mathbf{F}$, один из столбцов содержит данные отклика y_i , другой — фактора x_i , где индекс i — номер строки в матрице $\mathbf{F}$) получают уравнение $\mathbf{Y} = \mathbf{A} \times \boldsymbol{\beta}$, где $\mathbf{Y}$ — вектор откликов размерностью $(n \times 1)$, вспомогательная матрица $\mathbf{A}$ размерностью $(n \times 3)$ и $\boldsymbol{\beta}$ — вектор искомых коэффициентов [19].

Далее в процессе решения задачи регрессии вычисляются: вектор оценок искомых коэффициентов $\boldsymbol{\beta}_0$, вектор $\mathbf{Y}_0$ оценок откликов, остаточная сумма квадратов ε и остаточная дисперсия d :

$$\boldsymbol{\beta}_0 = (\mathbf{A}^T \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^T \mathbf{Y},$$

$$\mathbf{Y}_0 = \mathbf{A} \times \boldsymbol{\beta}_0,$$

$$\mathbf{e} = \mathbf{Y} - \mathbf{Y}_0,$$

$$\varepsilon = \mathbf{e}^T \mathbf{e},$$

$$d = \varepsilon/n,$$

$$R^2 = 1 - d/\sigma^2, 0 \leq R \leq 1,$$

где $\mathbf{T}$ — операция транспонирования, σ — выборочная дисперсия откликов.

При использовании данного алгоритма когда величины ε и d будут достигать своих минимальных значений, будет получено наилучшее решение задачи регрессии. Кроме того, учитывая зависимость R от d , следует, что наилучшее решение будет при максимальном значении R [19].

Метод корреляционных отношений позволяет количественно оценить межканальное взаимодействие различных участков головного мозга и выявить направленность связи между отведениями. Несомненное преимущество корреляционных отношений перед аналогичными другими методами в том, что данный метод использует в своих расчетах нелинейную (квадратичную) связь между сигналами ЭЭГ [19], в отличие от линейного подхода, используемого к примеру, в коэффициентах когерентности. Корреляционные отношения способны объективно охарактеризовать уровни связи при произвольных их моделях: линейных (линейная математическая функция) или нелинейных (нелинейная математическая функция) [19]. Помимо этого, метод корреляционных

отношений может также служить индикатором отличия модели связи от линейной [19].

Тем самым, используя матрицу $\mathbf{R}$, можно не только вычислить, как связаны изучаемые области головного мозга, но и какая из них оказывает влияние на другую, иными словами, какая из них является фактором, а какая откликом. Выявление отведения-фактора и отведения-отклика проводится путем выбора наибольшего значения из соответствующих ячеек матрицы $\mathbf{R}$. Помимо этого, с помощью матрицы корреляционных отношений можно исследовать не только парные (между двумя отведениями), но и множественные связи [19]. Физиологическое значение метода корреляционных отношений состоит в расширении отображения интрацентральных взаимодействий, а также включении тех, которые не могли быть учтены методом когерентности.

Записи электроэнцефалограмм испытуемых были зарегистрированы с соблюдением всех необходимых этических стандартов и представлены сотрудниками Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева (Санкт-Петербург). ЭЭГ записывали на электроэнцефалографе «Телепат 104» (ООО «Потенциал», Санкт-Петербург, Россия). Электроды располагали в соответствии с международной системой 10-20 [20]. Частота дискретизации электроэнцефалографа составляла 250 Гц. Использовали шлем из силиконовых тяжей и мостиковые хлорсеребряные неполяризующиеся электроды.

Данное исследование является пилотным. По этой причине для определения принципиальной возможности использования предлагаемого подхода в условиях широкой классификации больных депрессией были выбраны две достаточно «обобщенные» группы. Группа «Норма» состояла из 21 условно здоровых испытуемых в возрасте от 18 до 63 лет — 14 женщин и 7 мужчин. Группа «Депрессия» включала 9 пациентов с депрессией, диагностированной врачом психиатром, в возрасте от 23 до 70 лет — 5 женщин и 4 мужчин. Для исследования были отобраны пациенты с первичными депрессивными эпизодами, без сопутствующих тревожных, либо психотических, проявлений, а также без коморбидных сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. Все получали амбулаторное лечение по типу монотерапии (один из трех перечисленных далее препаратов): амитриптилин, прозак, золофт, чтобы медикаментозное влияние на характер ЭЭГ было минимальным. От каждого из испытуемых было получено согласие на обработку персональных данных.

Записи ЭЭГ исследовались в усредненном монтаже по 16 отведениям или каналам (Fp1, Fp2, F3, F4, C3, C4, P3, P4, O1, O2, F7, F8, T3, T4, T5, T6). Фильтр высоких частот был выставлен на

NORMA Alpha																
	Fp1	Fp2	F3	F4	C3	C4	P3	P4	O1	O2	F7	F8	T3	T4	T5	T6
Fp1	1	0,830	0,843	0,675	0,357	0,354	0,547	0,626	0,697	0,736	0,693	0,575	0,352	0,304	0,342	0,426
Fp2	0,831	1	0,678	0,817	0,324	0,380	0,643	0,508	0,744	0,663	0,468	0,751	0,360	0,384	0,465	0,282
F3	0,843	0,677	1	0,641	0,548	0,366	0,443	0,557	0,616	0,723	0,621	0,423	0,395	0,309	0,292	0,542
F4	0,677	0,817	0,641	1	0,325	0,573	0,537	0,378	0,761	0,610	0,334	0,626	0,368	0,384	0,554	0,268
C3	0,361	0,330	0,550	0,323	1	0,368	0,540	0,296	0,300	0,426	0,299	0,396	0,419	0,461	0,285	0,619
C4	0,358	0,376	0,375	0,575	0,367	1	0,286	0,550	0,437	0,388	0,378	0,327	0,455	0,383	0,600	0,238
P3	0,548	0,643	0,445	0,536	0,541	0,283	1	0,410	0,713	0,411	0,451	0,760	0,295	0,648	0,429	0,384
P4	0,629	0,508	0,560	0,380	0,291	0,551	0,412	1	0,350	0,689	0,729	0,448	0,621	0,300	0,386	0,450
O1	0,697	0,743	0,614	0,760	0,303	0,434	0,714	0,350	1	0,634	0,486	0,702	0,268	0,554	0,476	0,244
O2	0,736	0,662	0,723	0,611	0,422	0,388	0,412	0,692	0,635	1	0,652	0,509	0,503	0,322	0,305	0,473
F7	0,693	0,465	0,621	0,332	0,294	0,383	0,450	0,728	0,486	0,652	1	0,384	0,687	0,264	0,404	0,439
F8	0,580	0,752	0,426	0,627	0,392	0,326	0,761	0,449	0,703	0,516	0,394	1	0,352	0,685	0,472	0,306
T3	0,364	0,366	0,405	0,373	0,414	0,458	0,300	0,626	0,268	0,508	0,691	0,355	1	0,380	0,687	0,506
T4	0,300	0,387	0,306	0,385	0,460	0,382	0,648	0,299	0,555	0,317	0,261	0,687	0,383	1	0,483	0,596
T5	0,350	0,473	0,299	0,556	0,291	0,601	0,439	0,387	0,480	0,307	0,409	0,473	0,684	0,484	1	0,364
T6	0,423	0,284	0,540	0,271	0,618	0,236	0,386	0,444	0,250	0,473	0,436	0,305	0,506	0,602	0,364	1

Рис. 1. Корреляционные отношения (R) для испытуемых группы «Норма» по альфа-диапазону частот.

значение 0.5 Гц, фильтр низких частот – на 50 Гц, с режекторным фильтром на 50 Гц. Для каждого испытуемого были проанализированы две эпохи анализа фоновой записи рутинной электроэнцефалограммы с закрытыми глазами длительно-стью 15 с, не содержащие артефакты.

Для каждого испытуемого было получено 4 таблицы корреляционных отношений для диапазонов частот дельта, тета, альфа и бета, содержащих по $16 \times 16 = 256$ значений. В каждой ячейке вычисленной матрицы R содержится число от 0 до 1 показывающее связь между двумя отведениями. Для нахождения отличий во взаимодействии отдельно выбранной пары отведений между исследуемыми группами испытуемых, сначала были отобраны соответствующие ячейки в таблице корреляционных отношений. Тем самым, были получены две группы значений, отличия между которыми определялись статистическими методами. Для статистического анализа использовалась программа Graphpad Prism версии 8.4.3. Данные проверяли на равенство дисперсий с помощью теста Брауна–Форсайта и на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения данных и равенства дисперсий использовали t -критерий Стьюдента, в противном случае – критерий Манна–Уитни. Такой алгоритм применяли для всех ячеек каждого из четырех диапазонов частот по отдельности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате описанного выше алгоритма сначала были получены таблицы корреляционных отношений для всех испытуемых по каждому диапазону частот – дельта, тета, альфа, бета. Каждая такая таблица содержит $16 \times 16 = 256$ значений. Полученные усредненные данные по альфа диа-

пазону частот представлены на рис. 1 для группы «Норма» и на рис. 2 для группы «Депрессия». В этих таблицах любая строка и столбец соответствуют одному из 16 отведений, а значение в ячейке на пересечении пары отведений показывает вычисленное корреляционное отношение для этой пары, когда отведение, написанное в строке, является фактором, а написанное в столбце – откликом. По представленным данным видно, что значения корреляционных отношений при перемене мест отклика и фактора в большинстве случаев не равны, что косвенно доказывает правильность выбора нелинейного подхода.

Далее было проведено статистическое сравнение вычисленных корреляционных отношений. Среди всех исследуемых данных не были обнаружены существенные отличия между дисперсиями (стандартными отклонениями). Полученные существенные отличия представлены на рис. 3–6, где звездочками (*) и решетками (#) обозначена достоверность отличий между данными: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, для решеток (#) – аналогично. Звездочками (*) обозначены существенные отличия, определенные по t -критерию Стьюдента, а решетками (#) – по критерию Манна–Уитни. В обозначении столбцов фигурирует название исследуемой группы и два отведения, указанные через дефис. Например, обозначение «NORMA O1-O2» означает корреляционные отношения для группы «Норма» с фактором по отведению O1 и откликом по O2. Столбцы показывают среднее значение ($mean$) по указанному параметру, а «усы» – стандартное отклонение (SD).

В результате были обнаружены отличия между группами «Норма» и «Депрессия» между отведениями O1 и O2 по дельта-диапазону частот ($P < 0.01$ по t -критерию Стьюдента), между отведениями P4 и T6 по тета-диапазону частот

	DEPR Alpha															
	Fp1	Fp2	F3	F4	C3	C4	P3	P4	O1	O2	F7	F8	T3	T4	T5	T6
Fp1	1	0,687	0,796	0,421	0,357	0,213	0,375	0,623	0,479	0,660	0,654	0,305	0,282	0,313	0,273	0,598
Fp2	0,691	1	0,488	0,730	0,269	0,311	0,593	0,412	0,655	0,567	0,375	0,674	0,273	0,216	0,547	0,281
F3	0,796	0,488	1	0,407	0,636	0,244	0,267	0,576	0,385	0,673	0,558	0,165	0,347	0,477	0,194	0,711
F4	0,422	0,730	0,408	1	0,293	0,677	0,534	0,220	0,698	0,431	0,207	0,571	0,432	0,277	0,673	0,246
C3	0,354	0,266	0,634	0,287	1	0,286	0,594	0,359	0,310	0,440	0,248	0,376	0,471	0,662	0,327	0,696
C4	0,217	0,318	0,254	0,676	0,288	1	0,404	0,481	0,525	0,274	0,376	0,342	0,597	0,486	0,650	0,291
P3	0,375	0,590	0,259	0,533	0,593	0,406	1	0,190	0,707	0,280	0,354	0,667	0,459	0,638	0,675	0,388
P4	0,622	0,408	0,575	0,213	0,359	0,482	0,195	1	0,168	0,718	0,689	0,250	0,603	0,393	0,320	0,641
O1	0,479	0,651	0,383	0,698	0,311	0,528	0,707	0,176	1	0,421	0,348	0,606	0,278	0,427	0,666	0,212
O2	0,659	0,560	0,672	0,429	0,440	0,268	0,280	0,718	0,404	1	0,555	0,357	0,419	0,217	0,143	0,611
F7	0,679	0,389	0,577	0,209	0,260	0,385	0,352	0,701	0,353	0,565	1	0,208	0,491	0,381	0,239	0,553
F8	0,302	0,669	0,169	0,579	0,388	0,355	0,678	0,246	0,614	0,360	0,195	1	0,358	0,507	0,531	0,179
T3	0,289	0,271	0,358	0,430	0,471	0,597	0,456	0,604	0,277	0,417	0,474	0,346	1	0,566	0,744	0,557
T4	0,318	0,229	0,482	0,295	0,666	0,496	0,642	0,395	0,436	0,211	0,382	0,502	0,572	1	0,518	0,770
T5	0,274	0,544	0,199	0,673	0,328	0,649	0,674	0,321	0,665	0,154	0,245	0,521	0,743	0,510	1	0,336
T6	0,598	0,269	0,711	0,225	0,697	0,284	0,388	0,643	0,205	0,615	0,544	0,175	0,554	0,767	0,331	1

Рис. 2. Корреляционные отношения (R) для испытуемых группы «Депрессия» по альфа-диапазону частот.

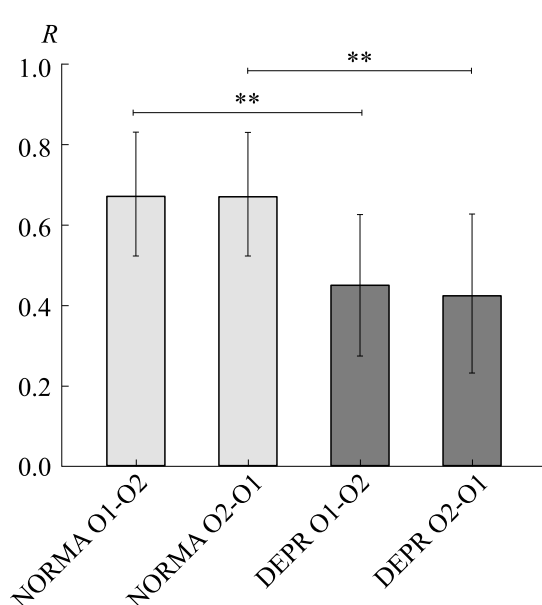


Рис. 3. Отличия между корреляционными отношениями (R) испытуемых группы «Норма» (NORMA, белый цвет) и группы «Депрессия» (DEPR, серый цвет) по дельта-диапазону частот. Показаны среднее значение и стандартное отклонение ($mean \pm SD$). «NORMA O1-O2» означает корреляционные отношения с фактором по отведению O1 и откликом по O2 для испытуемых группы «Норма».

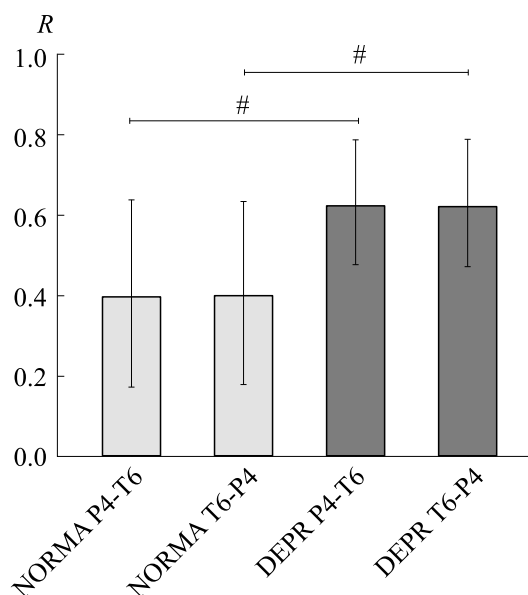


Рис. 4. Отличия между корреляционными отношениями (R) испытуемых группы «Норма» (NORMA, белый цвет) и группы «Депрессия» (DEPR, серый цвет) по тета-диапазону частот. Показаны среднее значение и стандартное отклонение ($mean \pm SD$). «NORMA P4-T6» означает корреляционные отношения с фактором по отведению P4 и откликом по T6 для испытуемых группы норма.

($P < 0.05$ по критерию Манна–Уитни), между отведениями F4 и Fp1 по альфа-диапазону частот ($P < 0.01$ по критерию Манна–Уитни), между отведениями F8 и Fp1 по альфа-диапазону частот ($P < 0.001$ по t -критерию Стьюдента), между отведениями F4 и F3 по альфа-диапазону частот ($P < 0.01$ по t -критерию Стьюдента), между отведениями F3 и O1 по альфа-диапазону частот ($P < 0.01$ по t -критерию Стьюдента), между отве-

дениями F8 и F3 по альфа-диапазону частот ($P < 0.01$ по t -критерию Стьюдента), между отведениями P3 и T5 по альфа-диапазону частот ($P < 0.01$ по t -критерию Стьюдента), между отведениями O2 и O1 по альфа-диапазону частот ($P < 0.01$ по критерию Манна–Уитни); между отведениями T3 и F4 по бета-диапазону частот ($P < 0.001$ по t -критерию Стьюдента), между отведениями T5 и P3 по бета-диапазону частот

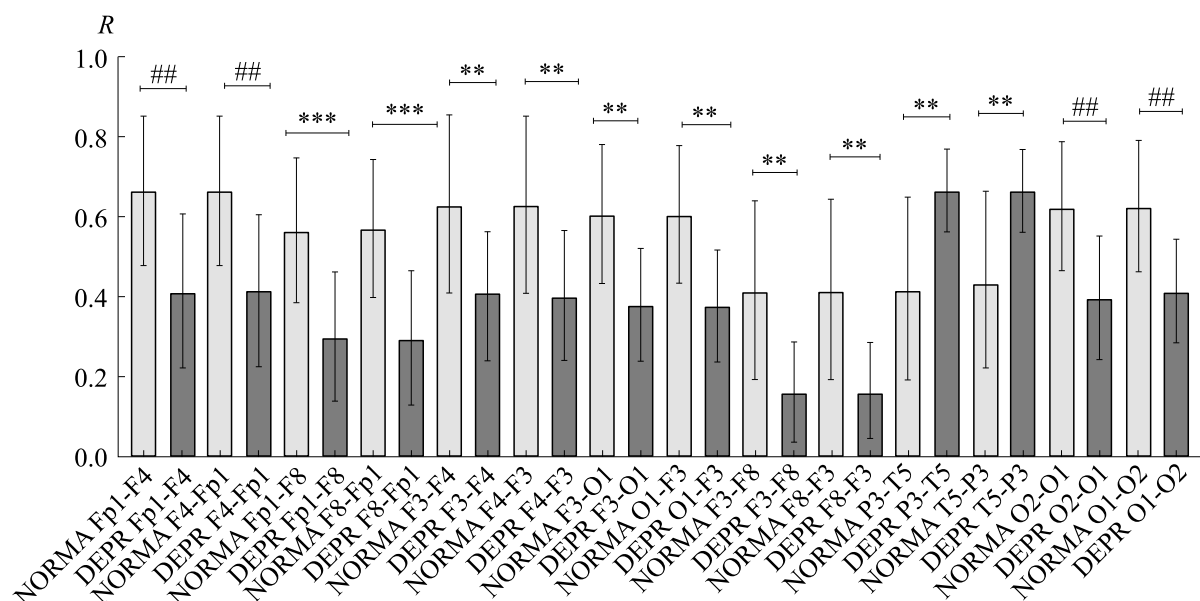


Рис. 5. Отличия между корреляционными отношениями (R) испытуемых группы «Норма» (NORMA, белый цвет) и группы «Депрессия» (DEPR, серый цвет) по альфа-диапазону частот. Показаны среднее значение и стандартное отклонение ($mean \pm SD$). «NORMA Fp1-F4» означает корреляционные отношения с фактором по отведению Fp1 и откликом по F4 для испытуемых группы норма.

($P < 0.001$ по t -критерию Стьюдента). В приведенных выше отличиях первое отведение является фактором («что влияет»), а второе — откликом («на что влияет»).

внутриполушарной коротко- и среднестанционной когерентности в задних отделах коры [22], в основном для низкочастотных (дельта- и тета-) и

ОБСУЖДЕНИЕ

Корректная математическая обработка результатов ЭЭГ, количественная объективизация данных продолжает оставаться весьма актуальной задачей для клинической практики. Одно из важных направлений в данном контексте связано с анализом особенностей попарных связей каналов ЭЭГ, а, следовательно, и соответствующих зон головного мозга. Такой анализ необходим для решения различных прикладных задач, таких как, определение состояния пациента и постановка соответствующего диагноза, контроль динамики изменений, происходящих в ходе лечения.

Работы, посвященные анализу когерентности при депрессиях, немногочисленны и проведены на небольшом числе испытуемых, хотя уже в первых исследованиях было показано, что когерентность позволяет отличать группы больных с аффективными расстройствами от нормы, больных шизофренией и гериатрических пациентов, а также чувствительна к антидепрессивному лечению [21]. Наиболее устойчивым отличием ЭЭГ больных депрессией от здоровых испытуемых являются более низкие значения межполушарной когерентности в лобных и префронтальных отведениях, а также большие значения межполушарной и

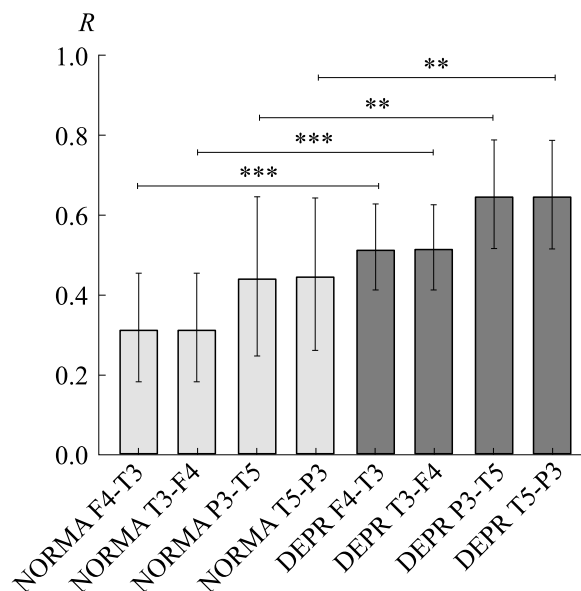


Рис. 6. Отличия между корреляционными отношениями (R) испытуемых группы «Норма» (NORMA, белый цвет) и группы «Депрессия» (DEPR, серый цвет) по бета-диапазону частот. Показаны среднее значение и стандартное отклонение ($mean \pm SD$). «NORMA F4-T3» означает корреляционные отношения с фактором по отведению F4 и откликом по T3 для испытуемых группы норма.

высокочастотных (гамма-) ритмов ЭЭГ. Кроме того, сообщается о снижении межполушарной когерентности при депрессиях относительно нормы, особенно в отсутствие лечения и когнитивной нагрузки [23].

При реактивной и эндогенной депрессии наблюдалось увеличение мощности альфа- и бета-активности в левом полушарии головного мозга, а также снижение мощности тета-ритма [24]. При тревожном типе депрессии происходило увеличение мощности тета- и бета-активности [25]. В других публикациях, касавшихся оценки ЭЭГ у пациентов с тревожными расстройствами, также отмечена тенденция к десинхронизации: увеличение мощности бета-ритма и снижение относительной представленности альфа-диапазона [26,27].

У группы пациентов с депрессией сообщалось [28] о снижении внутриполушарной когерентности в тета-диапазоне в правых височных отделах и в бета1-диапазоне частот (13–17 и 20–22 Гц) в задневисочных отделах по сравнению с условно здоровыми испытуемыми, но при отсутствии различий в межполушарной когерентности в бета-диапазоне частот. Кроме того, было обнаружено снижение межполушарной интеграции в альфа-диапазоне и увеличение межполушарной когерентности в тета-диапазоне, а также уменьшение внутриполушарной интеграции в тета- и альфа-диапазонах частот по сравнению с контрольной группой.

В ряде работ продемонстрировано, что паттерны изменений ЭЭГ могут различаться в зависимости от остроты, клинической картины и генеза депрессии [21]. Одни авторы выделили три типа ЭЭГ у пациентов с большим депрессивным расстройством [29]: при рекуррентной депрессии наблюдалось повышение бета активности; второй паттерн, отражающий снижение уровня бодрствования, встречался при инсомнии, ажитации и ненаследственной форме заболевания; третий паттерн характеризовался межполушарной асимметрией и имел место при высокой тревожности.

Было выявлено, что общей характеристикой ЭЭГ для всех пациентов с депрессией оказалась преимущественная активация правого полушария [30]. Отмечается, что депрессия сопровождается левосторонней гипоактивацией префронтальной коры в сочетании с ослаблением ответа на стимулы, сигнализирующие о награде [31]. Авторы другой работы показали [32], что наиболее чувствительным ЭЭГ-индикатором принадлежности к различным нозологическим группам является когерентность в альфа диапазоне частот.

Помимо этого, сообщалось о снижении показателей межполушарной когерентности в дельта-, тета-, альфа- и бета-диапазонах у страдающих де-

прессией мужчин [33]. Для женщин с депрессией сообщалось [34] о повышении альфа-когерентности в лобно-височных регионах, понижении в височно-теменных и не отличающихся от контрольной группы в задних отделах головного мозга. В смешанной по полу группе было выявлено снижение когерентности в дельта-диапазоне между фронтальными отделами, повышение межполушарной когерентности в тета-диапазоне в задних отделах головного мозга и снижение межполушарной и внутриполушарной когерентности в бета-диапазоне частот во фронтальных отделах [35].

Было продемонстрировано [36], что у пациентов с умеренной и тяжелой депрессией функциональная связность была выше по сравнению с контрольной группой в правой миндалине и правом хвостатом ядре. Более глубокие области играют ключевую роль в качестве центров крупномасштабных мозговых сетей, поэтому изменения в их свойствах локальной связи могли также привести к изменениям в связях во всем мозге. Как известно, миндалевидное тело участвует в обработке существенных стимулов [37] и считается одним из центральных узлов в аффективных сетях [38].

У пациентов с депрессией и тревогой было обнаружено [39] снижение внутриполушарной когерентности при открытых глазах для дельта-волн по всей коре. Было продемонстрировано, что межполушарная когерентность ЭЭГ во время сна для бета- и тета-ритмов и внутриполушарная когерентность между бета- и дельта-ритмами были значительно ниже у пациентов с депрессией [40].

В результате нашей работы по анализу матриц корреляционных отношений, отражающих нелинейный характер процессов, для испытуемых группы «Депрессия», в отличие от группы «Норма», были обнаружены снижение межполушарных затылочных связей по диапазону дельта-частот (каналы O1 и O2); увеличение правых внутриполушарных взаимодействий между теменной и височной областями по диапазону тета-частот (каналы P4 и T6); уменьшение лобных межполушарных связей по диапазону альфа-частот (каналы F4 и Fp1, F8 и Fp1, F4 и F3), снижение лобно-затылочных взаимодействий левых внутриполушарных по диапазону альфа-частот (каналы F3 и O1), увеличение левых внутриполушарных взаимодействий между теменной и височной областями по диапазону альфа-частот (каналы P3 и T5), уменьшение межполушарных затылочных связей по диапазону альфа-частот (каналы O2 и O1); увеличение межполушарных лобно-височных взаимодействий по бета-диапазону частот (каналы T3 и F4), увеличение левых внутриполушарных височно-теменных взаимодействий по бета-диапазону частот (каналы T5 и P3). Взаимодействия между отведениями F3 и F8 по диапазону альфа-

частот были слабыми (меньше 0.5), но существенно отличающимися между исследуемыми группами. В приведенных выше парах отведений первое отведение является отведением-фактором (управляющая роль), а второе — отведением-откликом (исполняющая роль).

В данной пилотной работе были исследованы электроэнцефалограммы групп испытуемых обоих полов с широким возрастным охватом. В результате проведенных исследований были найдены статистически значимые отличия в межканальных взаимодействиях различных участков головного мозга у здоровых испытуемых и пациентов с депрессией с помощью обработки данных ЭЭГ по методу корреляционных отношений. Предполагается, что при более строгих правилах включения электроэнцефалограмм испытуемых в группы (согласно известным классификаторам) также будут определены еще более существенные количественные отличия корреляционных отношений. На наш взгляд, более значимые отличия были обнаружены в взаимодействии между затылочными отведениями (O1 и O2) и между лобными отведениями разных полушарий (Fp1 и F8) головного мозга.

Полученные в настоящей работе значительные изменения, отражающие межполушарное взаимодействие, в большинстве своем соответствуют приведенным в разделе «Обсуждение» литературным данным по смыслу: основной тенденцией при депрессии является снижение межполушарной когерентности в дельта- и альфа-диапазонах частот [12, 22, 23, 26–28], а также увеличение внутрислошарной когерентности в задних отделах коры [22, 26, 27] при тета- и бета-диапазонах частот. Кроме того, было показано повышение межполушарной когерентности в тета-диапазоне в задних отделах коры головного мозга, что согласуется с данными работы [35]. Хочется отметить, что наибольшее количество отличий между группами было обнаружено по альфа-диапазону по сравнению с другими диапазонами частот, что также согласуется с литературными данными [32]. Согласованность полученных в настоящей статье результатов с литературными данными еще раз подтверждает работоспособность и дальнейший потенциал применения метода корреляционных отношений.

Нами было также получено противоположное литературным данным [22] уменьшение межполушарных затылочных связей по дельта-диапазону частот (в литературе упоминается об их увеличении). Кроме того, нами было обнаружено увеличение внутрислошарной когерентности в тета-диапазоне в правых височных отделах и увеличение при бета-диапазоне частот в задневисочных отделах, хотя в работе [28] отмечается ее уменьшение. Но, как уже упоминалось ранее, в

мировой литературе (см. табл. 1) имеются разнообразные данные, касающиеся отличий электроэнцефалограмм здоровых испытуемых от пациентов с депрессией. Физиологический смысл отмеченных изменений требует дальнейшего не входящего в рамки данного пилотного исследования изучения.

Резюмируя вышенаписанное можно отметить, что метод корреляционных отношений главным образом отличается от ранее применявшихся методов тем, что использует нелинейный подход, иными словами, предполагает нелинейную связь между отведениями электроэнцефалограммы. Он также позволяет установить какой из каналов ЭЭГ является фактором, а какой — откликом. Другими словами, найдена возможность выявления направленности связи между отведениями. На данный момент мы предполагаем, что в зафиксированной на момент ЭЭГ-исследования картине текущего функционального состояния, в паттерне, отображающем специфику интегративной деятельности мозга как совокупности актуальных функциональных систем, отведение-фактор играет управляющую роль, а отведение-отклик — исполняющую. Эти соображения нуждаются в дальнейшем изучении и анализе.

Можно надеяться, что с помощью данного метода удастся обнаружить и некие специфические искажения интегративной деятельности головного мозга при различных нервно-психических заболеваниях, не обнаруживаемых в рамках линейного подхода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод корреляционных отношений является относительно новым, в отличие от коэффициентов кросс-корреляции и коэффициентов когерентности, давно известных и используемых в научных и клинических исследованиях. Несомненное преимущество данного метода состоит в том, что он позволяет оценить не только факт и интенсивность взаимодействия различных участков головного мозга, но и какой из них влияет на другую или другие значимые зоны, или, иными словами, определить направленность связи. Помимо нелинейных моделей метод корреляционных отношений может работать и с линейными моделями. Кроме того, по оценкам корреляционных отношений можно определить отличия модели связи между исследуемыми отведениями от линейной.

В настоящей статье с помощью метода корреляционных отношений на базе клинического материала были продемонстрированы статистически значимые отличия в межканальных взаимодействиях ЭЭГ между испытуемыми групп «Норма» и «Депрессия». Помимо этого, была об-

наружена направленность связи между отведениями. В дальнейшем планируется применить метод корреляционных отношений для определения характерных количественных маркеров других психических заболеваний. Предполагается, что данный метод станет дополнительным инструментом для своевременной диагностики нервно-психических расстройств.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику отделения нейрохирургии Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и неврологии им. В. М. Бехтерева, ведущему научному сотруднику лаборатории нейрофизиологии и патологии поведения Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, профессору кафедры неврологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, доктору медицинских наук А. Г. Нарышкину за высказанное предположение о нарушении амплитудно-частотных характеристик ЭЭГ у пациентов нервно-психического профиля, что стало основой для этой статьи и ряда других исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Процедуры, выполненные в работе с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. Д. Давыдова, Р. Ф. Еникеева, А. В. Казанцева и др., Вавиловский журн. генетики и селекции, **23** (4), 465 (2019).
2. МКБ-10, международная классификация болезней 10 пересмотра [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://mkb-10.com/index.php?pid=4211> (05.12.22).
3. А. Б. Смулевич, *Депрессии при психических и соматических заболеваниях* (Медицинское информационное агентство, М., 2015).
4. T. Hajek, J. Kozeny, M. Kopecek, et al., J. Psychiatry Neurosci., **33**, 91 (2008).
5. P. C. Koolschijn, N. E. van Haren, G. J. Lensvelt-Mulders, et al., Hum. Brain Mapp., **30** (11), 3719 (2009).
6. M. Naughton, T. G. Dinan, and L. V. Scott, Handbook Clin. Neurol., **124**, 69 (2014).
7. Y. Noda, M. Nakamura, T. Saeki, et al., Neurosci. Res., **77** (1–2), 70 (2013).
8. J. P. Hamilton, M. C. Chen, and I. H. Gotlib, Neurobiol. Dis., **52**, 4 (2013).
9. R. Ramasubbu, et al., Front. Psychiatry, **5**, 17 (2014).
10. S. Tang, et al., Depress. Anxiety, **36**, 712 (2019).
11. M. A. Ferdek, C. M. van Rijn, and M. Wyczesany, Cogn. Affect. Behav. Neurosci., **16**, 1099 (2016).
12. А. Ф. Изнак, Е. В. Изнак и Т. С. Мельникова, Психиатрия, **2**, 127 (2018).
13. М. Н. Ливанов, *Избранные труды. Пространственно-временная организация потенциалов и системная деятельность головного мозга* (Наука, М., 1989).
14. А. Г. Нарышкин, Т. А. Скоромец, А. Л. Горелик, и др., Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, **109** (10), 51 (2009).
15. Koufen H, Dichgans J. Frequency and course of post-traumatic EEG-abnormalities and their correlations with clinical symptoms: a systematic follow up study in 344 adults. Fortschr Neurol Psychiat Grenzgeb. **46**, 165 (1978).
16. А. П. Кулаичев, Н. Л. Горбачевская, А. В. Горюнов и др., Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, **112** (12), 55 (2012).
17. М. Е. Соболев, А. Л. Горелик и О. Л. Власова, Науч.-техн. ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки, **13** (3), 119 (2020).
18. MAS.Exponenta.ru [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://mas.exponenta.ru/> (29.06.22).
19. Р. И. Ивановский и М. А. Новожилов, Математическая биология и биоинформатика, **11** (2), 214 (2016).
20. Н. В. Звёздочкина, *Исследование электрической активности головного мозга* (Изд-во Казан. ун-та, Казань, 2014).
21. И. А. Лапин и М. В. Алфимова, Социальная и клиническая психиатрия, **24** (4), 81 (2014).
22. А. А. Варламов и В. Б. Стрелец, Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова, **63** (6), 613 (2013).
23. Т. С. Мельникова и И. А. Лапин, Социальная и клиническая психиатрия, **28** (3), 27 (2008).
24. Е. А. Петрова, Н. А. Георгиевская, И. В. Кичук и др., Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, **110** (6), 77 (2010).
25. Д. Ю. Бутко, А. Т. Давыдов и др., Рус. мед. журн., **5** (17), 266 (2008).
26. K. Wiedemann, Dialogues Clin. Neurosci., **13** (2), 225 (2011).
27. A. Demerdzieva and N. Pop-Jordanova, Prilozi., **32** (1), 229 (2011).
28. И. В. Кичук, Е. А. Петрова, А. А. Митрофанов и др., Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика, **8** (3), 34 (2016).
29. M. Matousek, Int. J. Psychophysiol., **10** (3), 239 (1991).
30. А. Ф. Изнак и М. Б. Никишова, Физиология человека, **33** (2), 137 (2007).

31. R. J. Davidson, *Cognition & Emotion*, **12** (3), 307 (1998).
32. M. R. Ford, J. W. Goethe, and D. K. Dekker, *Biol. Psychiatry*, **21** (12), 1175 (1986).
33. V. Knott, C. Mahoney, S. Kennedy, and K. Evans, *Psychiatry Res.*, **106** (2), 123 (2001).
34. H. Hinrikus, A. Suhhova, M. Bachmann, et al., *Med. Biol. Eng. Comput.*, **47** (12), 1291 (2009).
35. T. Takeda, *J. Jusen Med. Society*, **114** (4), 62 (2005).
36. A. Damborská, E. Honzírková, R. Barteček, et al., *Sci. Rep.*, **10**, 4398 (2020).
37. L. Pessoa and R. Adolphs, *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 773 (2010).
38. B. T. Thomas, et al., *J. Neurophysiol.*, **106**, 1125 (2011).
39. S. Markovska-Simoska, N. Pop-Jordanova, and J. Pop-Jordanov, *Prilozi (Makedon. Akad. Nauk Umet. Odd. Med. Nauki)*, **39** (2–3), 5 (2018).
40. R. Armitage, R. F. Hoffmann, and A. J. Rush, *Psychol. Med.*, **29** (6), 1435 (1999).

Comparative Analysis of Interchannel Interactions on Electroencephalograms in Healthy People and Patients with Depression Using the Method of Correlation Ratios

M.E. Sobolev*, A.L. Gorelik**, ***, and O.L. Vlasova*

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

**V.M. Bekhterev National Medical Research Center for Psychiatry and Neurology,
ul. Bekhtereva 3, Saint Petersburg, 192019 Russia

***I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
prosp. Toreza 44, Saint-Petersburg, 194223 Russia

In the article, based on clinical material obtained in the course of a study of patients with depression, an approach was applied to the analysis of the dependences of electroencephalogram channels using correlation ratios. It can objectively evaluate the properties of connections in any of their models (linear and non-linear). On the basis of the constructed matrices of correlation ratios, the possibility of analyzing paired dependences is shown in order to determination of parameters that differ for the norm and pathology. The direction of the connections between the leads was also established. In our opinion, differences in interhemispheric occipital connections are the most significant. This approach could become the basis for determining unique quantitative markers of depressive states and other neuropsychiatric disorders.

Keywords: quantitative electroencephalography, interchannel relationships, depression, coherence coefficients, correlation ratio

XXI ВЕК: СОЗНАНИЕ И МОЗГ¹

© 2023 г. Г.Р. Иваницкий*,#

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

*E-mail: ivanitsky@iteb.ru

Поступила в редакцию 15.03.2023 г.

После доработки 03.07.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

Существенным результатом творчества людей в XXI веке стало создание креативных андроидных роботов, снабженных искусственным интеллектом. Уровень совершенства этих роботов становится столь высоким, что по внешним признакам установить их отличие от живых людей вскоре будет невозможно. Существующие методы анализа (тесты А. Тьюринга и Дж. Сирла) ставят много интересных вопросов, связанных с неопределенностью определения термина «сознание». Однако похожесть людей и роботов может приводить к логической ошибке, т.е. к подмене реального мира виртуальным миром.

Ключевые слова: способы обработки информации в мозгу человека, креативные андроидные роботы, ценность информации.

DOI: 10.31857/S000630292304021X, EDN: KOJXRU

Среди основных рисков, угрожающих существованию человечества, имеют место следующие явления.

Во-первых, падение крупных метеоритов или существенное изменение климата на нашей планете (резкое потепление и глобальная засуха, затопление больших территорий при таянии льдов на полюсах Земли или резкое и длительное похолодание, которое приведет к глобальному голоду).

Во-вторых, изменение динамических процессов внутри Земли, которые могут создать условия, приводящие к землетрясениям и росту вулканической деятельности.

В-третьих, ограниченность энергетических ресурсов и пресной воды на планете, что неизбежно приводит к массовой миграции населения и локальным войнам.

В-четвертых, возникновение новых вирусных пандемий, в том числе и рукотворных, нарушающих устойчивость густо заселенных регионов планеты.

В-пятых, развал существовавших империй, стремящихся удержать свое мировое господство, что может привести к мировой атомной войне и уничтожению большей части (возможно и всего) человечества.

В-шестых, рост потребления наркотических средств и увеличение психических заболеваний. Рост количества людей, страдающих деменцией.

В-седьмых, с развитием робототехники вытеснение людей с рынка труда, что приведет к росту расслоения общества и повсеместному нарушению устойчивости социальных систем.

В связи с перечисленными рисками возрастает роль фундаментальных пограничных системных наук, подобных биофизике, направленных на исследование критических ситуаций и изучение их причинно-следственных отношений.

ПОПЫТКА ОПРЕДЕЛИТЬ СОЗНАНИЕ ЧЕЛОВЕКА

Чтобы бороться с возникающими рисками, нужно понимать и осознавать их опасность. Однако, никто не знает, что такое *сознание* и что означает глагол *осознавать*. 300 лет пытаются найти этому термину определение. Бихевиористы (от англ. *behaviour* — поведение) считали, что *сознания* не существует, это иллюзия, в которую мы верим. Термины «сознание», «эмоции» и «поведение» не имеют четких определений. Когда человек заявляет, что у него есть *сознание*, то бихевиористы возражают, что так мог бы сказать и самообучающийся суперкомпьютер-робот. *Сознание* — субъективный феномен. И.П. Павлов в свое время отказался использовать этот термин

¹ Пленарная лекция на открытии VII Съезда биофизиков России (Краснодар), 17 апреля 2023 года



Рис. 1. Научные дисциплины, имеющие свое определение сознания.

в своей лаборатории. Гипотезу работы мозга он построил на условных и безусловных рефлексах. Сегодня исследователи вернулись к активному изучению *сознания*. По крайней мере, 12 наук пытаются внести свою лепту в его определение (рис. 1).

Всем известно выражение: *человек потерял сознание*. Но что это такое, что он потерял? Пока ответа нет. Существует порядка 100 определений сознания. Опубликовано на эту тему порядка 25000 статей и книг.

КРАТКИЕ ИТОГИ XX ВЕКА: КАК РАБОТАЕТ НАШ МОЗГ

Анатомические (рис. 2) и физиологические исследования мозга человека в XX веке показали, что, несмотря на очевидный успех, остались неопределенности в описании механизмов его работы, которые не позволяют объяснить множество вариантов поведения человека, наблюдаемых психологами.

Исследования обычно проводились на разных уровнях структурной организации мозга (рис. 2б), от молекул до целостной нервной системы. Однако каждый иерархический уровень описывался в своих терминах, на своем языке, что не позволяет объединить эти описания в виде единой модели. Эволюционное усложнение мозга показало, что он в филогенезе увеличивается как путем наращивания столбов, так роста пластов нейронов (рис. 3).

Платой за усложнения структуры мозга служит увеличение затрат времени при переходе к двигательной реакции. Если насекомое богомол с простой системой организации мозга (№ 1 на рис. 3) совершает простую двигательную реакцию за 1 мс, то у человека (№ 5 на рис. 3) на простую реакцию «зажглась лампочка — нажми кнопку» требуется 80–100 мс. Сравнение мозга человека с мозгом рептилий, например, крокодила, показало появление у человека новой структуры — развитой большой коры головного мозга (рис. 4б).

Сравнение коры мозга человека с корой других млекопитающих показало, что у людей кора занимает большой объем мозга — свыше 80% (рис. 5).

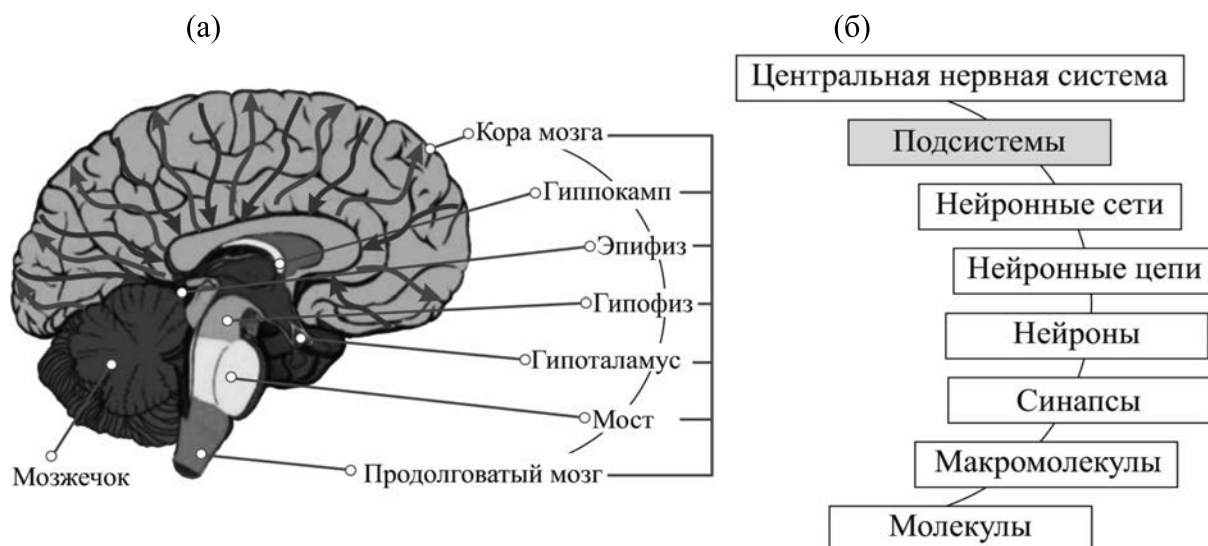


Рис. 2. Структурные образования подсистем головного мозга человека (а) и их иерархическая организация (б).

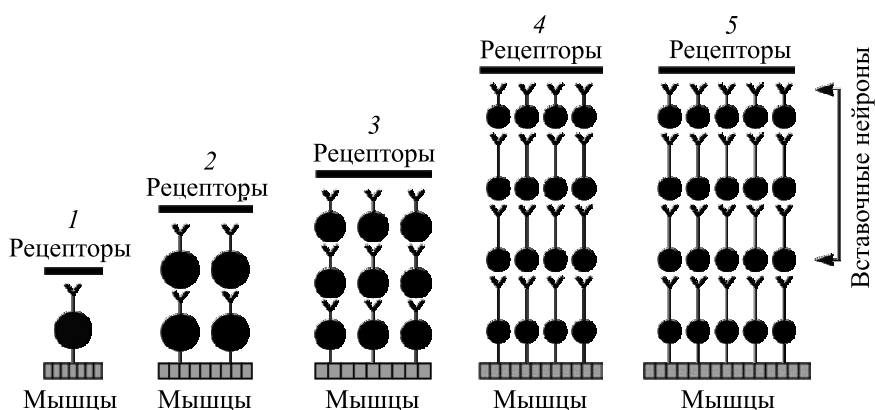


Рис. 3. Развитие мозга в филогенезе. Черными кружками отмечены вставочные нейронные слои.

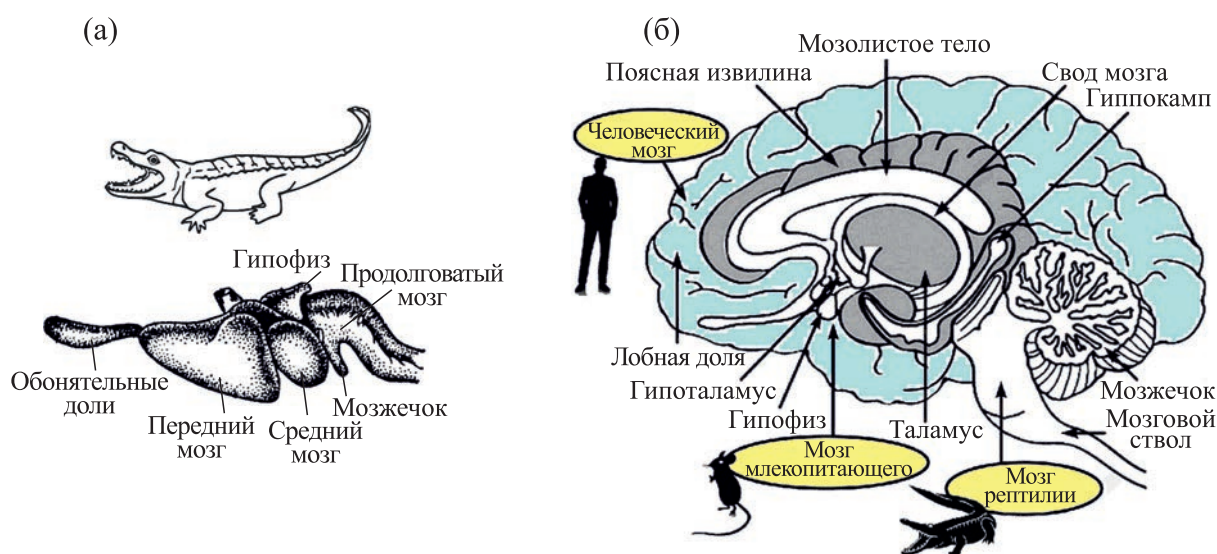


Рис. 4. Строение головного мозга рептилии — крокодила (а) и строение эволюционно развившегося мозга человека (б).

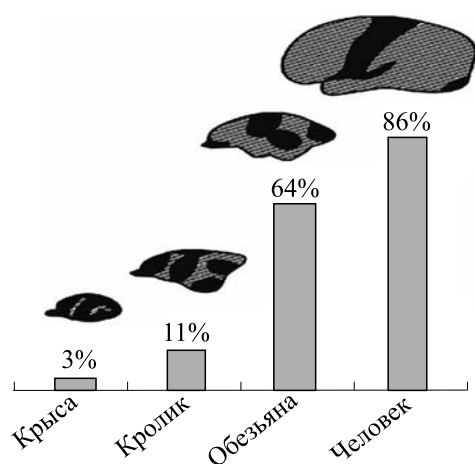


Рис. 5. Увеличение доли новой коры в эволюции млекопитающих по сравнению со старой корой (черные области).

В середине XX века были созданы первые универсальные вычислительные машины, появилась гипотеза, что человечество, наконец, приобрело возможность моделировать деятельность своего мозга.

МОЖЕТ ЛИ МАШИНА МЫСЛИТЬ?

В 1950 г. Алан Тьюринг в философском журнале *Mind* (Разум) опубликовал статью под названием «Вычислительные машины и разум» (*Computing Machinery and Intelligence*), в которой предложил тест, который должен был бы доказать, что вычислительная машина на основе заложенной в нее программы начинает обладать «мышлением». Он сформулировал свой тест на основе ответа на вопрос: может ли машина совершать действия, неотличимые от обдуманных действий человека? Суть этого теста показана на рис. 6.

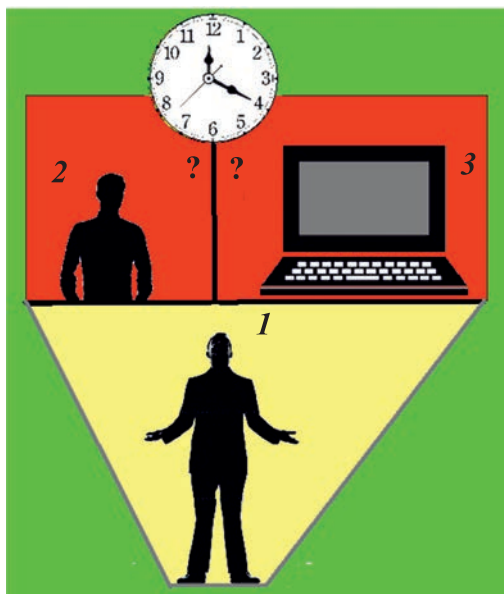


Рис. 6. Человек-экзаменатор (1) задает вопросы скрытым от него двум субъектам — человеку (2) и машине (3) — и получает от них ответы. Если за заданное время он не сможет отличить, с кем он ведет диалог — с машиной или человеком, то можно утверждать, что машина мыслит. Если это утверждение справедливо, то люди — это машины особой биологической разновидности на водно-органической основе. Тогда, по всей видимости, можно создать мыслящие машины, обладающие сознанием, из самых разных материалов.

30 лет спустя с целью опровергнуть тест А. Тьюринга американский философ Дж. Сирл придумал другой тест — «китайскую комнату» [1]. Суть теста Дж. Сирла состояла в доказательстве, что комбинаторный перебор, реализуемый в вычислительных машинах, не эквивалентен мышлению человека. Даже сам человек на основе перебора может давать на первый взгляд разумные ответы без понимания смысла вопроса (рис. 7).

В результате Сирл делает вывод: «Способ, посредством которого человеческий мозг порождает осмысленные явления, не может сводиться лишь к выполнению детерминированной инструкции, т. е. к компьютерной программе».

Последующие события внесли новые неопределенности в сравнение мышления человека и компьютерной программы. 11 мая 1997 г. компьютер Deep Blue (корпорация IBM) в матче из шести партий обыграл чемпиона мира по шахматам Гарри Каспарова со счетом 2:1 и три ничьих. Затем 19 лет спустя с 9 по 15 марта 2016 г. программа AlphaGo в матче из пяти партий обыграла корейского профессионала Ли Седола в китайскую игру Го со счетом 4:1. Игра Го имеет больше комбинаций, чем шахматы.

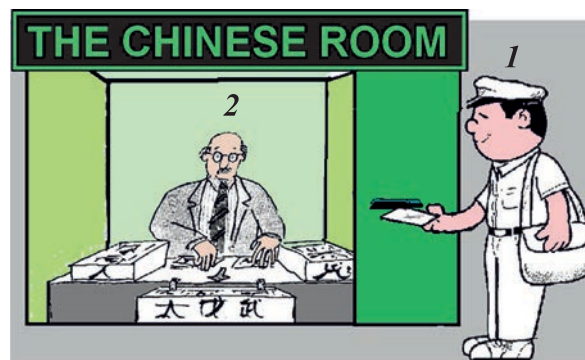


Рис. 7. Тест Дж. Сирла. Человек (1), владеет китайской иероглифической письменностью. Он отправляет человеку (2) вопрос в виде иероглифа. Человек (2) не знает китайской письменности, но имеет следующую инструкцию: «Получив иероглиф такого вида, возьми такой-то иероглиф из корзинки № 1 и поместив его рядом с таким-то иероглифом из корзинки № 2, отправь обратно».

XXI ВЕК — НАЧАЛО ЭПОХИ НОВЫХ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И АНДРОИДНЫХ РОБОТОВ

Развитие мозга гоминидов от Человека Умелого до Человека Разумного завершилось приблизительно 50—100 тыс. лет назад (рис. 8а). В XXI веке Человек Разумный создал похожего на себя по внешнему виду Креативного Андроидного Робота (рис. 8б).

Дальнейшие события в этом направлении происходили с ускорением. Фольклор современных студентов, занимающихся информационными технологиями и робототехникой, гласил:

Прогресс все ускоряет бег,

В нем победил не человек.

Разрыв становится сильнее,

Андроид превзошел людей!

С 11 по 13 января 2017 г. программа Libratus, созданная Университетом Карнеги—Меллона, выиграла у четырех лучших в мире профессиональных игроков в покер. Игра в покер содержит не только множество неопределенностей, но и основана на лжи, т. е. на обмане противника.

Что касается мозга современного человека, то можно сделать вывод: наш мозг по массе составляет всего ~2% нашего организма, но в активном состоянии может потреблять свыше 25% всей энергии, поступающей к нам с пищей. Мы имеем самую развитую новую кору по сравнению с другими млекопитающими, покрывающую средний мозг. Мозг человека содержит 86 млрд. нейронов и порядка 100 трлн. синапсов, обеспечивающих активные связи между нейронами.

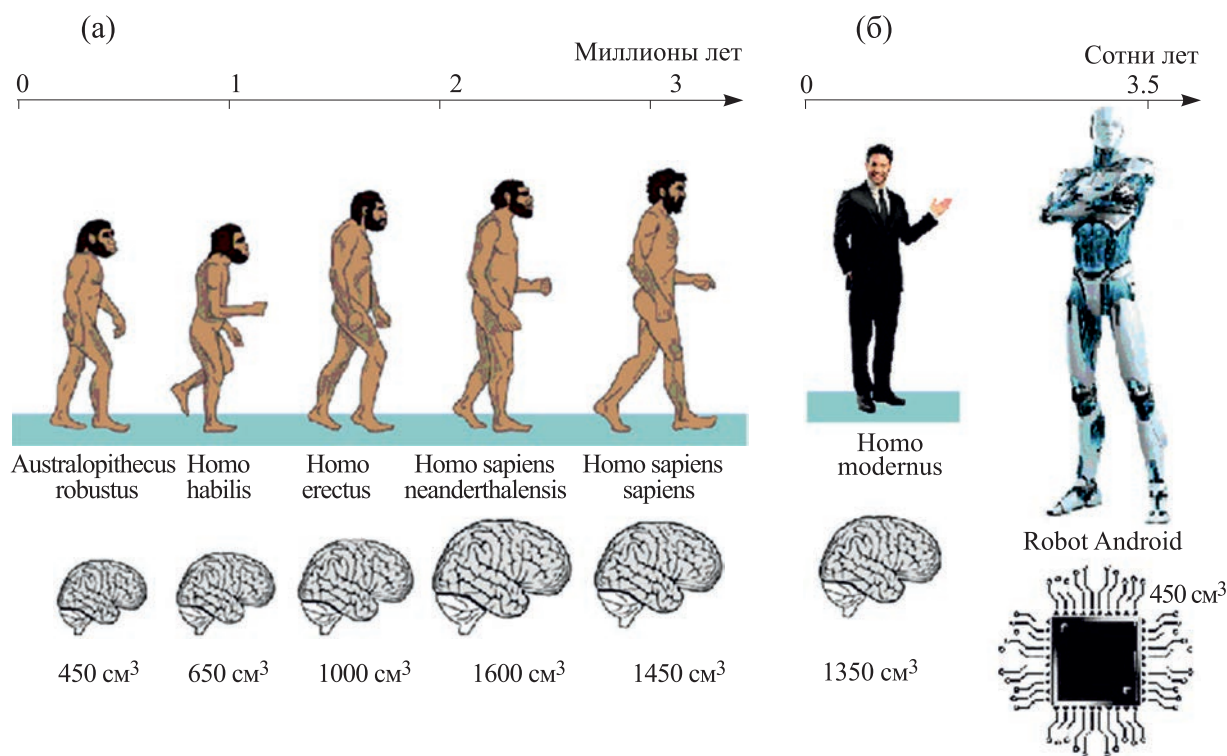


Рис. 8. Эволюция гоминидов: биологическая (а) и информационно-техническая (б).

ЭМОЦИИ И ГОРМОНЫ

Человек, в отличие от робота, наряду с обработкой информации всегда имеет Цель и информационную эмоциональную окраску процесса ее достижения. В культурах разных народов базовые эмоции различаются. Их присутствие можно распознать по выражению лица человека, его жестам или по изменению физиологических параметров человека. Основной набор эмоций — это любовь, страх, гнев, отвращение, влечение, счастье, печаль, удивление и т. д. Древовидные трехкомпозиционные графы связи слов, описывающих эмоции были построены в конце прошлого века и с вариациями повторялись в последующих работах

в XXI веке. На рис. 9 показаны графы для двух базовых эмоций.

Страх и *любовь* являются врожденными процессами с генетически заданными физиологическими компонентами и с определенными мимическими проявлениями.

Страх мобилизует организм для избегания опасных ситуаций, угрожающих его жизни. Причинами страха считают реальную или воображаемую опасность. *Любовь* наряду с верой и надеждой выступает одной из главных добродетелей во всех религиях. Существенную роль в проявлении эмоций играют гормоны. В нашем организме

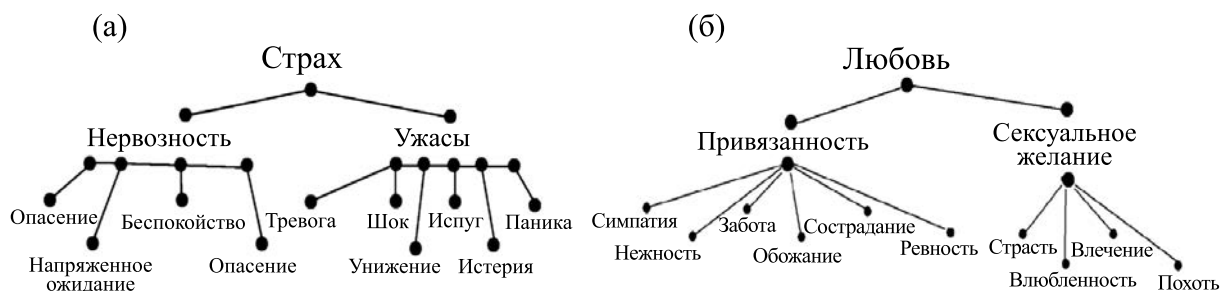


Рис. 9. Пример двух базовых эмоций: страх (а) и любовь (б).

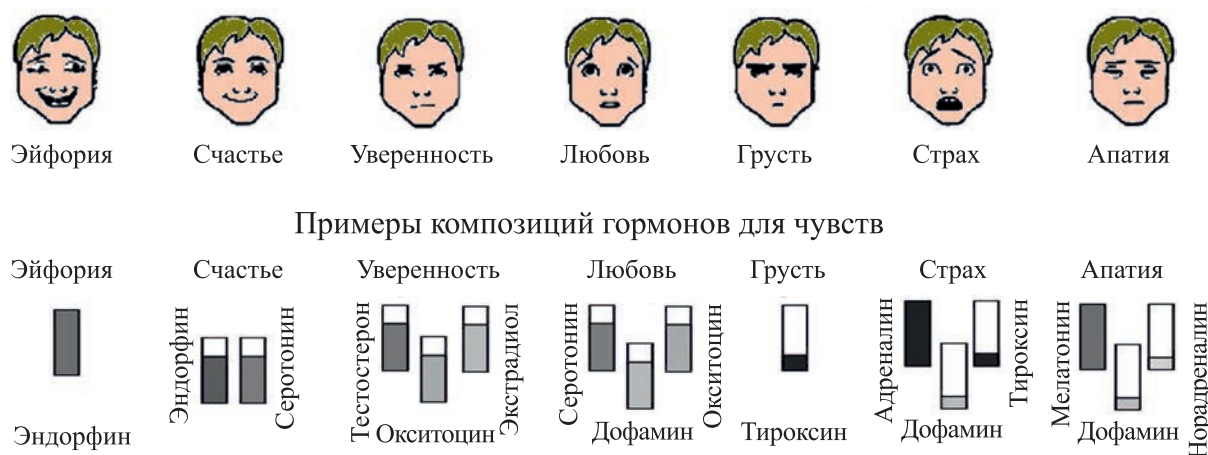


Рис. 10. Мимика лица и композиции гормонов.

синтезируется порядка 150 разных гормонов. Их комбинации связаны с эмоциями (рис. 10).

Гормоны вырабатываются в одних клетках и связываются с рецепторами клеток-мишеней в других органах, оказывая регулирующее влияние на обмен веществ и скорость обработки информации. Учитывая химическое строение гормонов, их делят на группы: стероидные гормоны, белковые и небольшие пептидные гормоны, являющиеся производными аминокислот. Они синтезируются в разных частях эндокринной системы человека: в области коры надпочечников, в зоне половых желез у мужчин и женщин, в поджелудочной железе, в эпифизе, надпочечниках, в нейронах и в щитовидной железе. Например, проявление эмоции *Любовь* связывают с гормонами — Серотонин, Дофамин, Окситоцин и другие в меньших концентрациях. Казалось, что главное отличие человека от Креативного Андроидного Робота найдено. У Роботов нет эмоций. Мы не видим осмысленной мимики их лица.

РОБОТ С МИМИКОЙ ЛИЦА

Однако за последние 10 лет разработано свыше пятнадцати новых платформ для создания Креативного Андроидного Робота. Остановимся на последней — Андроидный робот Амека (*Amecca*) был показан на выставке CES в Лас-Вегасе в начале прошлого 2022 г. Выставка CES (Consumer Electronics Show — Бытовая Электронная Демонстрация) — это событие в западном мире. На ней демонстрируются новые технологии и неожиданные проекты. Амеку на этой выставке назвали самым похожим на человека роботом, что связано с реалистичной мимикой ее «лица». На данный момент этот робот умеет управлять губами, морщить нос, управлять веками глаз и подмигивать. Ми-

мика Амеки не связана с гормонами. Это чисто электромеханическая имитация. На лице Амеки установлено множество мини моторов, при помощи которых деформируется силиконовое покрытие ее лица, создавая иллюзию мимики реального человеческого лица (рис. 11).

«Человеческое лицо» — это коммуникационный интерфейс с высокой скоростью генерации визуальной информации за счет подвижности мышц. С помощью изменения выражения лица и жестов можно сообщить настолько много информации, что даже иногда отпадает необходимость в словах. Младенец обучается этому языку раньше, чем звуковому языку. Уже через 9 мин после рождения младенца интересуют лица окружающих людей, к 12-му дню младенец способен имитировать мимику. В связи с наличием индивидуальных базовых эмоций, каждый ребенок учиться оценивать намерения людей. Внешний язык мимики и жестов является проявлением не только внутреннего химического гормонального языка. Если сравнить мимику южных и северных народов, то она будет разная. Мимика каждого человека имеет не только генетические особенности, но и испытывает на себе существенное влияние культуры народа, в которой воспитывается человек.

У Амеки внешнее проявление эмоций основаны на программах машинного перевода текстов. Внутри ее памяти заложен словарь, описывающий проявление эмоций (любовь, грусть, радость и их антиподы, и отрицания). По вопросам, задаваемых ей, в результате анализа словарного состава вопроса (или слов в диалоге и их комбинаторики), подается сигнал на работу соответствующего двигателя, растягивающего или сжимающего силиконовое покрытие «лица». Главная

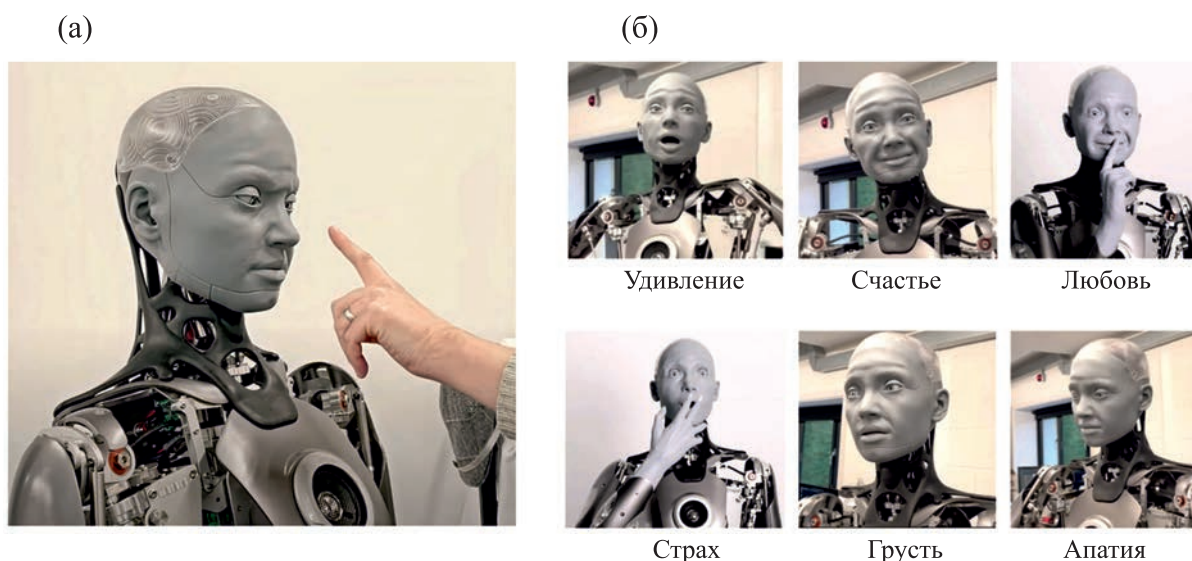


Рис. 11. Робот «Амека» (Engineered Arts, Великобритания) с мимикой лица.

цель создания креативных роботов — это стремление фирм заработать большие деньги (рис 12).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНДРОИДНЫХ РОБОТОВ

Области использования Креативного Андроидного Робота имеют, по крайней мере, семь практических приложений: (1) секретари, встречающие посетителей; (2) официанты, принимающие заказы; (3) экскурсоводы, рассказывающие об экспозиции выставки; (4) сиделки или мед-

сестры медицинских учреждений и домов престарелых; (5) продавцы товаров; (6) эстрадные артисты; (7) лекторы, читающие лекции и отвечающие на вопросы слушателей с заранее запрограммированными ответами.

Особое место занимают роботы-двойники — Геминоиды (рис. 13).

В интервью на вопрос, какова цель создания двойников, профессор из Университета в Осака Хироси Исигуро ответил: «Прежде всего, это попытка при помощи андроида понять, кто такой человек. С помощью Геминоида мы можем присутствовать везде, где пожелаем. Мы также можем прикоснуться к философскому вопросу: что собой представляет присутствие человека? Где проходит граница между сознанием и телом? Это моя цель, вот почему я изучаю телеприсутствие человека в оболочке робота-андроида».

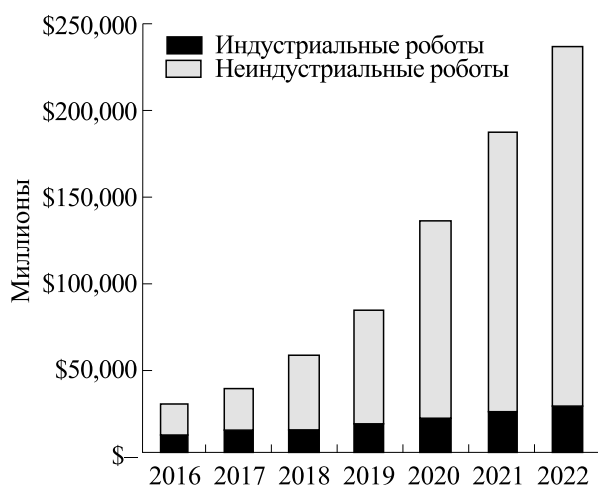


Рис. 12. Рост объема продаж роботов к 2022 г. оценивался в 237.3 млрд. долларов США. Он вырос за счет покупок в основном роботов неиндустриального назначения (Tractica: Total Industrial and Non- Industrial Robotics Revenue, World Markets (2016-2022)).



Рис. 13. Профессор Хироси Исигуро (справа) и его двойник — робот Геминоид (слева).

Таблица 1.

Вопрос и ответ XX века	Вопрос и ответ XXI века
МОЖЕТ ли машина иметь сознание в таком же смысле, в каком имеем его мы? Если ДА, то люди — это машины особой биологической разновидности на водно-органической основе. Тогда по всей видимости можно создать мыслящие машины, обладающие сознанием из самых разных материалов, включая кремний.	ЯВЛЯЕТСЯ ли искусственно созданная программа основой мышления или это всегда лишь имитация? Это принципиально иной подход к проблеме. Он затрагивает общий вопрос: что первично информация или ее носитель? Нельзя сделать одно и тоже сознание на разных материалах, из которого создается машина.

Итог этих дискуссий XX и XXI веков и выводы из них представлены в табл. 1.

ИНФОРМАЦИЯ, ЕЕ НОСИТЕЛЬ И ЕЕ ЦЕННОСТЬ

Все описанные выше явления связаны с обработкой информации. Информация и ее носитель — это разные понятия, хотя сама информация и не может распространяться без носителя. Носитель информации — это материальный объект, а информация есть идеальная субстанция, передающая смысл происходящих вокруг явлений. Именно развитие у приматов разных способов обработки и запоминания смыслов, заложенных в информации, привело к появлению человека. Носители информации могут различаться: электромагнитные поля (свет); акустические поля (звук); молекулы, взвешенные в воздухе (запах); жидкие и твердые вещества (вкус), наконец, творения человека на разных носителях (рисунки, тексты, строения, машины и т.п.).

Биология исследует в основном движение и взаимодействие носителей информации (молекул и зарядов), которые описываются законами механики Ньютона, и законами квантовой механики. Постоянно следует помнить, что информация измеряется в отличающихся для разных носителей единицах — битах, байтах, кубитах. Законы обработки информации отличаются от законов материального мира. Существует свыше полутора десятка определений информации. Следовательно, термин *информация*, как и термин *сознание*, страдает неопределенностью.

Теория информации развивается уже порядка 100 лет, начиная с первых работ 1920-х годов (работы Гарри Найквиста и Ральфа Хартли). Сегодня она находится на пересечении пяти наук — теории вероятностей, статистики, статистической механики, инженерии и электротехники. Порядка 50 лет к ее изучению проявляют интерес биофизики.

В биологии использование термина *информация* началось с термина *негэнтропия* (отрицательная энтропия), когда Эрвин Шредингер в 1944 г. в книге "*Что такое жизнь?*" ввел этот термин. В

теории информации и в статистике термин *негэнтропия* используется как мера отклонения распределения энтропии при работе системы от нормального распределения Гаусса. Если в распределении появляется асимметрия, то это означает, что внутри этих процессов есть элементы с обратной связью, т.е. возникает самоуправление. Из всех распределений с заданным средним значением и дисперсией нормальное (гауссово) распределение имеет наибольшую энтропию. Негэнтропия соответствует разности энтропий между наблюдаемым распределением и распределением Гаусса. Таким образом, негэнтропия всегда положительна и обращается в нуль тогда и только тогда, когда сигнал (воздействие на систему) является случайным, т.е. система не содержит информации. Следовательно, негэнтропия и информация характеризуют одно и тоже явление — устойчивость системы, но измеряемую в разных единицах. Негэнтропия измеряется в единицах энергии (джоулей или калорий), деленной на градус в шкале Кельвина, информация — в относительных единицах (битах) путем сравнения с некоторой стандартной системой хранения или передачи информации по каналу связи. Далее методом сравнения, используя эталонную систему, обрабатывающую информацию, описываются другие системы. Однако для описания работы мозга такой подход мало продуктивен.

При исследовании мозга важно понимать, что термины *информация* и *сознание* связаны между собою. Информация приобретает смысл, когда у Субъекта, принимающего информацию от Объекта, есть Цель. Любой живой организм обладает генетической памятью, в которой на ДНК записана информация, унаследованная им от родителей. Генетическая информация используется бессознательно в виде безусловных рефлексов. Однако наряду с генетической информацией существует интеллектуальная информация, приобретенная от учителей и/или в результате своего жизненного опыта.

Интеллектуальная информация может быть *априорной информацией* и описываться в виде *априорной вероятности достижения цели*. Если *априорной информации* недостаточно, чтобы до-

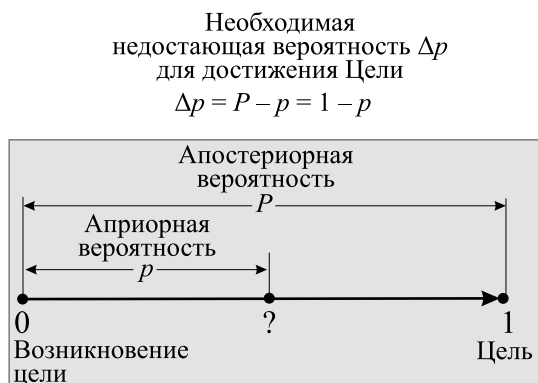


Рис. 14. В предельном случае, когда цель достигнута, апостериорная вероятность $P = 1$, а вероятность отсутствующей информации $\Delta p = 0$.

стичь цель, то живой объект должен получить ее недостающую часть Δp из внешней среды. Цель будет достигнута тогда, когда апостериорная информация P станет равной единице (рис. 14).

Следовательно, через априорную p и апостериорную P вероятности можно выразить ценность полученной информации V , которая позволит достичь поставленную Цель. Например, по Бонгарду и Харкевичу [2, 3] ценность информации равна:

$$V_{B-X} = \log_2(P/p).$$

В.И. Корогодина предложил другую формулу для определения ценности информации [4, 5]:

$$V_K = \frac{P - p}{1 - p}.$$

Причина состояла в том, что ценность информации зависит не только от Цели Субъекта (принимающего информацию), но часто и от Цели Объекта (передающего информацию). Если цель Объекта помешать решению задачи Субъектом, то передаваемая субъекту информация может быть ложной. Если у субъекта отсутствует способность отличать ложь от правды, то лживая информация будет отдалять его на оси времени от решения собственной задачи, порою приводя к трагическим последствиям. Таким образом, ценность

информации в терминах апостериорной вероятности P можно выразить в виде трех предельных ситуаций:

При $P_1 = 1$ наиболее ценная информация, позволяющая сразу решить задачу.

При $P_2 = 0$ информация нейтральная, не имеющая отношение к решению задачи.

При $P_3 = -1$ информация лживая, маскирующаяся под ценную информацию. Если апостериорная информация имеет отрицательное значение, в по формуле Корогодина ее ценность будет отрицательной. Однако если субъект обладает способностью распознать и отличить по каким-либо признакам ложь от правды, он может, приступив к решению задачи, превратить лживую информацию в ценную информацию. Поступая наоборот, он тем самым, вопреки желанию Объекта, может осуществить переход от $P_3 = -1$ к $P_1 = +1$.

Таким образом взаимодействие между Объектом и Субъектом можно представить в виде блок-схемы, представленной на рис. 15.

ПРОБЛЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ СОЗНАНИЯ

Если сознание человека рассматривать как процесс, то это адаптация организма к внешним условиям, т.е. динамический способ формирования внешнего мира в виде виртуальной, информационной модели внутри мозга. Последовательность операций, осуществляемых в сознании, состоит из четырех актов:

Сознание = Рецепция + Память +
+ Мышление + Поведение.

Если из этих актов убрать «память и мышление», то сознание исчезнет, хотя внешнее поведение может сохраниться. При этом информация анализироваться не будет:

Подознание = Рецепция + Поведение.

Окружающий мир предстает перед нами в разных обликах. «Метаморфозы Природы» отображаются в «Метаморфозах модели внутри мозга», также как местность отображается при ее переносе

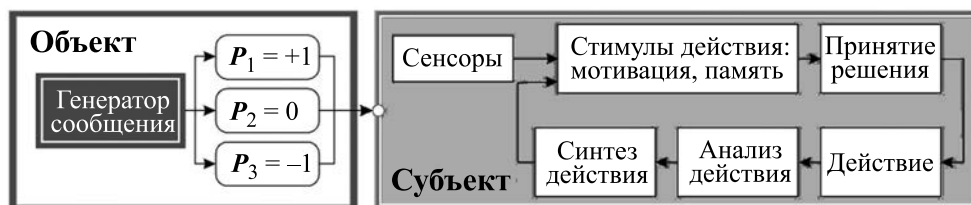


Рис. 15. Блок-схема информационного взаимодействия Объекта и Субъекта. В целом поведенческое действие Субъекта характеризуется целенаправленностью и активным действием. Объект передает информацию, имеющую разный вес с вероятностью P_1 , P_2 или P_3 . В блоке «принятие решения» определяется ценность информации и на ее основе синтезируется действие организма.

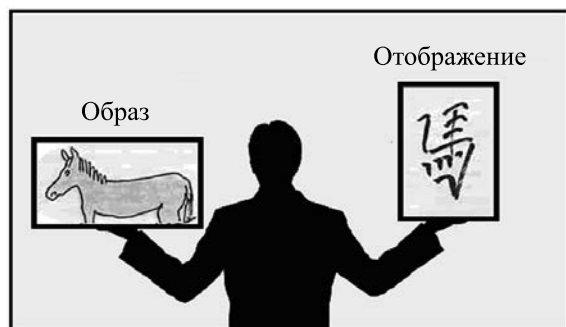


Рис. 16. Реальный образ и его отображение в виде символа — китайского иероглифа.

се на географическую карту. Это отображение условное, выраженное в паттернах, смысл которого посторонний наблюдатель не понимает. Аналогично человек, не знающий китайского языка, не сможет понять переход от образа *лошади* к его отображению в виде иероглифа (рис. 16).

В коре нашего мозга есть области, которые служат представителями наших рецепторных, информационных систем (рис. 17).

Проблема исследования *сознания* состоит в том, что, в отличие от генетики, мы пока в полной мере не знаем код интеллектуальной информации, поскольку исследуем в основном не информационные смыслы, а материальные носители информации. Это аналогично тому, что, желая понять смысл книги, мы будем исследовать не само содержание текста, а состав бумаги и краски, на котором он написан. Мы изучаем в основном носители информации, а не ее смысл. Еще в XIX веке Шарль Пьер Бодлер — французский поэт, классик французской литературы и основоположник символизма — писал:

*Природа — некий храм, где от живых колонн
Обрывки смутных фраз исходят временами,
Как в чаще символов, мы бродим в этом храме,
И взглядом родственным глядит на смертных он.*

Мы знаем точно, что мышление тормозит принятие решения. Крылатым выражением при принятии решений служит высказывание: *нужно подумать или утро вечера мудренее*. Возникает конкуренция между подкорковыми структурами, требующими немедленно действия, и новой корой мозга, тормозящей действие, чтобы предварительно оценить его последствия в существующей внешней среде.

Смысловые паттерны квалиа, например, во снах могут давать разнообразную комбинаторику. Проблема выяснения интеллектуального кода состоит в том, что в отличие от сравнительно стабильного кода тела, записанного на ДНК, код сознания непрерывно меняется под влиянием

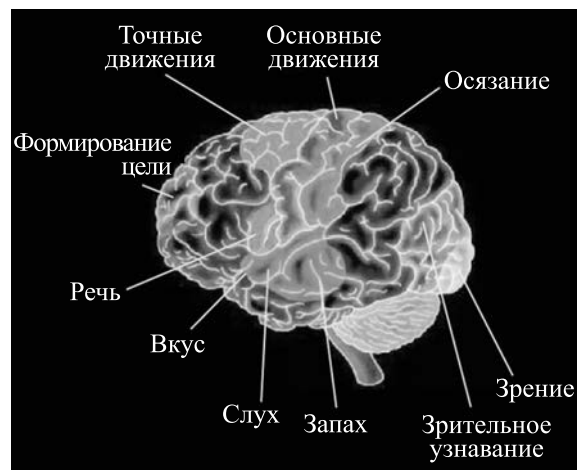


Рис. 17. Представительства информационных систем в коре головного мозга. их часто в англоязычной литературе называют Квалиа, от лат. Qualita «свойство, качество».

внешней среды, возраста и собственных интересов человека. Само выяснение этого кода является некорректной обратной задачей физики, т.е. по «уликам», которые мы наблюдаем в данный момент, необходимо выяснить причины, которые приводят к наблюдаемым «уликам». Такие задачи решаются в обратном порядке причинно-следственных отношений и очень чувствительны даже к небольшим ошибкам измерения. К сожалению, сегодня методы изучения динамических процессов в мозге не позволяют достичь необходимой пространственно-временной точности, т.е. нанометров (10^{-6} мм) в пространстве и долей 10^{-3} с во времени.

ПРЕВРАЩЕНИЕ ОБРАТНОЙ ЗАДАЧИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МОЗГА В ПРЯМУЮ ЗАДАЧУ

Можно попытаться превратить обратную задачу в прямую, выдвинув гипотезу и построив модель взаимодействия кластеров, формирующих паттерны. Затем проверить предсказанные моделью результаты в эксперименте.

Мы выдвинули такую гипотезу, приняв как постулат, что механизмы конкуренции, обработки и запоминания информации на нейронных кластерах можно описать на основе волнового уравнения ФитцХью—Нагумо с кросс-диффузией и кросс-адвекцией, которая в точке является моделью нелинейного маятника Балтазара—Ван дер Поля. Этот постулат был основан на наших экспериментах (проведенных почти 40 лет назад) по наблюдению *автоволнового распространения тепловой активности в изолированном фрагменте мозга* [6].

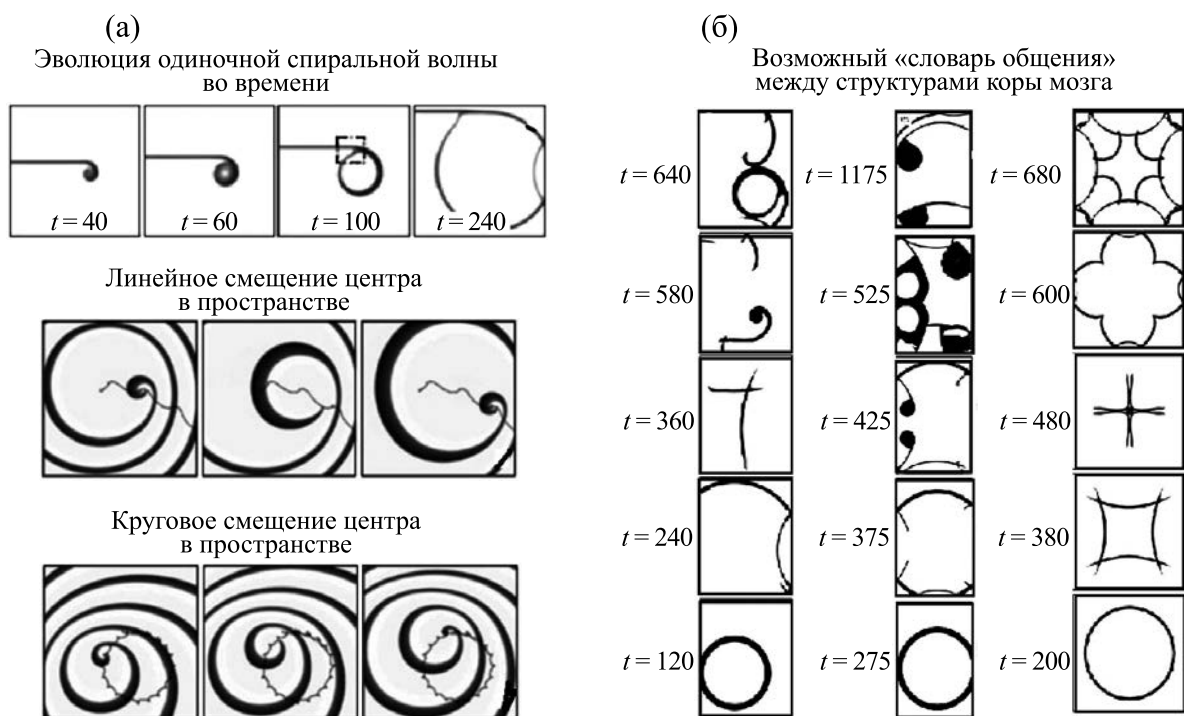


Рис. 18. Изменение во времени и в пространстве электромагнитного поля, создаваемого вокруг аксона при движении по нему импульса возбуждения (а) и возможный «словарь общения» между структурами коры мозга (б).

Математическая модель имеет вид:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = f(u, v) + D_u \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \pm h_u \frac{\partial}{\partial x} \left(Q_u(u, v) \frac{\partial v}{\partial x} \right) \pm j_u \frac{\partial u}{\partial x},$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = g(u, v) + D_v \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} \mp h_v \frac{\partial}{\partial x} \left(Q_v(u, v) \frac{\partial u}{\partial x} \right) \mp j_v \frac{\partial v}{\partial x},$$

где u — это волна, движущаяся с относительной скоростью du/dt , например, в коре мозга, v — это волна, движущаяся, например, в подкорке с относительной скоростью dv/dt . Эти две волны перекрестно влияют друг на друга, изменяя ареал распространения (диффузию) и направление движения (адвекцию) в этом ареале. Волна подкорки стремится ускориться, а волна коры тормозит влияние подкорки. Коэффициенты h и j являются показателями перекрестной связи соответственно для диффузии и адвекции. Процесс, описываемый этими уравнениями, нами был исследован сначала без адвекции, т.е. только с перекрестной диффузией [7], а затем с добавлением адвекции [8]. Было исследовано во времени и в пространстве изменение электромагнитного поля, создаваемого изменением потенциала вокруг аксона при движения по нему импульса возбуждения (рис. 18а). Далее на этой основе по изменению волновых локальных паттернов был состав-

лен возможный «Словарь общения» между структурами мозга (рис.18б).

ВЫВОДЫ

Ограниченность существующих сегодня методов исследования, не позволяет пока подтвердить правильность выдвинутой гипотезы. Позитронно-эмиссионная томография имеет невысокое временное разрешение (≈ 10 с). Электроэнцефалография достигает временного разрешения до 2 мкс, но имеет низкое пространственное разрешение. В результате мы наблюдаем взаимодействие нейронных групп лишь интегрально. Их границы и переходы практически не наблюдаются. Вживление микро-электродов повышает пространственное разрешение, но этот метод — инвазивный и его использовать на человеке нельзя. Наконец, функциональная магнитно-резонансная томография позволяет регистрировать изменение потребления кислорода и, следовательно, скорость метаболических процессов. Ее пространственное разрешение — порядка 1 мм, а временное — порядка 2 с, но этого также недостаточно (рис. 19).

Имеется много косвенных доказательств того, что распространение и изменение электромагнитных полей мозга являются главным способом обработки информации и ее кратковременного

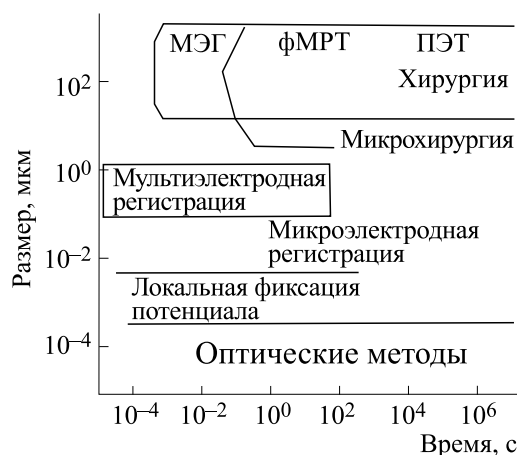


Рис. 19. Диапазон существующих различных физических методов для регистрации пространственно-временного изменения паттернов мозга [9].

запоминания. С помощью сверхпроводящих квантовых интерференционных датчиков можно наблюдать вращение этих полей внутри черепной коробки (рис. 20).

Метод магнитной энцефалографии с использованием сверхпроводящих квантовых интерференционных датчиков при регистрации процессов, происходящих в мозге, может дать значительно больше информации, чем обычная электроэнцефалография или термография, так как кости черепа сильно ослабляют электрические сигналы и тепловое излучение. Однако и у этого метода пространственно-временное разрешение пока недостаточно для расшифровки «разговоров» между нейронными кластерами.

На основании изложенного можно сделать два вывода:

1. *Вывод пессимистический.* По-видимому, человечество вступило в новую, весьма опасную, фазу своего развития, когда виртуальный мир вытесняет реальный мир. Эту ситуацию можно назвать *информационным психозом*, при котором пороги между мирами исчезают. При этом может возникнуть нарушение устойчивости общества.

2. *Вывод оптимистический.* Риски возникали и существовали всегда. Эта ситуация — обычная в развитии человечества, и периодически повторяется. Чрезвычайная эффективность современной науки вселяет оптимизм.

Выбор дальнейшего пути развития человечества становятся главным направлением при использовании синтетических наук, таких как, например, *биофизика*, или, если кому-то больше нравится, то *психофизика*. Здесь уместно вспомнить, что нередко наиболее плодотворными оказываются приложения биофизического форма-

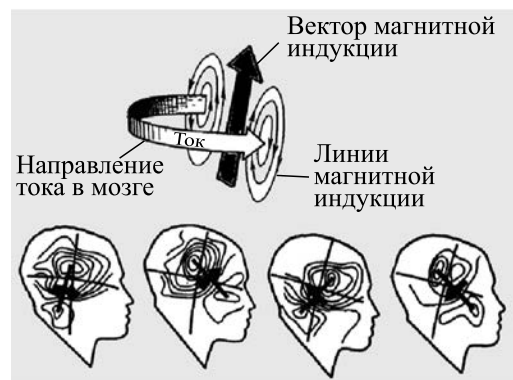


Рис. 20. Пример одного из сравнительно новых методов исследования мозга — магнитная энцефалография с помощью сверхпроводящих квантовых интерференционных датчиков. Регистрируется изменение контуров магнитных полей вблизи поверхности головы, что дает возможность локализовать очаги повышенной электрической активности мозга [10].

лизма к повышению устойчивости систем, о которых никто и не подозревал в начале их создания.

Подробнее с вопросами, затронутыми в данной статье, можно ознакомиться в работах [11–15] и процитированных в них списках литературы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания № 075-01025-23-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Searle, *Behav. Brain Sci.* **3** (3), 417 (1980). DOI: 10.1017/S0140525X00005756
2. М. М. Бонгард, *Проблема узнавания* (Наука, М., 1967).
3. А. А. Харкевич, *О ценности информации*, в сб. Проблемы кибернетики. Вып. 4 (Физматгиз, М., 1960).
4. В. И. Корогодин, *Информация и феномен информации* (Препринт) (Пушино, 1991).
5. В. И. Корогодин и В. Л. Корогодина, *Информация как основа жизни* (Издат. центр «Феникс», Дубна, 2000).

6. Е. Н. Хижняк, А. Г. Брагин, Г. Р. Иваницкий и др., Биофизика, **31** (5), 897 (1986).
7. М. А. Цыганов, В. Н. Бикташев, Дж. Бриндли и др., Успехи физ. наук, **177**, 275 (2007)
8. Е. Р. Zemskov, М. А. Tsyganov, G. R. Ivanitsky, and W. Horsthemke, Phys. Rev. E, **105**, 014207 (2022).
9. Л. В. Доронина-Амитонова и др., Успехи физ. наук, **185**, 371 (2015).
10. Г. Н. Борисюк, Р. М. Борисюк, Я. Б. Казанович и Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук, **172**, 1189 (2002).
11. Г. Р. Иваницкий, А. Б. Медвинский и М. А. Цыганов, Успехи физ. наук, **164**, 1041 (1994).
12. Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук, **187**, 757 (2017),
13. Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук, 188, 965 (2018).
14. Г. Р. Иваницкий и А. А. Морозов, Успехи физ. наук, 190, 1165 (2020).
15. Г. Р. Иваницкий, Успехи физ. наук, **191**, 872 (2023).

The XXI Century: Consciousness and the Brain

G.R. Ivanitskii*

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

The most remarkable result of human creativity in the XXI century is the development of creative android robots equipped with artificial intelligence. The rate of progress made in developing these robots is so fast that it will soon be impossible to distinguish robots from human beings in appearance features. Searching for the difference between humans and robots (tests by A. Turing, J. Searle, etc.) gives rise to a host of difficult questions concerning the common understanding of the definition of the term “consciousness”. However, the similarities between humans and robots can lead to a logical error, i.e., to substitution of actual reality for virtual reality.

Keywords: ways of information processing in the human brain, creative android robots, value of information

ДИСКУССИИ

УДК 577, 929, 378.12

Памяти наших учителей Л.А. Блюменфельда
и С.Э. Шноля посвящается

О БИОФИЗИКЕ И О КАФЕДРЕ БИОФИЗИКИ ФИЗИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ

© 2023 г. В.А. Твердислов*,*, В.И. Лобышев*, Л.В. Яковенко*, М.Г. Гапочка*

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

*E-mail: tverdislov@mail.ru

Поступила в редакцию 30.01.2023 г.

После доработки 30.01.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

*О милых спутниках, которые наш свет
Своим сопутствием для нас животворили,
Не говори с тоской: их нет,
Но с благодарностью: были.*

В.А. Жуковский

*Я прожил жизнь. Не мне судить,
Как прожил — хорошо или плохо,
Но не смогла совсем убить
Меня во мне моя эпоха.*

Л.А. Блюменфельд

*Положение страны в мировой иерархии определяется ее местом
в мировой науке. ... У нас единственный бесценный предмет гордости —
наш интеллект, наша история, наша уникальная многонациональная
культура, наша уникальная природа, наша традиция дружеского общения,
наш язык. Они — основа нашего патриотического чувства.
Они — условия выживания, возрождения и процветания нашей страны...
Независимость и самобытность особенно свойственна людям науки. ...
Интеллектуальная основа общества сохраняется лишь при условии
связи поколений, при непосредственном общении «отцов» и «детей».*

С.Э. Шноль

Перешагнула 63-летний рубеж своей истории первая в мировой науке кафедра биофизики, созданная на физическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова. Ушли из жизни ее создатели: в 2002 г. — профессор Л.А. Блюменфельд, в 2021 г. — профессор С.Э. Шноль. В последних выпусках журнала «Биофизика» была опубликована большая серия статей, подготовленных друзьями, коллегами, учениками и последователями этих выдающихся ученых. Настоящая статья завершает эту подборку. В ней дан краткий исторический обзор становления мировой и российской биофизики как научной дисциплины, рассказано об истории возникновения кафедры биофизики, ее основных достижениях и сформировавшихся в ее стенах научных школах.

Ключевые слова: Московский государственный университет, физический факультет, кафедра биофизики, биофизика в России.

DOI: 10.31857/S0006302923040221, EDN: KOUAUD

Проходят годы и многое, связанное с историей науки в стране и в Московском университете, постепенно стирается в памяти сменяющихся поколений. Это естественный процесс. И мы, к сожалению, непростительно мало знаем и помним о наших замечательных предшественниках. И что еще более нам непростительно, — мы теряем их мысли и идеи.

Перешагнула 63-летний рубеж своей истории первая в мировой науке кафедра биофизики, созданная на физическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова — *у физиков и для физиков*. Ушли из жизни ее создатели: в 2002 г. — профессор Лев Александрович Блюменфельд, в 2021 г. — профессор Симон Эльевич Шноль. В последних номерах журнала «Биофизика» была опубликована большая серия статей, подготовленных друзьями, коллегами, учениками и последователями этих выдающихся ученых. Настоящая статья завершает эту подборку.

«Физическая» биофизика России и Московского университета много старше кафедры и восходит своими истоками непосредственно к именам М.В. Ломоносова, Н.А. Умова, П.Н. Лебедева, П.П. Лазарева. Об этом, как и об истории создания самой кафедры осенью 1959 г., пойдет речь. Это, скорее, не системное исследование, а заметки о давних и недавних событиях. О коллегах.

О БИОФИЗИКЕ

Поначалу о предмете исследования биофизики как науки о живой материи. Исторически и административно биофизику относят к биологии, называя ее разделом биологии, изучающим физические механизмы различных биологических процессов. Это положение справедливо лишь отчасти, поскольку биология по своему существу и умению изучает лишь сами живые системы, а биофизика привносит в науку глубокое понимание общих физических основ исходного формирования и развития живых систем. Известные и цитируемые определения «живого» обычно сводятся к перечислению важнейших биологических признаков (типа клеточного строения, обмена веществ, размножения, естественного отбора и т.д.), к констатации универсальности химического разнообразия живой природы, к упоминанию некоторых общих физических характеристик (типа термодинамической неравновесности, нелинейности и пр.).

Попробуем перейти к более общему определению живого, точнее говоря, предмету науки, которая ранее называлась естествознанием и которым сейчас сквозным образом занимается единственно биофизика, перекрывая свои понимания

с философией: *живое можно охарактеризовать как системную совокупность физических принципов, реализуемых универсальным химическим инструментарием и проявляющуюся в единстве биологических структур и функций, способных к устойчивой эволюции*. Поэтому как раздел биологии биофизика действительно изучает физические аспекты строения и механизмы процессов в живых системах, а как направление физики, как естествознание биофизика раскрывает фундаментальные принципы возникновения, структурной системности и устойчивого развития живых систем. Действительно, в основе всех природных процессов лежат процессы физические, определяемые непреложными законами физики.

Оттого достаточно несостоятельным представляется широко цитируемое определение NASA, выработанное в 1994 г. и применяющееся в задачах поиска жизни во Вселенной: *«жизнь — самоподдерживающаяся химическая система, способная к дарвиновской эволюции»*. Жизнь — далеко не только химическая система в своей основе (!), а механизмы устойчивой эволюции вполне могут быть отличны от дарвиновской модели. Хорошая выборка определений Живого приведена в Интернете в статье «Жизнь» (<https://ru.wikipedia.org/wiki/Жизнь>).

В этом отношении куда более адекватными представляются определения биофизиков М.В. Волькенштейна — *«Живые тела, существующие на Земле, представляют собой открытые, саморегулирующиеся и самовоспроизводящиеся системы, построенные из биополимеров — белков и нуклеиновых кислот»* [1] — и Л.А. Блюменфельда — *«Назовем живыми самовоспроизводящиеся системы, которые способны создавать информацию при взаимодействии с окружающей средой»* [2, 3], а также математика А.А. Ляпунова — *«Жизнь можно охарактеризовать как высокоустойчивое состояние вещества, использующее для выработки сохраняющих реакций информацию, кодируемую состояниями отдельных молекул»* [4].

Еще одно содержательное, информационно-ориентированное и в чем-то эпатажное определение жизни дано Г.Р. Иваницким: *«Жизнь — это система (биосфера), для которой характерна память, способность к направленной подвижности, самовоспроизведению, обмену веществ, регулируемому потоку энергии и к размножению. Жизнь — это результат процесса игры при взаимодействии части системы со своим окружением. В игре у этой части системы появилось свойство запоминать вероятность появления удач и неудач в предыдущих раундах, что дало ей шанс на существование в последующих раундах»* [5].

Существенно, что все эти определения жизни, по существу, идут от биофизического комплекса представлений о предмете живого. Встречающее-

ся в некоторых учебниках и высказываниях определение «*биофизика есть наука о взаимодействиях и механизмах*» не отражает фундаментальной роли физики и биофизики, поскольку вне этого определения *вся биология построена на взаимодействиях и механизмах на всех уровнях живого*.

До начала XIX века биология как самостоятельная наука не существовала, а все науки о живом входили в предмет интересов и пониманий физики. Формальное разделение наук о живом и неживом произошло относительно недавно, а сам термин «биология» был предложен всего 200 с небольшим лет назад — в 1802 г. независимо и одновременно Жаном Батистом Ламарком (1744–1829), французским естествоиспытателем, эволюционистом, великим предшественником великого Чарльза Дарвина (1809–1882), и немецким естествоиспытателем, анатомом и физиологом Готфридом Рейнхольдом Тревиранусом (1776–1837). Для биологии концентрация наук о живом оказалась плодотворной: завершилась систематизация видов, появилось дарвиновское эволюционное учение, физиология, цитология и эмбриология сформировались как системные разделы науки о живом.

Вместе с тем науки о живом всегда были естественным образом вплетены в развитие физики. Ученый мир всегда стремился добраться до основ биологических явлений. Достаточно упомянуть всего лишь несколько имен выдающихся физиков, которые закладывали физический фундамент биофизики и биологии: Рене Декарт (1596–1650), Антони ван Левенгук (1632–1723), Роберт Гук (1635–1703), Исаак Ньютон (1643–1727), Леонард Эйлер (1707–1783), Даниил Бернулли (1700–1782), Пьер Симон Лаплас (1749–1827), Луиджи Гальвани (1737–1798), Алессандро Вольты (1745–1827), Томас Юнг (1773–1829), Юлиус Роберт Майер (1814–1878), Альберт Эйнштейн (1879–1955), Нильс Бор (1885–1962), Эрвин Шредингер (1887–1961) и многие-многие другие. Однако основателем и корифеем современной биофизики все-таки следует считать Германа Людвига Фердинанда фон Гельмгольца (1821–1894), выпускника Военно-медицинской академии в Берлине, лейб-лекаря императора, ставшего выдающимся физиком и биофизиком.

Заметим, что не успели биология и физика размежеваться, как вышла в свет книга «Грамматика науки», написанная английским математиком Карлом Пирсоном (1857–1935) в которой тот дал одно из первых определений биофизики (в 1892 г.): «*Уже теперь представляется несомненным, что некоторые обобщения физики — в особенности великий принцип сохранения энергии — описывают... часть нашего чувственного опыта относительно жизненных форм. Нужна... отрасль науки, имеющая своей задачей приложение законов*

неорганических явлений, физики к развитию органических форм. ... Факты биологии — морфологии, эмбриологии и физиологии — образуют частные случаи приложения общих физических законов. ... Следовало бы назвать ее биофизикой. ... Ей принадлежит большое будущее» [6]. Эта книга, по-видимому, привнесла в научный мир первое системное определение биофизики и принесла Пирсону такой же успех, как и его кривые распределения случайных величин.

С 40-х годов прошлого уже века в биофизике начались разительные перемены. Из линейной и фрагментарно-описательной она становилась «объяснительной». И это было велением времени — совершившая к середине нашего века феноменальный скачок физика активно входила в биологию через представления термодинамики открытых систем, квантовую химию и математическое понимание нелинейных сложных систем. Здесь необходимо вспомнить выдающийся вклад Эрвина Шредингера в биологию, связанный с его книгой «Что такое жизнь с точки зрения физики?» (1944), основанной на лекциях, которые были прочитаны в Дублинском Тринити-колледже в феврале 1943 г. [7]. По версии С.Э. Шноля эти лекции и книга были созданы под впечатлением от статьи Н.В. Тимофеева-Ресовского, Карла Циммера и Макса Дельбрюка, опубликованной в 1935 г. и переданной Шредингеру Паулем Эвальдом в начале 1940-х годов [8]. Статья была посвящена изучению генетических мутаций, которые возникают под действием рентгеновского и гамма-излучений и для объяснения которых автора была развита теория мишеней. Хотя в то время еще не была известна молекулярная природа генной наследственности, взгляд на проблему мутагенеза с точки зрения атомной физики позволил выявить некоторые общие закономерности этого процесса. Работа Тимофеева–Циммера–Дельбрюка была положена Шредингером в основу его книги, которая привлекла широкое внимание сначала физиков, а затем и биологов. Некоторые из них (например, Морис Уилкинс — английский физик и молекулярный биолог, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1962 года совместно с биологом Джеймсом Уотсоном и физиком Фрэнсисом Криком) под ее влиянием решили заняться молекулярной биологией/биофизикой. Ф. Крик также известен тем, что сформулировал доминирующую «центральную догму молекулярной биологии»: генетическая информация передается в клетке в одну сторону, от ДНК к РНК, а затем к белку.

Уже в 1954 г., через год после открытия двуспиральной структуры молекул ДНК, другой великий физик Георгий Гамов понял, что структура белков, состоящих из 20 аминокислот, должна быть зашифрована в последовательности из четырех возможных нуклеотидов, входящих в со-

став молекулы ДНК [9]. Он предположил и рассчитал, что кодоны должны состоять из трех нуклеотидов, чтобы кодонов хватило для всех 20 аминокислот (всего же возможно 64 различных кодона из трех нуклеотидов: на каждую из трех позиций можно поставить один из четырех нуклеотидов). Таким образом, он был первым, кто обосновал кодирование аминокислотных остатков триплетами нуклеотидов. Особая ситуация в отношении возникающей молекулярной биологии складывалась в те годы в СССР. Но именно в нашей стране физики сыграли выдающуюся роль в области развития биологии.

О РОССИЙСКОЙ БИОФИЗИКЕ

Необходимо сказать о наших соотечественниках, которых за труды и идеи следовало бы считать физиками-биофизиками. И, как не трудно догадаться, первым среди них был наш Михаил Васильевич Ломоносов (1711–1765). Будучи последователем Ньютона и приверженцем его представлений о роли эфира в физических и физиологических процессах, он попытался детализировать описание нервного импульса, рецепции и зрения на основе механической модели эфира. В «Слове о происхождении света» он описывает механическую модель эфира, состоящую из малых сфер, имеющих на своей поверхности зубцы, плотно сцепляющие соседние сферы при поворотах и вращении. При этом на движение этих эфирных частиц могут оказывать влияние молекулы различных веществ. *«Вообразив сие основание, — пишет Ломоносов — ясно себе представить можете всех чувств действия и других чудных явлений и перемен в натуре бывающих. Жизненные соки в нервах таковым движением возвещают в голову бывающие на концах их перемены, сцепляясь с прикасающимися им внешних тел частицами. Сие происходит нечувствительным временем, для непрерывного совмещения частиц по всему нерву от конца до самого мозга. Ибо по механическим законам известно, что многие тысячи таких шаровых колес, когда они стоят в совместном сцеплении, непрерывно должны с одним повернутым внешнею силою вертеться, с остановленным остановиться и с ним купно умножить или умалять скорость движения. Таким образом, кислая материя, в нервах языка содержащаяся, с положенными на язык кислыми частицами сцепляется, перемену движения производит и в мозге оную представляет. Таким способом рождается обоняние».* Конечно, с позиций современного знания приведенное высказывание выглядит архаичным. Тем не менее, даже при отсутствии «достаточного запаса опытов», в нем угадываются глубоко осмысленные, пусть интуитивные, представления о фундаментальных свойствах возбудимых биологических систем — цик-

лических процессах, активных средах, автоволновых процессах и т.д.

Российская биофизика формировалась в среде выдающихся русских ученых-естествоиспытателей конца девятнадцатого, начала двадцатого века — физиков, биологов, медиков, тесно связанных с Московским университетом. Среди них были Н.К. Кольцов, В.И. Вернадский, П.Н. Лебедев, И.И. Мечников, П.П. Лазарев, позднее — С.И. Вавилов, А.Л. Чижевский, Н.В. Тимофеев-Ресовский и многие другие.

Удивительна связь между судьбами научных идей и людскими судьбами. Николай Константинович Кольцов (1872–1940), о котором мы уже упоминали выше, выдвинул гипотезу, что признаки, передаваемые по наследству, определяются линейным расположением мономеров в полимерных молекулах, размножающихся по принципу матриц (!). Эта основополагающая идея так бы и была долгое время не замечена, если бы не работы его ученика Николая Владимировича Тимофеева-Ресовского (1900–1981), выдающегося биолога и биофизика. Вместе с физиком-теоретиком Максом Дельбрюком в Германии он начал экспериментальное изучение идеи Кольцова — определения частоты мутаций у дрозофил в зависимости от радиоактивного излучения. Он экспериментально определил размер генома в клетке — его «эффективное сечение захвата». Под влиянием Тимофеева-Ресовского Дельбрюк заинтересовался генетикой фагов. После эмиграции Дельбрюка в США в аспирантуру к нему поступил орнитолог Дж. Уотсон (1928), который, как мы уже упоминали, вместе с английским биофизиком и генетиком Ф. Криком (1916) и М. Уилкинсом (1916), английским биофизиком, в 1953 году создали пространственную модель ДНК — двойную спираль, а в 1962 году получили за эту работу Нобелевскую премию. Мы не забываем, что Розалинда Франклин своей работой над получением рентгенограмм структуры ДНК составила экспериментальную основу этого эпохального движения мысли. Полученные ею снимки отличались особой четкостью и подготовили почву для выводов о структуре ДНК, сделанных Дж. Уотсоном и Ф. Криком.

А истоки идеи матричного синтеза, по крайней мере независимо и впервые, пришли к ним через Дельбрюка и Шредингера от Кольцова и Тимофеева-Ресовского. Заметим, что в конце жизни Николай Владимирович несколько лет преподавал молекулярную биологию, а по существу, — теорию микроэволюции, будущим биофизикам на кафедре биофизики физического факультета.

«Биологическая» биофизика в России естественным образом брала начало от наших славных зоологов, ботаников, физиологов, медиков, в

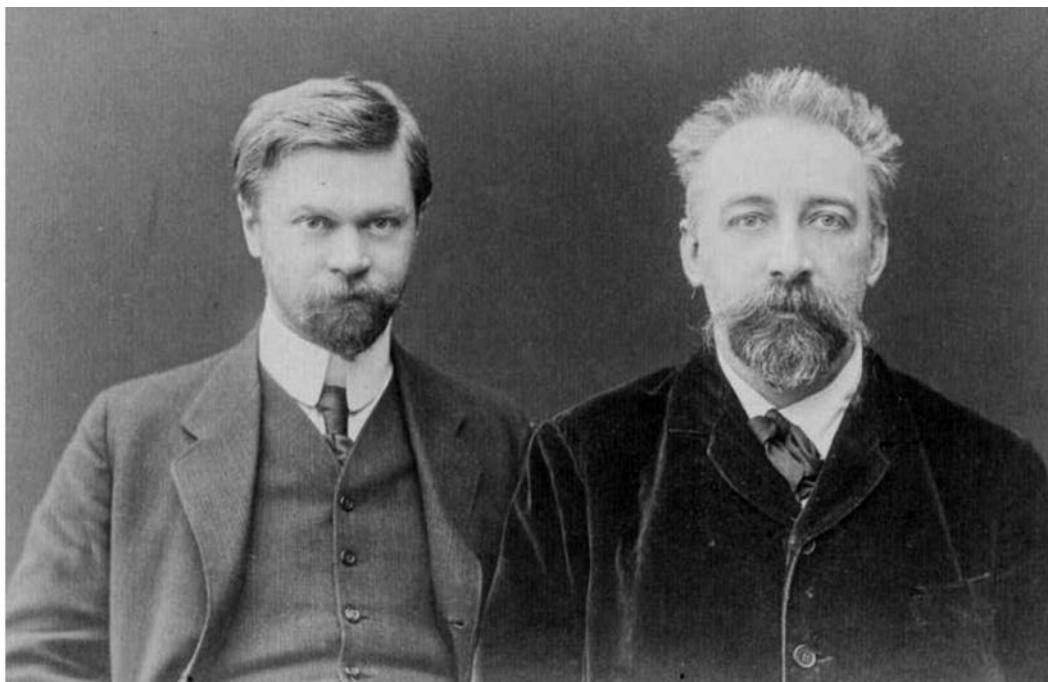


Фото 1. П.П. Лазарев и П.Н. Лебедев (справа), 1911 г.

первую очередь И.М. Сеченова. Это известно и неоднократно описано [10, 11]. История академической биофизики полно описана Г.Р. Иваницким в работе [12].

Сейчас о том, как отечественная «физическая» биофизика создавалась физиками Московского университета. В физической лаборатории, руководимой Петром Николаевичем Лебедевым (1866–1912), создателем русской экспериментальной физической школы, в начальные годы XX столетия проходили семинары (коллоквиумы), посвященные проблемам фотосинтеза. В их организации и проведении участвовал профессор Московского университета, выдающийся физиолог растений и популяризатор эволюционного учения Климент Аркадьевич Тимирязев (1843–1920). Лебедевы и Тимирязевы дружили семьями. Сейчас предмет семинарских обсуждений назывался бы биофизикой фотосинтеза. Обсуждался, в частности, и вопрос относительно зависимости эффективности фотосинтеза от интенсивности и длины волны света. Напомним, что тогда еще не существовало теории относительно энергии светового кванта. Именно с этим вопросом обращался к Тимирязеву тогда еще студент медицинского факультета Петр Петрович Лазарев (1878–1942), впоследствии ученик и соратник Лебедева. В 1901 г. Лазарев окончил медицинский факультет Московского университета. Позднее (в 1903 г.) он сдал экстерном на физико-математическом факультете полный курс физики и математики и остался работать поначалу лаборантом в

лаборатории Лебедева. Позже, уже в 1912 г., Лазарев по представлению своего учителя возглавил его лабораторию. В 1917 г. он был избран первым в России академиком-биофизиком по представлению выдающегося физиолога, Нобелевского лауреата Ивана Петровича Павлова (1849–1936). Им же в 1922 г. был прочитан первый в России лекционный курс под названием «Биофизика» для врачей при клинике Московского университета.

С 1918 г. П.П. Лазарев был главным редактором и издателем журнала «Успехи физических наук», с 1920 по 1931 г. возглавлял созданный по его инициативе и утвержденный специальным декретом Председателя Совнаркома В.И. Ульянова-Ленина Государственный институт биофизики и физики. Лазарев также являлся основоположником медицинской рентгенологии: в его институте имела первая и единственная тогда работавшая рентгеновская установка, на которой сделали рентгеновский снимок В.И. Ленину после покушения на него в 1918 г. Однако Институт биофизики и физики был ликвидирован после ареста Лазарева в 1931 г., а в 1934 г. на его основе был сформирован ФИАН имени Лебедева.

И все же следует заметить, что одним из наиболее выдающихся, мудрым и, странным образом, недооцененным в нашей области знания ученым был Николай Алексеевич Умов (1846–1915). Если Гельмгольц окончательно сформулировал закон сохранения энергии в ин-

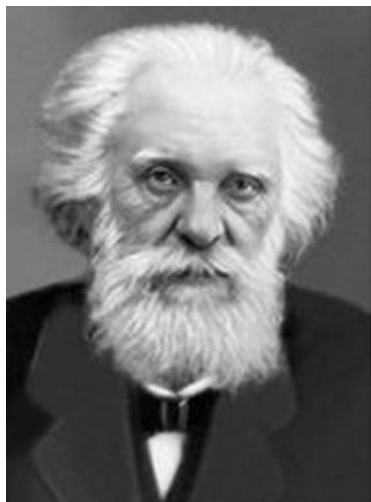


Фото 2. Н.А. Умов.

тегральной форме, то Умов впервые сформулировал его в дифференциальной форме через поток энергии (!). Вместе с Лебедевым он принимал деятельное участие в составлении проекта и организации Физического института при университете, преподавал физику студентам-медикам, был Президентом Московского общества испытателей природы (1897–1915). После смерти А.Г. Столетова в 1896 г. он возглавлял кафедру физики.

Исторически и по неразумению распорядителей науки биофизику относят к разделу биологии. По существу же она вместе с рядом других наук (типа биохимии и молекулярной биологии) составляет куда более широкий комплекс наук о живом. Биофизика по предмету изучения и по методам значительно шире, чем биология: это наука о живых и сопряженных неживых системах, определяющая через физические закономерности возможности, границы и механизмы возникновения и функционирования живых систем. Биофизика — в классическом понимании — естествознание, база наук о живом, где принципы — физические, инструментарий — химический (биохимический), а функции — биологические. Так и Н.А. Умов, выдающийся мыслитель, воспринимал физику как базу наук о живом. Предвосхитив мысли не читавших его трудов создателей термодинамики открытых систем, синергетики, а также многих современных отечественных биофизиков, он языком современной тогда ему науки формулировал «что есть жизнь с точки зрения физики». Он содержательно обсуждал концепцию открытых термодинамических систем и физических машин в живых системах. Чего стоит его яркое принципиальное высказывание, отражающее естественнонаучное предназначение биофизики: *«Переживаемая нами эпоха должна*

служить не къ разъединенію, а къ сближенію задачъ объ организованномъ и неорганизованномъ въ природе. Не только въ области жизни, но и въ области неживой матеріи есть стройность.» (1902 (!) год) [13]. Сейчас бы его слово «стройность» звучало как «симметрия» или «регулярность».

С середины 1920-х годов до послевоенного времени физики Московского университета системно живой природой непосредственно не занимались. Но и здесь необходимо вспомнить Сергея Ивановича Вавилова (1891–1951), младшего брата Николая Ивановича Вавилова (1887–1943), выдающегося биолога, генетика, физиолога растений и географа, президента ВАСХНИЛ (1929) и непримиримого врага Т.Д. Лысенко (1898–1976). Лазарев был научным руководителем Вавилова. В Институте физики и биофизики Вавилов исследовал квантовую природу света при отсутствии приборов для регистрации сверхнизкой интенсивности света. Тогда Лазарев, занимавшийся биофизикой рецепторов и проводивший спектральные исследования чувствительности глаза, предлагает использовать для опытов человеческий глаз — на тот момент наиболее чувствительный физический прибор. В 1932 году вместе со своим аспирантом Павлом Алексеевичем Черенковым (1904–1990) он открывает излучение, возникающее при движении в веществе заряженных частиц со скоростями, превышающими фазовую скорость света в данном веществе (Нобелевская премия за это открытие и теоретическое его объяснение в 1958 г. была присуждена И.Е. Тамму, И.М. Франку и П.А. Черенкову).

К ИСТОРИИ СОЗДАНИЯ КАФЕДРЫ БИОФИЗИКИ НА ФИЗФАКЕ МГУ

Для естествознания 40-х–50-х годов XX века в мировой науке актуальной стала подготовка исследователей с тремя фундаментальными образованиями — физическим, биологическим и химическим. В нашей стране была еще одна важная причина возникновения в 40-е годы тесного союза между биологией и физикой. Теперь мало известно и частью забыто, что именно физика и физики сыграли решающую политическую роль в возрождении современной биологии на переломном этапе истории нашей страны в середине прошлого столетия. И с этой ситуацией как раз и связано создание кафедры биофизики на физфаке.

Начиная с 30-х годов, в 40-е годы, и даже позже, в 50-е годы прошлого века, при Н.С. Хрущеве, политически доминирующим направлением в биологии, науке и образовании, стала «лысенковщина», поддержанная властью и отрицавшая классическую генетику и связанные с нею основы эволюционного учения. Лысенко обещал с помощью своего учения в голодное послевоенное

время быстро накормить страну, против долгой и неопределенной по результатам генетики. А для биологии это явление было частью общего идеологического наступления на «буржуазные, идеалистические» направления в науке. Конкретно, это серьезным образом коснулось и набиравшей силу кибернетики. Насаждение догматических и вненаучных (убедительно бытовых) взглядов академика Т.Д. Лысенко, а также его реально вредоносная деятельность привели после печально известной сессии ВАСХНИЛ 1948 г. к прямым репрессиям в среде генетиков, а в 40-е и 50-е годы к прямому разгрому практически всех передовых биологических и сельскохозяйственных лабораторий, что критическим образом и на многие годы затормозило развитие биологии в СССР. А происходило это в то время, когда уже с 1953 г. (!) были известны структура ДНК и молекулярный смысл генетического кода. Ученые неоднократно обращались с письмами к руководству страны о недопустимости подобного положения в биологической науке, но безрезультатно. Тогда группа передовых биологов стала в инициативном порядке готовить обращение к руководству страны. Но главной силой, решительно вставшей против лысенковщины, стали десятки ведущих физиков, в том числе большая группа выдающихся академиков, работавших на физфаке.

Напомним, что «идеологизированные» представители марксистской философии начали наступление и на «идеалистические корни» квантовой механики, т.е. на фундаментальные основы физики. За квантовой физикой стояли атомное оружие, твердотельная радиоэлектроника, науки о материалах. Активные нападки начинались и на новейшие направления квантовой химии. В 1955 г. группой ученых, современно образованных и осведомленных, преимущественно ленинградских, было подготовлено письмо-обращение в ЦК КПСС, которое подписали около 300 человек, среди которых значительное большинство составляли физики. Можно назвать имена некоторых наших выдающихся ученых, поднявших свой голос в защиту отечественной науки. Это были академики Л.Д. Ландау, И.Е. Тамм, М.В. Келдыш, Г.С. Ландсберг, А.И. Фрумкин, П.Л. Капица, А.И. Алиханов, Ю.Б. Харитон, М.А. Леонтович, М.А. Арцимович, А.Н. Тихонов, М.А. Лаврентьев, С.Л. Соболев, С.А. Христианович; В.Л. Гинзбург, Я.Б. Зельдович, М.А. Марков, А.И. Алиханьян, И.Я. Померанчук, А.И. Шальников, А.Б. Мигдал, Г.Н. Флеров и многие другие.

Н.С. Хрущев, на тот момент первый секретарь ЦК КПСС и председатель Совета Министров СССР, был крайне раздражен этой несанкционированной инициативой, но, обладая необразованным, но рациональным умом, понемногу стал сдерживать Лысенко и отодвигать его от управления наукой. Как раз в это время физики через во-

енные лобби создали несколько научных центров, где поднялись ростки современной молекулярной биологии: на Урале в Миассово, в Москве в Курчатовском центре, в Обнинске. Тогда же стране требовалось создание независимого образовательного подразделения в смежных областях биологии и физики. Два Нобелевских лауреата, академики И.Е. Тамм и Н.Н. Семенов, при деятельном участии А.И. Шальникова, впоследствии тоже академика, в 1959 г. обратились к ректору МГУ математику И.Г. Петровскому с предложением создать кафедру биофизики на физическом факультете, первую в научном мире кафедру биофизиков у физиков, а не у биологов или медиков.

На биологическом факультете МГУ кафедру биофизики создали в 1953 г., ориентируя ее на медико-биологические, радиологические и, отчасти, космические направления. В становлении кафедры участвовали академики А.А. Красновский, А.Н. Теренин, Г.М. Франк, член-корреспондент АН СССР А.М. Кузин. Ее основателем был доктор биологических наук, биохимик по роду занятий, профессор Борис Николаевич Тарусов. К общепризнанным научным заслугам Б.Н. Тарусова следует отнести исследования в области физико-химических механизмов адаптации, радиационной биофизики, теории цепных реакций при перекисном окислении липидов и их роли в жизнедеятельности организмов и при развитии патологических процессов. Он был одним из первооткрывателей сверхслабого свечения у растений и в тканях животных в видимой области спектра. С первых дней кафедра биофизики биологического факультета МГУ является бесспорным флагманом отечественной биологической биофизики, сотни ее выпускников успешно работают в области биофизики и физико-химической биологии. С 1976 г. кафедру возглавляет профессор Андрей Борисович Рубин, известный биофизик, доктор биологических наук, академик РАН (2022). А.Б. Рубин – автор множества статей, монографий и классических учебников в области биофизики [14]. На наш взгляд, лучшими учебными пособиями в стране стали и учебники Г.Ю. Ризниченко по математическому моделированию в биологии [15].

Ректор МГУ И.Г. Петровский и декан физического факультета В.С. Фурсов поддержали инициативу физиков по созданию «физической» биофизики, и в ноябре 1959 г. была заложена сначала специализация, затем межкафедральная лаборатория, а следом и кафедра биофизики. Руководить кафедрой по предложению названных академиков предложили физико-химику Л.А. Блюменфельду, а в качестве преподавателей пригласили биохимика С.Э. Шноля и физиолога И.А. Корниенко. Следует отметить очень важное обстоятельство, связанное с созданием кафедры



Фото 3. Л.А. Блюменфельд.

на физическом факультете: среди студентов тогда же возникла встречная инициатива по созданию физической специализации «биофизика». Они же и стали первыми студентами и аспирантами кафедры, частью перейдя на нее с других направлений.

Л.А. Блюменфельд (1921–2002) является реальным создателем кафедры биофизики, возглавлявшим ее в течение 30 лет [16]. Л.А. Блюменфельд — участник Великой отечественной войны. После окончания химического факультета МГУ учился в аспирантуре Физико-химического института им. Карпова. На кафедре биофизики он многие годы читал курсы лекций «Физическая химия», «Квантовая химия и строение молекул», «Избранные главы биофизики». Л.А. Блюменфельд — ученый с мировым именем, автор более 200 работ, в том числе шести монографий. Его небольшая книга-завещание «Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики» до наших дней является одним из самых ярких научных трудов, определивших движение российской биофизики в XXI веке [3].

Его исследования были связаны с методами радиоспектроскопии (им был создан первый в стране ЭПР-спектрометр для биологических исследований), его интересы охватывали широкий круг вопросов — от проблем термодинамики, теории информации в биологии до изучения механизмов ферментативного катализа, фотосинтеза и окислительного фосфорилирования.

В 2001 г. Л.А. Блюменфельд совместно с В.А. Твердисловым и А.Н. Тихоновым был удостоен Ломоносовской премии за научные исследования в области биологических энергопреобразующих молекулярных машин.

Научные интересы Л.А. Блюменфельда в значительной степени определили научные направления, представленные на кафедре биофизики физического факультета МГУ, — физические основы строения, функционирования и регуляции биологических систем на молекулярном, клеточном и т.д. уровнях, вплоть до биосферного. В подобном понимании биофизика, включающая математическое моделирование фундаментальных биологических процессов и синергетические подходы, на его взгляд, состоялась как теоретическая биология. Следует отметить, что в научных направлениях, развиваемых на кафедре биофизики и в работах ее выпускников, представлены практически все направления современной биофизики и биологии. В последние годы на кафедре успешно ведутся работы в области медицинской биофизики, биофизической экологии и нанобиотехнологий.

Более полувека существования кафедры курсы лекций по биохимии и истории биологии читал доктор биологических наук профессор Симон Эльевич Шноль (1930–2021), окончивший в 1951 г. Московский университет по кафедре биохимии животных (в последние годы биохимию преподает профессор, член-корреспондент РАН



Фото 4. С.Э. Шноль.

М.А. Пантелеев). Совместно с коллегами С.Э. Шноль в течение десятилетий изучал колебательные процессы и космофизические эффекты в биологических и физико-химических системах, изотопные эффекты в биологических системах, разрабатывал новые нетривиальные подходы в теории биологической эволюции. Он — автор более чем 200 работ, в том числе четырех монографий. С.Э. Шноль — выдающийся популяризатор науки, блестящий рассказчик, остроумнейший и эрудированный дискуссиант. Его многократно переиздававшаяся книга «Герои, злодеи и конформисты российской науки» является одним из отечественных шедевров научно-исторического исследования [11]. Именем С.Э. Шноля названа малая планета Солнечной системы.

С.Э. Шноль обладал удивительной интуицией в науках, также определившей на многие десятилетия научные направления кафедры биофизики. Именно он привнес на кафедру идеи изотопии в биологии и эволюции, идеи слабых воздействий и малых концентраций, осознание физико-химических принципов естественного отбора и эволюции, идеи биологических часов и колебательных процессов в живых системах, понятия автоволновой самоорганизации в биологии через возрож-

денную им реакцию Белоусова (в настоящее время именуемую реакцией Белоусова–Жаботинского), а также нераскрытые пониманием до сих пор идеи относительно роли космофизических факторов в развитии Вселенной, в том числе живой материи.

Вскоре после ее создания на кафедру биофизики перешли работать с кафедры физики колебаний два замечательных радиофизика — Г.Н. Берестовский (1929–2010) и А.Н. Заикин (1934–2019). Оба они на протяжении многих лет занимались проблемами возбудимых сред, вопросами теоретического и экспериментального изучения волновых процессов в мембранах растительных и животных клеток (Берестовский) и динамики автоволновой самоорганизации в химических средах, в морских нейстонных и почвенных популяциях микроорганизмов (Заикин). В 1964 г. Г.Н. Берестовский и А.Н. Заикин вместе с С.Э. Шнолем переехали работать в Пушкино в Институт биологической физики, где успешно работали в течение многих лет. Следует добрым словом вспомнить и других сотрудников первых лет кафедры: лаборанта Е.В. Денисенко, лаборанта Н.А. Смирнову, мастера С.Н. Чернова, инженера А.П. Репкина, техника В.Н. Леонову. Несколько позже пришли работать на кафедру мастером — Г.А. Денисенко, лаборантом — О.А. Крутоверцева. Эти интеллигентные, самоотверженные, дружелюбные люди составили животворящую основу тогдашней экспериментальной жизни кафедры и в значительной степени сформировали ее традиционную доброжелательную атмосферу.

В первые же годы из сферы атомной физики пришла работать на кафедру Г.Н. Зацепина, многие годы развивавшая направление, связанное с биофизикой водных систем. Галина Николаевна была замечательным ученым и педагогом, человеком ярким и творческим. Ею, совместно с С.В. Тульским (бессменным, после ухода И.А. Корниенко, заместителем заведующего кафедрой профессор Л.А. Блюменфельда) были разработаны биофизические принципы создания терапевтических приборов, способствующих регенерации костных тканей с помощью низкочастотных электрических токов.

Первыми аспирантами со специализацией «биофизика» стали выпускники других кафедр физического факультета С.В. Тульский, И.Г. Харитоненков, Э.К. Рууге и, годом спустя, — биофизик А.Ф. Ванин. На их долю выпала масса работы по оборудованию кафедры, вследствие чего исследовательская работа и защиты диссертаций задерживались. Ими даже был основан «Тайный союз незащитившихся аспирантов Блюменфельда». Тем не менее, с задержкой примерно на два года, все они успешно защитили кандидат-

ские диссертации и впоследствии блестяще проявили себя в науке. И.Г. Харитоненков выполнил ряд замечательных работ в области вирусологии, А.Ф. Ванин впервые начал систематическое изучение физико-химических характеристик нитрозильных комплексов железа и биофизических аспектов воздействия метаболитов оксида азота на живые системы [17]. В результате многолетних исследований им было доказано, что динитрозильные комплексы железа с тиольными лигандами играют значительную роль в функционировании оксида азота в организме как в норме, так и при патогенезе многих заболеваний. В контакте с А.Ф. Ваниным успешно развивает это направление исследований профессор кафедры биофизики Э.К. Рууге.

Выпускник кафедры биофизики А.М. Жаботинский (1938–2008), будучи аспирантом Л.А. Блюменфельда, по предложению профессора С.Э. Шноля в 1961 г. приступил к изучению механизмов гомогенной цветной колебательной реакции, открытой химиком Б.П. Белоусовым в 1951 г. и получившей впоследствии всемирную известность под названием «реакция Белоусова–Жаботинского». Выпускники кафедры В.А. Вавилин и М.Д. Корзухин, а также А.Н. Заикин приняли самое активное участие в проведении экспериментального и теоретического исследования реакции. Что чрезвычайно существенно, были изучены точечный колебательный и пространственно-распределенный автоволновой и хаотический режимы. Несмотря на то, что к тому времени были известны некоторые колебательные процессы, особенно в гетерогенных системах, именно эта реакция стала базовой демонстрационной системой в системно формировавшейся тогда науке о самоорганизации – синергетике. За это выдающееся исследование в 1980 г. А.М. Жаботинскому и А.Н. Заикину совместно с их коллегами Г.Р. Иваницким и В.И. Кринским была присуждена Ленинская премия – высшая научная награда в СССР.

В 1962 г. в аспирантуру кафедры поступил ее выпускник А.К. Кукушкин, целеустремленный и широко образованный биофизик. Прошел путь от научного сотрудника до профессора. Им была детально исследована взаимосвязь первичных процессов фотосинтеза с транспортом и запасанием продуктов фиксации CO_2 , показана важная роль неорганического фосфата для регуляции метаболизма углерода. Были рассчитаны квантовые характеристики компонент системы «пластохинон–гистидин», моделирующей начальный этап сопряжения переноса электрона и протона, получены энергетические уровни и волновые функции протона в этой системе для различных состояний восстановления пластохинона. На основании результатов расчета была высказана гипотеза

о молекулярном механизме сопряжения протонного и электронного транспорта в реакционном центре фотосистемы II высших растений и хроматофорах бактерий. А.К. Кукушкин ушел из жизни в 2015 г.

Многие годы рядом с ним работал старший научный сотрудник М.К. Солнцев, удивительно светлый, доброжелательный и надежный человек (скончался в 2011 г.). Он исследовал первичные процессы фотосинтеза люминесцентными методами, влияние ряда физико-химических факторов (гербицидов, фунгицидов, стимуляторов роста, антиоксидантов, тяжелых металлов, газового состава окружающей среды и др.) на процессы запасаения и трансформации энергии зелеными растениями. Им было проведено сравнительное исследование люминесцентных и физиолого-биохимических показателей здоровых и зараженных растений, обработанных регуляторами роста, антиоксидантами и фунгицидами, установлена взаимосвязь этих показателей с фотосинтезом.

Первым преподавателем биологии на кафедре биофизики стала Н.А. Ляпунова, привлекая к обучению физиков биологии преподавателей восьми кафедр биофака, заложившая замечательные традиции практики на Беломорской биологической станции МГУ. Ее традиции продолжила М.Н. Виленкина, сейчас преподавание организует Л.Л. Меньшенина. Заметим, все они – выпускницы кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ.

В 1989 г. заведующим кафедрой биофизики, сменившим профессора Л.А. Блюменфельда, стал заслуженный профессор МГУ, доктор физ.-мат. наук В.А. Твердислов, зачисленный в ее штат лаборантом в феврале 1964 г. после окончания кафедры.

Об основных современных направлениях научных исследований на кафедре биофизики и о ее сотрудниках рассказано в следующем разделе.

НАУЧНАЯ ШКОЛА ФИЗФАКОВСКОЙ БИОФИЗИКИ

Более чем за 60 лет своего существования кафедра подготовила примерно 1000 биофизиков. Сложилась признанная в мировом научном сообществе учебная (бакалавриат + магистратура/специалитет) и научная школа биофизики. На уровне высших мировых стандартов студентам-физикам в течение четырех лет в дополнение к физике и математике системно и полно преподаются курсы биологии и физиологии, общей химии, физической и квантовой химии, биохимии, молекулярной биологии, микробиологии, физики биомакромолекул, биоэнергетики, биоинформатики, биофизики макросистем и экологии, методов математического моделирования, си-

стемной биофизики, биомеханики, экспериментальных методов в биофизике, медицинской биофизики и многие другие. Все годы сотрудники биологического факультета терпеливо учат наших физиков основам биологии — цитологии, эмбриологии, ботанике. Биологическое образование завершается на Беломорской биологической станции МГУ, где после окончания третьего курса студенты-физики проходят полноценную биологическую практику. Выпускники кафедры получают глубокое, поистине университетское, всестороннее образование в области физики, биофизики, физико-химической биологии, медицинской биофизики.

В научном отношении кафедра биофизики представляет собой разносторонне направленное научное учреждение, осуществляющее плодотворное сотрудничество со многими академическими и медицинскими организациями. Принципиальной особенностью кафедры как научной школы является традиционное сочетание разработки глубоких фундаментальных проблем происхождения, формирования и развития живых систем, изучения важнейших структур, процессов и функций живой материи на всех уровнях ее организации (от молекулярного до биосферного) и практических медико-биологических применений. Значительными достижениями кафедры можно считать разработку механизмов автоволновой самоорганизации в активных химических и биологических средах, физических механизмов фотосинтеза, теории молекулярных биологических машин, биофизических основ функционирования цитоскелета клеток и систем свертывания крови. Известны работы в области нанобиотехнологий.

Развитие физических идей в концепции биологических машин, высказанной Н.А. Умовым в начале XX столетия, в России уже в 60-е годы прошлого века было связано с появлением известной работы С.Э. Шноля, Ю.И. Хургина и Д.С. Чернавского [18]. Наиболее глубоко эти идеи были развиты Л.А. Блюменфельдом в ряде статей и монографий [19–21].

Сам Лев Александрович считал, что физической основой его выхода на машинную тематику послужили работы К. МакКлэра [22–24]. Начиная с 40-х годов, стало ясно, что преобразование энергии в фотосинтетических системах и в системах окислительного фосфорилирования митохондрий основано на работе мембранных молекулярных машин. Как раз этими проблемами занимаются ученики профессора Л.А. Блюменфельда профессора Э.К. Рууге и А.Н. Тихонов, базируя свои экспериментальные работы на методах магнитной спектроскопии, в частности, ЭПР.

Э.К. Рууге детально изучил участие свободно-радикальных центров и парамагнитных металлокомплексов в процессах энергетического метаболизма в клетках сердечной мышцы при гипоксии и реоксигенации. Им показано, что защитное действие природных хиноидных соединений и полифенолов, а также нитрозильных комплексов железа против активных форм кислорода и азота обусловлено антиоксидантными свойствами этих соединений. Физиологически наиболее значимые метаболиты оксида азота — динитрозильные комплексы железа — проявляют свое защитное действие на клетки сердечно-сосудистой системы как антиоксиданты при разных значениях парциального давления кислорода, включая условия глубокой гипоксии, характерные для острой сердечной недостаточности [25].

Профессор А.Н. Тихонов, выпускник кафедры, работающий на ней после окончания аспирантуры с 1975 г., успешно исследовал ключевые факторы регуляции фотосинтетического транспорта электронов и протонов, сопряженного с синтезом АТФ в хлоропластах растений. Им применительно к данной системе предложена и развита концепция «белок—машина»: теоретически и экспериментально обоснованы представления о физических механизмах функционирования белков и белковых комплексов как макромолекулярных машин, обеспечивающих преобразование и запасаение энергии в энергопреобразующих органеллах живой клетки (хлоропластах и митохондриях) [26, 27].

Профессор В.А. Караваев многие годы развивает экологические приложения фундаментальных исследований, связанных с фотосинтезом. Им систематически исследуется функциональная связь естественных и антропогенных физико-химических воздействий внешней среды на тонкие механизмы регуляции фотосинтеза у высших растений [28–30].

С марта 1967 г. был зачислен инженером выпускник кафедры В.И. Лобышев, ныне ее профессор. С первых дней существования кафедры фундаментальные проблемы строения воды и водных растворов, в частности их взаимодействия с биологическими структурами, а также изотопных эффектов, занимали одно из центральных мест [31]. В.И. Лобышев как раз и является двигателем этого направления, и именно ему в значительной степени принадлежит обретающая силу принципиальная концепция о долговременных неравновесных состояниях воды и водных растворов, имеющая прямое отношение к проблемам слабых воздействий и малых концентраций. В.И. Лобышевым на различных биологических объектах обнаружено аномальное активирующее влияние небольших вариаций концентраций дейтерия в воде относительно его

природного содержания, в том числе в регенерации гидроидов, что может быть значимо для отдельных направлений медицины. Показано, что вода, специфически связанная с биополимерами, стабилизирует белки и липидные мембраны. Он также продемонстрировал образование мезоструктур в сильно разбавленных водных растворах, проявляющееся, в частности, в появлении фотолюминесценции в растворах веществ, не обладающих собственной флуоресценцией. Интенсивность свечения не подчиняется закону С.И. Вавилова и является немонотонной функцией концентрации растворов. Область возбуждения излучения — примерно 100 нм. Также наблюдается длительная эволюция спектров фотолюминесценции таких растворов, и в подобном неравновесном состоянии проявляется высокая чувствительность к слабым внешним электромагнитным полям. Эти наблюдения радикально изменяют наши представления о разбавленных растворах и служат обоснованием нового направления — водные разбавленные растворы как самоорганизующаяся система [32, 33].

Научные проблемы, которыми занимаются сотрудники кафедры биофизики, чрезвычайно разнообразны, но объединены общими представлениями о системном единстве физических подходов к изучению различных биологических проблем, идеями самоорганизации. Многие годы профессор Л.В. Яковенко, выпускник кафедры, совместно с В.А. Твердисловым изучает проблему возникновения предшественников живых клеток на Земле в ходе начальных стадий биопоза [34, 35]. Ими развиты основные положения гипотезы о происхождении предшественников клеток в ходе предбиологической эволюции на границе раздела «океан—атмосфера». Показано, что неравновесная поверхность Мирового океана обладает физико-химическими свойствами, обеспечивающими ионную асимметрию, фракционирование энантиомеров аминокислот, нуклеиновых оснований и формирование замкнутых везикул, т.е. условия, необходимые для самопроизвольного возникновения предшественников клеток. В подходе к решению данной проблемы также продуктивными оказались представления об автоволновой самоорганизации [36].

Фракционирование физиологически важных ионов в неживых неравновесных и нелинейных системах сменилось в ходе биологической эволюции появлением и работой мембранных молекулярных машин — ионных насосов. Л.В. Яковенко предложена физическая модель функционирования Na^+ -насоса клеточных мембран. Основная идея состоит в том, что фермент представляет собой два ионных канала, работающих сопряженно: высоты трех потенциальных барьеров внутри каналов для ионов каждого типа (натрия и калия)

изменяются синхронно, при этом в одном из состояний системы возможен внутренний обмен ионами между каналами. Этот наиболее общий подход к описанию активного транспорта ионов в мембранах вошел в ряд учебников по биофизике [10]. Кроме того, им разработаны модель конформационной релаксации белковой глобулы после быстрого локального возмущения (совместно с Л.А. Блюменфельдом и В.А. Намиотом), модель одноионного канала и метод реконструкции энергетических барьеров и их флуктуаций по вольтамперной характеристике (совместно с В.А. Намиотом и Б.И. Ходоровым), кинетическая модель реакций, катализируемых ферментом с медленными конформационными изменениями (совместно с В.В. Пешехоновым) [21, 37, 38].

Физические идеи автоволновой самоорганизации в биологических системах нашли свое яркое воплощение в работах другого выпускника кафедры, Ф.И. Атауллаханова, ныне ее профессора и академика РАН. Атауллахановым и его коллегами было показано, что распространение фронта свертывания крови подчиняется тем же законам, что и распространение нервного импульса или фронта горения. Кровь — активная среда необычного типа. Существенное отличие системы свертывания крови состоит в том, что она умеет останавливать распространение таких волн. Это открытие привело к формированию новых представлений о том, как протекает процесс свертывания. Оказалось, что за разные фазы процесса формирования сгустка (активацию, распространение, остановку) отвечают разные метаболические блоки реакций. Были предсказаны новые реакции, играющие ключевую роль в финальной фазе формирования сгустка — его остановке [39, 40]. Исследования свертывания крови фактически привели к возникновению нового направления теории «активных сред» и синергетики.

Микротрубочка — молекулярный мотор цитоскелета. Под руководством Ф.И. Атауллаханова создана модель микротрубочки, позволяющая теоретически рассчитать силы, развиваемые деполимеризующейся микротрубочкой. Оказалось, что эти силы настолько велики, что могут полностью обеспечить движение хромосом в митозе без участия молекулярных моторов известного типа наподобие сократительных или мембранных транспортных АТФаз. Проведенные эксперименты подтвердили предсказания модели. В сотрудничестве с коллегами из США Ф.И. Атауллахановым и Н.Б. Гудимчуком в последние годы был обнаружен и теоретически обоснован новый механизм полимеризации микротрубочек, реализующийся путем смыкания изогнутых протофиламентов на растущем конце [41, 42]. Поведение ансамбля таких необычных

механохимических преобразователей в процессе формирования и развития веретена деления приводит, видимо, к необычным механизмам самоорганизации, которые являются в настоящее время предметом исследований.

Тромбоциты являются центральным звеном системы гемостаза, которая отвечает за остановку кровотечения при ранениях и кровоизлияниях любой природы. Одна из интригующих загадок — почему тромбоциты при активации переходят в разные функциональные состояния? Тема гетерогенности тромбоцитов оказалась в центре внимания сотрудников кафедры с середины 2000-х годов, когда появились первые доказательства того, что есть, как минимум, две популяции активированных тромбоцитов с радикально разными свойствами. Научная группа, возглавляемая профессором М.А. Пантелеевым и А.Н. Свешниковой, активно участвовала в процессе идентификации этих двух субпопуляций и позднее выявила механизм агрегации, с помощью которого прокоагулянтные тромбоциты включаются в агрегаты и тромбы [43–45].

Было установлено, что субпопуляций на самом деле может быть больше двух, были выявлены основные сигнальные пути, ведущие к их формированию. В 2015 г. Пантелеевым и Свешниковой была предложена теория формирования гетерогенности в ответе тромбоцитов, спустя год подтвержденная экспериментально. Исследователи установили механизм модуляции этого процесса через пуринорецепторы, выявили механизмы инактивации адгезионных рецепторов в субпопуляции сверхактивированных тромбоцитов, а также физиологический смысл двухрецепторной схемы активации тромбоцитов тромбином. В рамках этого направления была обнаружена активация контактного пути свертывания на прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов, неравномерность прокоагулянтной активности на поверхности этих клеток. На основании этого была разработана математическая модель их участия в свертывании крови [46, 47].

Д.Ю. Нечипуренко предложил механохимический механизм, связывающий наблюдаемую специфичность расщепления ДНК ультразвуком с конформационной подвижностью дезоксирибозы в составе молекулы. Показано, что наблюдаемая специфичность расщепления ДНК ультразвуком является универсальным механическим свойством данной молекулы, которое проявляется во всех известных механических подходах к фрагментации двунитевых молекул ДНК. В цикле его исследований, посвященных механизмам свертывания крови, было продемонстрировано, что миозин-зависимая контракция артериального тромба является причиной механического вытеснения прокоагулянтных тромбоцитов на его

периферию и приводит к гетерогенной структуре внешней части тромба [48]. На основе экспериментальных данных о взаимодействии тромбоцитов с фактором фон Виллебранда и друг с другом была построена стохастическая модель тромбообразования, учитывающая ключевые особенности межтромбоцитарных взаимодействий. При помощи данной модели было показано, что именно стохастическая природа взаимодействия слабоактивированных тромбоцитов позволяет объяснить наблюдаемую пластичность оболочки тромба [49].

Научная группа, возглавляемая А.В. Беляевым, работает над созданием оригинальной теории регуляции роста тромба в артериях и микрососудах. Созданная математическая модель впервые продемонстрировала особенности влияния гидродинамических сил, действующих на тромб и играющих решающую роль в микрососудах (артериолах и венах). Показано, что размер области и форма повреждения стенки микрососуда влияют на динамику роста тромба и его конечный размер [50]. Согласно данным проведенного компьютерного моделирования, гидродинамические силы также оказывают регуляторное воздействие на клеточном и молекулярном масштабах [51]. Эти данные, а также сама математическая модель уже используются медиками и инженерами для оценки рисков окклюзии (закупорки) сосудов тромбом в разветвленных системах кровеносных микрососудов.

В 2015–2018 гг. сотрудники кафедры Е.Ю. Симоненко, С.А. Яковенко, В.А. Твердислов участвовали в масштабном проекте МГУ «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем — Ковчег», поддержанным Российским научным фондом. Проект признан Ведущей научной школой МГУ. Это исследование послужило основанием для развития еще одного направления кафедры — криобиологии. За последние годы Е.Ю. Симоненко и С.А. Яковенко совместно с науч. сотр. кафедры А.А. Ивановой, студентами и аспирантами разработали новый системный подход к созданию криопротекторных сред для повышения эффективности криоконсервации культур клеток, основанный на анализе изменений термодинамических характеристик растворов на всех этапах их формирования, с учетом их влияния на целостность и жизнеспособность клеток. На основании разработанных дополнительных анализов клеточных структур, таких как фрагментация ДНК, целостность мембран, группой предложен ряд модификаций протоколов криоконсервации клеток, позволяющих повысить их выживаемость после цикла заморозки-разморозки. Работы в данном направлении успешно развивались кафедрой биофизики на базе клиники репродуктивных технологий «АльтраВита», возглавляемой

С.А. Яковенко. Эти работы служат научной основой еще одного активно развивающегося направления в деятельности Московского университета — Научно-образовательной школы «Космос» по направлению «Астробиология» [51–53].

Научной группой, возглавляемой Е.А. Генераловым, были выделены и охарактеризованы различные полисахаридные молекулы, обладающие перспективными биологическими активностями: иммуномодулирующей, радиопротекторной, регенераторно-репараторной, адаптогенными и другими. Были получены также результаты, свидетельствующие о наличии бифуркационных и метастабильных состояний в клетках, что может быть использовано для создания нового класса фармакологических веществ с разнонаправленными активностями [55, 56].

Разработка биофизических принципов создания функциональных наноструктур также является одним из важных научных направлений кафедры. Г.Б. Хомутов развивает исследования, связанные с разработкой эффективных подходов к созданию функциональных наноматериалов и наносистем с использованием биомиметических синтетических стратегий, основанных на принципах самосборки, самоорганизации и методах нанобиоинженерии. В частности, им получены и исследованы биомиметические системы одноэлектронного туннельного транспорта на основе пленок Ленгмюра–Блоджетт, содержащих встроенные в структуру пленки упорядоченные ансамбли белков (цитохром *c*), металлических нанокластеров и наночастиц. Получены новые биомиметические нанокомпозитные везикулы и капсулы, которые могут являться реальной основой новой технологической платформы и прототипом для создания новых эффективных биосовместимых средств капсулирования, адресной доставки лекарств. Принципиально важным моментом в этом подходе является использование биомиметических магнитных наночастиц оксидов железа, которое является по сути использованием и развитием открытий и идей Л.А. Блюменфельда в области исследования магнитных свойств живых систем [57]. Более шестидесяти лет назад Л.А. Блюменфельдом с сотрудниками впервые в мире были получены экспериментальные данные, указывающие на присутствие ферромагнитных или суперпарамагнитных наночастиц оксидов железа в культурах одноклеточных организмов и в препаратах ДНК (так называемые широкие линии сигнала ЭПР). Биогенные нанофазные магнитные структуры на основе оксида железа уже найдены в самых разных живых организмах — от бактерий и растений до насекомых, рыб, птиц и животных включая человека. Такие структуры могут играть важную физиологическую роль (обеспечивают ориентацию в магнитном поле Земли) или являются био-

маркерами патологий (например, у человека коррелируют с нейродегенеративными заболеваниями).

Достаточно долгая история кафедры биофизики позволяет проследить тренды и бифуркации в развитии самой биофизики в российской и мировой науке. Спустя много лет на новой методологической основе всплывают исследования, посвященные решению проблем, активно обсуждавшихся на семинарах кафедры в 60-е и 70-е годы прошлого века. В частности, речь идет о математико-биофизических подходах к изучению биологической эволюции в самом широком крупномасштабном плане. В дискуссиях участвовали Н.В. Тимофеев-Ресовский, Н.Н. Воронцов, Л.А. Блюменфельд, С.Э. Шноль, Н.А. Ляпунова, включавшийся в проблему талантливейший Александр Базыкин и многогранный ученый и музыкант А.А. Замятнин (оба — из четвертого выпуска кафедры биофизики), позднее, в Пушкино — яркий и креативный в науках Е.Е. Сельков, эрудированнейший и чрезвычайно многосторонний в науках Г.Р. Иваницкий.

Давние проблемы и подходы в новых поколениях обретают новое видение. И вот А.Э. Сидорова на кафедре развивает концепцию, согласно которой активные среды составляют системную основу пространственно-временной самоорганизации на разных уровнях организации живой материи — от макромолекулярного до биосферного и антропосферного [58]. На базе данного общеметодологического принципа, объединяющего процессы автоволновой самоорганизации, были получены следующие результаты. Построены биофизическая и математическая модель эволюции биосферы как иерархии сопряженных активных сред; модель стабилизации мутаций в пространстве перколяционной решетки отбора, учитывающая сопряжение детерминированных и случайных факторов; модели морфогенеза урбоэкосистем как автоволнового процесса самоорганизации (ошибка модели относительно реальных структур развития Москвы составляет 5–7%) [59]. На основе разработанной методики количественной оценки хиральности белков (адекватность подтверждена анализом 836 структур белков) построена трехмерная автоволновая модель образования хиральных вторичных структур белков [60, 61].

В последние годы лекции по биоинформатике читает кандидат физ.-мат. наук М.С. Попцова, сотрудник кафедры и заведующая международной лабораторией биоинформатики НИУ ВШЭ, доцент департамента больших данных и информационного поиска факультета компьютерных наук НИУ ВШЭ. Основная область научных интересов — изучение роли вторичных структур ДНК (квадруплексов, триплексов, Z-ДНК, кре-

стообразных структур) как дополнительного уровня кодирования информации в геноме, а также поиск взаимосвязей вторичных структур ДНК с эпигенетическим кодом. Под руководством Попцовой были разработаны нейросетевые модели глубинного обучения для предсказания вторичных структур ДНК на основе омиксных данных [62, 63].

Научные интересы д.б.н. М.Г. Гапочки связаны с экологическими проблемами воздействия электромагнитных полей в присутствии других антропогенных факторов на биологические системы разной степени организации. Им исследованы и объяснены зависимости стадии формирования популяции гидробионтов на их реакцию, устойчивость и чувствительность к воздействию токсических веществ и облучения ЭМП. М.Г. Гапочкой предложены практические методы использования ЭМП для снижения токсичности водных растворов, в том числе, сточных вод. Кроме того, исследования действия ЭМП на воду как гасителя митогенетического излучения привели к формулировке перспективной гипотезы механизма действия ЭМП на живые организмы [64, 65].

С первых дней существования кафедры на ней работает выпускница кафедры Т.А. Преображенская, негибаемая и доброжелательнейшая опора организационной и учебной жизни кафедры. Все годы она ведет основополагающие задачи биофизического спецпрактикума.

Особую благодарность хочется выразить Н.Г. Есиповой, которая более полувека читает студентам уникальный курс «Физика биомолекул». Ее курс — фундаментальная физическая основа молекулярно-биологического образования биофизиков физфака. Изложение курса продолжают ее ученики Д.Ю. Нечипуренко и Е.В. Белова (Малышко). Одной из ярких работ Н.Г. Есиповой, во многом воплотившей идеи макромолекулярной механики, развиваемые на кафедре биофизики, является ее статья с коллегами в журнале «Биофизика» [66].

В задачи кафедры входит не только образовательная и научная работа, но многочисленные виды деятельности, связанные с взаимодействием с организационными структурами факультета и университета. И здесь нельзя не упомянуть кажущуюся незаметной, но на самом деле критически важную роль в жизни кафедры ее выпускника ведущего программиста А.М. Адельянова. Наряду с проведением практикума он обеспечивает решение множества практических задач: от учета материальных ценностей до сопровождения заседаний диссертационного совета.

Многие годы научные интересы В.А. Твердислова были связаны с биофизикой мембран, изучением роли неорганических ионов

в биологических системах, механизмов их переноса через клеточные и модельные мембраны с помощью ионных насосов. Им была предложена и совместно с профессором Л.В. Яковенко экспериментально разработана модель параметрического разделения жидких смесей в периодических полях в гетерогенных системах и вошедшая в учебники модель натриевого насоса клеточных мембран [67, 68]. Ими же была предложена модель фракционирования основных биологических ионов в неравновесной поверхностной пленке морской воды при формировании протоклеток [34–36]. В последние годы В.А. Твердислов развивает новое направление в выяснении механизмов фолдинга в белках и их функционирования как молекулярных машин с учетом первичной гомохиральности [69, 70]

Имеются веские основания считать, что, как и в физике, в биологии фундаментальное значение могут иметь базовые симметричные факторы. В частности, именно они могут сопрягать и оптимизировать потоки превращений энергии, вещества и информации, переводя их из микроскопического уровня химии в макроскопический уровень макромолекулярных биологических машин.

В развитие нетривиальных фундаментальных идей Эмми Нётер и Фримана Дайсона о физической обусловленности связей между законами сохранения и разными типами симметрий, а также о связности эволюции систем через череду нарушения симметрий, мы высказываем соображение о том, что молекулярные машины живой природы являются ключевой находкой Природы в формировании Жизни на Земле. О внеземных формах жизни мы ничего толком не знаем, но можем предполагать, что основные принципы живого во Вселенной универсальны, тогда как механизмы и формы могут значительно отличаться. Основным биологическим признаком, по крайней мере для земных форм жизни, являются клетки, а их главным физическим признаком являются молекулярные машины.

По своей сути любая биологическая машина, прошедшая «естественный отбор», несет в себе «умение» сделать что-то «полезное». Для этого, с необходимостью, она обладает долговременной памятью и управляющим устройством, а также исполнительской частью, хотя, составляя функциональную иерархию, эти устройства могут включать в себя общие конструктивные элементы. Иными словами, конструктивные элементы молекулярной машины, «рабочее тело», элементы памяти и коммуникативные тракты могут включать общие детали. По всей видимости, эволюция исходно создавала иерархические системы, работая посредством естественного отбора блочно, сразу на нескольких уровнях молекулярной организации. Отбор на уровне отдельных элементов,

вне единого, хотя бы примитивного, системного устройства представляется эволюционно неэффективным.

В.А. Твердисловым выявлено и физически интерпретировано явление спонтанного формирования иерархических молекулярных структур, характеризующихся сменой знака хиральности в исходно гомохиральных молекулярных системах, а также сменой типа симметрии и увеличением масштаба [69, 70, 72, 73]. Явление обнаружено в информационно детерминированных, гомохиральных в своей основе, биологических макромолекулярных системах нуклеиновых кислот и белков, а также в искусственных полимерных и жидкокристаллических структурах. Хиральный дуализм служит физическим инструментом молекулярной биологии, позволяющим осуществлять фолдинг - формировать конструкции со стратифицированными уровнями внутри- и надмолекулярной организации, тогда как симметричное ядро всей молекулярной биологии можно рассматривать как периодическую знакопеременную систему хиральных элементов. В публикациях описана фундаментальная закономерность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии белков и нуклеиновых кислот. Для белковых структур эта закономерность L-D-L-D, для ДНК — D-L-D-L. Молекулярные машины являются хиральными иерархически организованными устройствами (конструкциями). Они циклически осуществляют преобразование формы энергии за счет смены или переключений симметрий в ее хиральных структурных элементах, которые как раз и реализуют в них выделенные «квазимеханические» степени свободы, способные депонировать энергию на относительно большие времена, по сравнению с тепловыми степенями свободы. Феномен хиральности позволяет формировать дискретные хирально знакопеременные четырех- или пятиуровневые иерархии структур в макромолекулярных машинах в процессе фолдинга, а также обеспечивает однонаправленное движение машин по энергетическому циклу за счет нелинейных вентильных свойств спиральных внутри- и надмолекулярных структур. Непосредственное участие в развитии отдельных направлений этой работы принимали Л.В. Яковенко, Е.В. Белова (Малышко), А.Э. Сидорова.

В качестве важного дополнения к обсуждению научных заслуг наших учителей авторы хотят отметить, что при всех их личностных различиях их роднила высокая традиция российской интеллигенции — умение слушать, понимать и поддерживать учеников. Истинные и великие учителя.

История, традиции и научные достижения кафедры биофизики, замечательные качества ее сотрудников, студентов и аспирантов дают все ос-

нования верить в ее дальнейшее успешное развитие.

Авторы выражают свою признательность ВСЕМ друзьям и коллегам, с которыми уже на протяжении десятилетий работали, общались и формировали свои мнения о наших общих науках и соратниках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа выполнена при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Фундаментальные и прикладные исследования Космоса».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. В. Волькенштейн, *Биофизика* (Наука, М., 1988).
2. Л. А. Блюменфельд, *Проблемы биологической физики* (Наука, М., 1977).
3. Л. А. Блюменфельд, *Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики* (Едиториал УРСС, М., 2002).
4. А. А. Ляпунов, *Проблемы кибернетики*, № 10, 179 (1963).
5. Г. Р. Иваницкий, *Успехи физ. наук*, **180** (4), 337 (2010).
6. К. Пирсон, *Грамматика науки* (Шиповник, СПб., 1911).
7. E. Schrodinger, *What is Life? The physical aspect of the living cell*, (Cambridge University Press, Cambridge, 1944).
8. N. W. Timofeeff-Ressovsky, K. G. Zimmer, und M. Delbruck, *Nachr. Gess. Wiss. Gottingen*, **1** (13), 189 (1935).
9. G. Gamow, *Nature*, **173**, 318 (1954).
10. А. Б. Рубин и Б. Н. Тарусов, в сб. *История биологии. С начала XX века до наших дней*, под ред. Л. Я. Бляхера (Наука, М., 1975), сс. 285, 468.
11. С. Э. Шноль, *Герои, злодеи, конформисты отечественной науки* (URSS, М., 2022).
12. Г. Р. Иваницкий, *Мир глазами биофизика* (Педагогика, М., 1985).
13. Н. А. Умов, в кн. *Собрание сочинений профессора Николая Алексеевича Умова. Т. 3. Речи и статьи общего содержания* (МОИП и Об-во содействия успехам опытных наук имени Х. С. Леденцова, М., 1916), сс. 184–200.
14. А. Б. Рубин, *Биофизика* (URSS, М., 2013).
15. Т. Ю. Плюснина, П. В. Фурсова, Л. Д. Терлова и Г. Ю. Ризниченко, *Математические модели в био-*

- логии (Регулярная и хаотическая динамика, М.–Ижевск, 2014).
16. В. А. Твердислов и А. Н. Тихонов, *Биофизика*, **66** (6), 1246 (2021).
 17. A. F. Vanin, *Nitric Oxide*, **54**, 15 (2016).
 18. Д. С. Чернавский, Ю. И. Хургин и С. Э. Шноль, *Молекуляр. биология*, **1**, 419 (1967).
 19. Л. А. Блюменфельд, *Природа*, № 6, 66 (1981).
 20. L. A. Blumenfeld and A. N. Tikhonov, *Biophysical Thermodynamics of Intracellular Processes. Molecular Machines of the Living Cell* (Springer-Verlag, New-York, 1994).
 21. Л. А. Блюменфельд, В. А. Намиот и Л. В. Яковенко, *Биофизика*, **31** (4), 572 (1986).
 22. C. W. F. McClare, *J. Theor. Biol.*, **30**, 1 (1971).
 23. C. W. F. McClare, *J. Theor. Biol.*, **35**, 233 (1972).
 24. C. W. F. McClare, *J. Theor. Biol.*, **35**, 569 (1972).
 25. K. B. Shumaev, A. L. Dudylyna, M. V. Ivanova, et al., *BioFactors*, **44** (3), 237 (2018).
 26. A. N. Tikhonov, G. B. Khomutov, E. K. Ruuge, et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **637**, 321 (1981).
 27. А. Н. Тихонов и Л. А. Блюменфельд, *Биофизика*, **30** (3), 527 (1985).
 28. В. А. Караваев и А. К. Кукушкин, *Биофизика*, **38** (6), 958 (1993).
 29. V. A. Karavaev, I. B. Polyakova, M. K. Solntsev, et al., *J. Lumin.*, **76** (4), 335 (1998).
 30. В. А. Караваев, О. А. Калмацкая, Б. В. Трубицин и др., *Биофизика*, **67** (3), 524 (2022).
 31. В. И. Лобышев и Л. П. Калиниченко, *Изотопные эффекты D₂O в биологических системах* (Наука, М., 1978).
 32. В. И. Лобышев, М. С. Томкевич и И. Ю. Петрушанко, *Биофизика*, **50** (3), 464 (2005).
 33. В. И. Лобышев, *Биофизика*, **67** (4), 658, (2022).
 34. В. А. Твердислов, М. Р. Кузнецова и Л. В. Яковенко, *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физика. Астрономия*, № 5, 56 (1992).
 35. Л. В. Яковенко и В. А. Твердислов, *Биофизика*, **48** (6), 1137 (2003).
 36. В. А. Твердислов, Л. В. Яковенко, М. Е. Мазуров и др., *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физика. Астрономия*, №6, 107 (2014).
 37. В. А. Намиот, Л. В. Яковенко и Б. И. Ходоров, *Биофизика*, **33** (2), 303 (1988).
 38. Л. В. Яковенко и В. В. Пешехонов, *Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)*, **51** (1), 31 (2007).
 39. Ф. И. Атауллаханов, В. И. Зарницына, А. Ю. Кондратович и др., *Успехи физ. наук*, **172** (6), 671 (2002).
 40. Ф. И. Атауллаханов, Е. С. Лобанова, О. Л. Морозова и др., *Успехи физ. наук*, **177** (1), 87 (2007).
 41. N. B. Gudimchuk, and J. R. McIntosh, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **22** (12), 777 (2021).
 42. П. Н. Захаров, В. К. Аржаник, Е. В. Ульянов и др., *Успехи физ. наук*, **186** (8), 853 (2016).
 43. N. A. Podoplelova, A. N. Sveshnikova, Y. N. Kotova, et al., *Blood*, **128**(13),1745 (2016).
 44. A. N. Sveshnikova, F. I. Ataullakhanov, and M. A. Panteleev, *Mol. Biosyst.*, **11** (4), 1052 (2015).
 45. Т. А. Коваленко, М. А. Пантелеев и А. Н. Свешникова, *Биофизика*, **62** (2), 370 (2017).
 46. В. А. Терентьева, А. Н. Свешникова и М. А. Пантелеев, *Биофизика*, **62** (5), 909 (2017).
 47. А. Н. Свешникова, А. А. Якушева, А. А. Рябых и др., *Креативная кардиология*, **12** (3), 260 (2018).
 48. D. Y. Nechipurenko, N. Receveur, A. O. Yakimenko, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **39** (1), 37 (2019).
 49. V. N. Kaneva, J. L. Dunster, V. Volpert, et al., *Biophys. J.*, **120** (2), 334 (2021).
 50. A. V. Belyaev, M. A. Panteleev, and F. I. Ataullakhanov, *Biophys. J.*, **109**, 450 (2015).
 51. Е. Ю. Симоненко, В. В. Прядун, А. А. Иванова и др., *Биофизика*, **64** (1), 5 (2019).
 52. А. А. Иванова, В. В. Прядун, А. Н. Ефанов и др., *Акт. вопр. биол. физ. и хим.*, **5** (3), 434 (2020).
 53. С. А. Яковенко, Е. Ю. Симоненко, С. Б. Гармаева и др., *Биофизика*, **61** (2), 316 (2016).
 54. А. В. Беляев, *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физ. Астрон.*, № 5, 445 (2017).
 55. Е. А. Генералов, Е. Ю. Симоненко и Л. В. Яковенко, *Акт. вопр. биол. физ. и хим.*, **7** (4), 613 (2022).
 56. Е. А. Генералов, Е. Ю. Симоненко, Н. Г. Кульченко и др., *Биомед. химия*, **68** (6), 403 (2022).
 57. G. B. Khomutov, V. P. Kim, Y. A. Koksharov, et al., *Coll. and Surf. A: Physicochem. and Engin. Asp.*, **532**, 26 (2017).
 58. В. А. Твердислов, А. Э. Сидорова и Л. В. Яковенко, *Биофизическая экология* (КРАСАНД, М., 2020).
 59. А. Э. Сидорова, Н. Т. Левашова, А. Е. Семина и др., *Мат. биол. и биоинф.*, **13** (2), 454 (2018).
 60. В. А. Твердислов, А. Э. Сидорова, О. Е. Багрова и др., *Биофизика*, **67** (5) 837 (2022).
 61. А. Э. Сидорова, Н. Т. Левашова, А. О. Луценко и др., *Учен. зап. физ. фак-та Моск. ун-та*, № 4, 1940401 (2019).
 62. N. Beknazarov, S. Jin, and M. Poptsova, *Sci. Rep.*, **10**, 19134 (2020).
 63. T. Zhang, C. Yin, A. Fedorov, et al., *Nature*, **606**, 594 (2022).
 64. М. Г. Гапочка, *Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон.* № 6, 33 (2008).
 65. М. Г. Гапочка, *Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон.*, № 1. 67 (2009).
 66. А. В. Батыновский, И. Д. Волотовский, В. А. Намиот и др., *Биофизика*, **60** (3), 437 (2015).
 67. В. А. Твердислов, А. Н. Клейменов и Л. В. Яковенко, *Биофизика*, **18** (2), 251 (1973).
 68. В. А. Твердислов и Л. В. Яковенко, *Биофизика*, **25** (5), 815 (1980).
 69. В. А. Твердислов и Е. В. Малышко, *Успехи физ. наук*, **189** (4), 375 (2019).

70. V. A. Tverdislov and E. V. Malyshko, *Symmetry*, **12** (4), 587 (2020).
71. Е. В. Малышко, А. Р. Муртазина и В. А. Твердислов, *Биофизика*, **65** (2), 213 (2020).
72. В. А. Твердислов, Е. В. Малышко и С. А. Ильченко, *Известия РАН. Сер. физ.*, **79** (3), 1728 (2015).
73. В. А. Твердислов, *Акт. вопр. биол. физ. и хим.*, **7** (4), 552 (2022).

On Biophysics and a Chair of Biophysics at the Faculty of Physics of Moscow State University

V.A. Tverdislov*, V.I. Lobyshev*, L.V. Yakovenko*, and M.G. Gapochka*

**Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/2, Moscow, 119991 Russia*

A historical timeline created to celebrate the 63-year anniversary of a chair of biophysics, the first in the world of science chair founded at Lomonosov State Moscow University. Professor Lev Alexandrovich Blumenfeld and Professor Simon El'evich Shnoll, who both departed this life in 2002 and 2021, respectively, started the chair. In the latest issues of journal "Biophysics", a large series of articles written and prepared by friends, colleagues, students, and the successors of these outstanding scientists have been published. This article closes this series. The article includes a brief historical overview of the formation of world and Russian biophysics as a scientific discipline, gives information about the history of how the Chair of Biophysics has been established, its main achievements and the scientific schools formed within the walls of this Department.

Keywords: Moscow university, faculty of physics, chair of biophysics, biophysics in Russia

VII СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ

© 2023 г. Г.Ю. Ризниченко*, А.А. Анашкина**, #, А.Б. Рубин*

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

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

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

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 04.08.2023 г.

Принята к публикации 09.08.2023 г.

Обсуждаются проблемы и результаты исследований в биофизике, которым был посвящен VII съезд биофизиков России (Краснодар, 17–23 апреля 2023 г., <http://rusbiophysics.ru/db/conf.pl>). На пленарных, секционных и стендовых сессиях были представлены результаты фундаментальных и прикладных исследований в области молекулярной биофизики, биофизики клетки, биофизики сложных многокомпонентных систем. Активно обсуждались структура и динамика биополимеров, фундаментальные механизмы, лежащие в основе воздействия физико-химических факторов на биологические системы, мембранные и транспортные процессы. Большое внимание было уделено новым экспериментальным методам биофизических исследований, методам биоинформатики, компьютерного и математического моделирования как необходимых инструментов исследований на всех уровнях организации живых систем. Наряду с фундаментальными проблемами изучения биофизических механизмов регуляции процессов на молекулярном, субклеточном и клеточном уровне большое внимание было уделено прикладным исследованиям в области биотехнологии и экологического мониторинга. Особенно широко были представлены работы в области медицинской биофизики. В ходе Съезда был сформирован Национальный Совет по биофизике.

Ключевые слова: VII Съезд биофизиков России, молекулярная биофизика, медицинская биофизика, биофизика клетки, биофизика сложных систем, экологическая биофизика.

DOI: 10.31857/S0006302923040233, EDN: KOYFGD

В VII Съезде биофизиков России приняли участие 885 биофизиков из 386 организаций 41 региона России и гости из 12 стран [1]. Половина докладов была представлена очно на пленарных и секционных заседаниях, стендовых сессиях, круглых столах в аудиториях Кубанского государственного технологического университета.

Программа VII Съезда включала следующие научные направления современной биофизики:

- Молекулярная биофизика. Структура и динамика биополимеров и биомакромолекулярных систем
- Биофизика клетки. Мембранные и транспортные процессы
- Механизмы трансформации энергии. Биоэнергетика. Молекулярные моторы
- Биомеханика. Биологическая подвижность
- Биофизика сложных многокомпонентных систем. Математическое моделирование. Биоинформатика
- Биофотоника. Фотобиология. Фотосинтез. Биолюминисценция. Фоторецепция. Оптогенетика

- Механизмы действия физико-химических факторов на биологические системы
- Экологическая биофизика
- Медицинская биофизика. Нейробиофизика
- Биофизическое образование
- Новые методы в биофизике

В пленарных докладах были представлены обзоры последних достижений в области экспериментального и теоретического изучения процессов в живых системах, а также результаты прикладных исследований. Более подробно результаты изучения конкретных биологических объектов были представлены на соответствующих секциях съезда. Секция медицинской биофизики была самой многочисленной на VII Съезде биофизиков России, что отражает востребованность результатов биофизических исследований в этой наиболее близкой к человеку области.

ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Прошедший Съезд продемонстрировал растущие возможности современной биофизики в об-

ласти фундаментального понимания механизмов процессов в живых системах. Представленные на Съезде доклады свидетельствуют о большом прогрессе в развитии экспериментальных, в первую очередь, оптических методов, что было представлено в ряде пленарных и большом количестве секционных докладов. Оптогенетика, лазерные пинцеты, ТГ-спектроскопия позволяют изучать не только структурные особенности, но пространственно-временную динамику процессов в живых системах на молекулярном и клеточном уровне. В этом отношении возрастает и ценность как системно-динамических, так и агентных, в том числе, молекулярных моделей, которые могут, благодаря использованию современных информационных технологий, адекватно воспроизводить процессы в живой клетке. Другая характерная черта Съезда — большое число высокого уровня работ по использованию результатов биофизических исследований в медицине, биотехнологии, разработке топливных элементов, экологическом мониторинге. В ходе работы Съезда был сформирован Национальный Совет по биофизике.

Накануне Съезда вышли два тома фундаментальной книги «Горизонты биофизики» под редакцией академика А.Б. Рубина [2, 3]. В этой книге участвуют более 30 ведущих российских биофизиков, которые поделились своими мыслями о современном состоянии и перспективах развития областей биофизики, в которых они работают. Большинство авторов и представителей их коллективов выступали на Съезде. Учитывая, что больше половины участников Съезда — представители молодого поколения исследователей,

можно уверенно сказать, что у российской биофизики большие перспективы, и на следующем VIII Съезде биофизиков России, проведение которого запланировано на 2027 г., мы услышим много нового и интересного.

БЛАГОДАРНОСТИ

От имени участников Съезда авторы благодарят членов Оргкомитета VII Съезда и членов Программного комитета, а также руководителей секций за их организационные усилия по подготовке и проведению Съезда. Отдельная благодарность локальному Оргкомитету, его председателю — бывшему ректору Кубанского государственного университета М.Г. Барышеву, заместителю председателя С.С. Джимаку и ученому секретарю А.А. Дороховой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сборник научных трудов VII съезда биофизиков России*, в 2-х томах (Типография КубГТУ, 2023). DOI: 10.31429/SbR6.2019.001
2. *Горизонты биофизики*, под ред. А. Б. Рубина, Т. 1 (Институт компьютерных исследований, М.—Ижевск, 2022).
3. *Горизонты биофизики*, под ред. А. Б. Рубина, Том 2 (Институт компьютерных исследований, М.—Ижевск, 2022).

VII Congress of Biophysicists of Russia

G.Yu. Riznichenko*, A.A. Anashkina**, and A.B. Rubin*

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

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

The problems and results of research in biophysics, which were devoted to the VII Congress of Biophysicists of Russia (Krasnodar, April 17–23, 2023, <http://rusbiophysics.ru/db/conf.pl>), are discussed. The results of fundamental and applied research in the field of molecular biophysics, cell biophysics, biophysics of complex multicomponent systems were presented at plenary, sectional and poster sessions. The structure and dynamics of biopolymers, the fundamental mechanisms underlying the impact of physicochemical factors on biological systems, membrane and transport processes were actively discussed. Much attention was paid to new experimental methods of biophysical research, methods of bioinformatics, computer and mathematical modeling as essential research tools at all levels of organization of living systems. Along with the fundamental problems of studying the biophysical mechanisms of regulation of processes at the molecular, subcellular and cellular levels, much attention was paid to applied research in the field of biotechnology and environmental monitoring. Works in the field of medical biophysics were especially widely represented. During the Congress, the National Council for Biophysics was formed.

Keywords: VII Congress of Biophysicists of Russia, molecular biophysics, medical biophysics, cell biophysics, biophysics of complex systems, ecological biophysics