

ISSN 0006-3029

Том 68, Номер 2

Март - Апрель 2023



БИОФИЗИКА

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 2, 2023

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Аланин: обычное и неожиданное

*В.Г. Туманян, А.А. Анашкина, И.В. Филатов, К.В. Смирнов,
И.Ю. Торшин, Н.Г. Есипова* 213

Имитационное моделирование работы глутамат-цистеин лигазы

В.С. Копылова, С.Е. Бороновский, Я.Р. Нарциссов 218

Модификация фермент-субстратных взаимодействий
при сверхвысоких разведениях субстрата

Г.Ю. Ломакина, Н.Н. Угарова 230

Влияние pH на конформацию модифицированного аптамера
к белку нуклеолину

П.В. Габрусенок, Р.Р. Рамазанов, А.С. Бучельников, П.А. Соколов 241

Исследование механизма взаимодействия фицина с графт-сополимером
натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола методами
молекулярного докинга, инфракрасной спектроскопии и спектроскопии
комбинационного рассеяния

*А.В. Сорокин, С.С. Гончарова, М.С. Лавлинская, М.Г. Холявка, Ю.Ф. Зувев,
Д.А. Файзуллин, М.С. Кондратьев, В.Г. Артюхов* 248

Стабильность коллагенового геля после ультрафиолетового облучения

Ю.А. Нащекина, Н.А. Трусова, П.О. Никонов, А.В. Нащекин, Н.А. Михайлова 257

Инструменты для визуализации сигнала покрытия секвенирования

И.В. Бездворных, Н.А. Черкасов, А.А. Канапин, А.А. Самсонова 263

Полногеномный анализ ассоциаций вариаций копийности
в контексте стабильности генома

М.А. Дук, А.А. Канапин, Т.А. Рожмина, А.А. Самсонова 268

Возможности исследования биологических объектов на установке импульсного реактора

*А.В. Власов, Ю.Л. Рижиков, И.В. Манухов, С.В. Баженов, С.А. Куракин,
Т.Н. Муругова, А.И. Иванов, В.В. Ской, А.В. Розачев, Д.П. Вертелецкий,
А.Х. Исламов, Н. Кучерка, В.И. Горделий, А.И. Куклин* 275

Удивительная макромолекула ДНК: компьютерное моделирование
ее пространственной структуры и многообразие уотсон-криковских
конформаций дуплекса

В. Полтев, В. Домингез, А. Руиз, А. Дерябина, Э. Гонзалез 292

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Об использовании уравнений Колмогорова для определения характеристик
потенциал-зависимых ионных каналов

А.П. Кручинина, Н.В. Куликовская 305

Два субкомпартамента гладкого эндоплазматического ретикулума в перисинаптических отростках астроцитов: ультраструктура и распределение в синапсах гиппокампа и неокортекса

Е.А. Шишкова, В.В. Рогачевский 320

Влияние нейротрофических факторов на состав белков при повреждении и регенерации соматических нервов

Т.П. Кузьменко, М.В. Парчайкина, Э.С. Ревина, М.Ю. Гладышева, В.В. Ревин 334

Калориметрия плавления ядер клеток печени крысы в присутствии ионов магния

Г.Я. Коломийцева, А.Н. Прусов, Е.А. Коломийцева, Т.А. Смирнова 349

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Замораживающий раствор с использованием агара для длительного криосохранения срезов мозга негибернирующих животных

А.А. Мокрушин 360

Смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме лабораторных животных при пятикратном повышении концентрации дейтерия в питьевом рационе

С.В. Козин, О.М. Лясота, А.А. Кравцов, Е.В. Чихиржина, В.А. Ивлев, К.А. Попов, А.А. Дорохова, В.В. Малышко, А.В. Моисеев, А.В. Дроздов, С.С. Джимак 369

Влияние альгинатно-тканевого покрытия с наночастицами серебра на течение раневого процесса у лабораторных животных

В.В. Малышко, Л.В. Федулова, М.Е. Соколов, А.В. Моисеев, А.А. Басов, А.А. Дорохова, Д.И. Шашков, С.С. Джимак 376

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Тераностика онкологических заболеваний: результаты мировых исследований и пути развития

Л.А. Ромодин 384

Применение методов оптического анализа для неинвазивного контроля уровня оксигенации крови

М.М. Гузенко, М.С. Мазинг, А.Ю. Зайцева 389

Прогноз метаболической активности организма спортсменов по академической гребле на основании результатов биохимического анализа сыворотки крови

В.И. Пустовойт, Т.А. Астрелина, Е.И. Балакин, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, А.В. Хан, А.А. Муртазин, Н.Ф. Максютлов, В.А. Брумберг 396

Часть антиковидной терапии, основанной на теоретической модели механики контактного взаимодействия коронавируса с оболочкой клетки

Н.А. Кольцова 404

Направленная перестройка популяции возбудителя SARS как возможная причина преобладания бессимптомных форм инфекции в COVID-19

И.Д. Колесин, Е.М. Житкова 411

Contents

Vol. 68, No. 2, 2023

Molecular Biophysics

Alanine: from the Usual to the Unexpected

*V.G. Tumanyan, A.A. Anashkina, I.V. Filatov, K.V. Smirnov,
I.Yu. Torshin, and N.G. Esipova*

213

Simulation Modeling of Glutamate Cysteine Ligase Activity

V.S. Kopylova, S.E. Boronovskiy, and Ya.R. Nartsissov

218

Alteration of Enzyme-Substrate Interactions by Ultra-High Dilutions of the Substrate

G.Yu. Lomakina and N.N. Ugarova

230

Study of the Influence of pH on the Conformation of a Modified Aptamer to Nucleolin Protein

P.V. Gabrusenok, R.R. Ramasanoff, A.S. Buchelnikov, and P.A. Sokolov

241

Study on the Interaction Mechanism between Ficin and a Graft Copolymer of Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt and *N*-Vinylimidazole Using Molecular Docking, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and Raman Spectroscopy

*A.V. Sorokin, S.S. Goncharova, M.S. Lavlinskaya, M.G. Holyavka, Yu.F. Zuev,
D.A. Faizullin, M.S. Kondatyev, and V.G. Artyukhov*

248

Stability of Collagen Gel after UV Irradiation

Yu.A. Nashchekina, N.A. Trusova, P.O. Nikonov, A.V. Nashchekin, and N.A. Mikhailova

257

A Toolbox for Visualization of Sequencing Coverage Signal

I.V. Bezdvornyykh, N.A. Cherkasov, A.A. Kanapin, and A.A. Samsonova

263

Genome-Wide Association Study of Copy Number Variation
in Flax Through the Lens of Genome Integrity

M.A. Duk, A.A. Kanapin, T.A. Rozhmina, and A.A. Samsonova

268

Possibilities of Studying Biological Objects on a Pulsed Reactor

*A.V. Vlasov, Yu.L. Ryzhykau, I.V. Manukhov, S.V. Bazhenov, S.A. Kurakin,
T.N. Murugova, A.I. Ivankov, V.V. Skoy, A.V. Rogachev, D.P. Verteletskiy,
A.Kh. Islamov, N. Kucherka, V.I. Gordeliy, and A.I. Kuklin*

275

The Marvelous DNA Macromolecule: Computer Modeling of DNA 3D Structure
and Diversity of Watson-Crick Duplex Conformations

V. Poltev, V. Dominguez, A. Ruiz, A. Deriabina, and E. Gonzalez

292

Cell Biophysics

On the Use of Kolmogorov Equations for Determining Ion Channels Characteristics

A.P. Kruchinina and N.V. Kulikovskaya

305

Two Subcompartments of the Smooth Endoplasmic Reticulum in Perisynaptic Astrocytic Processes: Ultrastructure and Distribution in Hippocampal and Neocortical Synapses

E.A. Shishkova and V.V. Rogachevsky

320

Influence of Neurotrophic Factors on Protein Composition
during Somatic Nerve Injury and Regeneration

T.P. Kuzmenko, M.V. Parchaikina, E.S. Revina, M.Yu. Gladysheva, and V.V. Revin

334

Complex Systems Biophysics

Agar Freezing Solution for Long-Term Cryopreservation of Brain Slices
from Non-Hibernating Animals

A.A. Mokrushin

360

A Shift of the Prooxidant-Antioxidant Balance in the Bodies of Laboratory Animals
at Five-Fold Increased Deuterium Content in Drinking Diet

*S.V. Kozin, O.M. Lyasota, A.A. Kravtsov, E.V. Chikhirzhina, V.A. Ivlev, K.A. Popov,
A.A. Dorohova, V.V. Malyshko, A.V. Moiseev, A.V. Drozdov, and S.S. Dzhimak*

369

Influence of Alginate-Fabric Coating with Silver Nanoparticles on the Course
of Wound Process in Laboratory Animals

*V.V. Malyshko, L.V. Fedulova, M.E. Sokolov, A.V. Moiseev, A.A. Basov, A.A. Dorohova,
D.I. Shashkov, and S.S. Dzhimak*

376

Medical Biophysics

Theranostics for Oncological Therapy: Results from Worldwide Research
and the Paths of Development

L.A. Romodin

384

Application of Optical Analysis Methods for Non-Invasive Monitoring
of Blood Oxygen Saturation Level

M.M. Guzenko, M.S. Mazing, and A.Yu. Zaitseva

389

Prediction of Metabolic Activity of Rowing Athletes Based on Serum Biochemical Analysis

*V.I. Pustovoyt, T.A. Astrelina, E.I. Balakin, I.V. Kobzeva, Y.B. Suchkova, A.V. Khan,
A.A. Murtazin, N.F. Maksjutov, and V.A. Brumberg*

396

Part of Anti-COVID Therapy Based on a Theoretical Model Describing Mechanics
of Contact Interaction between Coronavirus and Cell Membrane

N.A. Koltcova

404

Single SARS Virus Mutation as a Possible Cause of the Prevalence
of Asymptomatic COVID-19 Infection Forms

I.D. Kolesin and E.M. Zhitkova

411

УДК 577.3

АЛАНИН: ОБЫЧНОЕ И НЕОЖИДАННОЕ

© 2023 г. В.Г. Туманян^{*,#}, А.А. Анашкина^{*}, И.В. Филатов^{**}, К.В. Смирнов^{*},
И.Ю. Торшин^{***}, Н.Г. Есипова^{*}

^{*}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991, Россия

^{**}Московский физико-технический институт,

Институтский пер., 9, Долгопрудный Московской области, 141700, Россия

^{***}Вычислительный центр им. А.А. Дородницына Федерального исследовательского центра
«Информатика и управление» РАН, ул. Вавилова, 40, Москва, 119333, Россия

[#]E-mail: vgt450@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 11.12.2022 г.

Принята к публикации 14.12.2022 г.

На основании экспериментальных данных можно говорить об аномально большом вкладе аланина в стабилизацию альфа-спирали и других белковых конформаций. Независимые (в том числе экспериментальные) данные свидетельствуют об особо большом вкладе аланина в стабилизацию альфа-спирали. При этом выявляются позитивные вклады, как в энтропию системы, так и в энтальпию. Высокий вклад аланина в энтальпию образования альфа-спирали противоречит общепринятому взгляду: энтропия должна падать при образовании регулярных структур в белках. Аланин стабилизирует два типа вторичной структуры из трех: альфа-спираль и левую спираль типа «полипролин II», а если говорить о фибриллярных белках, то аланин стабилизирует и бета-структуру. Стабилизирующий эффект аланина на структуру альфа-спирали распространяется и на нативно-развернутые белки, и на конъюгаты «альфа-спираль–подложка». Словом, не будет преувеличением сказать, что проблема формирования вторичной структуры белка сводится к проблеме аланина. Вскрытые противоречия носят парадоксальный характер и их интерпретация (прежде всего, обоснование вклада аланина в энтальпию плавления в терминах фундаментальной физики) на сегодняшний день отсутствует. Между тем представленные в работе данные и комментарии позволяют надеяться на прогресс в разрешении выявленных противоречий.

Ключевые слова: аланин, конформационно стабильные/лабильные сегменты белка, локальная структура белка, конформационный анализ, статистический анализ, ЯМР, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0006302923020011, EDN: BZIYPK

Если задаться вопросом, какая аминокислота может рассматриваться как самый типичный представитель соответствующего класса соединений, отражающий свойства других аминокислот (здесь и далее мы имеем в виду так называемые кодируемые аминокислоты), то ответ может быть только один: аланин. Действительно, аланин имеет простое химическое строение, но сохраняет ряд свойств более сложных аминокислот. Проще аланина только глицин, но глицин вообще представляет собой исключение — это единственная ахиральная аминокислота из общего списка из 20 аминокислот.

Чтобы охарактеризовать вовлеченность аланина в науку и технику приведем только по одному примеру из области медицины и технологии.

Уже то, что аланин влияет на уровень сахара в крови, позволяет предположить, что он может найти применение в медицине. И действительно,

несмотря на простоту химической формулы, аланин эффективен в качестве лекарства и прописывается как средство от дегидратации при диарее, при гипертрофии предстательной железы, при стрессе, шизофрении и т.д. (см. <https://www.drug-bank.ca/drugs/DB00160>). Хотя спектр применения его в качестве лекарственного средства достаточно широк, почти нет данных о механизмах, стоящих за терапевтическим эффектом аланина.

В качестве примера применения аланина в области материаловедения можно привести связанную с проблемой защиты окружающей среды работу [1], в которой показано, что аланин может окислять оксид графена без катализатора или использования щелочной среды.

Физико-химические свойства аланина не носят крайнего характера; в группе гидрофобных алифатических аминокислот (Ala, Val, Leu, Ile) аланин, имея в качестве бокового радикала ме-

тильную группу, обладает наименьшей гидрофобностью и наибольшей растворимостью. Аланин широко распространен в белках, и во многих белках это наиболее представленная аминокислота. Это наиболее, если можно так выразиться, замещающая и замещаемая аминокислота. Согласно генетическим данным по аминокислотным заменам аланин относится к наиболее легко заменяемым аминокислотам, он делит второе и третье места по «заменимости». Другими словами, это наиболее толерантная к заменам аминокислота [2]. На первом месте находится метионин, содержание которого всегда незначительно, а на последнем (максимальная незаменимость) — пролин.

Ввиду перечисленных свойств аланина использование этой аминокислоты в качестве модели в теоретических и экспериментальных исследованиях представляется наилучшим выбором, можно привести многочисленные примеры работ такого плана.

Так, аланин часто используют как упрощенную модель других аминокислот (кроме глицина). В экспериментах «host-guest» он может выполнять как роль «гостя», так и «хозяина».

Замены на аланин, как правило, ведут к повышению стабильности альфа-спиральных host-пептидов.

Наконец, широко востребована процедура аланинового сканирования: в экспериментальном варианте и в варианте *in silico*, когда аминокислоты в цепи белка с первой до последней замещаются на аланин. Оба варианта, экспериментальный и расчетный, дополняют друг друга.

Все эти процедуры не свободны от эффекта контекста. Типичным примером может служить работа [3], в которой содержание альфа-спирали в пептиде-хозяине оценивалось спектроскопическими методами при замещениях на все 20 аминокислот (гость) и при этом учитывался контекст. Оценка свободной энергии позволила авторам прийти к выводу (не бесспорному), что только Ala и Glu доказательно являются спираль-стабилизирующими, тогда как все остальные боковые цепи являются нейтральными или дестабилизирующими.

Тем более неожиданными представляются обнаруженные в результате исследований факты, которые не вяжутся с ролью аланина как некоего среднего представителя аминокислотного ряда, факты, которые не согласуются с данными о структуре и свойствах этой молекулы.

Соответствующие данные, представляющиеся неожиданными, могут быть объединены под общей рубрикой: стабилизирующий вклад аланина. При этом речь идет о стабилизации альфа-спирали и левой спирали типа «полипролин II», а в ва-

рианте фибриллярных белков аланин способствует формированию также и бета-структуры.

Аномалия аланина всплывает уже при анализе обобщающих обширную экспериментальную информацию данных по статистике расстояний C α —C α , используемых с целью построения knowledge-based потенциалов. Эти данные позволяют обнаружить, что взаимодействия между C α -атомами аланинов особенно велики [4].

СТАБИЛИЗАЦИЯ АЛЬФА-СПИРАЛИ ПО ДАННЫМ БИОИНФОРМАТИКИ

Методы биоинформатики, носящие как правило статистический характер, позволяют обнаружить определенные закономерности, например, найти, какие остатки стабилизируют или дестабилизируют вторичную или локальную структуру белка. Далее в лучшем случае полученные тенденции интерпретируются исходя из представлений физической химии и молекулярной биофизики, а обычно остаются просто средством для предсказаний.

Что касается данных по аминокислотному составу, то обширный статистический материал свидетельствует о том, что остатки MALEK имеют предпочтение для вхождения в альфа-спираль и полипептидная цепь в местах скопления этих остатков с большой вероятностью примет структуру альфа-спирали.

Можно считать, что наибольший спираль-образующий вклад вносит аланин. Большой вклад можно приписать только метионину, но метионин находится среди наиболее редко встречающихся аминокислот (тогда как аланин — среди самых распространенных). Поэтому вряд ли имеет смысл говорить о заметной суммарной стабилизирующей роли метионина.

Аминокислоты, избегающие альфа-спираль, — это Pro и Ser. Обращает на себя внимание то, что в группу стабилизирующих альфа-спираль аминокислот входят остатки, не имеющие ничего общего в их структуре и свойствах. Действительно, E и K несут заряд разного знака, A, M и L вообще не имеют заряда и сильно различаются друг от друга. Невозможно, по крайней мере, на первый взгляд, найти общее свойство этих остатков, которое можно было бы считать ответственным за формирование и/или стабилизацию альфа-спирали, да и вообще найти общее свойство этих остатков. Более того, объяснить способность образовывать спираль трудно даже для отдельных остатков из этой группы и, пожалуй, особенно трудно это сделать для аланина.

В попытках объяснения свойств аланина самое естественное начать со свойств СН₃-группы. Поскольку боковая цепь аланина представляет собой метильную группу, в этом случае боковой

радикал имеет самый простой набор конформеров (+гош-, –гош- и транс-конформеры). Представляется естественным соотносить свойства SH_3 -группы со свойствами всей аминокислоты, тем более, что метильная группа сама по себе обладает целым набором оригинальных свойств. Так, существенная разница в динамике нуклеиновых кислот и белков, как полагают, обусловлена свойствами метильных групп при почти полном отсутствии таковых в нуклеиновых кислотах и большом их содержании в белках. По мнению авторов работы [5] метильная группа служит пластификатором и обеспечивает молекулярную гибкость. Метильные группы в ряде ферментов располагаются вокруг таких центров динамики как гибкие шарниры или активные центры. Эти группы нельзя игнорировать при рассмотрении таких явлений как гидрофобность, фолдинг, энтропия. Авторы работы [5] полагают, что может иметь место отбор числа и положения метильных групп в ходе эволюции биополимеров, что, на наш взгляд, представляется спорным. Что бесспорно, так это вовлеченность метильных групп в процессы гидратации и дегидратации. В белках динамика строго координирована с растворителем.

Оригинальные свойства аланина в аспекте гидратации привлекают специалистов, владеющих самыми современными методами исследования. Так, ячейка гидратации аланина была промоделирована с использованием квантовой молекулярной динамики [6], что позволило исследовать тонкие эффекты в ЯМР-химических сдвигах и не прямых спин-спиновых парных констант для разных ионных форм этого соединения. Обнаружено существенное различие в радиальных и угловых распределениях молекул воды вокруг растворенного вещества. Авторы работы [6] утверждают, что использование столь сложных методов является необходимым для исследования не только свойств молекулы, но и ее взаимодействия с окружающей средой, включая растворитель и подложку.

Интересно, что аланин стабилизирует конформацию типа «полипролин II» также и в так называемых развернутых или неупорядоченных белках, что убедительно доказано в работе [7]. Между тем, свойства других аминокислот в нативной глобуле и в развернутом состоянии могут существенно различаться. Таким образом, эти белки не столь уж неупорядоченные, если принять во внимание превалирование конформации типа «полипролин II», особенно в присутствии в первичной структуре аланина.

Это постоянство в оригинальном свойстве проявляется не только в одинаковом эффекте аланина в обычных и развернутых белках, но и, например, при сравнении его действия в стан-

дартных альфа-спиралях и в конъюгатах «подложка–пептид» что позволяет, как утверждают авторы работы [8], говорить о внутренне присущей этой аминокислоте спираль-образующей тенденции.

Особую роль при исследованиях таких подвижных групп, как SH_3 -группа, очевидно, играет метод ЯМР. Работа [9] дает представление о тенденциях в исследованиях белков методом ЯМР-спектроскопии. На примере SH_3 -домена альфа-спектрина авторы оценили энергию активации барьеров вращения метильных групп. Для 33 метильных групп SH_3 -домена средняя высота барьера составила 0.9 ккал/моль. Эта величина варьирует, в соответствии с моделью «жидкой» гидрофобной сердцевины белка, в зависимости от контактов с окружающими атомами. Но порядок, который привел бы к систематическому повышению (понижению) барьеров, отсутствует. Для сравнения: молекулярная динамика приводит к величине барьера от 3.1 до 3.5 ккал/моль. Иногда изменение высоты барьера связано со слишком быстрым «отжигом» к температуре 0 К. В нескольких случаях барьеры выше 10 ккал/моль служат индикатором возмущения ван-дер-ваальсовых контактов. Авторы констатируют, что таким образом может быть проложен мостик между структурными и динамическими исследованиями.

МИКРОКАЛОРИМЕТРИЯ

Теперь мы подходим к самой важной информации – результатам физических экспериментов. С помощью прямых определений термодинамических параметров методом микрокалориметрии был оценен вклад аланина в энтальпию перехода «спираль–клубок» в альфа-спирали по сравнению с другими аминокислотными остатками (разумеется, при нормировании на количество атомов в остатке). Был обнаружен аномально большой вклад аланина в энтальпию плавления альфа-спирального пептида, а также в энтропию.

Высокий вклад аланина в энтальпию образования альфа-спирали противоречит общепринятому взгляду, согласно которому энтропия должна падать при образовании регулярных структур в белках. Остановимся на этом моменте более подробно.

Как известно, различные аминокислотные остатки по-разному влияют на термодинамическую стабильность альфа-спирали, что объясняется различием в потере конфигурационной энтропии боковой цепи при образовании спирали. В работе [10] на основании калориметрических результатов для двенадцати пептидов было обнаружено, что имеют место существенные различия в энтальпии перехода «спираль–клубок» для раз-

личных аминокислотных остатков. Конечно, тот факт, что остатки аланина влияют на стабильность альфа-спирали, был известен достаточно давно [11], но важны количественные оценки. Аланин в альфа-спирали стабилизирует спираль по сравнению с Gly на 0.4 – 2.0 ккал/моль.

Как отмечают многие авторы, аланин благоприятным в смысле свободной энергии образом встраивается в альфа-спираль из-за энтропийного фактора. Действительно, для других аминокислот (кроме пролина и глицина) вхождение в альфа-спираль означает ограничение более или менее свободного вращения бокового радикала в конформации клубка. По реалистичным оценкам, потеря конформационной энтропии, препятствующая вхождению боковой цепи в альфа-спираль, соответствует в среднем 1.11 ккал/моль⁻¹. Для аланина эта потеря, естественно, отсутствует. Как ротамерное напряжение, так и χ -напряжение для аланина равны нулю, что является дополнительным к энтропийному фактором, способствующим формированию альфа-спирали аланин-содержащими цепями, и суммарный эффективный выигрыш для аланина по сравнению с другими аминокислотами составляет 1.08 ккал/моль⁻¹, если принять оценки, приведенные в работе [12].

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Какие же объяснения доминирующей роли аланина в формировании альфа-спирали можно представить с точки зрения современной физико-химии белка?

Прежде всего, трудно говорить о стабилизирующих ван-дер-ваальсовых контактах остатка аланина с атомами остова полипептидной цепи. Взаимодействия типа «остаток–остаток» для аланина весьма редки, а на участках скопления аланинов исключены, между тем, эффект аланина носит аддитивный характер. Точно также трудно делать выводы о благоприятном вкладе электростатики, поскольку парциальные заряды на атомах водородов метильной группы весьма малы. Очевидно, что исключены и водородные связи. Исследователи, изучающие роль квантово-химических эффектов для разных конформаций остова полипептидной цепи, не отмечают каких-либо особенностей, связанных с аланином. Наконец, трудно привлечь для объяснения роли аланина данные о гидратации альфа-спирали. Учитывая внешнее расположение остатка аланина в альфа-спирали и скорее гидрофобный характер этого остатка, нет оснований предполагать существенную разницу в характере гидратации аланина в альфа-спирали и в денатурированной форме белка. Последнее, что можно представить, – это быстрое вращение CH_3 -группы, детектируемое

методом ЯМР, что, безусловно, влияет на гидратацию и динамику.

В свете вышеизложенного мы приходим к заключению о необходимости дальнейшего выяснения роли аланина в контексте структуры, свойств и функции белка, при этом немалую роль играет переосмысление полученных ранее данных. Вскрытые противоречия носят парадоксальный характер и их интерпретация (прежде всего, обоснование вклада аланина в энтальпию плавления в терминах фундаментальной физики) на сегодняшний день отсутствует. Между тем представленные в работе данные и комментарии позволяют надеяться на прогресс в разрешении выявленных противоречий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной результат работы заключается в демонстрации уникальных свойств аланина в контексте участия этой аминокислоты в структурообразовании белков и стабилизации их структуры.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00936).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Wang, E. C. Salihi, and L. Šiller, *Mater. Sci. Engin.*, **72** (2), 1 (2017).
2. V. E. Gray, R. J. Hause, and D. M. Fowler, *Genetics*, **207**, 53 (2017).
3. J. Yang, E. J. Spek, Y. Gong, et al., *Prot. Sci.*, **6**, 1264 (1997).
4. Y. Wu, M. Lu, M. Chen, et al., *Prot. Sci.*, **16**, 1449 (2007).
5. J. D. Nickels, J. E. Curtis, H. O'Neill, and A. P. Sokolov, *J. Biol. Phys.*, **38**, 497 (2012).
6. M. Dracinsky, J. Kaminsky, and P. Bour, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 14698 (2009).
7. S. Toal and R. Schweitzer-Stenner, *Biomolecules*, **4**, 725 (2014).
8. C. A. Rohl, W. Fiori, and R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3682 (1999).

9. Y. Xue, M. S. Pavlova, Y. E. Ryabov, et al., J. Am. Chem. Soc., **129**, 6827 (2007).
10. J. M. Richardson, M. M. Lopez, and G. I. Makhata-dze, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102** (5), 1413 (2005).
11. L. Serrano, J. L. Neira, J. Sancho, and A. R. Fersht, Nature, **356** (6368), 453 (1992).
12. S. Penel and A. J. Doig, J. Mol. Biol., **305** (4), 961 (2001).

Alanine: from the Usual to the Unexpected

V.G. Tumanyan*, A.A. Anashkina*, I.V. Filatov, K.V. Smirnov*,
I.Yu. Torshin***, and N.G. Esipova***

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

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia*

****Dorodnicyn Computing Centre, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 40, Moscow, 119333 Russia*

Data from the experiments provides a possibility to talk about anomalously large contribution of alanine to the stability of an α -helix and other protein conformations. Independent data (and also experimental ones) suggest that alanine plays an especially big role in stabilization of the α -helix. This can be seen through the positive contribution of alanine both to the entropy of the system and to the enthalpy. The high contribution of alanine to the enthalpy of formation of the α helix contradicts the generally accepted view that the entropy should decrease during the formation of regular structures in proteins. Among three types of helices in proteins, alanine stabilizes two secondary structures: the α helix and the left helix of polyproline II, and in the case of fibrillar proteins, alanine also stabilizes the β sheet. The stabilizing effect of alanine on the α helix structure extends to both natively unfolded proteins and α helix–support conjugates. Thus, it is no exaggeration to say that formation of secondary structure relies on alanine. The revealed contradictions are of paradoxical nature and yet there is no interpretation of the above-mentioned findings (first of all, substantiation of the contribution of alanine to the enthalpy of fusion in terms of fundamental physics) so far to resolve them. Meanwhile, the data and comments presented in this work hold out the promise of progress in resolving the revealed contradictions.

Keywords: alanine, conformationally stable/labile protein segments, local protein structure, conformational analysis, statistical analysis, NMR, molecular dynamics

ИМИТАЦИОННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАБОТЫ ГЛУТАМАТ-ЦИСТЕИН ЛИГАЗЫ

© 2023 г. В.С. Копылова*,#, С.Е. Бороновский*, Я.Р. Нарциссов*,**

*НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, ул. 6-я Радиальная, 24/14, Москва, 115404, Россия

**Biomedical Research Group, BiDiPharma GmbH, Bültbek, 5, 22962, Siek, Germany

#E-mail: kopilova.veronika@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.10.2022 г.

После доработки 22.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин) — один из основных внутриклеточных антиоксидантов, играющих важную роль в клеточном обмене. В клетках млекопитающих глутатион синтезируется в две стадии, первая из которых катализируется глутамат-цистеин лигазой и является лимитирующей. В данной работе стохастический алгоритм на основе марковских цепей с непрерывным временем был использован для моделирования работы глутамат-цистеин лигазы. Было рассмотрено несколько механизмов работы, учитывающих обратное ингибирование глутатионом, а также порядок присоединения АТФ. На основании физиологических концентраций участвующих в реакции метаболитов была рассчитана скорость работы глутамат-цистеин лигазы эритроцитов человека. Среди возможных вариантов присоединения субстратов в активный центр исследуемого фермента только механизм, предусматривающий первичное связывание с АТФ, позволяет получить значение для скорости реакции, соответствующее экспериментальной измеренной активности глутамат-цистеин лигазы при физиологических уровнях субстратов. В случае других схем присоединения субстратов различие значений скорости составляет более порядка. Проведенный анализ позволяет сделать вывод о том, что при моделировании биосинтеза глутатиона в условиях *in vivo* необходимо учитывать как концентрацию молекул АТФ, так и обратное ингибирование глутатионом.

Ключевые слова: глутатион, глутамат-цистеин лигаза, имитационное моделирование, стохастический алгоритм.

DOI: 10.31857/S0006302923020023, EDN: BZOQUQ

Глутатион представляет собой трипептид, молекула которого содержит глутамат, цистеин и глицин. Это соединение выполняет важную роль в функционировании клеток, являясь партнером по реакции детоксикации ксенобиотиков и кофактором в реакциях изомеризации. Ключевую роль глутатион играет как главный компонент антиоксидантной системы, которая выступает главным защитным механизмом при развитии целого ряда нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся острой и хронической гипоксией [1–3]. Кроме того, глутатион представляет собой форму хранения и транспорта цистеина, необходим для пролиферации клеток и поддерживает окислительно-восстановительный потенциал тиолов, сохраняя сульфгидрильные группы белков в восстановленной форме [4]. Возрастные изменения, стимуляция иммунных реакций, развитие острых и хронических заболеваний ассоциированы с синтезом глутатиона [5]. Глутатион существует в двух основных формах — восстановлен-

ной (GSH) и окисленной (GSSG), структуры которых приведены на рис. 1. Почти все биологические функции глутатиона реализуются за счет превращения восстановленной формы в окисленную с помощью различных ферментов, таких как глутатион пероксидазы, пероксиредоксины, глутаредоксины, глутатион трансферазы и другие [6]. Одновременно с этим происходит восстановление глутатиона при участии NADPH-зависимой глутатион редуктазы, основная функция которой заключается в поддержании соотношения GSH/GSSG.

Основная доля GSH в клетках эукариот находится в цитозоле, митохондриальный пул составляет 9–15%, при этом другие клеточные компартменты (особенно микросомы) имеют значительно более низкое содержание GSH [7]. В целом, уровень глутатиона в клетках млекопитающих очень высок и может достигать 12 мМ [4]. При этом концентрация GSSG в тканях не превышает 0.5–1.0% от GSH, что объясняется необходимо-

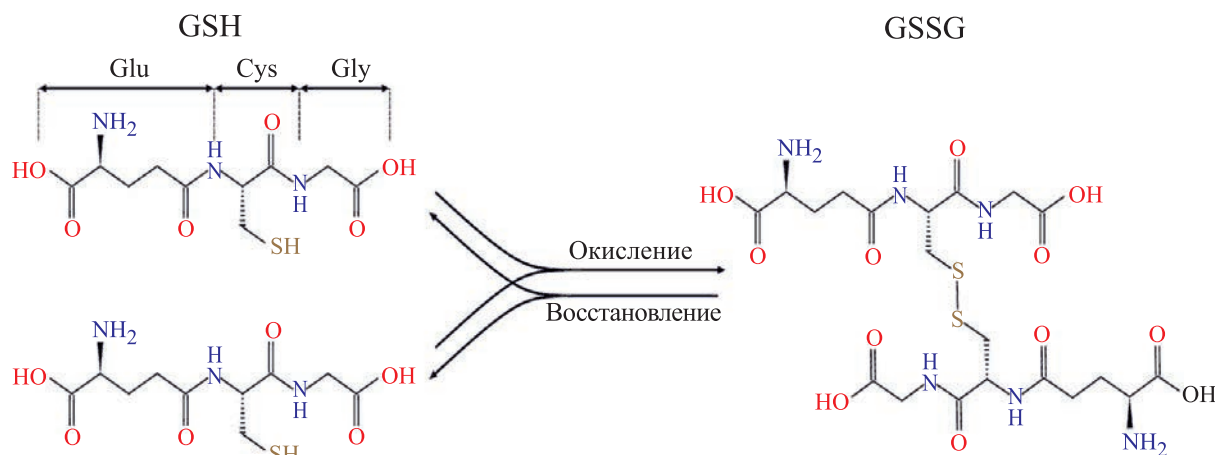


Рис. 1. Структура восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона.

стью поддерживать тиол-дисульфидное равновесие в клетке, препятствуя взаимодействию GSSG с сульфгидрильными группами белков [5].

В отличие от белковых пептидов, образуемых путем матричного синтеза, глутатион имеет свой путь синтеза, который осуществляется в цитозоле всех клеток млекопитающих посредством двух последовательных АТФ-зависимых реакций. Первая реакция катализируется глутамат-цистеин лигазой (GCL) (EC 6.3.2.2) с участием двухвалентных ионов магния или марганца (рис. 2).

На первом этапе синтеза образуется пептидная связь с участием γ -карбоксильной группы глутаминовой кислоты, эта необычная особенность защищает дипептид от гидролиза внутриклеточ-

ными пептидазами и способствует устойчивости глутатиона к внутриклеточной деградации. Глутамат-цистеин лигаза представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой (~73 кДа) и легкой (~27 кДа) субъединиц. Тяжелая субъединица, активируется во время окислительного стресса и проявляет каталитическую активность фермента, тогда как легкая субъединица играет регулируемую роль, модулируя сродство тяжелой субъединицы к субстратам и ингибиторам [8]. Трехмерная структура GCL была идентифицирована для некоторых видов бактерий, растений, а также дрожжей, однако, фермент человека до сих пор не был кристаллизован [9]. В связи с этим использовать точные методы для моделирования активно-

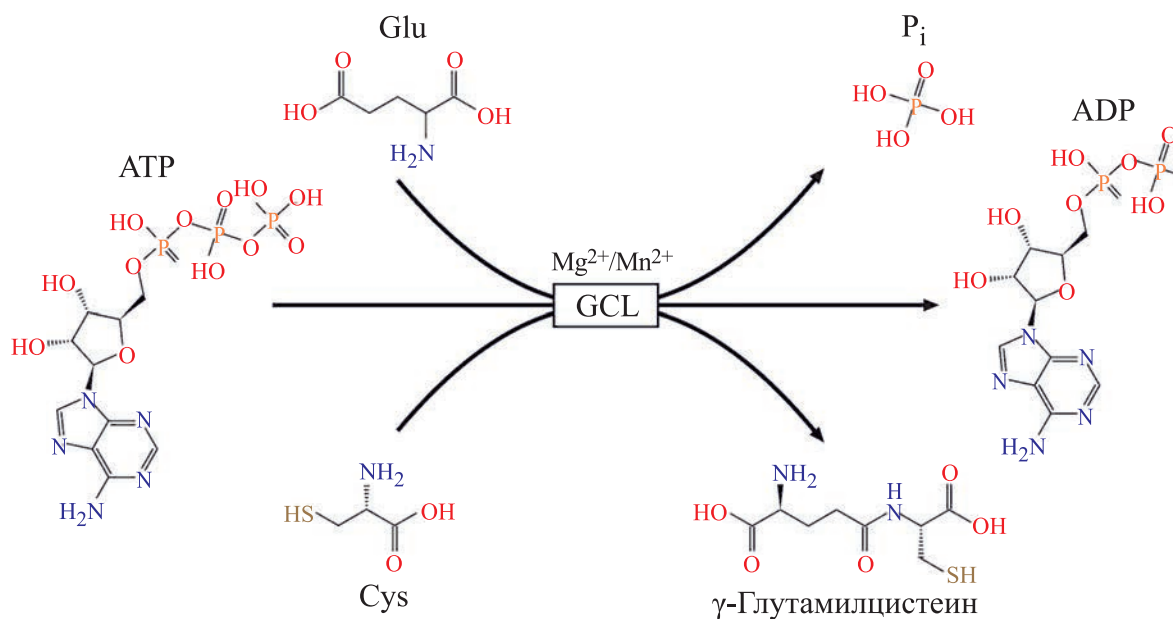


Рис. 2. Первая стадия синтеза глутатиона, катализируемая глутамат-цистеин лигазой.

сти белка человека, такие как, например, методы молекулярной динамики, не представляется возможным.

Активность GCL регулируется на нескольких уровнях, что позволяет ряду стимулов либо индуцировать, либо ингибировать активность фермента. Глутатион может регулировать свой собственный синтез в физиологических концентрациях путем ингибирования GCL по отрицательной обратной связи, что свидетельствует о быстрой реакции фермента на повышенную потребность в GSH [10]. Кроме того, активность глутамат-цистеин лигазы может регулироваться обратимыми ковалентными или нековалентными взаимодействиями между тяжелой и легкой субъединицами. В ответ на окислительный стресс или другие негативные условия, когда требуется больше GSH, экспрессия GCL регулируется двумя редокс-чувствительными сигнальными путями, состоящими из систем Nrf2-EpRE и AP-1 [11].

Вторая реакция катализируется глутатион синтетазой (EC 6.3.2.3), которая добавляет глицин к γ -глутамилцистеину и образует GSH. Глутатион синтетаза функционирует как гомодимер, где каждая субъединица имеет молекулярную массу 52 кДа, и принадлежит к суперсемейству глутатионсинтетазных АТФ-связывающих доменов [12]. Эксперименты по сверхэкспрессии GCL и глутатион синтетазы показали, что лимитирующей стадией синтеза GSH является первая реакция [13]. Помимо описанных выше стадий биосинтеза глутатиона существует также механизм его деградации, включающий четыре реакции [14]. В совокупности они образуют γ -глутамильный цикл, который функционирует следующим образом: γ -глутамилтрансфераза катализирует перенос γ -глутамилового остатка на нуклеофильные акцепторы, в результате чего происходит гидролиз или транслутамилирование. В первом варианте вода выступает в качестве акцептора, гидролизующего GSH, а во втором — акцепторами выступают аминокислоты, дипептиды, а также другая молекула GSH. Наиболее активным акцептором аминокислот является цистин, но и другие нейтральные аминокислоты, особенно метионин и глутамин, могут выступать в этой роли [15]. На следующем этапе цистеинил-глициновая часть GSH гидролизует на составляющие его аминокислоты дипептидазой. Затем цистеин транспортируется в клетки, где основная его масса расходуется на синтез глутатиона. В свою очередь, γ -глутамиламинокислота метаболизируется до 5-оксипролина и свободной аминокислоты с помощью γ -глутамилциклотрансферазы. В конечном итоге 5-оксипролин раскрывается 5-оксипролиназой, превращая 5-оксипролин в глута-

мат, который затем может использоваться в синтезе GSH. Гамма-глутамильный цикл является сложным метаболическим путем, все функции которого на текущий момент до конца не установлены. Изначально предполагалось, что этот цикл служит для переноса нейтральных аминокислот через плазматическую мембрану [16]. Кроме того, в большинстве клеток он позволяет использовать глутатион в качестве источника цистеина [15]. Помимо этого, в нейрональных клетках γ -глутамильный цикл может компенсировать снижение возбуждающей нейротрансмиссии, так как глутатион может являться одной из форм хранения глутамата [17].

Мутации, приводящие к инактивации глутамат-цистеин лигазы, характеризуются развитием различных патологических состояний, которые сопровождаются гемолитической анемией, неврологическими симптомами, миопатией и аминоацидурией. При проведении исследований на нокаутных мышцах было показано, что отсутствие легкой субъединицы фермента приводит к существенному снижению уровня глутатиона в клетках без соматических проявлений, тогда как мыши без тяжелой субъединицы погибают на ранних сроках беременности [18].

Большое количество экспериментальных работ посвящено изучению кинетики глутамат-цистеин лигазы. Кинетический механизм был описан как упорядоченный [19], с первичным связыванием АТФ и случайным присоединением оставшихся субстратов [20] и полностью случайным связыванием субстратов [21]. Первые исследования начальной скорости и ингибирования указывают на частично случайный механизм работы белка, при котором сначала присоединяется АТФ, а затем цистеин либо глутамат связываются в случайном порядке с GCL. В соответствии с предполагаемым механизмом АДФ является конкурентным ингибитором по отношению к АТФ и неконкурентным ингибитором по отношению к аминокислотным субстратам [20]. При этом при изучении метаболизма глутатиона с использованием математических моделей не всегда учитывается влияние АТФ на скорость работы глутамат-цистеин лигазы. Так, например, в исследовании синтеза GSH и фитохелатина в растениях на основе кинетических уравнений для описания работы GCL использовался обратимый случайный бирактивный механизм Михаэлиса—Ментен с конкурентным ингибированием GSH по глутамату [22]. Аналогичная схема была использована и при исследовании периода полураспада и регуляции синтеза глутатиона, а также его чувствительности к колебаниям поступления аминокислот [23]. В более поздней работе изучалась регуляция концентрации глутатиона в эритроцитах с ис-

пользованием математической модели, в которой для GCL рассматривался упорядоченный механизм работы белка [24]. Кроме того, на основе глобальной аппроксимации данных о начальной скорости глутамат-цистеин лигазы растений было показано, что лучшее совпадение с экспериментальными данными было достигнуто при использовании механизма «random-ter» [25]. Однако авторы утверждают, что факторы взаимодействия указывают на предпочтительный порядок связывания субстратов с активным центром фермента. Необходимо отметить, что данные об образовании различных промежуточных продуктов реакции не подтверждают механизм «пинг-понг» для моделирования активности GCL различных организмов [26].

Для разрешения неопределенности в выборе возможного механизма работы фермента в работе применяются комбинированные методы математического моделирования. Среди неизученных вопросов особо необходимо отметить регуляцию активности GCL глутатионом и АТФ, а также сам механизм присоединения АТФ к белковым комплексам при уровне субстратов близким к состоянию *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для моделирования активности глутамат-цистеин лигазы используется компьютерный алгоритм, основанный на стохастическом подходе, в котором каталитический цикл фермента представлен как набор последовательных переходов между отдельными состояниями с различным количеством метаболитов. В данной работе схема переходов между дискретными состояниями реализуется на основе марковских цепей с непрерывным временем. Предполагается, что вероятность перехода из состояния i в состояние j $P\{i \rightarrow j | \Delta t\}$ прямо пропорциональна рассматриваемому отрезку времени Δt :

$$P\{i \rightarrow j | \Delta t\} = q_{ij} \cdot \Delta t + o(\Delta t)$$

$$P\{i \rightarrow i | \Delta t\} = 1 - \sum_{i \neq j} q_{ij} \cdot \Delta t + o(\Delta t)$$

где q_{ij} — интенсивность перехода, характеризующая скорость соответствующего процесса, а $P\{i \rightarrow j | \Delta t\}$ — вероятность остаться системе в состоянии j .

Имитационное моделирование работы белка осуществляется путем генерации непрерывных и дискретных случайных величин, зная законы перехода между различными состояниями и количественные параметры. В качестве основного параметра в данной модели выступает матрица интенсивностей, на основе которой определяется направление перехода по цепи, а также рассчитывается время пребывания в конкретном состоянии.

Таким образом, вероятность перехода из состояния i в состояние j за время t с учетом времени перехода τ :

$$P\{i \rightarrow j | t \geq \tau\} = \begin{cases} \frac{q_{ij}}{\sum_{i \neq j} q_{ij}}, & i \neq j \\ 0, & i = j \end{cases}$$

Суть имитационного моделирования таких систем заключается в поиске путей реакции с последующей количественной оценкой необходимых биологических характеристик. В целом задачу по поиску путей протекания процесса с использованием данного метода исследования можно разделить на несколько основных этапов. В первую очередь необходимо выбрать начальное состояние системы. На следующем шаге рассчитывается время перехода в текущее состояние путем генерации непрерывной случайной величины, распределенной экспоненциально. Затем определяется следующее состояние системы с учетом выбранного времени перехода с использованием относительных интенсивностей переходов. Таким образом, полученное состояние становится новым начальным и далее используется для генерации дальнейшего перехода к следующему состоянию. Далее процесс моделирования продолжается до достижения конечного состояния системы, в котором фермент находится в свободной форме. Рассмотренный в работе алгоритм применялся для моделирования работы изолированного белка на примере цитохромоксидазы митохондрий [27]. В целом, методический подход по оценке активности единичного белка на основе различных стохастических комбинированных механизмов использовался также для оценки активности F_0F_1 -АТФ-синтазы [28], глутаминсинтетазы [29] и глутаматного переносчика в нейронах [30].

В связи с тем, что на сегодняшний день точный механизм работы глутамат-цистеин лигазы неизвестен, и существуют разные подходы к моделированию активности этого фермента, в данной работе рассматривается несколько схем работы GCL, учитывающих обратное ингибирование глутатионом, а также порядок присоединения АТФ. На рис. 3а представлена схема I, в которой последовательно присоединяется каждый из субстратов, а затем в обратном порядке происходит диссоциация продукта. При этом ингибирование глутатионом происходит конкурентно с пустой формой белка. Схема II представляет собой расширение относительно конкурентного связывания GSH известной концепции [31], предполагающей, в первую очередь, присоединение АТФ, а затем случайное связывание с остальными субстратами (рис. 3б). Кроме того, интересным для

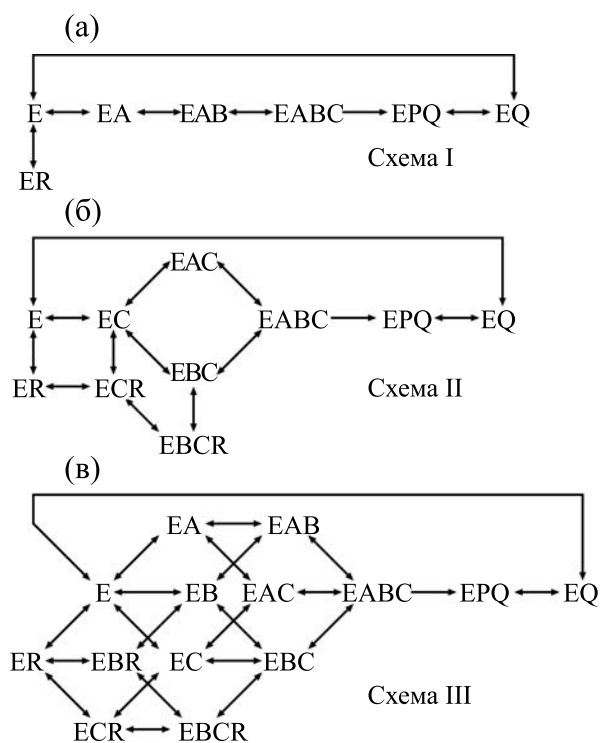


Рис. 3. Схемы работы глутамат-цистеин лигазы с конкурентным по глутамату ингибированием глутатионом: (а) – последовательное присоединение каждого из субстратов; (б) – первичное присоединение АТФ с последующим случайным присоединением оставшихся субстратов; (в) – полностью случайный порядок связывания субстратов. Е – GCL в активной форме, А – глутамат, В – цистеин, С – АТФ, Р – АДФ, Q – γ -глутамилцистеин, R – глутатион.

рассмотрения представляется механизм, который предусматривает полностью случайный порядок связывания субстратов с конкурентным по глутамату ингибированием глутатионом (схема III, рис. 3в). Моделирование работы белка на основе приведенных схем с использованием методов кинетики позволяет описать ансамбль белков, однако, единственный белок работает стохастически, в отличие от работы в ансамбле. Следовательно, для оценки активности единичного фермента предпочтительнее использовать описанный выше имитационный подход.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используемый в данной работе подход позволяет воспроизвести процесс протекания реакции, катализируемой GCL. Результатом единичного компьютерного эксперимента является зависимость потоков всех метаболитов от времени в единичной точке пространства концентраций. Чтобы оценить количество полученного в ходе реакции продукта, были построены зависимости произведенного γ -глутамилцистеина от времени для трех описанных выше схем работы глутамат-

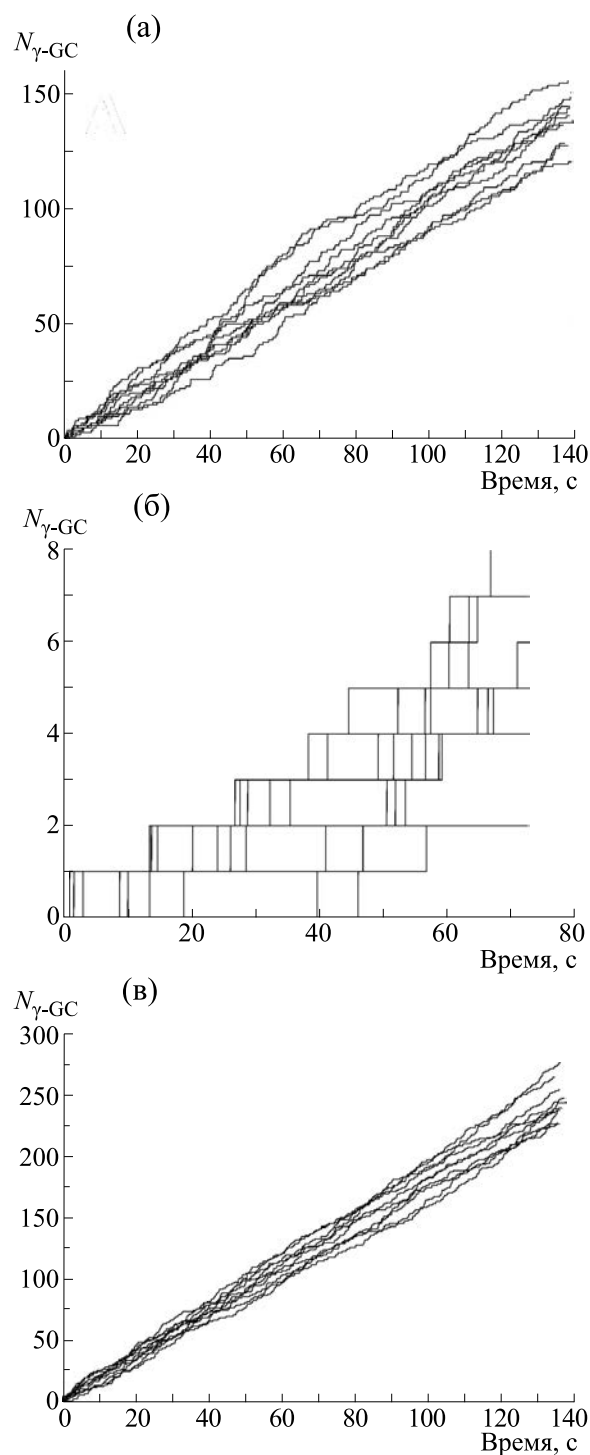


Рис. 4. Зависимость произведенного единичным белком γ -глутамилцистеина от времени для трех схем работы: (а) – схема I; (б) – схема II; (в) – схема III.

цистеин лигазы (рис. 4). Для каждого варианта моделирования активности фермента было проведено 10 экспериментов, каждый из которых состоял из $2 \cdot 10^7$ шагов. Как видно из приведенных графиков, в случае первичного связывания с АТФ

Таблица 1. Сравнение кинетических параметров GCL, полученных для трех рассматриваемых механизмов работы, с литературными данными

Субстрат	Схема	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$		
		Результаты моделирования	Результаты моделирования	Экспериментальные данные	
L-глутамат	I	129.9	2.0	1.9–2.4	[8, 31]
	II	125.7	2.0		
	III	134.1	2.1		
L-цистеин	I	127.2	0.30	0.1–0.5	[31, 33]
	II	123.6	0.33		
	III	131.2	0.28		
АТФ	I	128.2	0.38	0.35–0.88	[31, 34, 35]
	II	130.6	0.86		
	III	132.0	0.41		

поток γ -глутамилцистеина является наименьшим, а максимальная эффективность достигается при полностью случайном порядке присоединения субстратов. Кроме того, схема II характеризуется наиболее стохастическим протеканием реакции, при котором количество произведенного γ -глутамилцистеина существенно отличается от эксперимента к эксперименту, тогда как для схемы III количество продукта практически не изменяется в серии экспериментов. Такой характер работы белка связан с высокой чувствительностью к концентрации АТФ и GSH, которые в данной схеме являются лимитирующими факторами, в особенности в условиях *in vivo*. Большая часть времени модельного эксперимента приходится на переходы между состояниями E, E-АТФ и E-GSH, что приводит как к существенному различию между отдельными модельными экспериментами, так и к кратному падению средней скорости синтеза γ -глутамилцистеина. Для схемы с последовательным присоединением субстратов (рис. 4а) характерно относительно случайное протекание процесса, а количество произведенного γ -глутамилцистеина близко с аналогичной характеристикой для схемы III.

Стохастический алгоритм также применяли для оценки скорости работы фермента при различных концентрациях одного из субстратов, при этом значения концентраций двух других субстратов фиксировались на уровне насыщения, который используется при экспериментальном изучении кинетики GCL [32]. Для каждой точки в пространстве концентраций было рассчитано среднее значение скорости и стандартное отклонение по серии из 20 экспериментов (рис. 5). По-

лученные значения основных кинетических параметров хорошо согласуются с экспериментальными данными для каждой из рассматриваемых схем работы белка (табл. 1). При этом значение константы K_m для цистеина, учитывая клеточную концентрацию этой аминокислоты в условиях *in vivo*, свидетельствует о том, что именно концентрация цистеина является лимитирующим фактором работы глутамат-цистеин лигазы. Данный вывод подтверждается экспериментальными исследованиями, в которых показано, что регуляция синтеза глутатиона в целом осуществляется на первом этапе за счет нехватки цистеина. Кроме того, молекул АТФ также может быть недостаточно для высокой скорости протекания реакции, исходя из рассчитанных значений K_m , причем наиболее существенно это сказывается для механизма работы GCL с первичным связыванием с АТФ. Наряду с этим модельное значение k_{cat} согласуется с результатами исследования глутамат-цистеин лигазы эритроцитов человека [24].

Как было описано ранее, GCL ингибируется глутатионом по типу обратной связи, что указывает на необходимость учитывать влияние данного метаболита при моделировании активности глутамат-цистеин лигазы. Оценка ингибирования GCL глутатионом проводилась путем расчета скорости реакции с увеличением концентрации глутамата для каждой фиксированной концентрации GSH. На рис. 6а приведена зависимость обратной скорости от обратной концентрации глутамата при различных концентрациях GSH, лежащих в пределах физиологического диапазона. Эффект ингибирования активности фермента показан только для схемы с последовательным

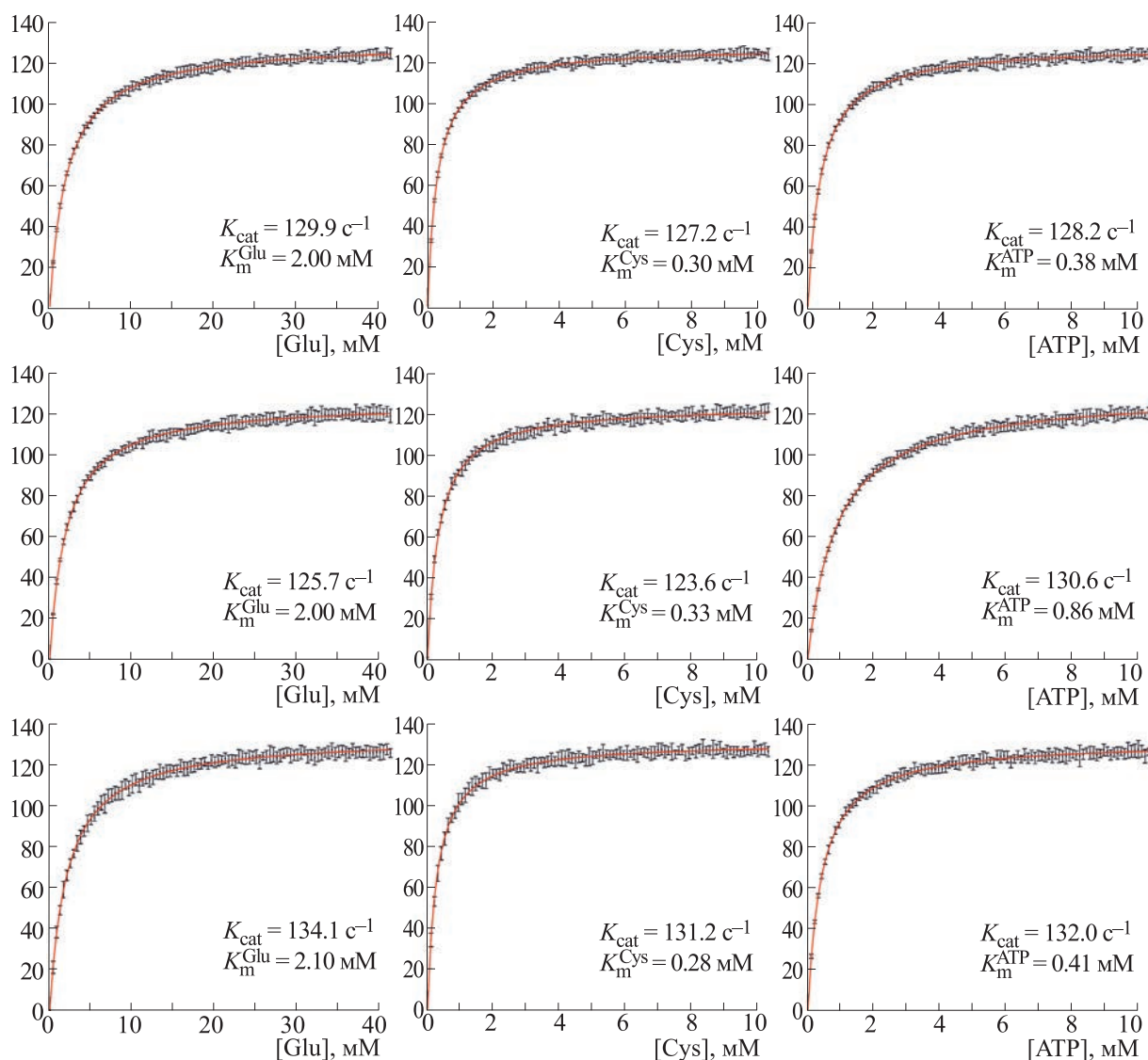


Рис. 5. Скорость работы единичного белка в зависимости от концентрации одного из субстратов для каждой из трех схем работы фермента: верхний ряд — схема I; средний ряд — схема II; нижний ряд — схема III. Результаты представлены в виде $M \pm SD$ для 20 независимо проведенных компьютерных экспериментов.

присоединением субстратов, так как для двух других механизмов двойная обратная зависимость выглядит аналогичным образом. Полученные значения константы ингибирования ($K_i = 2.27–2.32$) согласуются с экспериментальными данными для каждой из рассматриваемых схем работы GCL [36]. Также была построена зависимость относительной активности фермента от концентрации глутатиона (рис. 6б). Относительная активность представляет собой отношение активности GCL в присутствии различных концентраций GSH к аналогичной активности в отсутствии данного ингибитора. Эффективность работы глутамат-цистеин лигазы уменьшается на 10% при концентрации GSH, равной 1 мМ, при этом добавление 10 мМ глутатиона вызывает снижение

активности на 30%. Следует отметить, что такие значения концентраций глутатиона наблюдаются в клетках в условиях *in vivo*. Представленная зависимость полностью совпадает с аналогичной кривой, полученной при экспериментальном исследовании кинетики ингибирования глутатионом глутамат-цистеин лигазы человека [33].

Наиболее интересным представляется изучение активности фермента при концентрациях субстратов и регуляторов, соответствующих измеренному *in vivo*. В данном исследовании с этой целью проводили моделирование работы глутамат-цистеин лигазы эритроцитов человека. Концентрации метаболитов, участвующих в реакции, были зафиксированы на физиологическом уровне в соответствии с экспериментальными данными

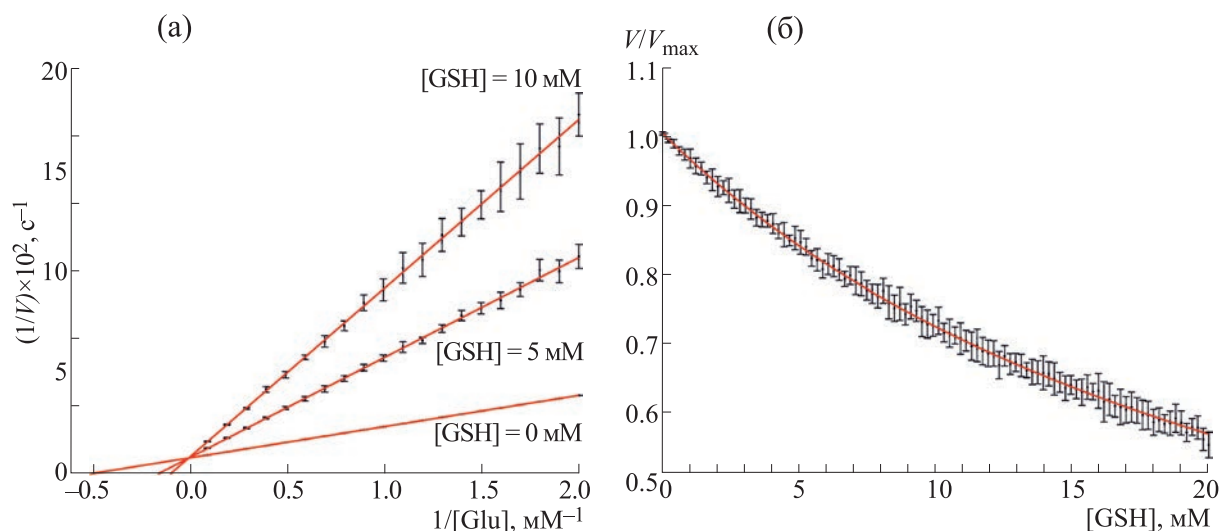


Рис. 6. Ингибирование единичного белка глутатионом. (а) — двойная обратная зависимость скорости реакции от концентрации глутамата в присутствии 0, 5 и 10 мМ GSH; (б) — зависимость относительной активности от концентрации глутатиона. Результаты представлены в виде $M \pm SD$ для 20 независимо проведенных компьютерных экспериментов.

ми. Так, концентрацию цистеина принимали равной 5 мкМ [37], а концентрацию глутатиона — 1.4 мМ [38]. Поскольку гликолиз достаточно стабильно поддерживает концентрации АТФ и АДФ в эритроцитах на одном уровне, концентрации этих двух метаболитов также поддерживались постоянными и равнялись 0.65 мМ и 0.085 мМ соответственно [39]. На рис. 7 представлена зависимость скорости работы GCL от концентрации глутамата для трех рассматриваемых схем. Как видно из приведенных результатов, скорости работы фермента существенно отличаются для каждого из механизмов. Так, с максимальной скоростью работает белок в случае полностью случайного порядка присоединения субстратов (рис. 7в), при этом при последовательном связывании субстратов скорость GCL существенно снижается (рис. 7а). С учетом физиологической концентрации глутамата в эритроцитах человека, равной 0.4 мМ [40], была рассчитана скорость работы глутамат-цистеин лигазы в условиях *in vivo*.

Необходимо отметить, что несмотря на то, что значения K_m , рассчитанные при концентрациях субстратов, соответствующих уровню насыщения, для всех трех моделей входят в диапазон экспериментальных значений K_m (табл. 1), только для механизма, предусматривающего первичное связывание с АТФ, величина скорости ($V = (0.049 \pm 0.027) \text{ s}^{-1}$) согласуется с экспериментально измеренной в эритроцитах человека скоростью работы GCL [41]. Так, для схемы с последовательным присоединением субстратов (схема I) скорость работы фермента превосходит экспериментальное значение более, чем в пять

раз, тогда как при полностью случайном порядке связывания субстратов (схема III) различие значений составляет более порядка. Таким образом, можно сделать вывод, что наиболее точно механизм работы фермента в условиях *in vivo* воспроизводится с использованием схемы II. Более того, моделирование биосинтеза глутатиона в предположении, что происходит насыщение АТФ, не отвечает физиологическим условиям, поскольку значения K_m по АТФ для схемы II (табл. 1) лежат выше соответствующих эритроцитарных концентраций. В условиях стресса, влияющих на биохимические пути выработки АТФ, данное предположение может оказаться еще менее достоверным. Так, например, на модели дрожжей было показано, что снижение концентрации АТФ ниже 2 мМ приводит к резкому снижению уровню глутатиона, аналогичная реакция на изменение АТФ ожидается и от растительной системы [22].

Поскольку экспериментальные измерения концентрации γ -глутамилцистеина в эритроцитах человека не проводились, концентрация данного метаболита в системе принималась равной нулю. Однако если предположить, что концентрация γ -глутамилцистеина сопоставима с измеренной в растительных клетках (0.04 мМ [42]), то скорость работы GCL в случае присоединения АТФ в качестве первого субстрата снизится в полтора раза: $V = (0.031 \pm 0.018) \text{ s}^{-1}$. Данная величина также соответствует физиологическому диапазону скорости работы эритроцитарной GCL человека.

Следует подчеркнуть, что экспериментально измеренные концентрации глутатиона в эритро-

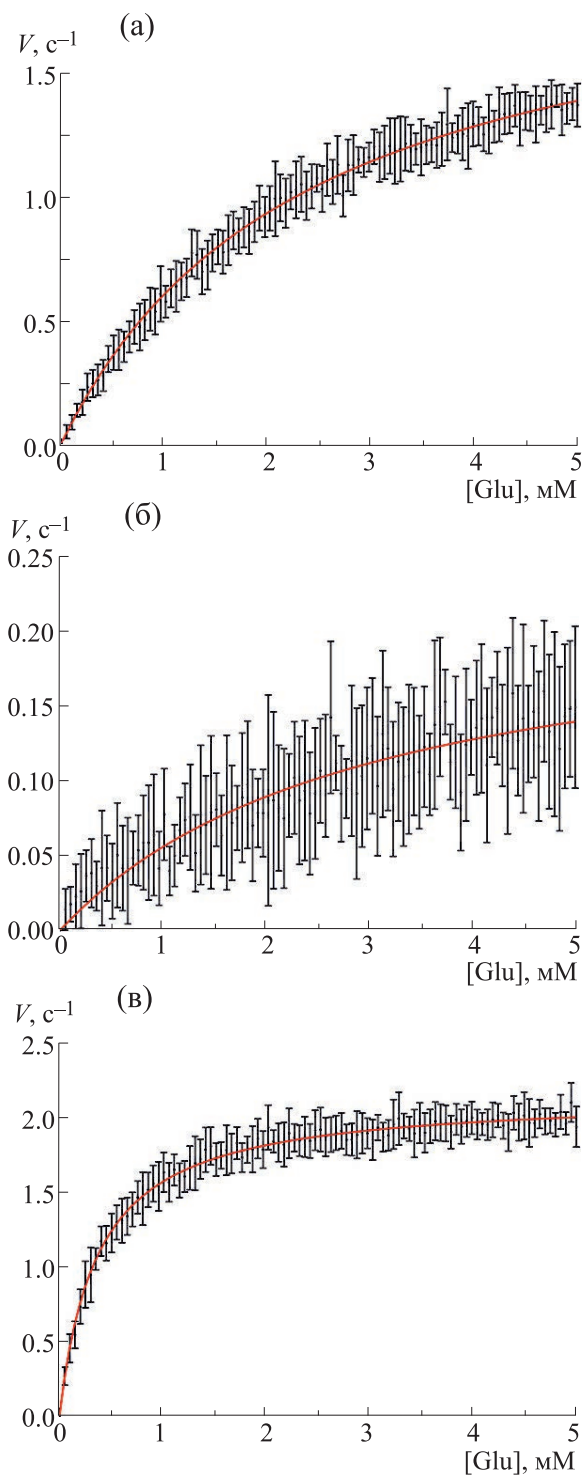


Рис. 7. Скорость работы единичного белка при концентрациях субстратов и регуляторов, соответствующих измеренному *in vivo*, в зависимости от концентрации глутамата для каждой из трех схем работы фермента: (а) — схема I; (б) — схема II; (в) — схема III. Результаты представлены в виде $M \pm SD$ для 20 независимо проведенных компьютерных экспериментов.

цитах человека лежат в широком диапазоне от 1.2 mM до 8.8 mM [41, 43]. Увеличение уровня GSH в клетках крови человека может существенно снижать скорость работы глутамат-цистеин

лигазы (рис. 8). Так, изменение концентрации глутатиона в указанном диапазоне приводит к уменьшению относительной активности фермента до 0.41. Таким образом, одним из механизмов

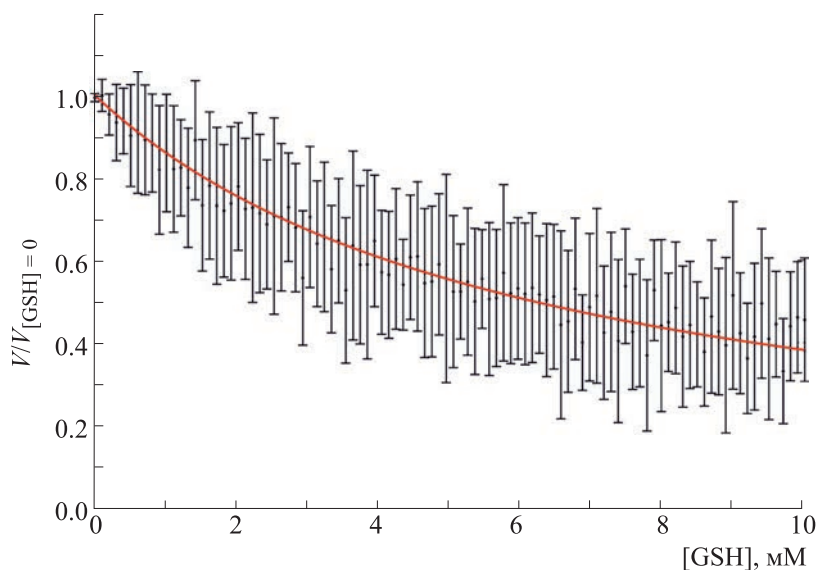


Рис. 8. Относительная скорость работы единичного белка при концентрациях субстратов и регуляторов, соответствующих измеренному *in vivo*, в зависимости от концентрации глутатиона для схемы II. Результаты представлены в виде $M \pm SD$ для 20 независимо проведенных компьютерных экспериментов.

поддержания необходимой концентрации GSH является регуляция активности глутамат-цистеин лигазы. Следовательно, при моделировании синтеза глутатиона в условиях *in vivo* необходимо учитывать обратное ингибирование GCL.

Кроме того, оценивали распределение частот состояний, в которых находилась система в течение модельного эксперимента (рис. 9). Концентрации всех метаболитов в данном исследовании были установлены на физиологическом для эритроцитов человека уровне, концентрация GSH, в частности, принималась равной 1.4 mM. В соответствии с проведенным анализом, белок чаще всего находится в свободном состоянии (E), либо связан с глутатионом (E-GSH). По-видимому, это объясняется достаточно низкими концентрациями аминокислотных метаболитов и высоким уровнем глутатиона в клетках крови человека. Также высока вероятность нахождения фермента связанным с АТФ, причем как в свободном со-

соединении (E-GSH), либо в связанном с АТФ состоянии (E-GSH*ATP). По-видимому, это объясняется достаточно низкими концентрациями аминокислотных метаболитов и высоким уровнем глутатиона в клетках крови человека. Также высока вероятность нахождения фермента связанным с АТФ, причем как в свободном со-

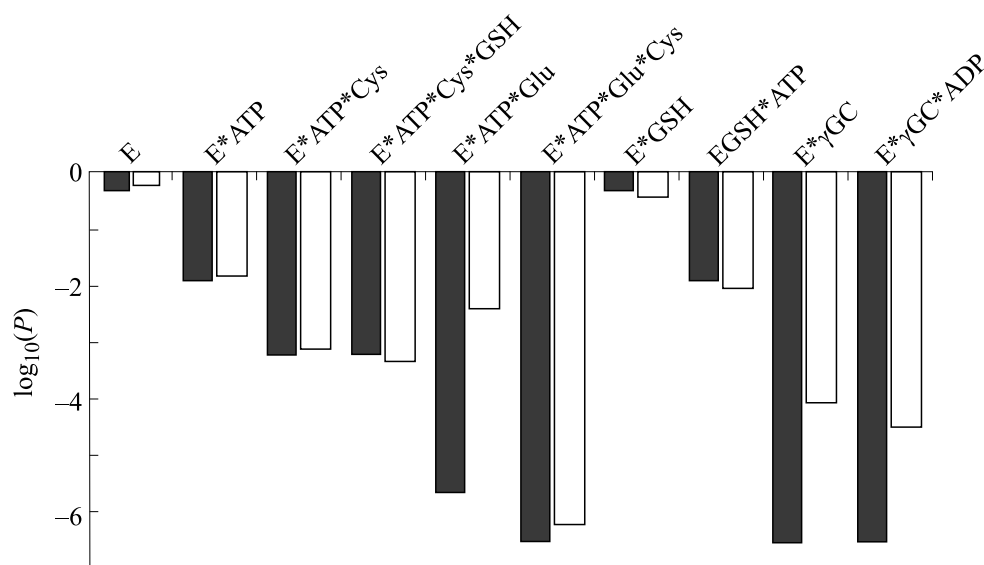


Рис. 9. Частота (темные столбики) и взвешенная по времени частота (светлые столбики) нахождения единичного белка в определенном состоянии при концентрациях субстратов и регуляторов, соответствующих измеренным *in vivo*.

стоянии (Е-АТФ), так и в комплексе с глутатионом (Е-GSH-АТФ). Интересно, что реже всего встречается состояние, в котором GCL связан со всеми субстратами (Е-АТФ-Glu-Cys), при этом, исходя из взвешенной по времени гистограммы, данная стадия является достаточно быстрой. Обратная ситуация наблюдается для фермента, связанного с АТФ и глутаматом (Е-АТФ-Glu), что, скорее всего, обусловлено конкуренцией глутатиона и глутамата за сайт связывания с GCL.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование активности фермента с использованием стохастических алгоритмов может быть полезно для оценки существующих теорий и экспериментальных данных, так как такой подход позволяет воспроизвести работу единичного белка, основываясь на известных физиологических параметрах. Изучение работы единичного белка является первым шагом на пути моделирования метаболического пути, в частности, γ -глутамильного цикла, что объясняется необходимостью корректного математического представления активности всех участвующих в нем ферментов. В данной работе с помощью описанного подхода было показано, что при моделировании биосинтеза глутатиона в условиях *in vivo* необходимо учитывать влияние концентрации АТФ на эффективность работы глутамат-цистеин лигазы, которая катализирует лимитирующую стадию синтеза GSH. Сравнение рассчитанной скорости работы глутамат-цистеин лигазы в условиях *in vivo* с экспериментальными значениями позволяет сделать вывод о том, что первичной стадией синтеза γ -глутамилцистеина является связывание GCL с молекулой АТФ. Также существенное влияние на скорость работы данного фермента оказывает обратное ингибирование глутатионом, концентрация которого в клетках человека может сильно варьироваться. Необходимо подчеркнуть, что в состоянии оксидативного стресса, сопровождаемого изменениями клеточных концентраций глутатиона, ингибирование будет оказывать еще большее влияние на эффективность синтеза GSH. Данный механизм является одним из способов поддержания необходимой клеточной концентрации глутатиона.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. A. Korneev, I. A. Komissarova, and Y. R. Nartsissov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **116**, 1089 (1993).
2. В. И. Скворцова, Я. Р. Нарциссов, М. К. Бодыхов и др., *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **107**, 30 (2007).
3. Y. R. Nartsissov, *Biochem. Soc. Trans.*, **45** (5), 1097 (2017).
4. R. Dringen, *Progr. Neurobiol.*, **62** (6), 649 (2000).
5. Л. П. Смирнов и И. В. Суховская, *Учен. зап. Петрозавод. гос. ун-та*, **6** (143), 34 (2014).
6. M. Deponte, *Antioxid. Redox Signal.*, **27** (15), 1130 (2017).
7. V. I. Kulinskii and L. S. Kolesnichenko, *Biomed. Khim.*, **55** (3), 255 (2009).
8. K. Chik, F. Flourie, K. Arab, et al., *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **827** (1), 32 (2005).
9. Y. Yang, E. D. Lenherr, R. Gromes, et al., *Biochem. J.*, **476** (7), 1191 (2019).
10. R. Njalsson, *Cell Mol. Life Sci.*, **62** (17), 1938 (2005).
11. H. Zhang and H. J. Forman, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **23** (7), 722 (2012).
12. A. Dinescu, M. E. Anderson, and T. R. Cundari, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353** (2), 450 (2007).
13. M. Grant, F. H. MacIver, and I. W. Dawes, *Mol. Biol. Cell.*, **8** (9), 1699 (1997).
14. K. Bachhawat and S. Yadav, *IUBMB Life*, **70** (7), 585 (2018).
15. V. I. Kulinskii and L. S. Kolesnichenko, *Biomed. Khim.*, **55** (4), 365 (2009).
16. A. Meister and M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 711 (1983).
17. T. W. Sedlak, B. D. Paul, G. M. Parker, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116** (7), 2701 (2019).
18. О. А. Борисенко, М. И. Бушма, О. Н. Басалай и др., *Мед. новости*, **7** (298), 3 (2019).
19. G. E. van Buskirk, J. E. Gander, and W. B. Rathbun, *Eur. J. Biochem.*, **85** (2), 589 (1978).
20. B. Yip and F. B. Rudolph, *J. Biol. Chem.*, **251** (12), 3563 (1976).
21. D. L. Brekken and M. A. Phillips, *J. Biol. Chem.*, **273** (41), 26317 (1998).
22. G. Mendoza-Cozatl and R. Moreno-Sanchez, *J. Theor. Biol.*, **238** (4), 919 (2006).
23. M. C. Reed, R. L. Thomas, J. Pavisic, et al., *Theor. Biol. Med. Model.*, **5**, 8 (2008).
24. J. E. Raftos, S. Whillier, and P. W. Kuchel, *J. Biol. Chem.*, **285** (31), 23557 (2010).
25. J. M. Jez, R. E. Cahoon, and S. Chen, *J. Biol. Chem.*, **279** (32), 33463 (2004).
26. M. Orłowski and A. Meister, *Biochemistry*, **10** (3), 372 (1971).
27. V. Y. Titova, S. E. Boronovskiy, J. P. Mazat, et al., *J. Physics: Conf. Series*, **1141**, 012029 (2018).
28. E. Mashkovtseva, S. Boronovsky, and Y. Nartsissov, *Math. Biosci.*, **243** (1), 117 (2013).

29. N. V. Kazmiruk, S. E. Boronovskiy, and Y. R. Nartsissov, *Biophysics*, **63** (3), 318 (2018).
30. O. A. Zagubnaya, S. Boronovskiy, and Y. R. Nartsissov, *J. Physics: Conf. Series*, **1141**, (2018).
31. O. W. Griffith and R. T. Mulcahy, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **73**, 209 (1999).
32. R. Quintana-Cabrera, S. Fernandez-Fernandez, V. Bobo-Jimenez, et al., *Nat. Commun.*, **3**, 718 (2012).
33. Z. Tu and M. W. Anders, *Arch. Biochem. Biophys.*, **354** (2), 247 (1998).
34. M. N. Willis, Y. Liu, E. I. Biterova, et al., *Biochemistry*, **50** (29), 6508 (2011).
35. Y. Chen, H. G. Shertzer, S. N. Schneider, et al., *J. Biol. Chem.*, **280** (40), 33766 (2005).
36. O. W. Griffith, *Free Radic. Biol. Med.*, **27** (9-10), 922 (1999).
37. K. Kiessling, N. Roberts, J. S. Gibson, et al., *Hematol. J.*, **1** (4), 243 (2000).
38. D. Darmaun, S. D. Smith, S. Sweeten, et al., *Diabetes*, **54** (1), 190 (2005).
39. E. Skotnicka, I. Baranowska-Bosiacka, W. Dudzinska, et al., *Biology of Sport*, **25** (1), 35 (2008).
40. J. C. Divino Filho, S. J. Hazel, P. Furst, et al., *J. Endocrinol.*, 156 (3), 519 (1998).
41. Y. Xiong, Y. Xiong, Y. Wang, et al., *Cell Physiol. Biochem.*, **51** (5), 2172 (2018).
42. G. Noctor, A.-C. M. Arisi, L. Jouanin, et al., *Physiol. Plantarum*, **100** (2), 255 (1997).
43. A. Kuster, I. Tea, S. Sweeten, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **390** (5), 1403 (2008).

Simulation Modeling of Glutamate Cysteine Ligase Activity

V.S. Kopylova*, S.E. Boronovskiy*, and Ya.R. Nartsissov*, **

*Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, ul. 6-ya Radialnaya 24/14, Moscow, 115404 Russia

**Biomedical Research Group, BiDiPharma GmbH, Bültbek, 5, 22962, Siek, Germany

L-γ-glutamyl-L-cysteinyl glycine, or glutathione, as one of the basic intracellular antioxidants, plays a vital role in cellular metabolism. In mammalian cells, glutathione is synthesized via two steps. The first step that is considered rate limiting is catalyzed by glutamate cysteine ligase. In this work, a stochastic algorithm based on continuous-time Markov chains was used to simulate the activity of glutamate-cysteine ligase. Several different mechanisms of enzymatic activity including reversible inhibition of glutathione, and an ATP binding motif have been considered. Based on physiological metabolite measurements made for human erythrocytes, the activity of glutamate cysteine ligase was determined. There are many possible ways for substrates to bind to an active site of the studied enzyme, but, only the mechanism by which primary binding to ATP can occur makes it possible to obtain the catalytic rate value similar to that of the experimentally measured glutamate-cysteine ligase activity relative to physiological concentrations of substrates. In other cases, the values differ by more than one order of magnitude. The performed analysis allows the conclusion that when models for glutathione biosynthesis are constructed *in vivo* conditions, the ATP concentration and reversible inhibition of glutathione should be taken into account.

Keywords: glutathione, glutamate-cysteine ligase, simulation modeling, stochastic algorithm

МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ СВЕРХВЫСОКИХ РАЗВЕДЕНИЯХ СУБСТРАТА

© 2023 г. Г.Ю. Ломакина*,#, Н.Н. Угарова*

*Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119991, Россия

#E-mail: nugarova@gmail.com

Поступила в редакцию 25.07.2022 г.

После доработки 03.10.2022 г.

Принята к публикации 19.10.2022 г.

Исследовано влияние ряда сверхвысоких разведений люциферина (в диапазоне разведений от 10^{10} до 10^{102} раз) на люциферин-люциферазную реакцию светлячков. Концентрацию субстрата люциферина варьировали от 0.0025 до 2.5 нМ, концентрация АТФ оставалась постоянной. Оценка интенсивности биолюминесценции после добавления в биолюминесцентную систему люциферина или воды в сверхвысоких разведениях показала наличие существенных разнонаправленных отличий. Количество сверхвысоких разведений из исследуемого ряда, при добавлении которых обнаруживались достоверные отличия, резко увеличивалось при снижении концентрации субстрата до 0.0025 нМ. Аналогичное сравнение влияния сверхвысоких разведений неспецифического контроля имидазола и сверхвысоких разведений воды на интенсивность свечения не выявило различий. Можно сделать вывод, что присутствие сверхвысоких разведений люциферина специфически ингибирует люциферин-люциферазную реакцию.

Ключевые слова: супрамолекулярные взаимодействия, биолюминесценция, фермент-субстратные взаимодействия, сверхвысокие разведения, люциферин-люциферазная реакция светлячков.

DOI: 10.31857/S0006302923020035, EDN: BZYXIY

Ферменты являются природными биологическими катализаторами, необходимыми для обеспечения многих процессов жизнедеятельности. Благодаря их каталитической активности специфические субстраты способны связываться с активным центром ферментов и образовывать фермент-субстратный комплекс. В дальнейшем субстрат подвергается ряду модификаций с превращением в продукт реакции, который обладает важными биологическими функциями. Варьируя концентрацию субстрата, можно менять скорость фермент-субстратных взаимодействий, которые обеспечивают работу многих биологических систем, в том числе и человеческого организма. Помимо этого, фермент-субстратные взаимодействия принимают участие в патогенезе и являются мишенями при лечении многих заболеваний [1]. Ферментативные реакции широко используются в медицине, применяются в биоаналитических системах, генной инженерии, при исследовании активных центров ферментов [2–6], а так-

же в текстильной и бумажной промышленности [7, 8]. В связи с этим поиск новых способов оптимизации фермент-субстратных взаимодействий всегда будет являться приоритетной задачей.

Вода в стационарном состоянии представляет собой открытую неравновесную систему, способную депонировать дополнительную свободную энергию [9]. К настоящему времени показано, что внешнее воздействие (оптическое, плазменное, механическое и т.п.) способно сильно изменить макроскопические свойства водных растворов [10–18]. Частным случаем образования таких систем является сочетание внешнего воздействия и последовательного многократного разбавления исходного вещества. Сверхвысокие разведения (СВР) веществ, полученные по этой технологии, имеют ряд особенностей, характерных для нелинейной системы. Например, относительно недавно применение современных методов исследований позволило установить, что полученные в ходе этого процесса разведения приобретают специфические долговечные физико-химические и биологические свойства, отличные как от свойств исходного вещества, так и от свойств растворителя (воды) [12, 19, 20]. Было показано, что образ-

Сокращения: СВР — сверхвысокие разведения, RLU — относительные световые единицы, LOD — предел качественного обнаружения, LOQ — предел количественного обнаружения.

цы, полученные в результате последовательного разведения, могут модифицировать функциональную активность молекул исходного вещества [21–23]. Все больший интерес вызывают исследования СВР в качестве модификаторов межмолекулярных взаимодействий [24–26], в связи с чем изучение влияния СВР на ферментативные реакции представляется весьма актуальным вопросом.

Физико-химические исследования СВР показали, что в процессе последовательного разведения с интенсивным встряхиванием на каждом этапе, снижение концентрации исходного вещества происходит нелинейно, что противоречит теоретически ожидаемому [27]. При встряхивании, сопровождающем каждую стадию разбавления, образуются нанопузырьки, способные адсорбировать на своей поверхности молекулы исходного вещества [28, 29]. Такие нанопузырьки преимущественно переносятся в следующее разведение за счет эффекта флотации [11, 27–31], что, в свою очередь, может привести к возможному присутствию молекул исходного вещества в СВР. В то же время есть вероятность, что спонтанно образующиеся наноассоциаты или кластеры являются «носителем» той активности, которая определяет особые физико-химические и биологические свойства СВР [19, 32]. Такие наноассоциаты могут воздействовать на клеточные мишени — ферменты, рецепторы, ионные каналы и пр., влияя на их физические, химические и биологические свойства [24, 33–37].

В настоящем исследовании мы проверяли гипотезу о том, может ли присутствие СВР изменить ход взаимодействия фермента с субстратом. В качестве исследовательской модели использовали высокочувствительный люциферин-люциферазный биолюминесцентный анализ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Люциферин (ООО «Люмтек», Россия) реконструировали в фосфатно-солевом буфере (0.15 M NaCl + 0.01 M Na-фосфатный буфер, pH 7.4). Далее аликвоту исходного раствора разбавляли в 40 раз в 0.5 M Na-карбонатном буфере (pH 11.5) и определяли концентрацию люциферина путем измерения оптической плотности при 385 нм на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin-Elmer, Великобритания) с использованием молярного коэффициента экстинкции $18200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [38]. pH фосфатно-солевого буфера или раствора люциферина определяли с помощью pH-метра MP220 (Mettler Toledo, Испания) и корректировали по мере необходимости. Реагент для определения люциферина (LH₂-реагент [39]) содержал рекомбинантную люциферазу светлячков *Luciola mingrelica* и АТФ (Sigma-Aldrich, США). В каче-

стве контроля использовали имидазол (Sigma-Aldrich, Германия, чистота 99%) или деионизированную воду. Деионизированная вода высокой чистоты (вода I типа с удельным сопротивлением 18.2 МОм/см при 25°C) была получена с помощью системы очистки воды WaterPro PS Polishing System/UF Life Science Model (Labconco, США).

Приготовление образцов. Растворы люциферина готовили с концентрациями 10 нМ (10^{-8} М), 1 нМ (10^{-9} М) и 0.1 нМ (10^{-10} М) путем последовательного разведения исходного раствора люциферина в деионизированной воде при объемном соотношении 1:99. Для исследования биолюминесценции растворы люциферина разводили в четыре раза реакционной смесью (см. параграф «Регистрация биолюминесценции»). Таким образом, конечные концентрации люциферина в смеси составили 2.5 нМ, 0.25 нМ и 0.025 нМ.

СВР люциферина, имидазола и воды были приготовлены и предоставлены ООО «НПФ МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» (Москва, Россия). Кратко процедуру приготовления СВР можно описать следующим образом: исходный раствор люциферина с концентрацией 10 нМ смешивали с очищенной водой в соотношении 1:100, после чего энергично встряхивали до получения первого 100-кратного разведения. Для приготовления каждого последующего разведения брали сотую часть объема от предыдущего разведения и добавляли к 99 частям воды. Образец при каждом последующем разведении также подвергали энергичному вертикальному встряхиванию с частотой 4.4 Гц в течение 4.8 с [40, 41]. Данную процедуру выполняли в соответствии с жестким протоколом: в стерильных условиях в ламинарном боксе (класс чистоты D по классификации международного стандарта ISO 14644-1:2015), стерильными автоматическими пипетками и стерильными наконечниками для пипеток. Все образцы были приготовлены в один день одним сотрудником и в одинаковых условиях. Диапазон разведения люциферина, использованного в данной работе, составлял от 10^{10} до 10^{102} , шаг разведения составлял 10^2 . Процедура приготовления СВР имидазола (концентрация исходного раствора 1 нМ) и воды была идентична процедуре приготовления СВР люциферина. Теоретическая концентрация люциферина или имидазола в СВР составляла от 10^{-18} до 10^{-110} М, однако этот расчет не учитывает нелинейное снижение концентрации растворенного вещества, описанное во введении [19, 27–29].

Все растворы готовили в стеклянных флаконах в стерильных условиях, они были защищены от длительного воздействия света и хранились при комнатной температуре. Исследование СВР образцов проводили на следующий день после при-

- 1) $\text{LH}_2 + \text{ATP} + \text{E} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}} \text{E} \cdot \text{LH}_2\text{-AMP} + \text{PP}_i$
- 2) $\text{E} \cdot \text{LH}_2\text{-AMP} + \text{O}_2 \rightarrow \text{E} + \text{LO}^\bullet + \text{CO}_2 + \text{AMP} + \text{light}$

Рис. 1. Реакции, катализируемые люциферазой. Обозначения: LH_2 — люциферин, ATP — аденозинтрифосфат, AMP — аденозинмонофосфат, E — фермент (люцифераза светлячков), PP_i — неорганический пирофосфат, O_2 — кислород, $\text{LO}^\bullet$ — оксилуциферин (продукт реакции), CO_2 — диоксид углерода, light — свет. Схема адаптирована из работы [45].

готовления и заканчивали не позже, чем через 24 ч с момента приготовления. В работе [19] было показано, что активность СВР сохраняется около суток после приготовления образца.

Регистрация биолюминесценции. Биолюминесцентные методы имеют высокую чувствительность, которая превышает фемтомольный уровень [42]. В связи с этим в качестве исследовательской модели была выбрана биолюминесцентная люциферин-люциферазная реакция светлячков, основанная на взаимодействии фермента люциферазы и двух субстратов — люциферина и АТФ (см. рис. 1).

Интенсивность биолюминесценции регистрировали на микропланшетном мультidetекторе Spectramax M5 (Molecular Devices, США) в белых 96-луночных планшетах высокой сорбционной емкости (Agilent Technologies, Германия, No. 6610022400) в диапазоне длин волн от 250 до 850 нм. Внесение разведений люциферина в 96-луночные планшеты проводили в ламинарном шкафу GS (Babcock, Germany). Уровень фонового шума измеряли в образцах, полученных смешиванием 100 мкл деонизированной воды и 100 мкл LH_2 -реагента.

Анализ данных. Статистическая обработка данных была проведена в программе RStudio Version 1.2.1335 (RStudio Inc., США) с использованием пакета R версии 3.6.0. Нормальность распределения оценивали по тесту Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — по тесту Бартлетта. Для экспериментов с добавлением в систему разных концентраций люциферина сравнение групп проведено с использованием U-критерия Манна–Уитни и t-критерия Стьюдента (приближение Уэлча в случае отсутствия гомогенности дисперсий).

Для оценки результатов измерений образцов, содержащих СВР имидазола, сравнение групп проведено с использованием дисперсионного анализа (при необходимости попарного сравнения групп использовалась поправка Тьюки) или теста Краскела–Уоллиса (при необходимости попарного сравнения групп — тест Данна с поправкой Холма). В случае нормального распределения переменных и отсутствия гомогенности диспер-

сий использовали попарное сравнение групп с помощью t-критерия Стьюдента с поправкой Холма, так как при соблюдении требований к данным, он имеет наибольшую мощность.

Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Ход эксперимента. Для оценки линейности зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации люциферина были проведены четыре независимых исследования с различными концентрациями (0, 0.025, 0.25 и 2.5 нМ). Измерение интенсивности биолюминесценции повторяли четыре раза для каждой концентрации люциферина, а также без него. После этого полученные данные аппроксимировали линейным трендом с указанием трехкратного и десятикратного стандартного отклонения для каждой экспериментальной точки, которые считались пределами качественного и количественного обнаружения соответственно.

Для изучения влияния СВР люциферина, имидазола или воды на люциферин-люциферазную реакцию в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 50 мкл раствора люциферина одной концентрации. В зависимости от эксперимента конечная концентрация люциферина в образцах составляла 0, 0.025, 0.25 или 2.5 нМ. Затем добавляли 50 мкл СВР люциферина, СВР имидазола или СВР воды (контроль) и перемешивали содержимое лунок при помощи пипетирования. Образцы и контроли располагали рядом друг с другом, уменьшая разницу в температурном градиенте. Далее реакцию инициировали добавлением в каждую лунку 100 мкл LH_2 -реагента. Полученный раствор перемешивали пипетированием, после чего регистрировали биолюминесцентный сигнал в трех временных точках — сразу, через 10 с и через 20 с после перемешивания. При обработке результатов величины биолюминесцентных сигналов по всем трем временным точкам усредняли, среднее значение в дальнейшем считали за одно измерение. Результат после усреднения обладает большей точностью за счет минимизации уровня шумов.

Измерения выполняли на двух планшетах, по два повтора (по две лунки) одного и того же СВР образца на каждом планшете. Таким образом, для каждого разведения было проведено по четыре измерения в каждой временной точке. Измерение биолюминесцентного сигнала выражали в относительных световых единицах (RLU). Отсутствие краевого эффекта планшета и влияния расположения образца на измерения было подтверждено на этапе разработки методики.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Качественная и количественная характеристика зависимости интенсивности биолюминесценции от различных концентраций люциферина. Мы определили предел качественного (LOD) и количественного (LOQ) обнаружения люциферазы. LOD рассчитывали как среднее значения фоновой интенсивности плюс трехкратное стандартное отклонение измерения, а LOQ — как среднее значение фоновой интенсивности плюс десятикратное стандартное отклонение [43, 44]. Таким образом, средняя фоновая интенсивность в исследовании составила 21.08 RLU, LOD — 58.81 RLU и LOQ — 146.86 RLU.

Далее изучали зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации люциферина в реакционной смеси (см. табл. 1).

Линейность и повторяемость измерений интенсивности биолюминесценции в зависимости от концентрации люциферина оценивали путем добавления возрастающих концентраций люциферина (от 0 до 2.5 нМ) к стандартной смеси, содержащей люциферазу и АТФ (см. раздел «Материалы и методы»).

На рис. 2 видно, что зависимость максимальной интенсивности биолюминесценции от концентрации люциферина характеризуется коэффициентом детерминации 99.9%, что подтверждает хорошую линейность применяемого метода.

На рис. 2 показано, что значение биолюминесценции с учетом стандартного отклонения не превышает порогов LOD и LOQ для нашей биолюминесцентной системы. Установлено, что зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации люциферина носит линейный характер. Таким образом, метод биолюминесценции можно использовать как количественный и качественный метод при концентрациях люциферина в диапазоне 0.025–2.5 нМ.

Влияние сверхвысоких разведений люциферина на интенсивность биолюминесценции в люциферин-люциферазной реакции. Сравнение интенсивности биолюминесценции при добавлении контрольных и испытуемых образцов с одинаковой степенью разбавления к системе с концентрацией люциферина 2.5 нМ (рис. 3а) и 0.25 нМ (рис. 3б) показало некоторые разнонаправленные, но существенные различия (рис. 3г). Одно статистически значимое увеличение интенсивности наблюдали при концентрации люциферина 2.5 нМ для степени разведения 10^{54} . В системе с концентрацией 0.25 нМ наблюдали два статистически значимых различия — для степени разведения 10^{28} и 10^{68} , также важно отметить, что в первом случае наблюдалось снижение интенсивности, а во втором случае — увеличение. Однако

Таблица 1. Зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации люциферина

Концентрация люциферина, нМ	Интенсивность люминесценции, RLU
2.5	19008.53 ± 442.37
0.25	1737.26 ± 17.27
0.025	185.46 ± 20.31
0	23.25 ± 14.88

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение для восьми измерений, RLU — относительные единицы интенсивности люминесценции.

количество разведений, в которых были обнаружены значительные различия, резко увеличивалось при снижении концентрации субстрата до

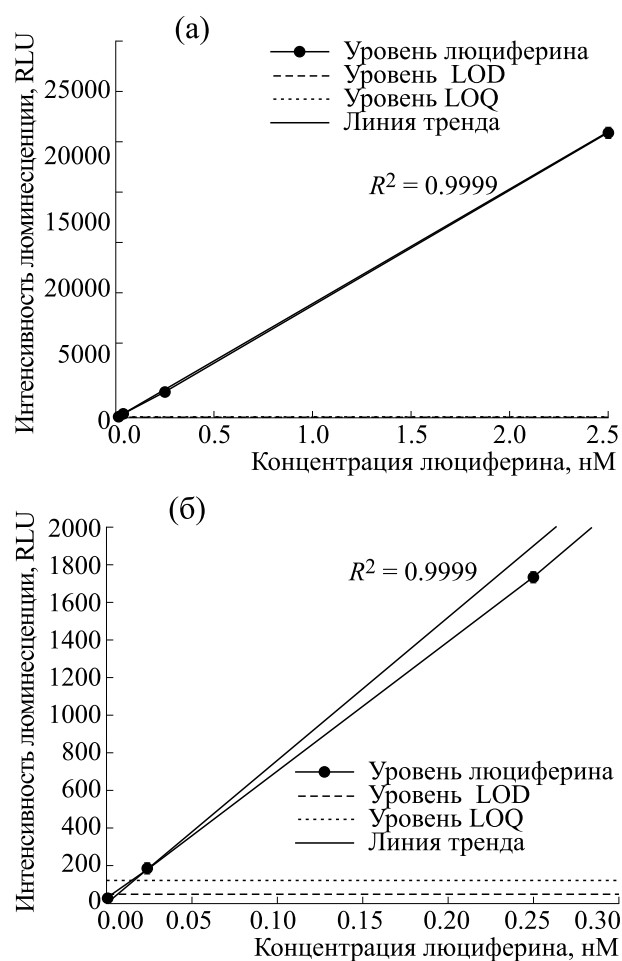


Рис. 2. (а) — Линейная зависимость биолюминесценции от концентрации люциферина. Анализ проводили в присутствии 0, 0.025, 0.25 и 2.5 нМ люциферина. Коэффициент детерминации $R^2 = 0.9999$. Данные выражены в относительных единицах люминесценции (RLU) и представлены в виде среднего значения по четырем измерениям, планки погрешностей соответствуют величине стандартного отклонения. (б) — Увеличенная часть рис. 2а. Предел качественного (LOD) и количественного (LOQ) обнаружения изображены в виде горизонтальных линий.

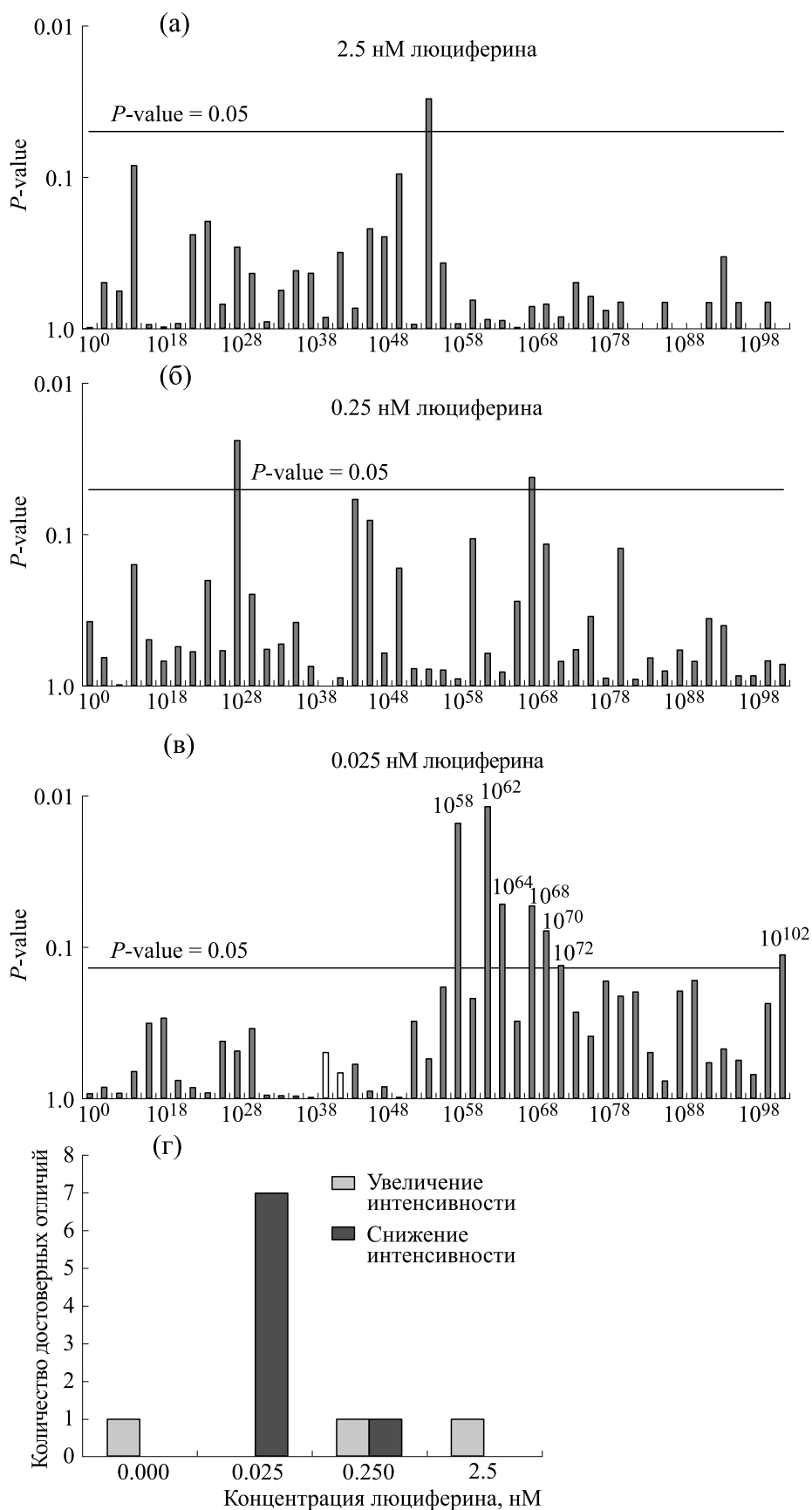


Рис. 3. Начало.

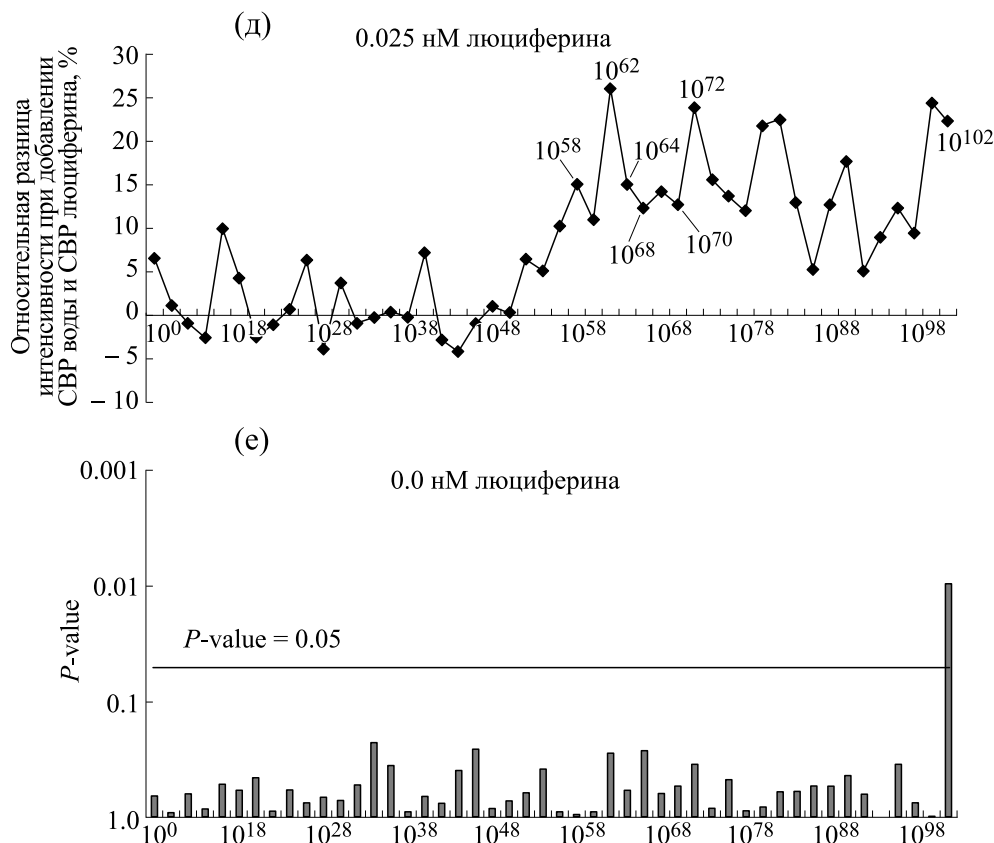


Рис. 3. (а) — Величины p -value для разницы между средней интенсивностью биоломинесценции, зарегистрированной в образцах при добавлении соответствующих СВР люциферина или воды в присутствии 2.5 нМ люциферина. Количество добавленного СВР составляло 50% от объема образца. Все образцы содержали стандартную смесь люциферазы и АТФ. Измерения проводили при комнатной температуре, pH 7.4. По оси абсцисс — степень разбавления. Горизонтальная линия обозначает порог статистики значимого p -value = 0.05. (б) — Величины p -value, полученные при сравнении интенсивности биоломинесценции при добавлении СВР люциферина или воды в присутствии 0.25 нМ люциферина. (в) — Величины p -value, полученные при сравнении интенсивности биоломинесценции при добавлении СВР люциферина или воды в присутствии 0.025 нМ люциферина. (г) — Количество разведений, для которых были обнаружены статистически значимые отличия при сравнении интенсивности биоломинесценции в присутствии СВР люциферина или воды. Измерения проводили при концентрации люциферина в диапазоне от 0 до 2.5 нМ. Результаты основаны на данных, представленных на рис. 3в и 3е. (д) — Процентное отличие между интенсивностями биоломинесценции, зарегистрированной от образцов при добавлении соответствующих СВР люциферина или воды в присутствии 0.025 нМ люциферина. Положительное значение указывает на то, что биоломинесценция, измеренная в присутствии СВР воды, характеризуется более высокой интенсивностью, чем в присутствии СВР люциферина. (е) — Величины p -value, полученные при сравнении интенсивности биоломинесценции при добавлении СВР люциферина или воды в присутствии 0 нМ люциферина.

0.025 нМ (рис. 3в–д) [22, 45]. Это снижение интенсивности происходило в образцах со степенью разбавлению 10^{58} , 10^{62} , 10^{64} , 10^{68} , 10^{70} , 10^{72} и варьировало от 14 до 26%. При снижении концентрации субстрата до 0 нМ количество статистически значимых отличий резко снизилось (рис. 3е).

С данной точки зрения эффект СВР люциферина более выражен при низкой концентрации субстрата (0.025 нМ).

Влияние сверхвысоких разведений имидазола на интенсивность биоломинесценции в люциферин-люциферазной реакции. Имидазол не может оказывать влияние на интенсивность люциферин-

люциферазной реакции, так как люцифераза не имеет активных центров для связывания имидазола [46]. В связи с этим мы решили использовать имидазол в качестве неспецифического контроля. Было решено изучить влияние СВР имидазола на интенсивность биоломинесценции в системе с концентрацией люциферина 0.025 нМ, так как максимальное количество статистически значимых односторонних отличий интенсивности биоломинесценции в присутствии СВР люциферина по сравнению с СВР воды было получено для этой концентрации люциферина. В предыдущем разделе было показано, что СВР люциферина, в отличие от СВР воды, снижают биоломинесценцию в присутствии 0.025 нМ люциферина.

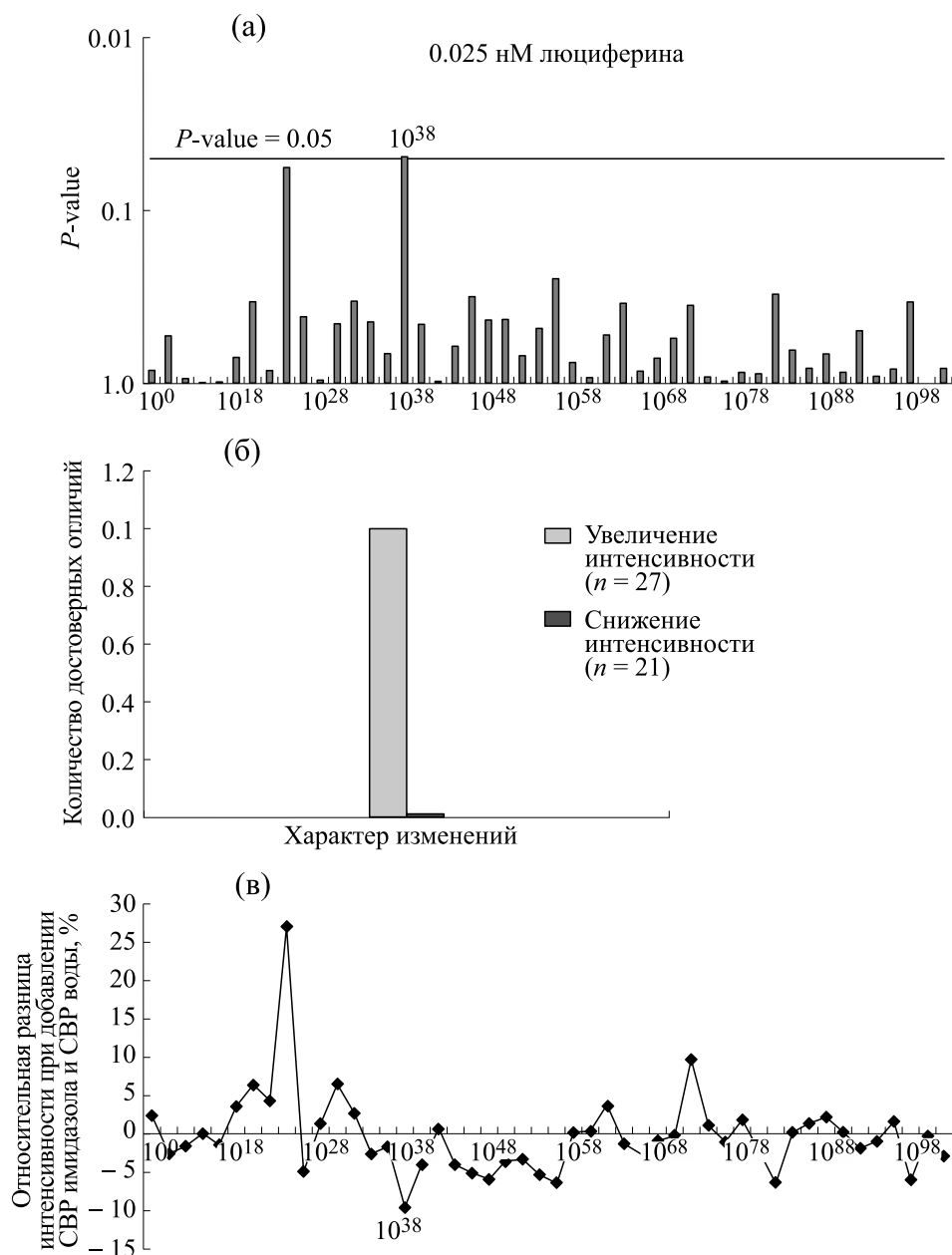


Рис. 4. (а) — Величины p -value, полученные для разницы между средними значениями биолуминесценции, детектированной от образцов с добавлением СВР имидазола или СВР воды в присутствии 0.025 нМ люциферина. Количество добавленного СВР составляло 50% от объема образца. Все образцы содержали стандартную смесь люциферазы и АТФ. Измерения проводили при комнатной температуре, pH 7.4. По оси абсцисс — степень разбавления. Горизонтальная линия обозначает порог статистически значимого p -value = 0.05. (б) — Количество разведений (n), для которых обнаружены статистически значимые различия при сравнении интенсивности биолуминесценции в присутствии СВР имидазола или СВР воды. Измерения проводили в присутствии люциферина с концентрацией 0.025 нМ. Результаты основаны на данных, представленных на рис. 4а и 4в. (в) — Процентное отличие между интенсивностями биолуминесценции, зарегистрированной от образцов при добавлении соответствующих СВР имидазола или воды в присутствии 0.025 нМ люциферина. Положительное значение указывает на то, что биолуминесценция, измеренная в присутствии СВР воды, характеризуется более высокой интенсивностью, чем в присутствии СВР имидазола.

Нами были зарегистрированы разнонаправленные изменения интенсивности биолуминесценции (рис. 4б,в) при добавлении СВР имидазола в присутствии люциферина в концентрации

0.025 нМ. В данном случае только одно из изменений, наблюдаемое при внесении разведения в степени разбавления 10³⁸, было статистически значимым и соответствовало увеличению биолу-

минесценции на 9.5% по отношению к СВР воды (контрольный образец) (рис. 4а,в).

Таким образом, СВР имидазола не оказывают выраженного влияния на интенсивность биолюминесценции. Этот результат подтверждает специфическое влияние СВР люциферина на интенсивность биолюминесценции при концентрации люциферина 0.025 нМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биолюминесценция в люциферин-люциферазной реакции светлячков имеет самый высокий квантовый выход среди всех биолюминесцентных систем (по данным разных авторов, он варьирует от 0.5 до 1.0 [47]), что позволяет определять сверхнизкие концентрации АТФ вплоть до 10^{-16} М [47]. Однако применение СВР АТФ осложняется тем, что при очень низких концентрациях молекула АТФ неустойчива в водных растворах и склонна к самопроизвольному гидролизу. Это может привести к изменению состава анализируемых СВР и неоднозначности полученных результатов. Использование люциферина в данном случае предпочтительнее, так как люциферин стабилен, нетоксичен, хорошо растворяется в воде, а его концентрация в растворе более контролируема.

На модели люциферин-люциферазной реакции мы протестировали широкий спектр СВР люциферина и показали, что его добавление разнонаправленно модифицирует интенсивность биолюминесценции, по сравнению с добавлением аналогичных СВР воды. Однако внесение одних разведений приводило к усилению люминесценции по сравнению в соответствующим СВР воды, а внесение других, наоборот, угнетало ее по сравнению с соответствующим водным СВР. Данный эффект наблюдался для всех концентраций субстрата. При этом наибольшее количество разведений, для которых были обнаружены достоверные отличия, было в биолюминесцентной системе с концентрацией люциферина 0.025 нМ (количество разведений — 7). Аналогичные исследования с концентрациями люциферина 0.25 нМ и 2.5 нМ показали только два и одно отличие соответственно. Это согласуется с результатами исследований, свидетельствующими о том, что добавление СВР вещества в системы, содержащие более высокие концентрации исходного вещества, приводит к наиболее выраженному эффекту в системе с наименьшим его содержанием [22, 45]. Помимо этого, введение СВР в систему вызывает полимодальные эффекты [48, 49]. Важно отметить, что в биолюминесцентной си-

стеме с концентрацией люциферина 0.025 нМ наблюдаемое ингибирование биолюминесценции находилось в диапазоне от 13 до 26% по сравнению с соответствующими разведениями воды. Таким образом, введение СВР субстрата в систему фермент-субстратных взаимодействий вызвало специфический ингибирующий эффект.

Специфичность действия СВР люциферина на систему, содержащую люциферин, была подтверждена результатами изучения действия на эту же систему ряда СВР неспецифического контроля — имидазола. Их добавление не приводило к изменению интенсивности биолюминесценции по сравнению с добавлением СВР воды.

Как мы отмечали в разделе «Введение», известно, что молекулы исходного вещества могут оставаться в растворе в процессе последовательного разведения [27] и образовывать кластерную структуру, которая способна воздействовать на белковые мишени. Принимая во внимание механизмы реализации эффектов СВР люциферина, описанные в данной работе, можно сделать предположение, что в более низких разведениях люциферина вокруг исходных молекул уже образуются специфические водные кластеры. При увеличении степени разбавления может оказаться, что в центре кластеризации находится не исходная молекула люциферина, а образовавшийся ранее специфический люцифериновый водный кластер. Таким образом, вполне вероятно, что люцифериновые водные кластеры влияют на интенсивность биолюминесценции. Ингибирование биолюминесценции такими кластерами может быть обусловлено несколькими механизмами:

1. Известно, что люцифераза имеет два независимых активных сайта связывания — один для люциферина, а другой — для АТФ [46], также известно, что водные кластеры способны действовать как ферменты, кинетика которых подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментен [50]. Однако возможно, что люцифериновые водные кластеры могут выступать в качестве субстрата для люциферазы, встраиваясь в ее активный центр. Вероятно, кластеры могут менять конформацию люциферазы таким образом, что исходный люциферин теряет способность взаимодействовать с ферментом, т. е. могут выступать аналогом субстрата, который ингибирует активный центр люциферазы [51]. Мы предполагаем, что такое взаимодействие люциферина, люциферазы и специфических водных кластеров люциферина можно описать с точки зрения конкурентного фермент-субстратного взаимодействия (рис. 5).

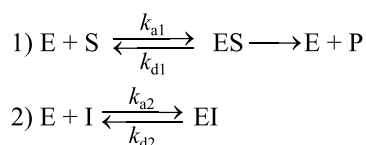


Рис. 5. Конкурентное ингибирование фермент-субстратных взаимодействий. Обозначения: E — фермент, S — субстрат, ES — фермент-субстратный комплекс, P — продукт реакции, I — ингибитор, EI — комплекс «фермент–ингибитор», k_{a1} — константа ассоциации фермент-субстратного комплекса, k_{d1} — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, k_{a2} — константа ассоциации комплекса «фермент–ингибитор», k_{d2} — константа диссоциации комплекса «фермент–ингибитор».

Переменными в данной системе уравнений являются люциферин (S), люцифераза (E) и специфический люцифериновый водный кластер (I). Если концентрация субстрата в системе увеличивается, то число занятых мест связывания на молекулах люциферазы будет больше. Вероятнее всего, константа ассоциации активного центра фермента с люциферином выше, чем со специфическими кластерами, полученными в результате последовательных разведений субстрата. Поэтому чем выше концентрация субстрата, тем быстрее проявятся эффекты, присущие классическому фермент-субстратному взаимодействию, нежели эффекты СВР. Снижение концентрации люциферина напрямую связано с увеличением числа свободных сайтов связывания, которые способны занимать водные кластеры. Следовательно, эффект СВР при более низкой концентрации субстрата будет более выраженным.

2. Другое возможное объяснение заключается в том, что кластеры воды могут действовать как конкурентный антагонист и стерически блокировать доступ субстрата к ферменту, вследствие чего нарушается их адекватное взаимодействие друг с другом [52]. Это также может приводить к снижению интенсивности биолюминесценции. Если предположить, что этот сценарий верен, то эффект контрольных образцов СВР воды или имидазола, вероятно, будет аналогичен действию СВР люциферина, однако мы не наблюдали такого эффекта. Хорошо известно, что комплекс люциферазы с АМФ и оксилуциферином не имеет сайтов связывания имидазола [53]. Таким образом, если СВР имидазола или воды также образуют кластерные структуры, то они не обладают специфичностью к люциферазе.

3. Интересная гипотеза описана в работах [54] и [55]. Авторы этих работ указывают на возможность передачи электромагнитного сигнала от скоплений воды (плотностных неоднородностей)

на подходящую цель, способную принимать данный сигнал. Плотностные неоднородности воды имеют специфические колебательные характеристики, выявляемые методом терагерцовой спектроскопии. Таким образом, электромагнитный сигнал от кластеров может воздействовать на активный центр люциферазы, приводя к ингибированию фермент-субстратного взаимодействия и снижению интенсивности биолюминесценции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из вышеописанного, можно сделать вывод, что люциферин-люциферазная реакция пригодна для качественного и количественного изучения СВР люциферина благодаря ее высокой чувствительности. Нами показано, что СВР люциферина вызывали значительное торможение биолюминесценции по сравнению с соответствующими СВР воды. Механизм реализации такого эффекта может быть опосредован специфическими водными кластерами люциферина, однако эта теория требует дальнейшего детального изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность компании ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» за помощь в финансировании и реализации настоящей работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова АААА-А21-121011290089-4 и частично финансирована компанией ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Работа частично финансирована компанией ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», предоставившей СВР-растворы люциферина, имидазола и воды для проведения исследования. ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» производит препараты на основе сверхвысоких разведений субстанций.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Ouertani, M. Neifar, R. Ouertani, et al., *Adv. Tissue Eng. Regen Med. Open Access*, **5**, 85 (2019).
2. Z. M. Kaskova, A. S. Tsarkova, and I. V. Yampolsky, *Chem. Soc. Rev.*, **45** (21), 6048 (2016).
3. L. J. Kricka, *Anal. Biochem.*, **175** (1), 14 (1988).
4. A. Pandey, P. Nigam, C. R. Soccol, et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **31** (2), 135 (2000).
5. N. N. Ugarova and G. Y. Lomakina, *Moscow University Chem. Bull.*, **75**, 15 (2020).
6. D. V. Smirnova and N. N. Ugarova, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **18** (10), 946 (2015).
7. P. M. de Souza and P. de Oliveira Magalhaes, *Brazil. J. Microbiol.*, **41**, 850 (2010).
8. S. Raveendran, B. Parameswaran, S. B. Ummalyma, et al., *Food Technol. Biotechnol.*, **56** (1), 16 (2018).
9. V. I. Bruskov, A. V. Chernikov, et al., *Phys. Wave Phen.*, **28** (2), 103 (2020).
10. I. A. Scherbakov, I. V. Baimler, S. V. Gudkov, et al., *Dokl. Physics*, **65** (8), 9 (2020).
11. S. V. Gudkov, G. A. Lyakhov, V. I. Pustovoy, et al., *Phys. Wave Phen.*, **27** (2), 141 (2019).
12. S. V. Gudkov, N. V. Penkov, I. V. Baimler, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8033 (2020).
13. I. V. Baymler, S. V. Gudkov, R. M. Sarimov, et al., *Dokl. Physics*, **65** (1), 5 (2020).
14. W. Lauterborn, *Appl. Phys. Lett.*, **21** (1), 27 (1972).
15. N. F. Bunkin and F. V. Bunkin, *Laser Physics*, **3** (1), 63 (1993).
16. A. Mai-Prochnow, R. Zhou, T. Zhang, et al., *NPJ Biofilms and Microbiomes*, **7**, 11 (2021).
17. Y. M. Zhao, A. Patange, D. W. Sun, et al., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **19** (6), 3951 (2020).
18. A. Scherbakov, *Phys. Wave Phen.*, **29** (2), 89 (2021).
19. I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, Y. V. Kiseleva, et al., *Dokl. Phys. Chem.*, **462** (1), 110 (2015).
20. S. V. Gudkov, I. V. Baimler, O. V. Uvarov, et al., *Front. Physics*, **8**, 622551 (2020).
21. E. Don, O. Farafonova, S. Pokhil, et al., *Sensors*, **16**, 10 (2016).
22. E. S. Don, S. A. Bobrovnik, G. Sherriff, et al., *J. Immunoassay Immunochem.*, **40** (3), 250 (2019).
23. O. Epstein, *Symmetry*, **10** (4), 14 (2018).
24. P. Bellavite, M. Marzotto, D. Oliosio, et al., *Homeopathy*, **103** (1), 22 (2014).
25. P. Muller, E. Ignatz, S. Kiontke, et al., *Chem. Sci.*, **9** (5), 1200 (2017).
26. S. A. Tarasov, E. A. Gorbunov, E. S. Don, et al., *J. Immunol.*, **205** (5), 1345 (2020).
27. P. S. Chikramane, D. Kalita, A. K. Suresh, et al., *Langmuir*, **28** (45), 15864 (2012).
28. N. F. Bunkin, A. V. Shkirin, S. N. Chirikov, et al., *ACS Omega*, **5** (24), 14689 (2020).
29. N. F. Bunkin, A. V. Shkirin, N. V. Penkov, et al., *Phys. Wave Phen.*, **27** (2), 102 (2019).
30. R. Bell, and G. E. Schwartz, *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, **5** (2), 685 (2013).
31. S. V. Gudkov, G. A. Lyakhov, V. I. Pustovoy, et al., *Phys. Wave Phen.*, **29** (2), 108 (2021).
32. G. A. Lyakhov, and I. A. Scherbakov, *Phys. Wave Phen.*, **27** (2), 79 (2019).
33. V. Elia, G. Ausanio, F. Gentile, et al., *Homeopathy*, **103** (1), 44 (2014).
34. E. Freier, S. Wolf, and K. Gerwert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (28), 11435 (2011).
35. K. Haider, L. Wickstrom, S. Ramsey, et al., *J. Phys. Chem. B*, **120** (34), 8743 (2016).
36. T. H. Plumridge and R. D. Waigh, *J. Pharm. Pharmacol.*, **54** (9), 1155 (2002).
37. T. M. Raschke, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16** (2), 152 (2006).
38. R. A. Morton, T. A. Hopkins, and H. H. Seliger, *Biochemistry*, **8** (4), 1598 (1969).
39. M. I. Koksharov and N. N. Ugarova, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **10** (6), 931 (2011).
40. К. А. Сарбашев и Е. О. Химич, Свидетельство №2022665255. TenzometryUnit (программа для ЭВМ), 03.08.2022.
41. V. V. Novikov and E. V. Yablokova, *Field. Appl. Sci.*, **12**, 5185 (2022).
42. K. V. Wood, Available online: <https://world-wide.promega.com/resources/pubhub/enotes/the-bioluminescence-advantage/> (accessed on 23.12.2020).
43. Food and Drug Administration, *ORA Laboratory Manual Volume II. 2020, ORA-LAB.5.4.5.*
44. US Department of Health and Human Services, C.O.V.M. Food and Drug Administration. 2015, *VICH GL49(R)*.
45. M. Pschenitz, E. S. Gavrilova, C. Tarasov, et al., *Int. Immunopharmacol.*, **21** (1), 225 (2014).
46. N. N. Ugarova, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **4** (1), 406 (1989).
47. W. D. McElroy, H. H. Seliger, and E. H. White, *Photochem. Photobiol.*, **10** (3), 153 (1969).
48. J. C. Cazin, M. Cazin, J. L. Gaborit, et al., *Hum. Toxicol.*, **6** (4), 315 (1987).
49. E. B. Burlakova, A. A. Konradova, and E. L. Maltseva, *Chem. Physics*, **22**, 106 (2003).
50. J. M. Saa and A. Frontera, *ChemPhysChem.*, **21** (4), 313 (2020).
51. I. V. Berezin, L. Y. Brovko, and N. N. Ugarova, *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **3** (12), 1589 (1977).
52. S. D. Banik, M. Nordblad, J. M. Woodley, et al., *Catalysts*, **7** (8), 18 (2017).
53. RCSB PDB, Available online: <https://www.rcsb.org/structure/2D1R> (accessed on 19.05.2020).
54. V. V. Goncharuk, T. V. Pletneva, E. V. Uspenskaya, et al., *J. Water Chem. Technol.*, **39** (6), 325 (2017).
55. K. Johnson, arXiv: Atomic and Molecular Clusters (2009).

Alteration of Enzyme-Substrate Interactions by Ultra-High Dilutions of the Substrate

G.Yu. Lomakina* and N.N. Ugarova*

**Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/3, Moscow, 119991 Russia*

The effects of different ultra-high dilutions of luciferin ranged from 10^{10} to 10^{102} on luciferin-luciferase reaction of fireflies were investigated. Luciferin substrate concentration varied from 0.0025 nM to 2.5 nM and ATP concentration remained unchanged. This study evaluated the bioluminescence intensity after addition of ultra-high dilutions of luciferin or ultra-high dilutions of water to the bioluminescent system and some multidirectional and significant differences were found. The number of ultra-high dilutions from studied starting materials, for which significant differences were found, increased sharply with decreasing substrate concentration to 0.0025 nM. No differences were found when the effects of ultra-high dilutions of a non-specific control imidazole and ultra-high dilutions of water on the signal intensity were compared. Our results suggest that ultra-high dilutions of luciferin can specifically inhibit the luciferin-luciferase reaction.

Keywords: supramolecular interactions, bioluminescence, enzyme-substrate interactions, ultra-high dilutions, firefly luciferin-luciferase reaction

ВЛИЯНИЕ pH НА КОНФОРМАЦИЮ МОДИФИЦИРОВАННОГО АПТАМЕРА К БЕЛКУ НУКЛЕОЛИНУ

© 2023 г. П.В. Габрусенок*, Р.Р. Рамазанов**, А.С. Бучельников**, П.А. Соколов*, **, #

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

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

#E-mail: p.a.sokolov@spbu.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Поиск агентов для адресной доставки противораковых препаратов остается крайне востребованной для медицины задачей. В этой связи находят свое применение ДНК-аптамеры к белкам, специфичным к раковым клеткам. Вместе с тем дополнительная настройка активности аптамеров для снижения их аффинности к мишеням вне раковых тканей может улучшить перспективы их клинического применения ввиду сокращения иммуногенности и количества побочных эффектов. Одним из подходов является использование нарушения кислотности в раковых клетках и тканях. В данной работе мы модифицировали аптамер AS1411 к нуклеолину путем присоединения к нему нуклеотидной последовательности, сообщающей аптамеру свойство pH-чувствительности. Методами спектрофотометрического плавления и флуоресценции было продемонстрировано, что конформация нового аптамера обусловлена pH среды.

Ключевые слова: аптамер, водородный показатель, ДНК, нуклеолин, рак.

DOI: 10.31857/S0006302923020047, EDN: CAEFMD

Нуклеолин является многофункциональным белком, который задействован в процессах выживания, роста и пролиферации клеток. У нормальных клеток этот белок обнаруживается преимущественно в ядре. В раковых клетках он также присутствует в цитоплазме и на поверхности [1]. Последнее позволяет использовать его как целевой белок для доставки лекарств в опухолевые ткани [2, 3] различного вида, включая нейробластому [4], глиобластому [5], рак молочной железы [6], шейки матки [7] и колоректальный рак [8].

В настоящее время для молекулярного узнавания все чаще применяются аптамеры — высокоаффинные нуклеотидные последовательности, специфичные к молекуле-мишени и являющиеся хорошей альтернативой, например, моноклональным антителам [9, 10]. По сравнению с антителами, ДНК-аптамеры обладают рядом преимуществ. Среди них простота синтеза и стабильность, а также они обладают небольшой или нулевой иммуногенностью, что означает возможность многократного введения в терапевтических целях, а также меньшее количество побочных эффектов [11].

В качестве связывающегося с нуклеолином агента для адресной доставки лекарств широко

исследуется и успешно применяется ДНК-аптамер AS1411 [12]. Наряду со сверхэкспрессией нуклеолина раковые ткани характеризуются нарушением кислотности внутри- и внеклеточного пространств [13, 14]. Это дает еще одну возможность для дополнительной тонкой настройки агентов доставки лекарств, придавая им способность активироваться в диапазоне pH, характерном для опухолевых тканей.

Ранее, на примере аптамера к аденозинтрифосфату (АТФ), была предложена универсальная схема дополнения последовательности аптамеров участками, которые в зависимости от кислотности окружения с различной эффективностью интерферируют с функциональной структурой аптамеров и регулируют таким образом их активность при разных pH [15]. В присутствии АТФ этот аптамер претерпевает структурную перестройку, формируя сайт связывания. При этом из его структуры вытесняется интерферирующий участок, что приводит к росту фракции активных аптамеров. Для различных pH размер данной фракции существенно различается, что и обуславливает эффективность подхода. На сегодняшний день структурная перестройка при связывании с мишенью была открыта также для

Таблица 1. Используемые в исследовании олигонуклеотиды

№	Обозначение	Последовательность 5'–3'
1	AS1411	Cy3-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-BHQ2
2	AS1411-interfere	Cy3-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG- TTTTTTTTTTTTTTT-CCAACACC-BHQ2
		quad-tail GGTGGTGG-...
		interfere-tail ...-CCAACACC
3	quad	GGTGGTGG
4	dis	GGTGTTGG
5	disA14	GGTGTTGG-AAAAAAAAAAAAA
6	Cy3T8	Cy3-TTTTTTTT

Примечание. Cy3 – цианин-3; BHQ2 – Black Hole Quencher 2; интерферирующая со структурой аптамера последовательность interfere-tail выделена двойным подчеркиванием; комплементарные к interfere-tail последовательности выделены одинарным подчеркиванием; нуклеотиды, участвующие в образовании не уотсон-криковских пар (мисматчи), обозначены полужирным шрифтом.

ДНК-аптамеров к тромбину и кокаину [16]. При этом многие ДНК-аптамеры имеют консервативные сайты связывания и не изменяют своей структуры при комплексообразовании с мишенями. Поэтому работоспособность упомянутого подхода для этого типа аптамеров нуждается в дополнительном изучении.

В данной работе мы исследовали возможность придания рН-зависимости консервативным аптамерам на примере аптамера AS1411 к нуклеолину. Последовательность AS1411 была дополнена интерферирующим участком. Для решения задач исследования был разработан альтернативный подход к проверке активности используемого аптамера в зависимости от рН. Он основан на изучении гибридизации сигнальной ДНК с интерферирующим участком аптамера, а не на детекции комплексообразования с нуклеолином. Это существенно упрощает процесс изучения системы, так как нет необходимости работать с самим белком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Трис(гидроксиметил)аминометан ($\geq 99.9\%$), ацетат натрия, хлорид магния и аденозинтрифосфат были закуплены в компании Sigma (США). Агароза была куплена в компании AppliChem (США). Для приготовления всех растворов использовали очищенную воду Milli-Q. Исследования проводили в буфере, содержащем 10 ммоль/л Трис-НCl, 10 ммоль/л CH_3COONa и 6 ммоль/л MgCl_2 .

Используемые в исследовании олигонуклеотиды представлены в табл. 1. Синтез проводило ООО «ДНК-Синтез» (Москва, Россия). Концентрация олигонуклеотидов AS1411, AS1411-interfere и Cy3T8 во всех опытах составляла 50 нмоль/л. Теоретическая температура плавления рассчитывалась при помощи калькулятора OligoAnalyzer (IDT, США) [17].

Плавление проводили на спектрофотометре Specord 2000 (Германия), регистрируя оптическую плотность проб на длине волны 260 нм. Градиент изменения температур во всех опытах не превышал $0.2^\circ\text{C}/\text{мин}$. Кривые плавления обработаны по алгоритму, предложенному в работе [18], и отражают долю α максимальной концентрации двунитевых участков ($\alpha = 1$).

Измерения интенсивности флуоресценции красителя Cy3 проводили с помощью флуориметра F-7100 (Hitachi, Япония) в режиме «Time scan» с напряжением на фотоумножителе 700 В. Длина волны возбуждения во всех опытах была 539 нм (ширина щели 5 нм), а интенсивность испускания измеряли на длине волны 590 нм (ширина щели 5 нм). При титровании измеряли флуоресценцию через 10 мин после добавления титрующего раствора. Исследование зависимости флуоресценции олигонуклеотида Cy3T8 от рН показало, что флуоресценция Cy3 не зависит от рН в диапазоне от 5.0 до 8.5 и составляет около 100 условных единиц.

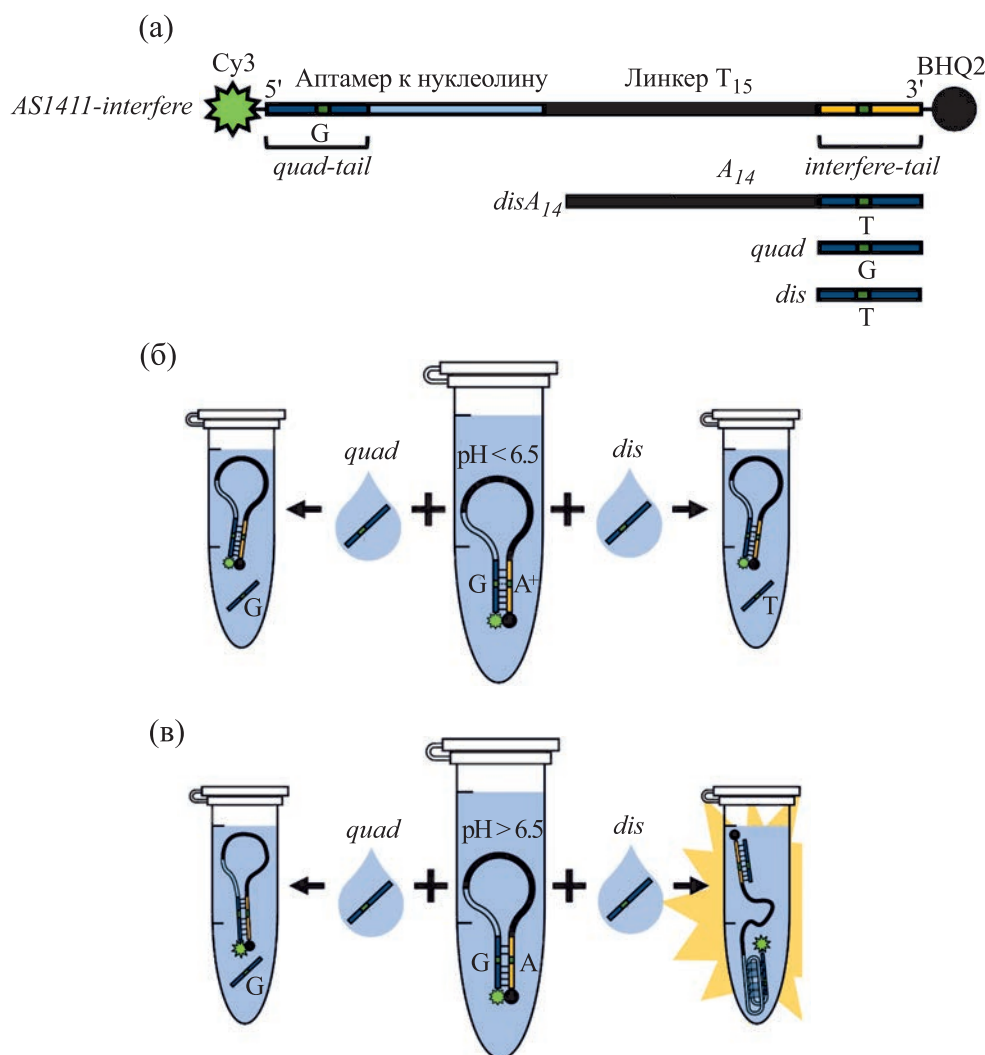


Рис. 1. Схема экспериментов по проверке pH-чувствительности выбранного дизайна сенсора (а). Случай «низкого» (б) и «высокого» (в) pH.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн модифицированного аптамера к нуклеолину. Исходный аптамер к нуклеолину *AS1411*, через политиминный (полиТ) линкер был дополнен участком *interfere-tail*, который за исключением одной пары А–Г комплементарен к его концевому участку *quad-tail*. Можно предположить, что в растворе устанавливается равновесие между «выключенными» макромолекулами аптамеров, в которых участок *interfere-tail* гибризован с *quad-tail*, и «включенными» макромолекулами, в которых участок *quad-tail* включен в формирование функциональной структуры аптамера. Стабильность дуплекса *quad-tail:interfere-tail* в нейтральных и кислых pH различаются. С понижением pH пара А–Г протонируется [19], и стабильность дуплекса возрастает. Чем выше стабильность дуплекса, тем меньше фракция апта-

меров, находящихся в функциональном состоянии, и наоборот. Это придает аптамеру *AS1411-interfere* зависимость от pH. Мы полагаем, что в случае отсутствия гибридизации участков *interfere-tail* и *quad-tail* аптамер *AS1411-interfere* переходит во «включенное» состояние аналогично тому, как это происходит для исходного аптамера *AS1411* [20]. Таким образом, измерение стабильности гибридизации участка *interfere-tail* и *quad-tail* при различных pH является косвенным измерением фракции «включенных» аптамеров. Для оценки стабильности указанного дуплекса мы использовали подход конкурентного связывания сигнальных олигонуклеотидов *quad*, *dis* и *disA₁₄* с участком *interfere-tail*, как это представлено на рис. 1. Чем эффективнее сигнальные олигонуклеотиды замещают *quad-tail* в дуплексе *quad-tail:interfere-tail*, тем менее стабилен данный дуплекс. Эффективность замещения оценивали по

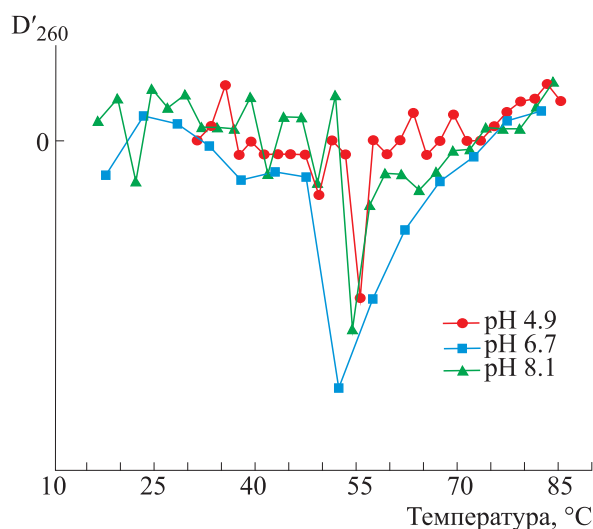


Рис. 2. Производная оптической плотности образцов NLC по температуре.

росту флуоресценции, сопровождающему разрушение дуплекса.

Изучение структуры аптамера при различных pH. Немодифицированный аптамер *AS1411* при используемых в работе ионных силах и pH формирует структуру, температура плавления которой варьируется от 52 до 56 °C (рис. 2), что соответствует литературным данным по плавлению квадруплексов [18]. Наблюдается характерное для квадруплексов изменение оптической плотности с ростом температуры [18], заключающееся в падении коэффициента экстинкции ϵ_{260} и увеличении ϵ_{295} (данные не представлены). При этом флуоресценция аптамера *AS1411* составила 20 ± 3 усл. ед., что существенно ниже аналогичных значений для олигонуклеотида *Cy3T₈* тех же концентраций. Это также свидетельствует о том, что 5'- и 3'-концы аптамера *AS1411*, модифицированные красителем и тушителем, находятся рядом, как и предполагает структура квадруплекса. Поэтому можно заключить, что в изучаемом диапазоне pH аптамер *AS1411* формирует свою функциональную квадруплексную форму.

Для модифицированного аптамера *AS1411-interfere* также наблюдали низкую интенсивность флуоресценции (18 ± 1 усл. ед. в диапазоне pH от 4.7 до 8.1). Это возможно в случае, если участок *quad-tail* комплементарно связан с участком *interfere-tail*. При этом, соответственно, *quad-tail* не участвует в формировании квадруплекса и аптамер теряет функциональность. Доля «выключенных» аптамеров зависит от стабильности дуплекса *quad-tail:interfere-tail*. В свою очередь, чем менее стабилен данный дуплекс, тем легче цепочка *quad-tail* в нем может быть замещена на один из

олигонуклеотидов *quad*, *dis* и *disA₁₄* с образованием нового более стабильного дуплекса [21].

Можно ожидать, что олигонуклеотид *quad* замещает участок *quad-tail* с одинаковой эффективностью во всем диапазоне pH, так как их последовательности полностью совпадают. Однако титрование раствора *AS1411-interfere* с помощью *quad* не вызвало роста флуоресценции во всех случаях. Такое поведение мы, в первую очередь, связываем с тем, что олигонуклеотид *quad*, являясь частью последовательности квадруплекса, может собираться в подобные структуры по четыре макромолекулы. Это препятствует его взаимодействию с участком аптамера *interfere-tail*.

Олигонуклеотиды *dis* и *disA₁₄* имеют один нуклеотид, отличный от последовательности квадруплекса, поэтому формирование ими в растворе подобных надструктур маловероятно. На рис. 3а показано, как изменяется интенсивность флуоресценции метки *Cy3* при титровании раствора *AS1411-interfere* раствором олигонуклеотида *dis*. При pH < 6.0 увеличение концентрации олигонуклеотида *dis* в растворе не приводит к существенному изменению сигнала. Олигонуклеотид *dis* при указанных pH не способен заместить *quad-tail* в дуплексе *quad-tail:interfere-tail*, так как такой дуплекс стабилизируется в кислых pH дополнительно парой $A^+ \cdot G$. При pH > 6.0 наблюдается существенный рост флуоресценции, связанный с гибридизацией олигонуклеотида *dis* с *interfere-tail* и разнесением тушителя на *interfere-tail* и красителя на *quad-tail*, как показано на рис. 1. В то же время олигонуклеотид *disA₁₄*, содержащий дополнительную последовательность поли(A), во всем диапазоне pH приводит к возрастанию флуоресценции (рис. 3б). Это хорошо согласуется с тем, что расчетная температура плавления дуплекса *disA₁₄:interfere-tail* в два раза выше температуры плавления дуплекса *quad-tail:interfere-tail*. Также линкер полиТ в аптамере *AS1411-interfere* является точкой опоры для реакции с *disA₁₄*, что существенно ускоряет протекание реакции [21]. Уже при соотношении концентраций *disA₁₄:AS1411-interfere*, равном 1:1, наблюдается выход зависимостей на плато вне зависимости от pH. Это полностью соответствует схеме гибридизации.

В отличие от олигонуклеотида *disA₁₄*, который имеет большую аффинность к аптамеру *AS1411-interfere*, а именно его участку *interfere-tail*, благодаря длинной комплементарной последовательности, олигонуклеотид *dis* и участок аптамера *quad-tail* имеют сопоставимые константы связывания с *interfere-tail* ввиду того, что конкуренция между ними за связывание с этим фрагментом практически отсутствует. В результате в растворе возникает фракция аптамера *AS1411-interfere*, в

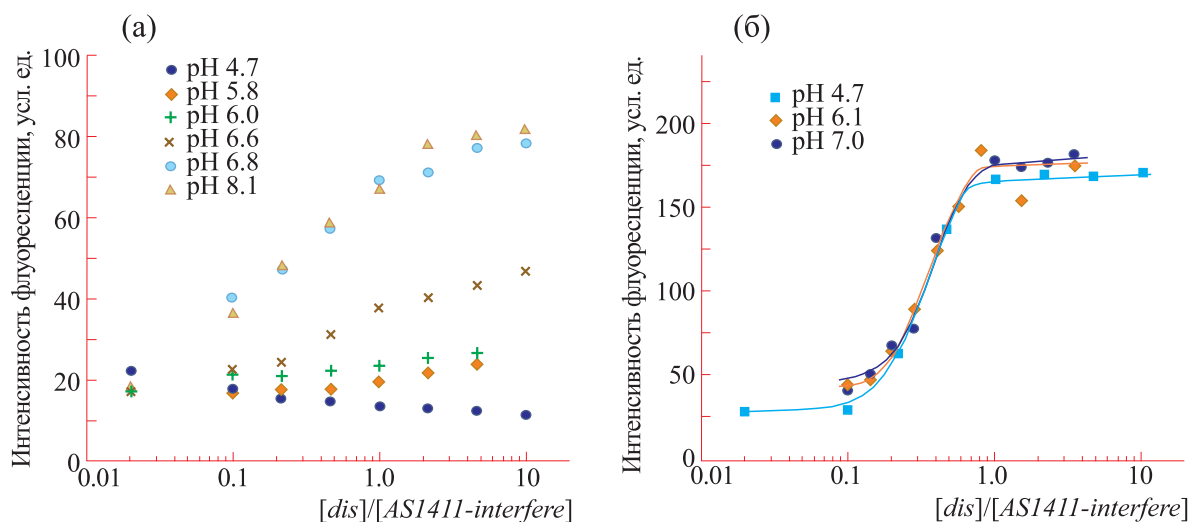


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции растворов аптамера *AS1411-interfere* от концентрации олигонуклеотидов *dis* (а) и *disA14* (б) при различных pH.

которой он имеет форму шпильки, и образуется дуплекс *quad-tail:interfere-tail*, и фракция, в которой он принимает форму квадруплекса, а его участок *interfere-tail* образует дуплекс *dis:interfere-tail*. По соотношению этих двух фракций можно судить о стабильности дуплекса *quad-tail:interfere-tail*. Как следует из рис. 4, при низких pH дуплекс *quad-tail:interfere-tail* стабилен, аптамер находится в «выключенном» состоянии. При $pH > 6.0$ дуплекс относительно нестабилен и доля «включенных» аптамеров должна расти, что согласуется с дизайном аптамера *AS1411-interfere*.

При соотношении *dis* и аптамера *AS1411-interfere*, равному 1:1, как видно из рис. 4, при $pH < 6.0$ практически не происходит замещения *quad-tail* на *dis*. При $pH 6.5$ замещение происходит примерно для половины аптамеров от максимального количества, которое достигается в области $pH > 7.0$. Известно, что наличие некомплементарных оснований А–Г в двойной спирали нуклеиновых кислот значительно понижает их стабильность и температуру плавления при нейтральных pH и существенно повышает в кислых [22]. Основываясь на этом, можно предположить, что температура плавления дуплексов *quad-tail:interfere-tail* больше температуры плавления дуплексов *dis:interfere-tail* в кислых pH и наоборот – в нейтральных. Если к началу плавления в растворе присутствуют две фракции *quad-tail:interfere-tail* и *dis:interfere-tail*, то при повышении температуры сначала будет плавиться фракция с более низкой температурой плавления. При этом значительного изменения поглощения наблюдаться не будет, так как высвободившийся *interfere-tail* будет вовлечен в формирование дуплекса в более стабильной фракции. Этот процесс будет идти пока первая фракция полностью не распла-

вится. С дальнейшим повышением температуры будет происходить денатурация оставшейся наиболее стабильной фракции. Действительно, при плавлении растворов *dis* и аптамера *AS1411-interfere* в соотношении 1:1 во всех областях pH наблюдается только один переход (рис. 5а), несмотря на наличие двух фракций для pH 6.5 и 7.3 (рис. 4). При pH 7.3 некомплементарная пара А–Г в дуплексе *quad-tail:interfere-tail* не протонирована и во время плавления фракция этого дуплекса переходит во фракцию *dis:interfere-tail*. При понижении pH пара A^+-G стабилизирует дуплекс и фракция *dis:interfere-tail* с повышением температуры переходит во фракцию *quad-tail:interfere-tail*, которая имеет повышенную темпера-

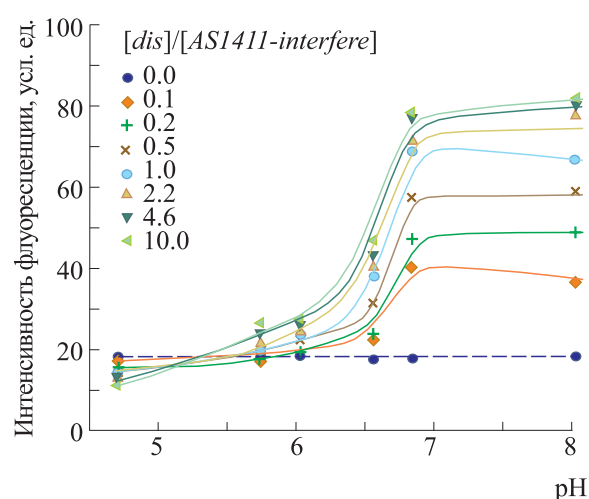


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции растворов аптамера *AS1411-interfere*, содержащих различные концентрации *dis*, от pH.

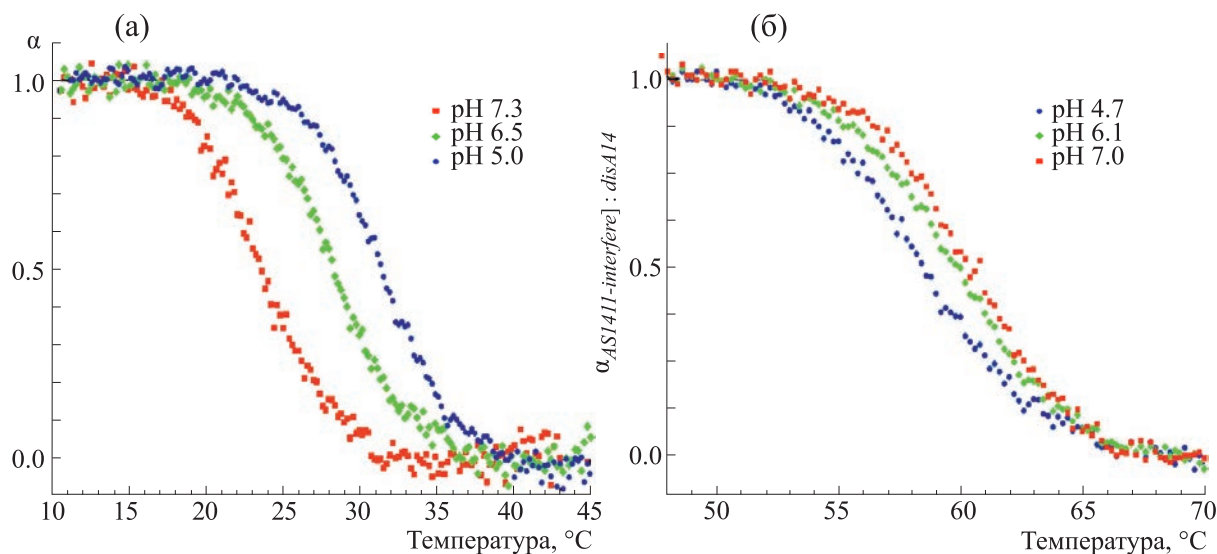


Рис. 5. Кривые плавления растворов *AS1411-interfere*, содержащих олигонуклеотиды *dis* (а) или *disA14* (б). *AS1411-interfere:dis = AS1411-interfere:disA14 = 1:1*.

туру плавления. Противоположная зависимость температуры плавления от pH наблюдается для комплексов аптамера *AS1411-interfere* с *disA14* (рис. 5б). Так как дуплекс *disA14:interfere-tail* плавится в области 60°C, что существенно выше, чем 30°C для *quad-tail:interfere-tail*, то перераспределение фракций во всем диапазоне pH отсутствует. При этом наблюдается небольшое падение температуры плавления с уменьшением pH, которое можно соотнести с дестабилизацией самого дуплекса *disA14:interfere-tail* в кислой среде. Кривые плавления комплексов аптамера с олигонуклеотидами *dis* и *disA14* полностью соответствуют схеме работы pH-зависимого аптамера *AS1411-interfere*.

ВЫВОДЫ

Продemonстрированный в данной работе подход по изучению конформации модифицированного аптамера *AS1411* при помощи сигнальных олигонуклеотидов представляется весьма перспективным. Методика не требует работы непосредственно с мишенью — нуклеотином. Полученные с ее помощью результаты полностью согласуются с ранее описанным механизмом действия интерферирующей последовательности, несущей некомплементарный нуклеотид.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-23-01066).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. Mongelard and P. Bouvet, Trends Cell Biol., **17** (2), 80 (2007).
2. S. Christian, J. Pilch, M. E. Akerman, et al., J. Cell Biol., **163** (4), 871 (2003).
3. J. Mosafer and A. Mokhtarzadeh, Curr. Drug Delivery, **15** (9), 1323 (2018).
4. C. Brignole, V. Bensa, N. A. Fonseca, et al., J. Exp. Clin. Cancer Res., **40** (1), 180 (2021).
5. J. Balça-Silva, A. do Carmo, H. Tão, et al., Exp. Cell Res., **370** (1), 68 (2018).
6. V. Moura, M. Lacerda, P. Figueiredo, et al., Breast Cancer Res. Treat., **133** (1), 61 (2012).
7. J. Carvalho, A. Paiva, M. P. Cabral Campello, et al., Sci. Rep., **9** (1), 7945 (2019).
8. N. F. Hosseini, R. Amini, M. Ramezani, et al., Biomed. Pharmacother., **155**, 113690 (2022).
9. С. П. Радько, С. Ю. Рахметова, Н. В. Бодоев и др., Биомед. химия, **53** (1), 5 (2007).
10. С. А. Лапа, В. Е. Шершов, Г. С. Краснов и др., Биоорг. химия, **46** (4), 411 (2020).
11. Z. Fu and J. Xiang, Int. J. Mol. Sci., **21** (8), 2793 (2020).
12. R. Yazdian-Robati, P. Bayat, F. Oroojalian, et al., Int. J. Biol. Macromol., **155**, 1420 (2020).

13. B. A. Webb, M. Chimenti, M. P. Jacobson, et al., *Nat. Rev. Cancer*, **11** (9), 671 (2011).
14. M. Damaghi, J. W. Wojtkowiak, and R. J. Gillies, *Front. Physiol.* **4**, 370 (2013).
15. I. A. P. Thompson, L. Zheng, M. Eisenstein, et al., *Nat. Commun.*, **11** (1), 2946 (2020).
16. M. Debiais, A. Lelievre, M. Smietana, et al., *Nucl. Acids Res.*, **48** (7), 3400 (2020).
17. <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>.
18. P. A. Rachwal and K. R. Fox, *Methods*, **43** (4), 291 (2007).
19. J. A. Lee and M. C. DeRosa, *Chem. Commun.*, **46** (3), 418 (2010).
20. L. Bie, Y. Wang, F. Jiang, et al., *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 1025313 (2022).
21. F. C. Simmel, B. Yurke, and H. R. Singh, *Chem. Rev.*, **119** (10), 6326 (2019).
22. S. E. Morse and D. E. Draper, *Nucl. Acids Res.*, **23** (2), 302 (1995).

Study of the Influence of pH on the Conformation of a Modified Aptamer to Nucleolin Protein

P.V. Gabrusenok*, R.R. Ramasanoff**, A.S. Buchelnikov**, and P.A. Sokolov*, **

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

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

The search for agents for targeted delivery of anticancer drugs remains a crucial challenge for medicine. For this reason, DNA aptamers targeting cancer cell-specific proteins have medical use. At the same time, the additional fine-tuning of aptamer properties to lower affinity of aptamers for target cells that are not surrounding cancerous tissues makes the aptamers promising tools in clinical applications due to reduced immunogenicity and fewer side effects. One of the approaches is to use acidity disruption in cancer cells and tissues. In this work, aptamer AS1411 was modified to increase affinity for nucleolin by attaching a nucleotide sequence to its binding site to create a pH-sensitive linker. UV melting and fluorescence methods were employed to demonstrate that the conformation of the new aptamer depends on pH of the medium.

Keywords: aptamer, pH, DNA, nucleolin, cancer

УДК 577.325:54.057

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФИЦИНА С ГРАФТ-СОПОЛИМЕРОМ НАТРИЕВОЙ СОЛИ КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ И *N*-ВИНИЛИМИДАЗОЛА МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА, ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

© 2023 г. А.В. Сорокин*, **, С.С. Гончарова*, М.С. Лавлинская*, **, М.Г. Холявка*, ***,#, Ю.Ф. Зуев****, Д.А. Файзуллин****, М.С. Кондратьев*, *****, В.Г. Артюхов*

*Воронежский государственный университет, Россия, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия

**Воронежский государственный университет инженерных технологий,
просп. Революции, 19, Воронеж, 394036, Россия

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

****Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, ул. Лобачевского, 2/31, Казань, 420111, Россия

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

#E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.10.2022 г.

После доработки 04.11.2022 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Методами гибкого молекулярного докинга, инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния исследован механизм взаимодействия фицина с графт-сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола. Выявлены функциональные группы и фрагменты молекул графт-сополимера, а также аминокислотные остатки, образующие первичную структуру фермента, вступающие во взаимодействия между фицином и графт-сополимером. Показано, что спектроскопия комбинационного рассеяния дает более полные представления о фрагментах макромолекул графт-сополимера, взаимодействующих с белком, по сравнению с инфракрасной спектроскопией. Установлено, что аминокислотные остатки, образующие активный центр фицина, участвуют в образовании водородных связей и гидрофобных взаимодействиях с графт-сополимером, что приводит к повышению протеолитической активности конъюгированного фермента.

Ключевые слова: фицин, графт-сополимеры, ИК-спектроскопия, КР-спектроскопия, механизм взаимодействия.

DOI: 10.31857/S0006302923020059, EDN: SAHGJT

Микроокружение макромолекул ферментов оказывает значительное влияние на их каталитическую способность и конформационное состояние. Различные типы слабых физических взаимодействий, таких как гидрофобные, ван-дер-Ваальсовы и др., а также образование водородных связей, в которые могут вовлекаться как аминокислотные остатки на поверхности глобулы, так и активный центр ферментов, часто изменяют функции белка, что может привести к гибели жи-

вой системы или затруднению использования фермента в технологических процессах. По этой причине исследование возможных механизмов взаимодействия ферментов с различными низко- и высокомолекулярными соединениями является важнейшей задачей современной энзимологии и биофизики, решение которой открывает возможности дизайна новых лекарственных препаратов или создания «умных» материалов с заданными свойствами, регулирующими активность биокатализаторов, применяемых в биотехнологических производствах.

Весьма информативным методом, позволяющим детализировать взаимодействия белковых

Сокращения: ИК-спектроскопия — инфракрасная спектроскопия, КР-спектроскопия — спектроскопия комбинационного рассеяния, НПВО — нарушенное полное внутреннее отражение.

макромолекул вплоть до номера аминокислотного остатка в последовательности, является гибкий молекулярный докинг. Благодаря этому методу можно не только оценить самопроизвольность взаимодействия, но и получить визуализацию комплекса белка, отражающую его топологию и положение лиганда относительно активного центра фермента. Кроме того, результатом *in silico* расчета является тип взаимодействия, в который вступает тот или иной аминокислотный остаток макромолекулы белка [1, 2]. Однако стоит отметить, что для подобного глубокого виртуального исследования механизма взаимодействия белков требуется наличие трехмерных моделей их макромолекул, получаемых на основании данных рентгеноструктурного и/или ЯМР-исследования.

Вибрационная молекулярная спектроскопия, включающая в себя инфракрасную (ИК) спектроскопию и спектроскопию комбинационного рассеяния (КР- или рамановскую спектроскопию), также находит широкое применение в исследовании структуры белков [3, 4]. Существует несколько методов ИК-спектроскопии, часто применяемых для получения информации о вторичной структуре белков, например, ИК-Фурье-спектроскопия с нарушенным полным внутренним отражением (НПВО). НПВО-ИК-спектроскопия показала свою эффективность при исследовании процессов кристаллизации белков, их поверхностных взаимодействий с другими высоко- и низкомолекулярными соединениями и процессов, связанных со структурными изменениями в белковых макромолекулах [5–8].

Для анализа вторичной структуры белков наиболее важными являются полосы Амид I (валентные колебания C=O), Амид II и Амид III, обусловленные деформационными колебаниями N–H и валентными колебаниями C–N. Наиболее интенсивная из них – полоса Амид I, обычно находящаяся в области $\sim 1650 \text{ см}^{-1}$, по смещению которой возможно оценить изменения во вторичной структуре белков, так как она характеризует колебательные моды пептидных связей [9]. Фактическое положение полосы Амид I определяется водородными связями, образуемыми пептидными группами. Однако полоса Амид I перекрывается с поглощением деформационных колебаний воды при 1640 см^{-1} , что осложняет ее регистрацию и анализ белковых систем в водных растворах [10]. Полоса Амид II, проявляющаяся в ИК-спектре в области $\sim 1550 \text{ см}^{-1}$, свободна от искажающего влияния воды и также используется для характеристики структурных изменений белковых молекул [11]. Так, в работе [12] с помощью НПВО-ИК-спектроскопии были оценены конформационные изменения цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина – в результате адсорбционной иммобилизации на поверхности

хитозана. Из данных по положению полос Амид I и II белков в ферментных препаратах установлено, что в ходе взаимодействия белковых макромолекул с полисахаридом происходит разрушение их α -спиральных доменов, возрастает число β -складчатых областей, а конформации всех исследуемых ферментов отклоняются от глобулярных к более вытянутым.

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния может дать аналогичную информацию о вторичной структуре белкового остова с акцентом на состоянии хромофоров, ароматических фрагментов и других боковых заместителей полипептидных цепей, обуславливающих, в том числе, третичную структуру макромолекул [13]. Более того, известен ряд преимуществ рамановской спектроскопии над ИК-Фурье-исследованием. Например, функциональные группы, такие как S–S, C–S и S–H, характеризуются высокой поляризуемостью. Такие группы могут слабо проявляться или полностью отсутствовать в ИК-спектрах, и для их детектирования требуются концентрированные и высокоочищенные пробы [14]. С помощью рамановской спектроскопии удалось определить температуру денатурации шипового гликопротеина S1 вируса SARS-CoV-2. При этом результаты опытов коррелируют с данными, полученными методом дифференциальной калориметрии, с точностью до 2°C [15].

Таким образом, комбинируя виртуальные расчеты и методы спектроскопических исследований, можно получить комплексное представление о механизме взаимодействия фермента с компонентами его микроокружения и оценить влияние последнего на каталитическую активность фермента.

Фицин (КФ 3.4.22.3) – тиоловая папаиноподобная эндопептидаза, выделяемая из растений рода *Ficus* [16]. Активный центр фермента содержит остатки аминокислот цистеина и гистидина. Фермент широко применяется в пищевых биотехнологиях и медицине [17], однако, как и многие биологические объекты, характеризуется низкой стабильностью. Наиболее доступным способом его защиты от неблагоприятного воздействия различных факторов изменения микроокружения является иммобилизация на различных носителях. К последним предъявляется несколько требований, среди которых доступность, низкая токсичность, а также способность сохранять протеолитическую способность фермента. Для оценки влияния взаимодействия фицин-носитель на практически значимые свойства фермента целесообразно изучить механизм их связывания комплексом методов.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы является исследование механизма взаимодействия фицина с графт-сополимером натри-

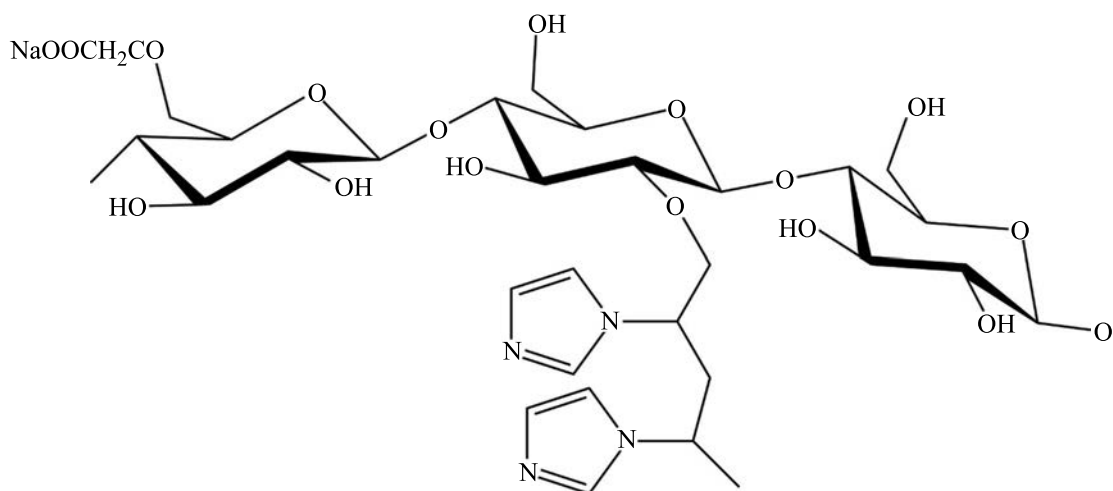


Рис. 1. Фрагмент структуры графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола.

евои соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола методами молекулярного докинга, ИК- и КР-спектроскопии, а также оценка влияния этого взаимодействия на каталитическую активность фермента. Выбор предложенного носителя обусловлен его низкой токсичностью и высокой комплексообразующей способностью [18]. Более того, структура предлагаемого носителя содержит различные типы функциональных групп и углеродный остов привитых боковых цепей, способных образовывать водородные связи и различные типы слабых физических взаимодействий. Это делает графт-сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола перспективной моделью для создания микроокружения глобул фицина, влияющего на его протеолитическую активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали фицин, субстратом для гидролиза был выбран азоказеин, оба — производства Sigma (США). Вещества использовали без дополнительной очистки.

Графт-сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола получали по следующей методике: навеску натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Sigma Aldrich, Германия; средняя молекулярная масса — 90 кДа, степень замещения 0.7) массой 0.5 г растворяли в 85 мл дистиллированной воды, после чего вносили 0.05 г растворенного в 5 мл дистиллированной воды персульфата калия. Полученную смесь дегазировали трехкратным повторением циклов замораживания—вакуумирования—оттаивания, затем вносили под током аргона навеску сухого метабисульфита натрия массой 0.04 г. Реакционную массу термостатировали в течение 20–30 мин. От-

дельно проводили вакуумную дегазацию 5.34 мл *N*-винилимидазола (Sigma Aldrich, Германия), после чего вносили в реактор под током аргона. Синтез вели в течение 18 часов при 40°C. По завершении времени процесса продукт осаждали в ацетоне («Вектон», Россия), центрифугировали и сушили в вакуумном шкафу до постоянной массы. Образовавшийся продукт очищали от примесей и гомополимера на экстракторе Сокслета этиловым спиртом со спектрофотометрическим контролем. Фрагмент структуры графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола представлен на рис. 1.

Синтезированный графт-сополимер характеризовали согласно методикам, представленным в работе [18]. Эффективность прививки (*GE*) определяли как разность масс очищенного продукта реакции (m_2 , г) и используемой натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы ($m_{\text{СМС}}$, г), отнесенную к массе загруженного *N*-винилимидазола ($m_{\text{мон}}$, г):

$$GE = \frac{m_2 - m_{\text{СМС}}}{m_{\text{мон}}} \times 100\%. \quad (1)$$

Для определения молекулярной массы привитых цепей поли-*N*-винилимидазола графт-сополимер (в виде порошка) растворяли в 250 мл 0.1 N раствора NaNO_2 , добавляли эквимольное количество 0.1 N раствора HCl и выдерживали в течение суток при комнатной температуре. Затем смесь осаждали в ацетоне, осадок выделяли центрифугированием и сушили в вакуумном сушильном шкафу при $50 \pm 2^\circ\text{C}$ до постоянной массы.

Молекулярную массу и индекс полидисперсности определяли методом гель-проникающей хроматографии на хроматографе Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, США), оснащенном

изократическим насосом, рефрактометрическим детектором и колонкой PLmixC. Для этого готовили раствор выделенного полимера в *N*-метилпирролидоне с концентрацией 1 г/мл. В качестве элюента использовали 0.03 М LiCl в *N*-метилпирролидоне при 50°C, скорость потока составляла 0.5 мл/мин, объем вводимой пробы — 20 мкл. Калибровку проводили по узкодисперсным образцам полистирола.

Установлено, что эффективность прививки составила 42%, средневесовая молекулярная масса привитых цепей поли-*N*-винилимидазола — 12569 Да, индекс полидисперсности — 2.3.

Иммобилизацию фицина на матрице полученного сополимера, содержание белка в полученном препарате, а также определение его каталитической активности проводили согласно методикам, представленным в работе [19]. Иммобилизацию фицина на графт-сополимерах осуществляли адсорбционным методом. К 0.5 г носителя добавляли 10 мл раствора фермента (в концентрации 2 мг/мл в боратном буфере, pH 9.0), инкубировали в течение 2 ч. После окончания инкубации образовавшийся осадок промывали с помощью диализа против 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7.5) через целлофановую мембрану с размером пор 25 кДа до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при $\lambda = 280$ нм).

Содержание белка в иммобилизованном препарате определяли методом Лоури со следующей модификацией: на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей между полисахаридом и молекулами фермента. Для этого иммобилизованный фицин обрабатывали раствором K₂Na-тарtrate (в концентрации 20 мг/мл или 0.7 М), приготовленным на 1 М NaOH, при 50°C в течение 10 мин. Отсутствие процессов разрушения фермента контролировали путем регистрации и анализа его спектра поглощения на спектрофотометре UV-2550PC (Shimadzu Scientific Instruments, Япония).

Определение протеолитической активности фицина проводили на субстрате азоказеине (Sigma, США). К 50 мг образца добавляли 200 мкл Трис-HCl-буфера, pH 7.5, 800 мкл азоказеина (0.5% в 50 мМ Трис-HCl-буфере, pH 7.5) и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее добавляли 800 мкл трихлоруксусной кислоты (5%), инкубировали 10 мин при 4°C, затем центрифугировали в течение 3 мин при 11700 *g* для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3%-го NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в одноканальной кювете. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл трихлоруксусной кислоты, 50 мг образца и 200 мкл Трис-HCl-бу-

фера. За единицу каталитической активности принимали количество фицина, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин.

Для исследования механизма взаимодействия фицина с графт-сополимером были использованы методы гибкого молекулярного докинга, ИК- и КР-спектроскопии. ИК-спектры образцов, представляющих собой сухие тонкодисперсные порошки, регистрировали на ИК-спектрометре IRAffinity1 (Shimadzu Scientific Instruments, Япония) методом НПВО с использованием приставки с призмой из селенида цинка, диапазон регистрации — 700–4000 см⁻¹. Спектр накапливали в течение четырех циклов регистрации по 72 сканирования в каждом. Эксперимент повторяли как минимум трижды на разных образцах. Суммарная погрешность измерения сдвигов полос поглощения в опыте по сравнению с контролем составляла 0.1–0.5 см⁻¹ в зависимости от ширины и интенсивности полосы. КР-спектры получали на ИК-Фурье-спектрометре с рамановской приставкой Tensor 37 Vertex 70 RAM II (Bruker Optic GmbH, Германия), мощность лазера составляла 250 мВт, длина волны излучения — 1064 нм, количество накоплений — 1024 скана. *In silico* исследование взаимодействия фицина и графт-сополимера проводили в пакете Autodock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/>) с использованием трехмерной структуры фицина (PDB ID: 4YYW, <https://www.rcsb.org/structure/4YYW>). Подготовку модели структуры фермента и оптимизацию матрицы полимера-носителя проводили, как описано в работе [20]. Структурную модель графт-сополимера строили в молекулярном конструкторе HyperChem (<http://www.hypercubeusa.com/>), после чего она была последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а затем квантово-химически в PM3. Лиганд в расчетах обладал максимальной конформационной свободой: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановка заряда на молекуле носителя и его протонирование/депротонирование осуществлялись автоматически в пакете MGLTools 1.5.6 (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/1-5-6/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления механизма взаимодействия фицина с матрицей полимера-носителя нами был применен метод гибкого молекулярного докинга. Данные расчетов демонстрируют отрицательное значение аффинности, равное –6.2 ккал/моль, подтверждающее самопроизвольное взаимодействие белка и носителя. Из анализа топологии модели комплекса фицин–графт-сополимер (рис. 2а) следует, что последний располагается в полости между доменами, образующими глобулу

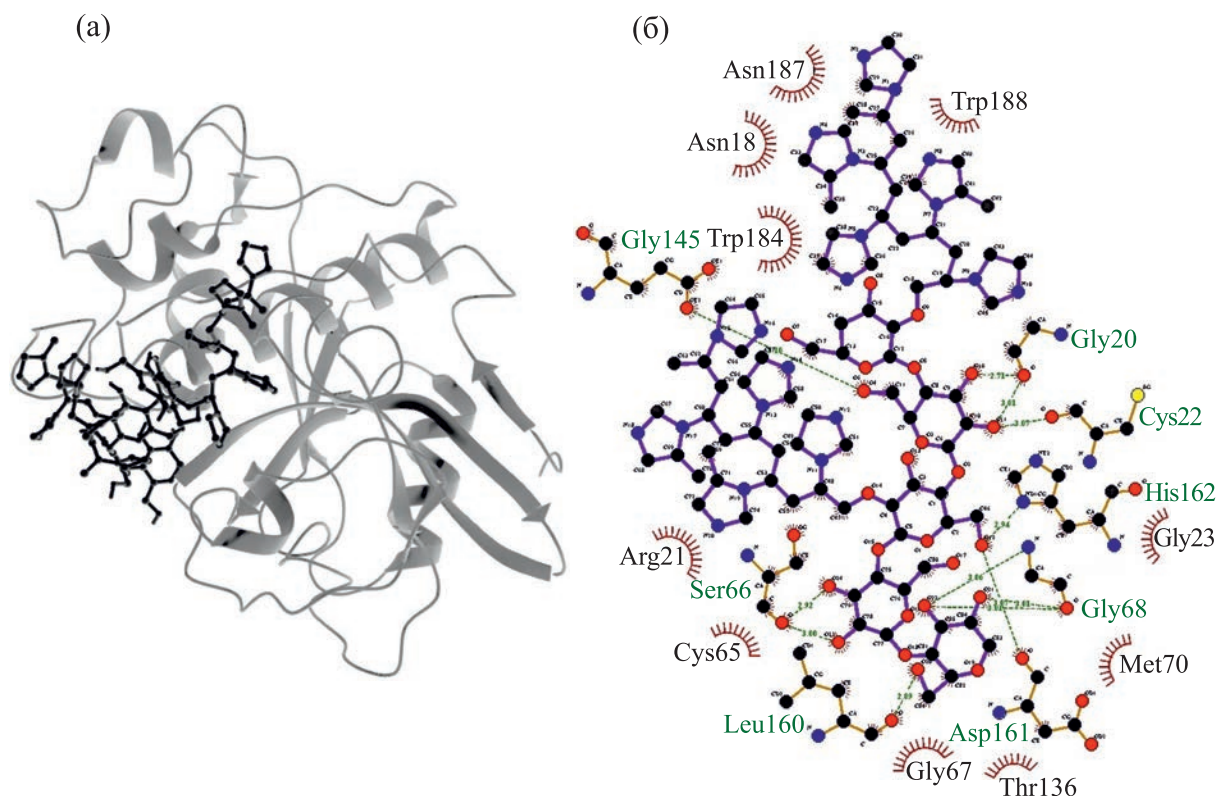


Рис. 2. Топология комплекса фицин-графт-сополимер (а) и связи и взаимодействия между ними, пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина которых приведена в Å (б).

фицина. Вследствие разветвленного строения графт-сополимера его молекула выходит за пределы полости, содержащей активный центр фермента, и может взаимодействовать с остатками аминокислот, находящихся на поверхности глобулы белка. Более детальное рассмотрение модели показывает, что водородные связи, оказывающие наибольшее влияние на конформационное состояние и каталитическую активность фермента, образуют со стороны матрицы-носителя только гидроксильные или карбоксиметильные группы полисахаридного остова. В этих процессах

участвует в том числе и одна из аминокислот активного центра фицина — His162 (рис. 26, табл. 1). Боковые привитые звенья поли-*N*-винилимидазола вступают в прочие, в основном гидрофобные, взаимодействия, причем как азольные циклы, так и углеродные цепи. В целом, результаты расчета *in silico* хорошо коррелируют с данными спектроскопических исследований (см. ниже), указывают на участие тех же функциональных групп графт-сополимера и выявляют природу аминокислотных остатков белка в процессе образования конъюгата фицина с носителем.

Таблица 1. Аминокислотные остатки фицина, образующие связи и взаимодействия с графт-сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола*

Остатки, образующие Н-связи, и их длина, Å	Остатки, вступающие в прочие взаимодействия
Gly20, 2.71 и 3.01 Cys22, 3.07 Ser66, 2.92 и 3.00 Gly68, 3.06, 3.01; 3.01 Gly145, 5.10 Leu160, 2.89 Asp161, 3.07 His162 , 2.94	Asn18, Arg21, Gly23, Cys65, Gly67, Met70, Thr136, Trp184, Asn187, Trp188

Примечание. Жирным шрифтом выделен аминокислотный остаток, входящий в активный центр фицина.

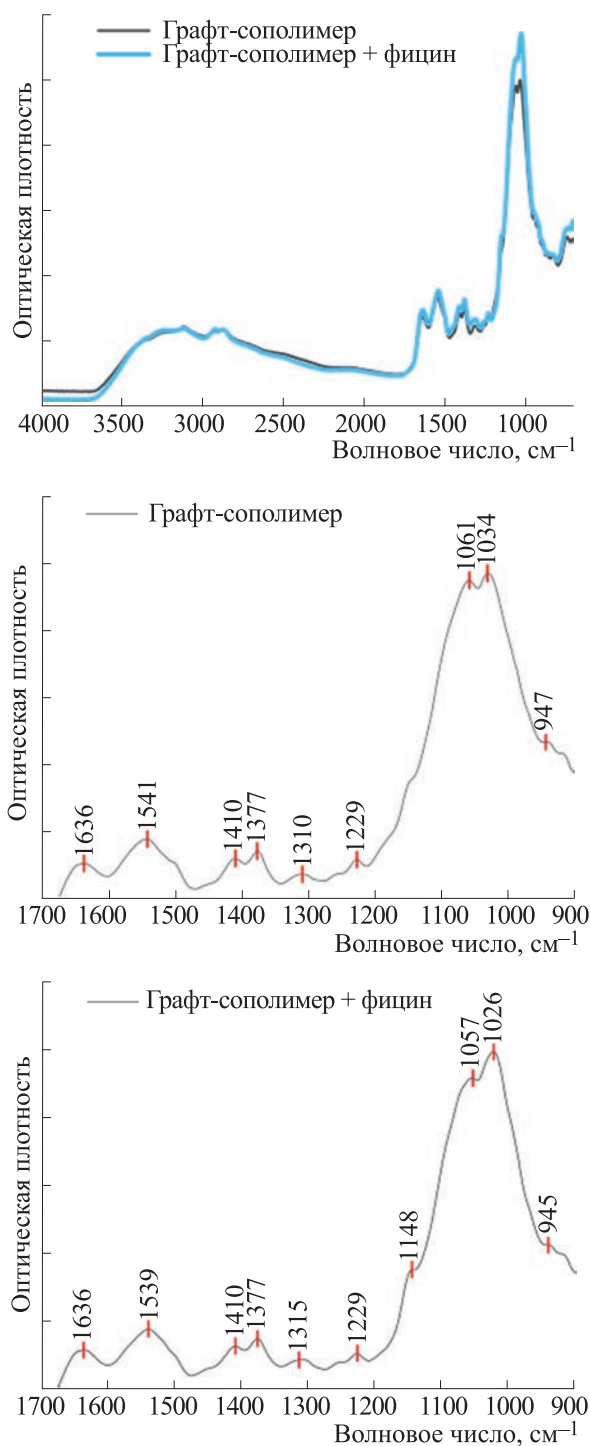


Рис. 3. ИК-спектры графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола и его конъюгата с фицином.

На рис. 3 представлен ИК-спектр графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола, содержащий следующие характеристические полосы поглощения — при 914, 1228 и 1635 см^{-1} , отвечающие различным проявлениям имидазольного цикла — деформационным колебаниям азольной структуры, колебаниям $\text{C}-\text{N}$ и валентным колебаниям $\text{C}=\text{N}$ соответственно; при 1034, 1060 и 1149 см^{-1} , соответствующие колебаниям пиранозных циклов, их эфирным и 1,4- β -гликозидным связям соответственно; ряд полос при 1377, 1410 и 1541 см^{-1} ,

соответствующие колебаниям пиранозных циклов, их эфирным и 1,4- β -гликозидным связям соответственно; ряд полос при 1377, 1410 и 1541 см^{-1} ,

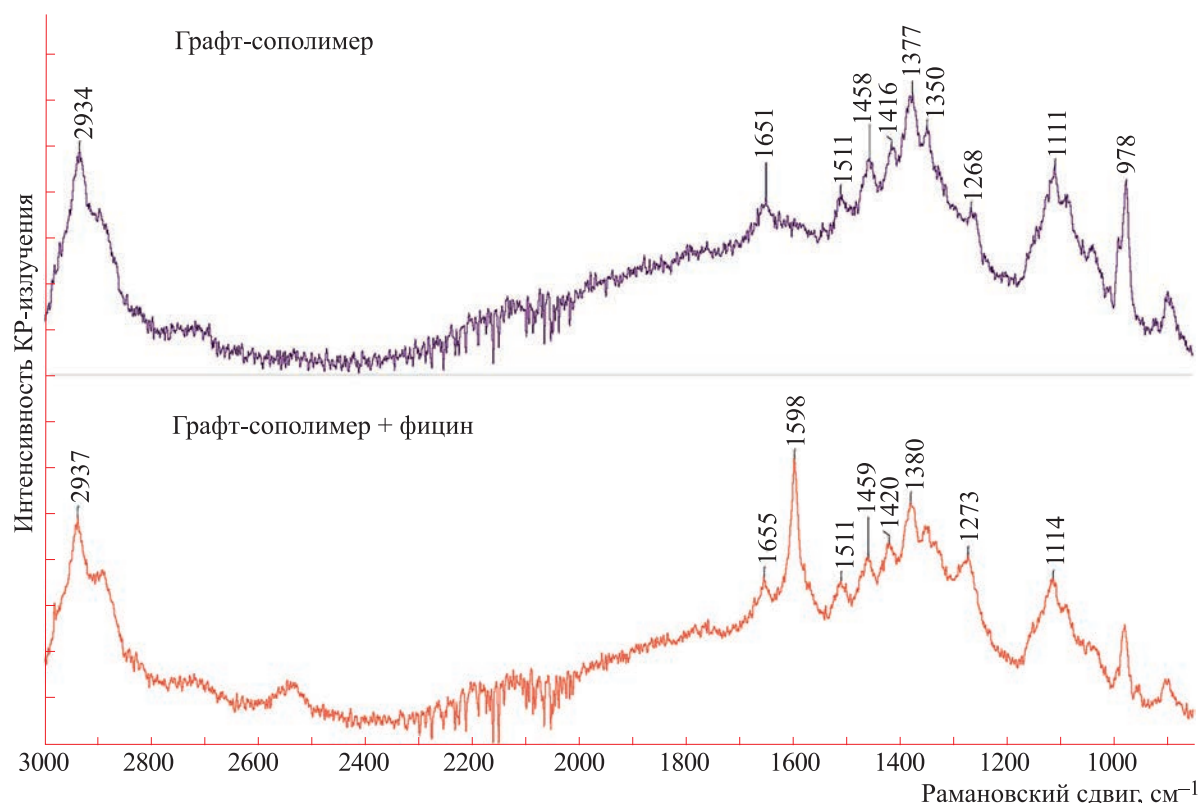


Рис. 4. КР-спектры графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола и его конъюгата с фицином.

отражающих колебания диссоциированных карбоксильных групп соли карбоксиметилцеллюлозы; полосы в области $2870\text{--}2935\text{ см}^{-1}$, обусловленные колебаниями метиленовых групп, а также широкая полоса в области $3000\text{--}3400\text{ см}^{-1}$ с явно выраженным максимумом при 3111 см^{-1} , соответствующая гидроксильным группам целлюлозы [18, 19, 21]. Стоит отметить, что в ИК-спектре синтезированного графт-сополимера присутствуют полосы поглощения в области $1541\text{--}1635\text{ см}^{-1}$, критически важной для исследования структурного состояния молекул белков. Этот факт может затруднить анализ состояния молекул фицина в изучаемом препарате.

В результате определения содержания белка в полученном после иммобилизации препарате установлено, что концентрация фицина составляет 30.0 ± 1.8 мг энзима на один грамм носителя. ИК-спектр биокатализатора представлен на рис. 3 (отдельно выделена область $900\text{--}1700\text{ см}^{-1}$, представляющая наибольший интерес при исследовании белков). В спектре не проявляются новые полосы, например, Амид I или Амид II. Это может быть связано с перекрыванием амидных полос с функциональными группами матрицы-носителя или же с недостаточной концентрацией фицина в препарате. Можно отметить изменения

в интенсивности или форме некоторых полос поглощения, например, отвечающих метиленовым группам и пиранозным циклам. Для последних также выявляется смещение положения максимумов и изменение соотношения интенсивности в модах, формирующих сигнал на спектре. Положение максимума также смещается для полосы с 1541 до 1539 см^{-1} , описывающей валентные асимметричные колебания карбоксилат-аниона. Таким образом, можно заключить, что между фицином и графт-сополимером происходят слабые физические взаимодействия, в которые, по-видимому, вовлечены карбоксильные и гидроксильные группы, а также гидрофобные фрагменты матрицы-носителя. Однако из полученных данных нельзя сделать определенных выводов о конформационном состоянии фицина. Напомним, что исследование методом ИК-спектроскопии проводилось для образцов в виде тонкодисперсных порошков без какой-либо дополнительной обработки.

На рис. 4 представлены КР-спектры исследуемых порошкообразных препаратов синтезированного графт-сополимера и его комплекса с фицином. В спектре носителя также присутствуют сигналы, описывающие как фрагменты натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (1111 см^{-1} —

колебания пиранозных циклов; 1377 см^{-1} — веерные колебания метиленовых групп карбоксиметильных фрагментов, 1416 см^{-1} — симметричные валентные колебания карбоксильных групп, 2934 см^{-1} — различные колебания ОН-групп), так и привитых цепей поли-*N*-винилимидазола (978 см^{-1} — деформационные колебания имидазольных колец, 1268 см^{-1} — крутильные колебания метиленовых групп, 1651 см^{-1} — валентные колебания $\text{C}=\text{N}$) [22, 23]. В КР-спектре комплекса присутствуют описанные выше полосы, для многих из них наблюдается смещение рамановского сдвига. Наиболее ярко это выражено для сигналов, соответствующих полярным фрагментам, например, имидазольным циклам (с 1268 до 1273 см^{-1} и с 1651 до 1655 см^{-1}), карбоксильным (с 1416 до 1420 см^{-1}), пиранозным (с 1111 до 1114 см^{-1}) и гидроксильным (с 2934 до 2937 см^{-1}) группам. Смещение сигнала неполярных метиленовых фрагментов также присутствует. Таким образом, результаты КР-спектроскопии не противоречат результатам ИК-спектроскопии и указывают на то, что во взаимодействии с фицином вступают как полярные, так и неполярные фрагменты молекул графт-сополимера. Стоит отметить, что по данным КР-спектроскопии, более чувствительной к колебаниям неполярных групп, становится заметным вовлечение во взаимодействие азольных колец боковых привитых цепей, что никак не отражалось на результатах ИК-спектроскопии. Более того, в спектре иммобилизованного фицина появляется новая интенсивная полоса при 1598 см^{-1} , отвечающая колебаниям боковых заместителей ароматических аминокислот [24]. Примечательно, что в спектре иммобилизованного фицина не проявилась характеристическая полоса Амид I, по-видимому, она не разрешилась с полосой колебаний имидазольных колец в области 1650 см^{-1} . Таким образом, в результате исследования механизма взаимодействия фицина и графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с *N*-винилимидазолом методом КР-спектроскопии получены более полные представления о функциональных группах графт-сополимера, принимающих участие в процессе конъюгации, однако сделать ценные выводы о вторичной структуре фермента также не представляется возможным.

В связи с тем, что во взаимодействии с графт-сополимером принимают участие аминокислоты активного центра фермента, представляло интерес сравнить активность нативного и конъюгированного фицина. Полная (в $\text{ед}\cdot\text{мл}^{-1}$ раствора) и удельная ($\text{ед}\cdot\text{мг}^{-1}$ белка) активности нативного фермента с концентрацией $2\text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$, определен-

ная по субстрату азоказеину, составила 96.0 ± 2.0 и 48.5 ± 1.6 соответственно. Для конъюгированного препарата фермента, содержащего $30.0 \pm 1.8\text{ мг}$ фермента на один грамм носителя, эти значения равны 157.0 ± 3.3 и 103.0 ± 2.2 соответственно. Из полученных данных видно, что взаимодействие полимера с фицином приводит к увеличению протеолитической активности фермента, что, по-видимому, обусловлено модуляцией активного центра фермента.

ВЫВОДЫ

Таким образом, был исследован механизм взаимодействия цистеиновой протеазы фицина с графт-сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола методами гибкого молекулярного докинга, ИК- и КР-спектроскопии. Идентифицированы функциональные группы графт-сополимера и аминокислотные остатки фермента, вступающие во взаимодействие, и показано, что КР-спектроскопия дает более полное представление о взаимодействии компонентов изучаемой системы по сравнению с ИК-спектроскопией сухих мелкодисперсных образцов. Выявлено, что конъюгированный фицин обладает более высокой протеолитической активностью, что, по-видимому, обусловлено модуляцией активного центра фермента, индуцированной слабыми физическими взаимодействиями аминокислотных остатков активного центра белковой молекулы с фрагментами графт-сополимера.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данные ИК- и КР-спектроскопии получены с использованием оборудования Распределенного коллективного спектро-аналитического Центра изучения строения, состава и свойств веществ и материалов ФИЦ КазНЦ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-74-20053 (молекулярный докинг — М.С. Кондратьев, иммобилизация и характеристика ферментного препарата — С.С. Гончарова, концептуализация работы — М.Г. Холявка и В.Г. Артюхов, подготовка и оформление рукописи — М.С. Лавлинская), Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук, грант МК-2517.2022.1.3 (синтез графт-сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола — А.В. Сорокин), Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания Казанского научного

центра РАН (регистрация и анализ ИК- и КР-спектров — Д.А. Файзуллин, обсуждение результатов — Ю.Ф. Зувев).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Tu, X. Zheng, P. Liu, et al., *Sci. Total Environ.*, **763**, 142959 (2021).
2. O. Vavra, J. Damborsky, and D. Bendar, *Biotechnol. Adv.*, **60**, 108009 (2022).
3. R. Vogel and F. Siebert, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 518 (2000).
4. H. Li, R. Lantz, and D. Du, *Molecules*, **24**, 186. (2019).
5. Yu. Ozaki, M. Baranska, I. K. Lednev, et al., *Vibrational Spectroscopy in Protein Research. From Purified Proteins to Aggregates and Assemblies* (Academic Press, London, San Diego, Cambridge, Oxford, 2020).
6. S.E. Glassford, L. Govada, N.E. Chayen, et al., *Vib. Spectrosc.*, **63**, 492 (2012).
7. S. G. Kazarian and K. L. Andrew Chan, *Analyst.*, **138**, 1940 (2013).
8. S. E. Glassford, B. Byrne, and S. G. Kazarian, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1834**, 2849 (2013).
9. I. Haris and F. Severcan, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **7**, 207 (1999).
10. A. Barth and Ch. Zscherp, *Q. Rev. Biophys.*, **35**, 369 (2002).
11. D. Ami, F. Lavatelli, P. Rognoni, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 29096 (2016).
12. M. Holyavka, D. Faizullin, V. Koroleva, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **180**, 161 (2021).
13. C. Qu, Yu. Li, Sh. Du, et al., *Food Res. Int.*, **161**, 111805 (2022).
14. Z. Wen, *J. Pharm. Sci.*, **96**, 2861 (2007).
15. A. C. Hernández-Arteaga, H. J. Ojeda-Galván, M. C. Rodríguez-Aranda, et al., *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **264**, 120269 (2022).
16. A. Kheroufi, M. E. Brassesco, D. A. Campos, et al., *Food Biosci.*, **47**, 101707 (2022).
17. R. Morellon-Sterling, H. El-Siar, O. L. Tavano, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **162**, 394 (2020).
18. V. A. Kuznetsov, A. V. Sorokin, M. S. Lavlinskaya, et al., *Polym. Bull.*, **76**, 4929 (2019).
19. A. V. Sorokin, S. S. Olshannikova, M. S. Lavlinskaya, et al., *Polymers*, **14**, 2279 (2022).
20. S. S. Olshannikova, N. V. Malykhina, M. S. Lavlinskaya, et al., *Polymers*, **14**, 3223 (2022).
21. A. Sorokin, P. Sukhanov, V. Popov, et al., *Cellulose*, **29**, 159 (2022).
22. H. A. Ambjörnsson, K. Schenzel, and U. Germgård, *BioRes.*, **8**, 1918 (2013).
23. L. M. Markham, L. C. Mayne, B. S. Hudson, et al., *J. Phys. Chem.*, **97**, 10319 (1993).
24. H. Takeuchi, *Anal. Sci.*, **27**, 1077 (2011).

Study on the Interaction Mechanism between Ficin and a Graft Copolymer of Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt and *N*-Vinylimidazole Using Molecular Docking, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and Raman Spectroscopy

A.V. Sorokin^{*, **}, S.S. Goncharova^{*}, M.S. Lavlinskaya^{*, **}, M.G. Holyavka^{*, ***}, Yu.F. Zuev^{****}, D.A. Faizullin^{****}, M.S. Kondatyev^{*, *****}, and V.G. Artyukhov^{*}

^{*}Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

^{**}Voronezh State University of Engineering Technologies, prosp. Revolutsii 19, Voronezh, 394036 Russia

^{***}Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

^{****}Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

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

Flexible molecular docking, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy were used to investigate the interaction mechanism between ficin and a graft copolymer of carboxymethyl cellulose sodium salt and *N*-vinylimidazole. Functional groups and fragments of the graft copolymer as well as amino acid residues that form primary structure of enzyme and participate in interactions between ficin and a graft copolymer are identified. It is shown that Raman spectroscopy yields more complete information about graft copolymer fragments interacting with the protein than that FTIR can provide. It is found that the amino acid residues that form the active site of ficin are involved in the formation of hydrogen bonds and hydrophobic interactions with the graft copolymer leading to an increase in the proteolytic activity of the conjugated enzyme.

Keywords: ficin, graft copolymers, FTIR, Raman spectroscopy, interaction mechanism

СТАБИЛЬНОСТЬ КОЛЛАГЕНОВОГО ГЕЛЯ ПОСЛЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ

© 2023 г. Ю.А. Нашекина*, **, #, Н.А. Трусова*, П.О. Никонов*,
А.В. Нашекин**, Н.А. Михайлова*

*Институт цитологии РАН, Тихорецкий просп., 4, Санкт-Петербург, 194064, Россия

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

#E-mail: nashchekina.yu@mail.ru

Поступила в редакцию 12.08.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Коллаген I типа является наиболее распространенным белком внеклеточного матрикса в организме человека, обеспечивающим основу структуры тканей и регулирует клеточные функции. В процессе жизнедеятельности компоненты внеклеточного матрикса, в частности коллаген, подвергаются ультрафиолетовому облучению. Целью данной работы было изучение влияния ультрафиолетового облучения на стабильность и структуру коллагеновых фибрилл. Было показано, что ультрафиолетовое облучение оказывает стабилизирующее действие на коллагеновый гель с концентрацией 0.5 мг/мл. При анализе диаметров коллагеновых фибрилл после УФ облучения методом сканирующей электронной микроскопии изменение размеров не выявлено. Степень распластанности клеток, культивируемых на коллагеновых фибриллах после ультрафиолетового облучения, больше по сравнению с площадью клеток, культивируемых на коллагеновых фибриллах без обработки. Методом ИК-Фурье-спектроскопии также показано, что ультрафиолетовое облучение вызывает смещение полосы амида коллагена A в более низкочастотную область, что свидетельствует об изменении структурного порядка коллагена.

Ключевые слова: коллаген I типа, УФ-облучение, ИК-Фурье-спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302923020060, EDN: CALMAF

Коллаген — это один из самых распространенных белков в организме и основной белок внеклеточного матрикса. Он является структурным компонентом кожи, костей и хрящевой ткани и составляет почти 33% белков организма человека [1]. Молекула коллагена представляет собой тройную спираль — три полипептидные α -цепи, образующие конформацию суперспирали [2]. Последовательность аминокислотных остатков в молекуле коллагена четко определена: глицин — каждый третий остаток в повторяющейся последовательности; Gly—X—Y, где на месте X и Y, как правило, находятся аминокислоты пролин и гидроксипролин. Молекулярная структура коллагена стабилизирована внутри- и межцепочечными водородными связями между NH-группой глицина и карбонильной группой C=O остатков другой полипептидной цепи. В организме человека

молекулы коллагена собираются в тройные спирали фибрилл [3, 4]. Они подвергаются воздействию внешних факторов, таких, например, как ультрафиолетовое (УФ) излучение [5]. Такие факторы могут вызывать различные физические, химические и физико-химические «ответы» в живых организмах на разных молекулярных уровнях. УФ-излучение отвечает за загар кожи, но при этом считается основным причинным фактором старения кожи и многих видов рака кожи [5].

Благодаря нитевидной форме и таким ассоциативным характеристикам, как гидрофильность, биосовместимость и хорошие кровоостанавливающие свойства, коллаген широко используется в качестве биоматериала для формирования носителей для культивирования и трансплантации клеток [6].

Коллагеновые носители часто «сшивают» различными методами для обеспечения необходимой структурной стабильности и механической

Сокращения: УФ — ультрафиолетовый, РЭМ — растровая электронная микроскопия.

прочности для решения задач регенеративной медицины [7, 8]. Для этой цели используют химические [9, 10] или физические [11, 12] методы. Все химические методы воздействуют на химическую структуру коллагеновых волокон [13]. Химические сшивающие агенты обычно взаимодействуют со свободными первичными аминогруппами (на остатках лизина) и карбоксилатными анионами (на остатках глутамата или аспартата). Многие из этих же боковых цепей аминокислот представляют собой основные участки связывания клеток на коллагеновых материалах, поэтому химические сшивающие агенты могут влиять на биологическую активность клеток [14]. В отличие от химических сшивающих агентов УФ-облучение стимулирует образование связей между остатками ароматических аминокислот, таких как тирозин и фенилаланин [15]. Следовательно, УФ-облучение обеспечивает прочное соединение внутри полипептидных цепей без использования кислотных и основных боковых цепей, которые важны для взаимодействия клеток с коллагеновыми носителями.

Достоинствами УФ-облучения являются простота в применении и отсутствие токсического эффекта, свойственного большинству сшивающих агентов. В процессе УФ-облучения коллагена конкурируют два процесса — сшивание и УФ-индуцированная денатурация белка. Именно баланс этих двух процессов влияет на свойства получаемых коллагеновых носителей [16]. Во многих исследованиях изучалось влияние УФ-излучения на свойства молекулярного коллагена. Было показано, что раствор коллагена после облучения теряет способность образовывать естественные фибриллы. Однако коллаген находится в организме в фибриллярной форме, поэтому для восстановления различных повреждений органов и тканей также используется фибриллярный коллаген. К сожалению, до настоящего времени опубликовано очень мало данных о влиянии УФ-излучения на стабильность коллагена, в связи с чем, целью данной работы является изучение влияния УФ-излучения на структуру, стабильность и биологические свойства коллагенового геля, используемого для культивирования клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коллаген I типа выделяли из сухожилий хвоста крысы методом кислотной экстракции [17]. Для перевода коллагена из раствора в гель значения ионной силы и pH доводили до физиологических условий добавлением десятикратной среды 199 (Gibco, США) и NaOH (ООО «Реактив», Россия) соответственно. Коллагеновый гель с концентрациями 0.5, 1.0, 2.0 и 3.0 мг/мл готовили на льду [6].

УФ-облучение коллагена проводили спектральной полосой в диапазоне длин волн 254–290 нм в течение 30, 60 и 120 мин.

Степень деградации коллагенового геля оценивали через 1 и 7 сут инкубирования в физиологических условиях в фосфатном буфере по количеству растворившегося и выделившегося из геля коллагена [18].

Структуру коллагеновых фибрилл до и после УФ-облучения оценивали с помощью растрового электронного микроскопа (РЭМ) JSM-7001F (Jeol, Япония), а также с помощью ИК-Фурье-спектрометра IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония) в режиме пропускания, в диапазоне $4000\text{--}600\text{ см}^{-1}$ со спектральным разрешением 2 см^{-1} .

Для обеспечения стока заряда при РЭМ-исследованиях образцы напыляли слоем золота в 30 нм с помощью магнетронного напыления.

Биосовместимость *in vitro* исследовали на клеточной линии FetMSCs (получена из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН, при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение №075-15-2021-683)). Клетки культивировали на полистирольных чашках в среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США), 1% пенициллина/стрептомицина (Sigma-Aldrich, Германия) при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 в воздухе. Подробное описание методики флуоресцентного окрашивания клеток описано в нашей ранее опубликованной работе [19]. Окрашивание проводили следующим образом: адгезировавшие клетки промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали 4%-м раствором формальдегида (Sigma-Aldrich, США), затем к клеткам добавляли раствор детергента. Родамин фаллоидин (Thermo Fisher Scientific, США) использовали для окрашивания актина. Организацию актинового цитоскелета анализировали с использованием конфокального микроскопа FV3000 (Olympus Corporation, Япония).

Результаты, полученные для пяти повторных экспериментов, обрабатывали в программе Microsoft Excel 2007, определяя среднее значение отклонения и стандартную ошибку среднего SE . Для сравнения результатов использовали t -критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность коллагенового геля *in vitro* и *in vivo* является важным параметром для успешной регенерации тканей и органов. Стабилизация коллагеновых гелей является одним из важных этапов в создании биосовместимых коллагеновых носителей.

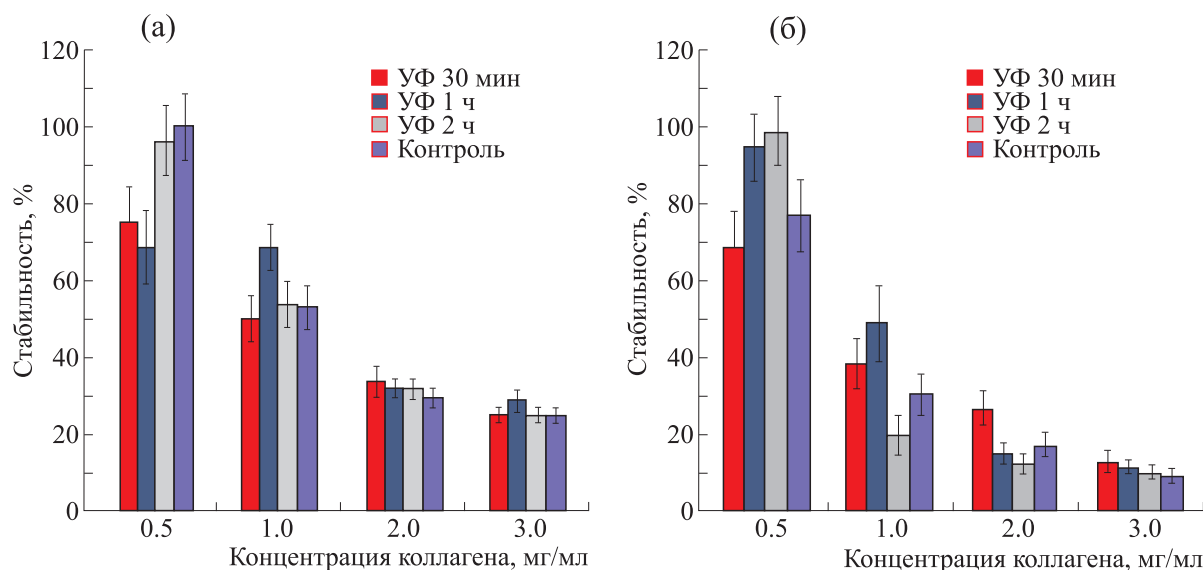


Рис. 1. Стабильность коллагенового геля при инкубировании в физиологических условиях (фосфатный буфер, pH 7.2, температура 37°C): (а) – после суточного инкубирования, (б) – после недельного инкубирования.

На рис. 1 представлены результаты исследования. Чем больше концентрация коллагенового геля, тем он более стабилен. Также можно видеть, что УФ-облучение оказывает различное воздействие на гели с разной концентрацией коллагена (рис. 1а). Для коллагеновых гелей с самой низкой концентрацией белка (0.5 мг/мл) УФ-облучение оказывает стабилизирующий эффект после суточного инкубирования (рис. 1а). После недельного инкубирования такой эффект не наблюдался (рис. 1б). Длительное воздействие УФ-облучения (в течение 2 ч) оказывает не стабилизирующее, а разрушающее действие. Сшивание или деградацию гелей с более высокими концентрациями белка (2–3 мг/мл) после УФ-облучения не наблюдали.

Структура фибрилл имеет определенную периодичность светлых и темных колец. Такое структурирование обусловлено особенностями молекулярного строения коллагена. Пять молекул коллагена выровнены параллельно друг другу с шагом около 67 нм [20]. Это продольное или осевое смещение представляет собой характерную D-периодичность исчерченности фибрилл, которая представляет собой сумму областей разрыва и перекрытия между молекулами коллагена. При анализе результатов РЭМ (рис. 2) мы можем наблюдать светлые и темные области промежутков, которые связаны с молекулярной структурой коллагеновых фибрилл.

Данные РЭМ демонстрируют отсутствие каких-либо изменений в морфологии коллагеновых фибрилл в течение всего периода облучения (30–120 мин) (рис. 2). Диаметр коллагеновых фибрилл

и их D-периодичность также не изменяются. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными атомно-силовой микроскопии о влиянии УФ-облучения на структуру коллагеновых фибрилл [20]. Авторы не обнаружили изменений в структуре и морфологии поверхности пленок на основе фибриллярного коллагена после обработки УФ-облучением.

ИК-спектры коллагеновых фибрилл демонстрируют отчетливые сигналы для амида А при $3330\text{--}3325\text{ см}^{-1}$ и амида В при 3080 см^{-1} . На рис. 3 представлены ИК-спектры коллагеновых фибрилл до и после УФ-обработки в течение разных периодов времени. Согласно полученным результатам, интенсивность сигнала необработанных коллагеновых фибрилл выше почти во всей спектральной области, чем у обработанных коллагеновых фибрилл (рис. 3).

Сигнал при 3330 см^{-1} представляет собой амид А со сложным контуром. Восемь компонентов этой полосы были определены путем разложения пика на составляющие в области $3600\text{--}2800\text{ см}^{-1}$. Амидная полоса коллагена А связана с NH-растяжением [18]. Частота амидных полос зависит от конформации коллагена; чем меньше структурный порядок белка, тем ниже частота этих амидных полос [18]. Когда структурный порядок белка уменьшается, частота амидных полос также уменьшается. УФ-облучение вызывает сдвиг полосы А амида коллагена на более низкую частоту, что свидетельствует об изменении структурного порядка коллагена.

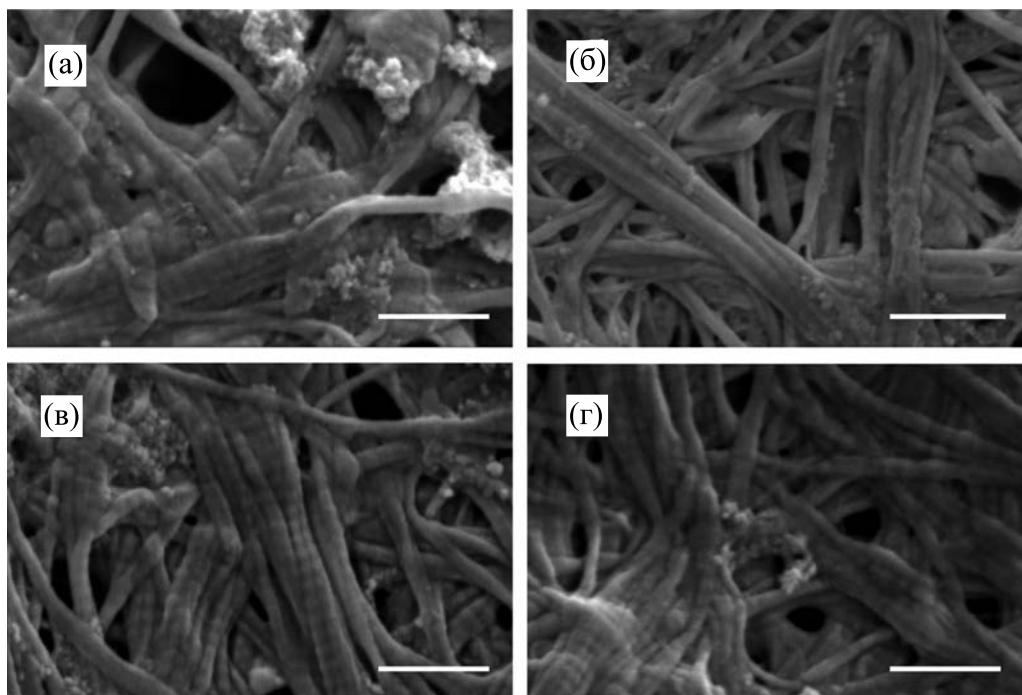


Рис. 2. РЭМ-изображения коллагеновых фибрилл после УФ-облучения: (а) — коллагеновые фибриллы до обработки; (б) — коллагеновые фибриллы после УФ-облучения в течение 30 мин; (в) — после УФ-облучения в течение 60 мин; (г) — после УФ-облучения в течение 120 мин. Шкала 500 нм.

Измененные структурные характеристики коллагенового геля после УФ-облучения могут влиять на поведение клеток, культивируемых на таких субстратах. В результате проведенных экспериментов было обнаружено достоверных отличий в количестве адгезировавших клеток на коллагеновых фибриллах до и после УФ-облуче-

ния. Однако можно отметить, что степень распластывания клеток на коллагеновых фибриллах после обработки УФ-облучением (30 и 60 мин) увеличивается по сравнению с клетками на интактных коллагеновых фибриллах. Такой эффект может быть обусловлен сшиванием коллагеновых фибрилл под действием УФ-облучения, что при-

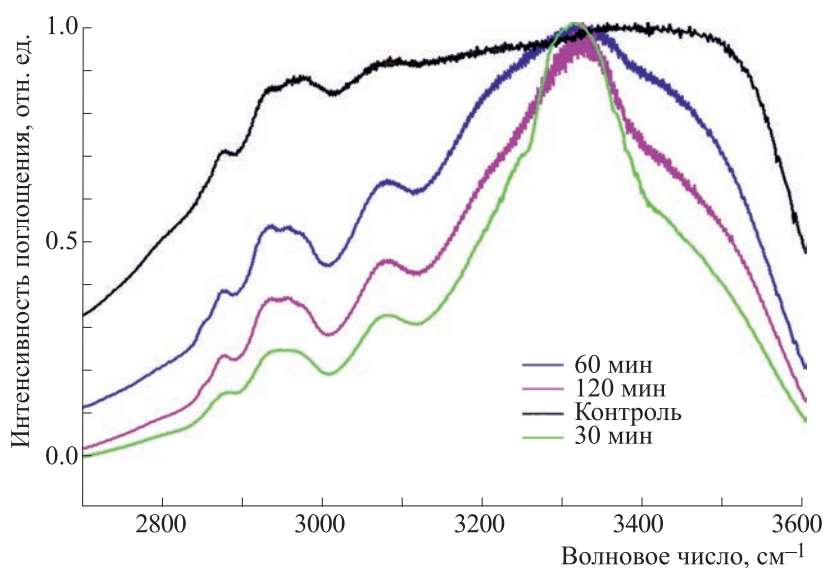


Рис. 3. Нормированные ИК-Фурье-спектры коллагеновых фибрилл после УФ-облучения в течение 30, 60 и 120 мин.

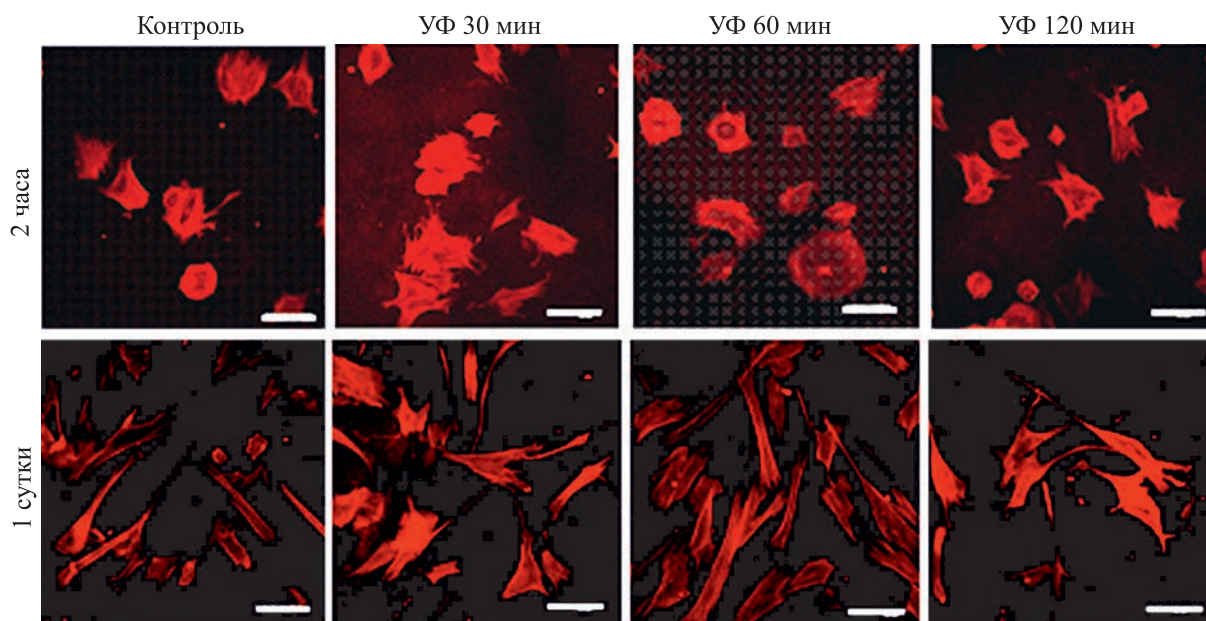


Рис. 4. Флуоресцентные микрофотографии FetMSC с актиновыми филаментами, окрашенными после двухчасового и суточного культивирования на коллагеновых фибриллах до (контроль) и после УФ-облучения. Шкала 50 мкм.

водит к увеличению жесткости поверхности и, следовательно, к увеличению степени распластанности клеток, культивируемых на таких поверхностях. Однако при дальнейшем увеличении времени УФ-облучения (120 мин) степень распластывания клеток снова снижается. При более длительном культивировании клеток (в течение суток) на коллагеновых фибриллах до и после УФ-обработки зависимость повторялась. Наиболее распластанные клетки наблюдали на коллагеновых фибриллах, обработанных УФ-облучением в течение 30 и 60 мин, а также после 2 ч культивирования.

Результаты, представленные в этом исследовании, показали, что УФ-облучение индуцирует сшивание коллагеновых фибрилл, но не изменяет их диаметр. Степень распластности клеток на обработанных УФ-облучением коллагеновых фибриллах выше, чем на необработанных коллагеновых фибриллах. Таким образом, УФ-облучение при коротком времени экспозиции (до 120 мин) может быть использовано для сшивания и стабилизации фибриллярных структур коллагена.

БЛАГОДАРНОСТИ

Спектральные и электронно-микроскопические исследования проводили с использованием оборудования Федерального ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-03-00400а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Bailey and R. Paul, *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **82**, 104 (1998).
2. S. Ricard, *Perspect. Biol.*, **1**, 3 (2011).
3. S. Ricard-Blum, *Perspect. Biol.*, **3**, 1 (2011).
4. Yu. A. Nashchekina, A. A. Starostina, N. A. Trusova, et al., *J. Physics: Conf. Series*, **1697**, 012053 (2020).
5. A. Amaro-Ortiz, B. Yan, and J. A. D'Orazio, *Molecules*, **19**, 6202 (2014).
6. Yu. A. Nashchekina, N. M. Yudintceva, P. O. Nikonov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **163**, 123 (2017).
7. M. G. Haugh, C. M. Murphy, R. C. McKiernan, et al., *Tissue. Eng. Part A*, **17**, 1201 (2011).
8. Y. Hu, L. Liu, W. Dan, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **55**, 221 (2013).
9. S. J. Hollister and R. D. T. Maddox, *J. Biomater.*, **23**, 4095 (2002).
10. J. S. Pieper, T. Hafmans, J. H. Veerkamp, et al. *Biomaterials*, **21**, 581 (2000).
11. M. G. Haugh., PhD Thesis (Trinity Colledge, Dublin University, Ireland, 2008).
12. D.-H. Lew, P. H.-T. Liu, and D. P. Orgill, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **82**, 51 (2007).
13. L. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. van Luyn, et al., *Biomaterials*, **17**, 765 (1996).
14. N. Davidenko, D. V. Bax, C. F. Schuster, et al., *Mater. Sci.: Mater. Med.*, **27**, 14 (2016).
15. N. Metreveli, L. Namicheishvili, K. Jariashvili, et al., *Int. J. Photoenergy*, **76830**, 1 (2006).

16. M. P. Ohan, K. S. Weadock, and M. G. Dunn, J. Biomed. Mater. Res., **60**, 384 (2002).
17. G. Chandrakasan, D. A. Torchia, K. A. Piez, J. Biol. Chem., **251**, 6062 (1976).
18. O. H. Lowry, N. J. Rosbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, J. Biol. Chem., **193**, 265. (1951).
19. Y. Nashchekina, A. Chabina, A. Nashchekin, et al., Polymers, **12**, 1042 (2020).
20. A. Sionkowska, J. Photoch. Photobiol. B: Biology, **82**, 9 (2006).
21. A. Kaminska and A. Sionkowska, Pol. Degr. Stability, **51**, 19 (1996).

Stability of Collagen Gel after UV Irradiation

Yu.A. Nashchekina*, **, N.A. Trusova*, P.O. Nikonov*, A.V. Nashchekin, and N.A. Mikhailova***

**Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

***Ioffe Institute, Russian Academy of Sciences, Polytekhnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia*

Type I collagen is the most abundant extracellular matrix protein in the human body, as well as is the main structural element in tissues and regulates cellular functions. In lifetime, the organism and extracellular matrix components such as collagen are exposed to UV irradiation. The purpose of this work was to study the effect of UV irradiation on the stability and structure of collagen fibrils. It has been shown that UV irradiation has a stabilization effect on collagen gel at a concentration of 0.5 mg/ml. Scanning electron microscope images have shown that the diameter of the collagen fibrils is not changed after UV irradiation. The degree of spreading of cells cultured on collagen fibrils after UV irradiation is greater compared to those cultured on collagen fibrils unirradiated with UV light. UV irradiation promotes a shift of the collagen amide A band to lower frequency, indicating that it induces structural changes in collagen.

Keywords: type I collagen, UV irradiation, FTIR spectroscopy, scanning electron microscopy

ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СИГНАЛА ПОКРЫТИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2023 г. И.В. Бездворных*, Н.А. Черкасов*, А.А. Канапин*, А.А. Самсонова*.*

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

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

Поступила в редакцию 22.11.2022 г.

После доработки 22.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Данные полногеномного секвенирования позволяют не только получать информацию о генетических вариантах, но также оценивать общую стабильность генома. Сигнал покрытия секвенирования, понимаемый как количество выравненных фрагментов в данной точке генома может быть использован в качестве ценного источника данных как о местонахождении структурных перестроек, об общем состоянии генома и о точности предсказания структурного варианта вычислительным алгоритмом. Последнее особенно важно, т.к. методы поиска перестроек в геноме часто дают очень противоречивую информацию о их нахождении. Однако до недавнего времени валидация предсказанных вариантов была затруднена, во многом из-за отсутствия информационных ресурсов, позволяющих напрямую работать с сигналами покрытия и визуализировать их с высокой степенью детализации. В работе представлен SCOPE (Sequence COverage ProfilEs) – прототип ресурса такого рода, включающий в себя базу данных, веб-интерфейс и набор программ для обработки данных секвенирования, извлечения и хранения профилей сигнала покрытия. Вычислительная платформа и интерфейс реализованы в программном коде открытого доступа и могут быть развернуты на локальном узле, что дает возможность пользователям проводить обработку и анализ собственных данных.

Ключевые слова: полногеномное секвенирование, база данных, визуализация, сигнал покрытия.

DOI: 10.31857/S0006302923020072, EDN: CAPGJL

Данные полногеномного секвенирования – незаменимый источник информации не только о генетических вариациях, но и о состоянии генома в целом. Сигнал покрытия секвенирования, представляет собой последовательность величин, соответствующих числу фрагментов секвенирования, выравненных на данную позицию референсного генома. Анализ сигнала покрытия широко используется для обнаружения структурных вариантов, особенно вариантов копийности, поскольку данная величина не зависит от протоколов и способов секвенирования, а также от длины фрагментов секвенирования и их типа (см., например, работу [1]). Однако до сих пор не существует надежного решения задачи поиска структурных вариантов в данных секвенирования [2–4]. Геномные координаты структурных вариантов, полученные с помощью различных алгоритмов, плохо согласуются друг с другом, поэтому дополнительно приходится применять так называемые meta-callers т.е. программы позволяющие получить консенсусное предсказание на основе

результатов работы нескольких программ [5]. Все это существенно затрудняет разработку диагностических тестов на основе анализа структурных вариантов.

Одним из факторов, затрудняющих создание новых методов поиска структурных вариантов, является отсутствие открытых ресурсов, содержащих в достаточном объеме информацию о форме и характере сигнала покрытия, соответствующего тем или иным структурным вариациям. В данной работе мы представляем SCOPE (Sequence COverage ProfilEs) – базу данных и программный интерфейс к ней, позволяющие хранить, анализировать и визуализировать сигнал покрытия, полученный из данных полногеномного секвенирования. База данных реализована в формате SQLite и может быть развернута на пользовательском компьютере вместе с интерфейсом. Также мы разработали набор программных средств для обработки данных секвенирования и подготовки их к загрузке в базу данных.

ИСТОЧНИКИ ДАННЫХ

В качестве демонстрационных данных для базы были использованы два набора данных секвенирования:

1. Один из эталонных образцов консорциума GIAB (genome-in-a-bottle) [6, 7], а именно HG002 [8] и соответствующие ему структурные варианты.

2. Три генома детей из семей YRI, CHS и PUR, опубликованных в работе [9]

Выбор данных образцов обусловлен следующими факторами. В течение последнего десятилетия консорциумом GIAB создается и поддерживается эталонная коллекция геномов человека. Образцы ДНК секвенируются с использованием различных протоколов, после чего в данных секвенирования осуществляется поиск генетических вариаций: однонуклеотидных замен и структурных вариантов. Образцы консорциума представляют собой *de facto* стандарт данных секвенирования и используются для сравнения производительности методов поиска вариантов, а также для оценки их точности. Образец HG002 примечателен тем, что для него впервые была проведена масштабная проверка точности предсказания структурных вариантов с помощью кураторов [10]. Анализ трех геномов, опубликованных в работе [9] и составляющих вторую часть данных, проводился с помощью протоколов секвенирования длинными и короткими фрагментами, что позволяет обеспечить приемлемую точность предсказания структурных вариантов, за счет сравнения и интеграции результатов, полученных при помощи разных протоколов секвенирования. Более того, так как в работе был проведен анализ геномов семейных трио, в отличие от большинства геномных исследований, генотип детей не был предсказан при помощи вычислительных процедур, а определен точно на основании данных родителей.

Нами были использованы файлы выравнивания в формате BAM, и информация о структурных вариантах в формате VCF, опубликованные авторами данных исследований. Данные находятся в открытом доступе и могут свободно использоваться и распространяться.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ СИГНАЛА ПОКРЫТИЯ И КООРДИНАТ ТОЧЕК РАЗРЫВА

Для хранения в базе данных и последующей визуализации были использованы профили сигнала покрытия в окрестности ± 256 нуклеотидов от точки разрыва, соответствующей тому или иному структурному варианту. Сигнал покрытия хранится в специальном двоичном формате BCOV [11]. Программный код предусматривает адаптацию ресурса под задачи пользователя за

счет манипуляции параметрами генерации файлов базы данных и построения графического интерфейса.

Более того, путем подбора и установки соответствующих параметров можно создать базу данных сигналов покрытия для произвольных типов профилей сигнала (т.е., например, не только для структурных вариаций, но и для локусов однонуклеотидных замен) и в интервалах произвольной длины. Информация о геномных координатах точки разрыва извлекается из VCF-файлов, тип структурного варианта и его длина определяются по флагам SVTYPE и SVLEN соответственно при помощи программы `import_vcf.py` (см. репозиторий проекта на Github: <https://github.com/comp-bio/scope>).

При анализе профиля сигнала покрытия с целью обнаружения структурного варианта желательно его «обособить» для упрощения задачи поиска точки. Иначе говоря, необходимо избегать ситуаций, когда в окно поиска попадает несколько кандидатов или так называемых «сложных» событий, когда они наслаиваются друг на друга в результате процесса хромотрипсиса [12, 13]. Как следствие, для визуализации мы отбираем в базу данных только те точки разрыва, для которых в указанную окрестность (256 п.о.) не попадают никакие другие варианты. Если размер структурной вариации слишком мал (т.е. меньше, чем 30 нуклеотидов), то она по умолчанию будет пропущена. Последнее решение мотивируется тем, что программы для поиска коротких структурных вариантов основываются на алгоритмах нахождения однонуклеотидных замен и основаны на других принципах нежели методы поиска длинных событий. Однако вполне возможно, что сигналы, возникающие в результате коротких перестроек, могут представлять научный интерес, поэтому импортировать сигналы коротких структурных вариаций можно, указав в параметре программы «special» их минимальный размер. В результате указанные геномные перестройки будут добавлены в базу данных с маркером «spSV» (специального типа). Предусмотрено четыре типа маркеров, связанных с типом точки разрыва: «L» и «R» — соответственно для левой и правой границ варианта, «BP» — присваивается для так называемых перестроек «нулевой длины». Перестройки «нулевой длины» — это сбалансированные перестройки, такие как, например, инсерции, инверсии и транслокации, где технически обе точки разрыва попадают в одну координату в референсном геноме. Тип «SpSV» соответствует вариантам, длина которых меньше, чем ширина региона, используемого для извлечения сигнала покрытия (512 п.о. по умолчанию). Разметка хромосом доступна для обеих версий человеческого генома (GRCh38 и GRCh37).

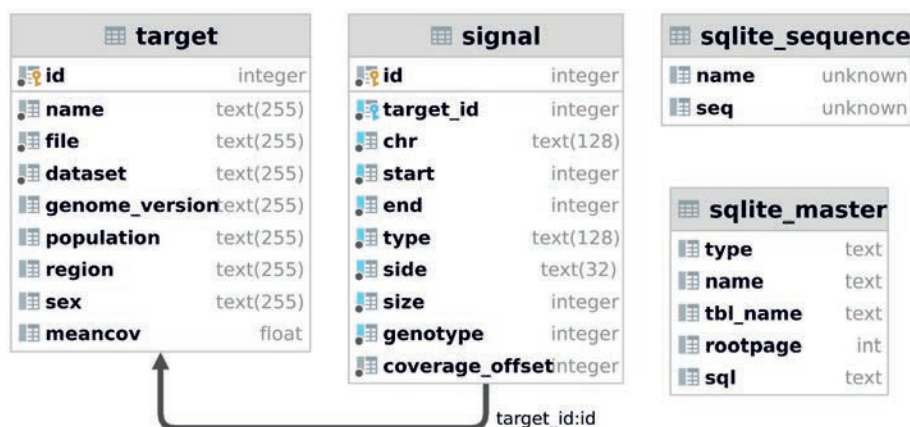


Рис. 1. Схема базы данных профилей сигнала покрытия SCOPE.

Сигнал покрытия извлекается из файлов выравнивания в формате BAM или CRAM с помощью программы *mosdepth* [14], определяющей численные значения покрытия для каждого основания в геноме. В базе данных профили сигнала секвенирования сохраняются в формате BCOV, специально разработанном для быстрого доступа к значениям покрытия в любой точке. Идея формата максимально проста: для каждой позиции в хромосоме отводится ровно два байта. Это свойство позволяет получить доступ к любой части генома, используя побайтовый отступ в файле покрытия, равный удвоенной координате искомого покрытия. Такое кодирование не позволяет сохранять глубину прочтения, превышающую 65536 прочтений на одну пару оснований. Таким образом, в случае обнаружения покрытия со значениями, превышающими это число, значения будут принудительно ограничены сверху. Обработка данных покрытия проводится программой *import_coverage.py* (см. репозиторий проекта на Github).

Для функционирования базы данных также необходимы метафайлы, содержащие следующую информацию: гистограммы покрытия для различных групп образцов (например, популяций), статистика количества точек разрыва различных типов и наконец хромосомная карта плотности точек разрыва в геноме. Генерация метафайлов осуществляется программой *overview.py* (см. репозиторий проекта на Github).

СТРУКТУРА И ИНТЕРФЕЙС БАЗЫ ДАННЫХ

SCOPE состоит из трех ключевых частей — инструментов, базы данных и интерфейса, каждая из которых максимально изолирована и независима от прочих. Это фактически означает, что у исследователей есть возможность использовать один интерфейс и подключать его к нескольким

базам данных, расположенным локально или на удаленных серверах и смонтированных через инструменты удаленного доступа (например, SSH). Базы данных и интерфейс поддерживают объединение нескольких наборов данных в одном месте. Схема базы данных приведена на рис. 1.

Готовая к визуализации база данных вместе с файлом сигналов покрытия и метафайлом может распространяться как отдельный набор данных, например:

EXAMPLE/index.db — база данных SQLite;

EXAMPLE/storage.bcov — все сигналы со значениями покрытий в BCOV-формате;

EXAMPLE/overview.json — мета-информация о проекте.

Подключение интерфейса к указанной базе производится через параметр «db» (db:EXAMPLE).

Пользовательская часть интерфейса реализована на JavaScript (React, SASS, Webpack, D3.js), серверная — на Python3 (Flask, event, tslearn). Полностью скомпилированная версия находится прямо в репозитории (раздел build), для ее развертывания на локальном узле требуется установка следующих модулей языка программирования Python, версия3:

```
pip3 install flask tslearn event.
```

Запуск сервера осуществляется командой:

```
python3 server.py db:EXAMPLE_DB.
```

Интерфейс позволяет визуализировать извлеченные профили, осуществлять поиск профилей по их геномным координатам, типу структурных вариантов и точек разрыва, а также по генотипу. Пример графического представления данных показан на рис. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

SCOPE — комплекс программного обеспечения для визуализации сигнала покрытия секве-

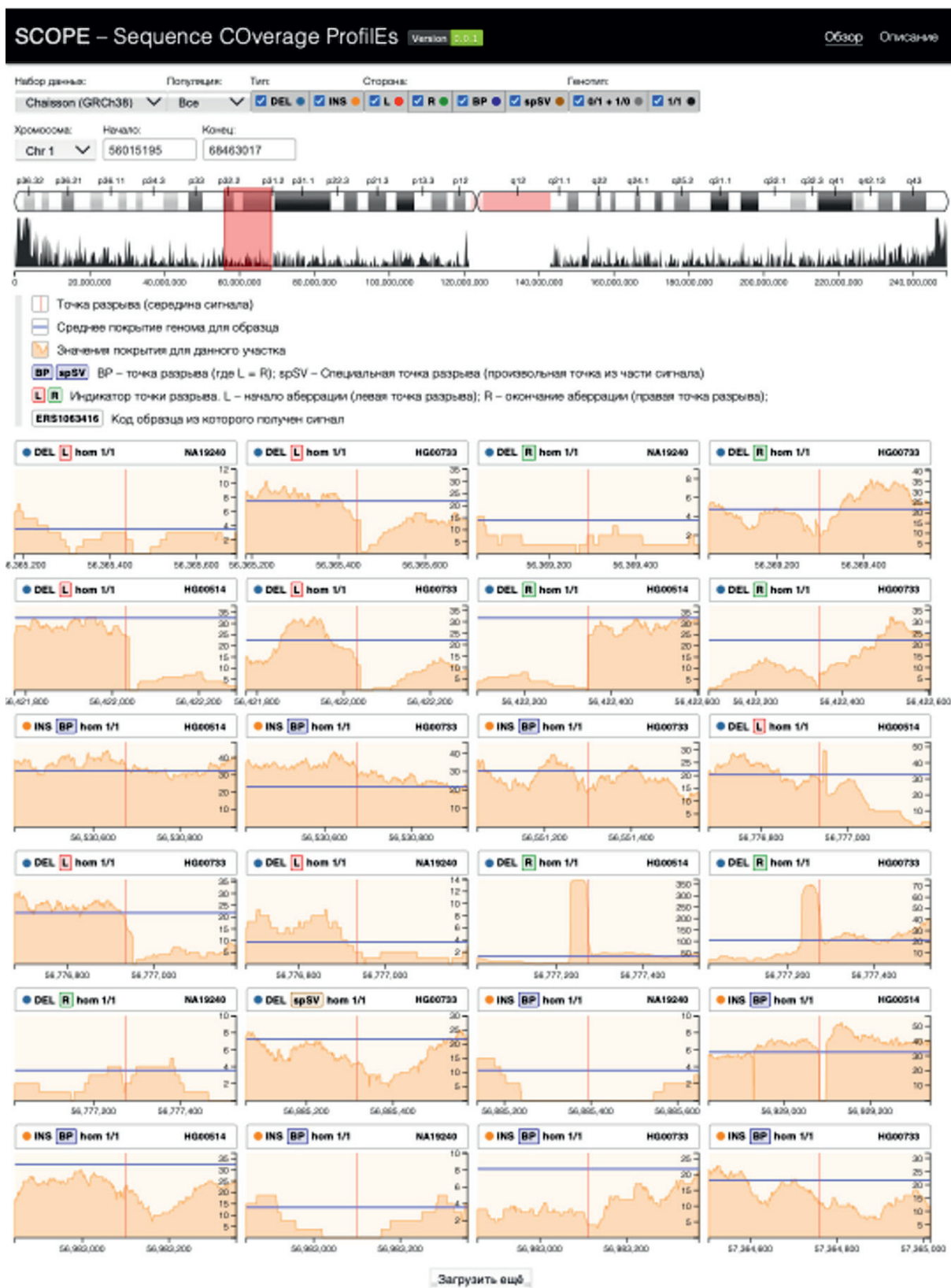


Рис. 2. Графический интерфейс ресурса SCOPE (scope.compbio.ru).

нирования, включающий в себя базу данных, веб-интерфейс и набор программ для обработки данных. Репозиторий открытого кода находится по адресу <https://github.com/comp-bio/scope>.

Доступ к ресурсу с полнофункциональной версией интерфейса SCOPE, включающей визуализацию профилей сигнала, поиск по геномным координатам и фильтрацией по типам точек разрыва осуществляется по адресу: <https://scope.compbio.ru/>.

Созданный ресурс открывает новые возможности для исследования нового типа данных, получаемых при полногеномном секвенировании. Данные такого типа могут быть использованы как для разработки новых методов поиска структурных вариантов, так и для анализа механизмов поддержания стабильности генома.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Abyzov, et al., *Genome Res.*, **21** (6), 974 (2011).
2. S. Kosugi, et al., *Genome Biol.*, **20** (1), 117 (2019).
3. Z. Liu, et al., *Genome Biol.*, **23** (1), 68 (2022).
4. M. Mahmoud, et al., *Genome Biol.*, **20** (1), 1 (2019).
5. A. Kuzniar, J. Maassen, S. Verhoeven, et al., *PeerJ*, **18**, e8214 (2020). DOI: 10.7717/peerj.8214
6. J. M. Zook, et al., *Sci. Data*, **3**, 160025 (2016).
7. J. M. Zook, et al., *Nat. Biotechnol.*, **32** (3), 246 (2014).
8. A. Shumate, et al., *Genome Biol.*, 1 (2020).
9. M. J. P. Chaisson, et al., *Nat. Commun.*, 10 (1), 1 (2019).
10. L. M. Chapman, et al., *PLoS Comput. Biol.* **16** (6), e1007933-20 (2020).
11. I. Bezdovornikh, A. Kanapin, and A. Samsonova, In *Abst. Book of the Thirteenth Int. Multiconf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022)* (2022), p. 762.
12. J. O. Korbelt and P. J. Campbell, *Cell*, **152** (6), 1226 (2013).
13. A. Aguilera and T. García-Muse, *Annu. Rev. Genetics*, **47** (1), 1 (2013).
14. B. S. Pedersen and A. R. Quinlan, *Bioinformatics*, **34** (5), 867 (2018).

A Toolbox for Visualization of Sequencing Coverage Signal

I.V. Bezdovornikh*, N.A. Cherkasov*, A.A. Kanapin*, and A.A. Samsonova*

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

Whole genome sequencing data allow access not only to information about genetic variation, but also provide an opportunity to evaluate the overall genome stability. Sequencing coverage signal considered as the number of fragments aligned to a given region within the genome can be used as a trustworthy source of data both on discovery of genomic rearrangements and the current state of whole genome sequencing as well as on precision of structural variant predictions by computational algorithms. The latter is of utmost importance as conflicting data on gene rearrangement events obtained by tools for finding gene rearrangements often appear. However, until recently, validation of predicted variants may present a significant challenge mainly due to the lack of information sources that may assist researchers with direct work with coverage signals and signal visualization with high precision. The present study proposes Sequence COverage ProfilEs (SCOPE), a prototype toolset that includes databases, web-interface and a series of programs for the processing of sequencing data, visualizing and storing of signal coverage profiles. The computer platform and interface is equipped with open-source software, supports local host deployment and allows users to process and analyze their own sequencing data.

Keywords: whole genome sequencing, database, visualization, coverage signal

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ВАРИАЦИЙ КОПИЙНОСТИ В КОНТЕКСТЕ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА

© 2023 г. М.А. Дук*, А.А. Канапин*, Т.А. Рожмина**, А.А. Самсонова*.,#

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

**Институт льна — обособленное подразделение Федерального научного центра лубяных культур, ул. Луначарского, 35, Торжок, Тверской области, 172002, Россия

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

Поступила в редакцию 28.11.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Классические методы поиска генетических вариантов, ассоциированных с теми или иными фенотипическими признаками, обычно сводятся к анализу однонуклеотидных замен. Вариации копийности и, шире, структурные варианты могут предоставить гораздо больший объем информации в силу масштабности вносимых ими изменений. Однако их использование в анализе полногеномных ассоциаций затруднено недостаточной точностью их локализации в геноме. Тем не менее, в отдельных случаях такой анализ возможен и может дать достоверные результаты. Ранее нами был проведен полногеномный поиск ассоциаций однонуклеотидных замен в геноме льна по отношению к фенотипическим признакам, определяющим качество получаемого волокна. В данной работе мы используем новый набор данных, полученный с большим значением покрытия секвенирования, что позволяет предсказать координаты вариаций копийности с большей точностью. В результате анализа получен список из 41 гена-кандидата, ассоциированных с пятью количественными фенотипическими признаками. Разработанная ранее метрика стабильности генома позволила также классифицировать регионы, содержащие вариации копийности на более и менее стабильные. Результаты анализа позволяют предположить, что менее стабильные, и, как следствие, более пластичные области генома более подвержены изменениям, связанным с изученными фенотипическими признаками.

Ключевые слова: вариации копийности, стабильность генома, *Linum usitatissimum* L., волокно льна, полногеномные ассоциации.

DOI: 10.31857/S0006302923020084, EDN: CARJRB

По мере роста популярности применения методов полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) для нахождения однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), отвечающих за сложные признаки у растений, со временем, стала очевидна их полигенная архитектура [1, 2]. Тем не менее, SNPs не объясняют всю наблюдаемую фенотипическую изменчивость признаков. Этот феномен известен как «недостающая наследственность». Одно из предложенных объяснений его возникновения — вклад дополнительных типов генетических вариантов, таких как вариации числа копий (CNV) [3, 4].

Характеризующиеся как делеции или дупликации фрагментов ДНК размером более 50 пар оснований [5], CNV представляют собой весьма

разнообразный класс мутаций, которые, благодаря своему подчас большому размеру, являются мощными фенотипическими модификаторами, действующими, например, посредством изменения дозы генов, т.е. делетирования и слияния генов. Путем отмены маскировки рецессивных аллелей или за счет повреждения *цис*-регуляторных элементов генов [6]. Геномные данные, полученные у различных видов растений в рамках крупномасштабных проектов секвенирования, указывают на CNV как на один из факторов, обеспечивающих природное разнообразие на геномном уровне [7, 8]. CNV у растений вовлечены в контроль времени цветения, устойчивости к насекомым, РНК-интерференции, ответов на солевой и обезвоживающий стрессы [7].

Лен является важной сельскохозяйственной культурой двойного назначения [9]. Семена масличного льна — ценный источник высококаче-

Сокращения: SNP — однонуклеотидный полиморфизм, CNV — вариации числа копий.

ственных ненасыщенных кислот, лигнинов, легко усваиваемых протеинов, диетической клетчатки, витаминов и минеральных элементов. Лен-долгунец в современных условиях рассматривается как стратегическая культура России, позволяющая заменить хлопок-сырец, который перешел в разряд импортного сырья. Поэтому получение высокопродуктивных сортов льна-долгунца с высоким качеством волокна является одной из актуальных и приоритетных селекционных задач [10].

Элементарное волокно у льна — это отдельная клетка склеренхимы с исключительно толстой клеточной стенкой и экстремальным отношением длины к диаметру (более 1000 раз) [11]. Клетки происходят из апикальной меристемы и развиваются в две стадии: удлинение и утолщение стенки. Вначале удлинение льняных волокон происходит синхронно с соседними клетками, однако через несколько часов начинается интрузивный рост, который приводит к образованию волокон, достигающих нескольких сантиметров в длину. Утолщение клеточной стенки включает отложение нескольких новых слоев внутри первичной клеточной стенки и начинается, когда удлинение прекращается. Первый дополнительный слой (так называемый S-слой) очень тонкий, а последующие слои характеризуются высоким содержанием целлюлозы, осевой ориентацией целлюлозных микрофибрилл, почти полным отсутствием ксилана и лигнина и присутствием рамногалактуронана-I [11–13]. Волокна собираются в пучки, расположенные по периферии стебля, обеспечивая его укрепление [9, 14]. Каждый пучок состоит из 15–50 элементарных волокон, заключенных в гелеобразную матрицу и соединенных между собой.

Техническое качество волокна — это комплексный признак, определяемый генотипом растений, окружающей средой и послеуборочной обработкой. Признаки волокна проявляют значительную степень вариабельности между сортами [9, 10, 14]. Наиболее важными морфологическими признаками, связанными с качеством волокна, являются следующие: техническая длина стебля (от основания стебля до первого цветочного разветвления), количество междоузлий и диаметр стебля. Сорта льна с более длинным техническим стеблем имеют компактные, плотные пучки луба, состоящие из длинных элементарных волокон. Растения с длинными междоузлиями и небольшим количеством листьев имеют более высокое качество волокна, так как пучки волокон разрываются в месте прикрепления листовых пластинок. У растений с более толстыми стеблями пучки волокон редкие и увеличенные, с хорошо развитыми одревесневшими сердцевинами, поэтому они дают грубое и менее гибкое волокно с низким качеством прядения. Цилиндрическая форма стебля указывает на равномерное распре-

деление элементарных волокон по его длине, что обеспечивает однородное созревание волокна и равномерное распределение цвета [14].

Ранее, используя однонуклеотидные полиморфизмы, мы идентифицировали ряд районов генома, контролирующие качество волокна у льна. Однако, у льна также обнаружена значительная структурная вариабельность в форме вариаций числа копий [15]. Мобилизация этого дополнительного источника геномной изменчивости поможет уточнить ранее идентифицированные районы, а также обнаружить новые, не маркированные однонуклеотидными полиморфизмами в изученной выборке сортов. В этой работе, используя вариацию числа копий в качестве маркеров, замещающих однонуклеотидные полиморфизмы, мы применили различные модели полногеномного поиска ассоциаций для идентификации районов, ассоциированных с признаком волокна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы данные полногеномного секвенирования 100 образцов льна из коллекции Федерального научного центра лубяных культур (Институт льна, Торжок Тверской области, Россия). Секвенирование было выполнено с использованием технологии коротких парных прочтений по технологии Illumina Inc.; средняя глубина покрытия в образцах составила около 20×. Поиск вариаций копийности осуществлялся с помощью пакета программ CNVnator [16], версия 0.4.1. Общее число обнаруженных вариантов составило 8275 (7379 делеций и 896 дупликаций).

Полногеномный анализ ассоциаций проводили для следующих фенотипических признаков, связанных с качеством производимого волокна: техническая длина волокна, высота растения, число междоузлий, технический вес растения, расстояние между узлами (детальное описание фенотипов приводится в работе [14]). Количественные фенотипические данные были нормализованы с помощью метода квантильной нормализации. Полногеномный анализ ассоциаций проводили с применением программы GAT3 [17], были использованы следующие статистические модели: GLM, MLM, SUPER, MLM, FarmCPU и Blink. Для анализа использовали вариации копийности со значением MAF (minor allele frequency, частота минорного аллеля), не ниже 0.05, таким образом, общее число вариантов, использованных в анализе, составило 3805. Для определения наиболее значимых вариаций копийности результаты полногеномного поиска ассоциаций были отфильтрованы по критерию FDR (false discovery rate, уровень ложноположительных результатов) составлявшим 0.01.

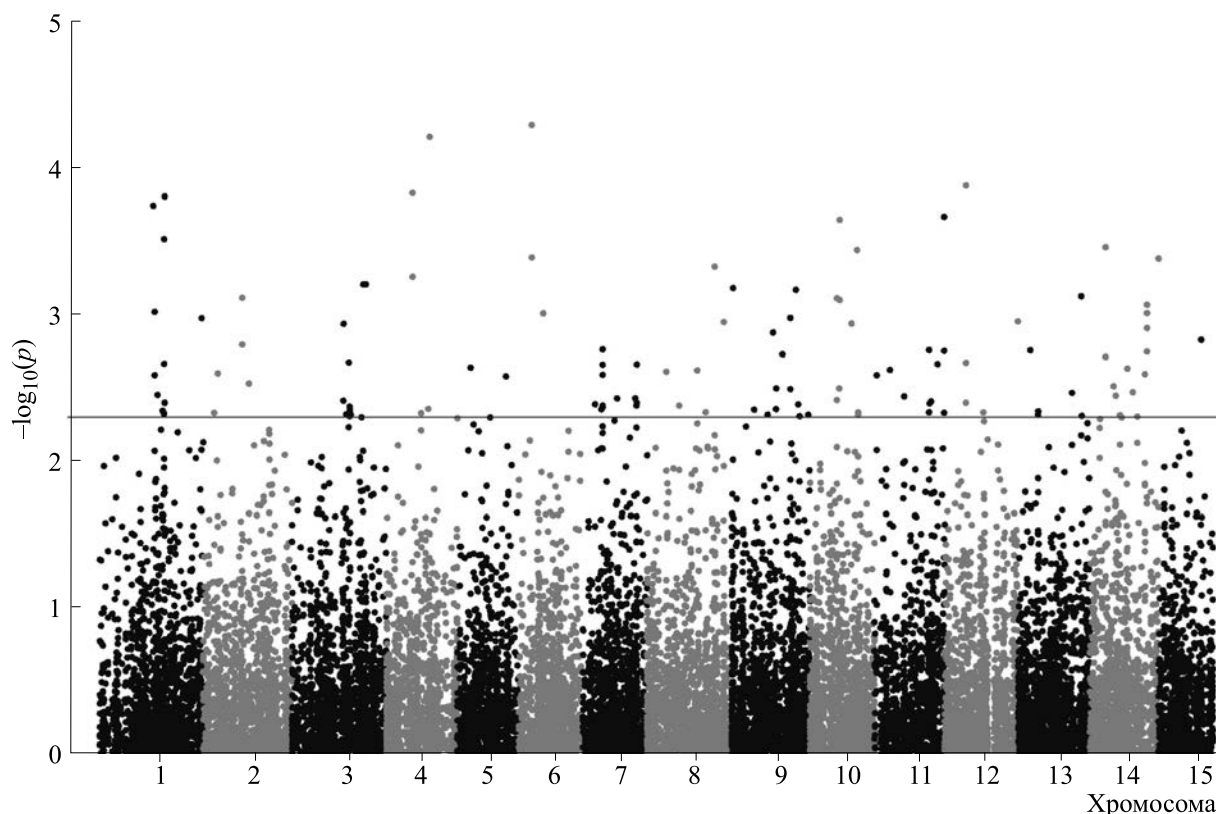


Рис. 1. Диаграмма Manhattan plot вариаций копийности. По оси абсцисс отложены номера хромосом, по оси ординат — значения логарифма P -value. Горизонтальная линия соответствует порогу по P -value в 0.005.

Функциональную аннотацию вариаций копийности, имеющих значимые ассоциации с использованными фенотипическими признаками, проводили путем поиска общих участков с белок-кодирующими генами льна, версия генома 2.0, аннотация из работы [18]

Ранее нами была описана метрика локальной стабильности генома, успешно примененная в анализе грибкового патогена льна *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* [19]. В данной работе мы также использовали этот подход. Метрика стабильности была рассчитана на всех 15 хромосомах льна, размер региона составлял 16384 п.о.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате полногеномного поиска ассоциаций нами было обнаружено 113 вариаций копийности, связанных с хозяйственными признаками, определяющими качество волокна. Результаты представлены в виде диаграммы Manhattan plot на рис. 1. Табл. 1 включает гены, общим числом 41, затронутые геномными регионами, содержащими варианты числа копий.

Следует отметить, что обнаруженные гены не содержатся в списке тех, которые были определены ранее с использованием однонуклеотидных замен [20]. Основной причиной этого является низкая частота встречаемости SNP в данных генах среди 306 образцов, проанализированных в предыдущей работе. Данный факт еще раз указывает на важность разработки альтернативных методов поиска полногеномных ассоциаций, не ограничивающихся только SNP.

Для всех участков генома, содержащих варианты числа копий, ассоциированные с признаками, определяющими качество волокна, нами было рассчитано среднее значение метрики локальной стабильности генома. Результаты анализа приведены на рис. 2. Тепловая карта демонстрирует наличие по крайней мере двух выраженных кластеров, отличающихся по значению метрики стабильности генома. Большой кластер соответствует регионам с низким значением метрики (среднее значения для регионов, входящих в кластер, составляет 4.6), меньший кластер содержит менее стабильные регионы со средним значением метрики 14.1 В табл. 1 гены, попадающие в регионы кластера 2, выделены курсивом. Среди них преобладают белки, вовлеченные в синтез и мо-

Таблица 1. Список генов, затронутых вариациями числа копий, ассоциированных с фенотипическими признаками качества волокна

Ген	Функциональная аннотация	Гомолог <i>A. thaliana</i>	Имя гена	Категория GO	Фенотип	CNV
Lus10006089	DEAD/DEAH box RNA helicase family protein	AT1G35530.2	—	GO:DNA primase activity GO:DNA replication, synthesis of RNA primer GO:ATP binding GO:DNA binding GO:hydrolase activity	Pht	DUP
Lus10018956	Major facilitator superfamily protein	AT3G05165.4	—	GO:integral component of membrane GO:transmembrane transporter activity GO:transmembrane transport	TeLen	DEL
Lus10033225	with no lysine (K) kinase 8	AT5G41990.1	ATWNK8, WNK8	GO:ATP binding GO:protein kinase activity GO:protein phosphorylation GO:protein serine/threonine kinase activity	Pht	DUP
Lus10033226	Yippee family putative zinc-binding protein	AT4G27745.1	—	—	Pht	DUP
Lus10033227	early nodulin-like protein 8	AT1G64640.1	AtENODL8, ENODL8	GO:electron transfer activity	Pht	DUP
Lus10033228	Major facilitator superfamily protein	AT1G64650.1	—	GO:integral component of membrane GO:molybdate ion transmembrane transporter activity GO:molybdate ion transport GO:transmembrane transporter activity GO:transmembrane transport	Pht	DUP
Lus10023481	binding; RNA binding	AT2G39260.1	—	GO:RNA binding GO:protein binding GO:spore wall GO:sporulation resulting in formation of a cellular spore GO:ATP binding	TeLen	DEL
Lus10038498	Arabidopsis thaliana gibberellin 2-oxidase 1	AT1G78440.1	ATGA2OX1, GA2OX1	GO:oxidation-reduction process GO:oxidoreductase activity	TeLen	DEL
Lus10008854	defective in meristem silencing 3	AT3G49250.1	DMS3, IDN1	—	Ufilen	DEL
Lus10008855	defective in meristem silencing 3	AT3G49250.1	DMS3, IDN1	—	Ufilen	DEL
Lus10022351	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	AT3G14470.1	—	GO:protein binding GO:ADP binding	Ninodes	DEL
Lus10010513	RING-H2 group F1A	AT4G14220.1	RHF1A	GO:metal ion binding GO:zinc ion binding GO:anaphase-promoting complex-dependent catabolic process GO:anaphase-promoting complex GO:cullin family protein binding GO:ubiquitin protein ligase activity	Tewgt	DUP
Lus10010514	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	AT5G19210.2	—	GO:ATPase activity GO:ATP binding GO:nucleic acid binding GO:DNA binding GO:hydrolase activity	Tewgt	DUP
Lus10010515	ADP glucose pyrophosphorylase large subunit 1	AT5G19220.1	ADG2, APL1	GO:biosynthetic process GO:nucleotidyltransferase activity GO:transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	Tewgt	DUP
Lus10010516	Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored	AT3G06035.1	—	GO:integral component of membrane	Tewgt	DUP
Lus10010517	peroxisomal adenine nucleotide carrier 1	AT3G05290.1	PNC1	—	Tewgt	DUP
Lus10016577	syntaxin of plants 52	AT1G79590.1	ATS-YP52, SYP52	GO:cell adhesion GO:Golgi vesicle transport GO:membrane	Ufilen	DUP
Lus10016578	TATA BOX ASSOCIATED FACTOR II 59	AT1G04950.1	ATTAF6, TAF6, TAFII59	GO:DNA binding GO:DNA-templated transcription, initiation GO:transcription initiation from RNA polymerase II promoter	Ufilen	DUP
Lus10016579	homolog of bacterial cytokinesis Z-ring protein FTSZ 1-1	AT5G55280.1	ATFTSZ1-1, CPFTSZ, FTSZ1-1	GO:GTPase activity	Ufilen	DUP

Lus10003208	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein	AT4G24060.1	—	GO:DNA binding GO:regulation of transcription, DNA-templated	TeLen	DEL
Lus10042690	Tudor/PWWP/MBT domain-containing protein	AT2G48160.1	—	GO:mitochondrial large ribosomal subunit GO:structural constituent of ribosome	Ninodes	DEL
Lus10032760	Primosome PriB/single-strand DNA-binding	AT1G47720.1	OSB1	GO:single-stranded DNA binding GO:nucleic acid binding GO:regulation of transcription, DNA-templated	Pht	DEL
Lus10036335	Heat shock protein DnaJ with tetratricopeptide repeat	AT4G02100.1	—	GO:extracellular region GO:hormone activity GO:protein binding	Tewgt	DEL
Lus10008989	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	AT3G18600.1	—	GO:ATP binding GO:nucleic acid binding GO:ATP:ADP antiporter activity GO:integral component of membrane GO:nucleotide transport GO:DNA binding GO:hydrolase activity GO:cell adhesion GO:extracellular region GO:ossification	Ufilen	DEL
Lus10026328	polyol/monosaccharide transporter 5	AT3G18830.1	ATPLT5, ATPMT5, PMT5	GO:integral component of membrane GO:transmembrane transporter activity GO:transmembrane transport	Ninodes	DEL
Lus10031392	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 16	AT3G23730.1	XTH16	GO:carbohydrate metabolic process GO:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds GO:apoplast GO:cellular glucan metabolic process GO:cell wall GO:xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity	Pht	DEL
Lus10031393	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 16	AT3G23730.1	XTH16	GO:carbohydrate metabolic process GO:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds GO:apoplast GO:cellular glucan metabolic process GO:cell wall GO:xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity	Pht	DEL
Lus10026103	nudix hydrolase homolog 3	AT1G79690.1	atnudt3, NUDT3	GO:hydrolase activity	Tewgt	DUP
Lus10026104	RING/U-box superfamily protein	AT3G14250.1	—	GO:metal ion binding	Tewgt	DUP
Lus10026105	rhodanese-like domain-containing protein / PPIC-type PPIASE domain-containing protein	AT5G19370.1	—	GO:peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	Tewgt	DUP
Lus10026106	Galactose mutarotase-like superfamily protein	AT5G57330.1	—	GO:carbohydrate metabolic process GO:isomerase activity	Tewgt	DUP
Lus10026107	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 14 precursor	AT3G12660.1	FLA14	—	Tewgt	DUP
Lus10026108	Protein kinase superfamily protein	AT1G79640.1	—	GO:ATP binding GO:protein kinase activity GO:protein phosphorylation GO:protein dimerization activity	Tewgt	DUP
Lus10031928	indeterminate(ID)-domain 4	AT2G02080.1	AtIDD4, IDD4	—	Ufilen	DEL
Lus10006824	receptor like protein 37	AT3G23110.1	AtRLP37, RLP37	GO:protein binding	Ninodes	DEL
Lus10006825	receptor like protein 7	AT1G47890.1	AtRLP7, RLP7	GO:protein binding	Ninodes	DEL
Lus10035647	xylem NAC domain 1	AT5G64530.1	ANAC104, XND1	GO:DNA binding GO:regulation of transcription, DNA-templated	Tewgt	DEL
Lus10035648	xylem NAC domain 1	AT5G64530.1	ANAC104, XND1	GO:DNA binding GO:regulation of transcription, DNA-templated	Tewgt	DEL
Lus10008323	heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	AT5G28540.1	BIP1	GO:ATPase activity GO:ATP binding	Tewgt	DEL

Lus10008324	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	AT1G09080.1	BIP3	GO:ATPase activity GO:ATP binding	Tewgt	DEL
Lus10018096	<i>Protein kinase superfamily protein</i>	<i>AT3G19300.1</i>	—	<i>GO:ATP binding</i> <i>GO:ATP binding</i> <i>GO:protein kinase activity</i> <i>GO:protein kinase activity</i> <i>GO:protein phosphorylation</i> <i>GO:protein phosphorylation</i>	<i>TeLen</i> <i>Uflen</i>	<i>DEL</i>

Примечание. Курсивом выделены гены, находящиеся в областях с высоким уровнем нестабильности генома. Акронимы фенотипов расшифровываются следующим образом: TeLen — техническая длина волокна, Uflen — длина междоузлий, Tewgt — технический вес волокна, Ninodes — число междоузлий, Pht — высота растений (для расшифровки фенотипов см. работу [14]).

дификацию компонентов клеточной стенки (Lus10026107, Lus10026106, Lus10031393, Lus10031392), ремоделинг хромосом/сайленсинг генов (Lus10042690, Lus10008854, Lus10008855), а также в ответ растения на стресс (Lus10018096, Lus10026108, Lus10022351), что позволяет предположить большую пластичность данных регионов с точки зрения изменчивости, и, таким образом,

их потенциальную важность для создания новых сортов с заданными хозяйственными свойствами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

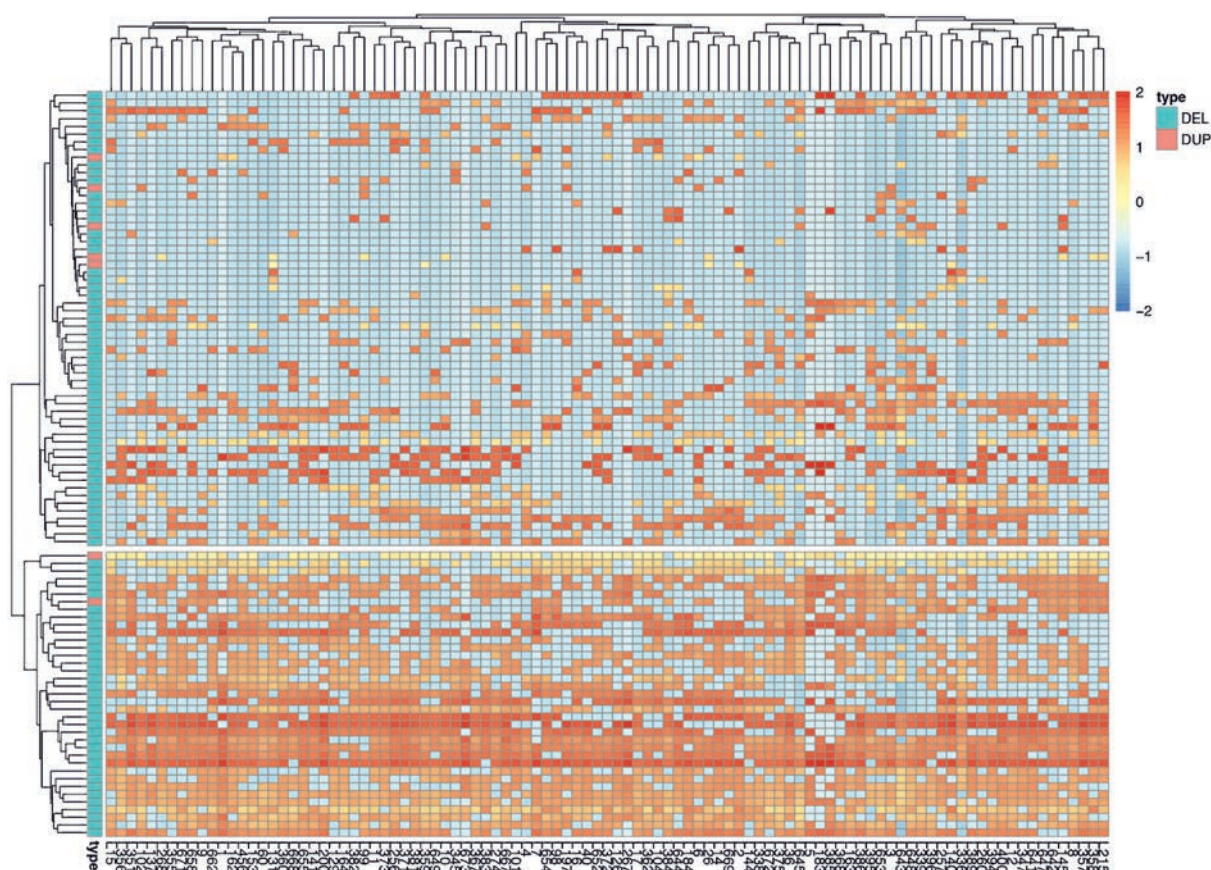


Рис. 2. Тепловая карта метрики локальной стабильности генома в участках, соответствующих вариациям копийности (строки) для исследованных образцов (столбцы). Дополнительная панель слева включает тип варианта числа копий (делеция — DEL, дупликация — DUP).

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. S. V. Nuzhdin, M. L. Friesen, and L. M. McIntyre, *Trends Genet.*, **28**, 421 (2012).
2. P. K. Gupta, P. L. Kulwal, and V. Jaiswal, *Adv. Genet.*, **104**, 75 (2019).
3. T. A. Manolio, et al., *Nature*, **461**, 747 (2009).
4. E. E. Eichler, et al., *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 446 (2010).
5. P. H. Sudmant, et al., *Nature*, **526**, 75 (2015).
6. T. H. Shaikh, *Curr Genetic Med. Reports*, **5**, 183 (2017).
7. A. Zmienko, et al., *Plant Cell*, **32**, 1797 (2020).
8. A. Dolatabadian, D. A. Patel, D. Edwards, and J. Batley, *Theor. Appl. Genet.*, **130**, 2479 (2017).
9. C. Goudenhooft, A. Bourmaud, and C. Baley, *Front. Plant Sci.*, **10**, 411 (2019).
10. C. Goudenhooft, A. Bourmaud, and C. Baley, *Industrial Crops & Products*, **97**, 56 (2017).
11. E. J. Mellerowicz and T. A. Gorshkova, *J. Exp. Bot.*, **63**, 551 (2012).
12. M. J. Roach, et al., *Plant Physiol.*, **156**, 1351 (2011).
13. T. Gorshkova, et al., *Sci. Rep-uk*, **8**, 14570 (2018).
14. T. Rozhmina, M. Bankin, A. Samsonova, et al., *Data Brief*, **37**, 107224 (2021).
15. М. А. Дук, А. А. Канапин, А. А. Самсонова и др., *Биофизика*, **67**, 234 (2022).
16. A. Abyzov, A. E. Urban, M. Snyder, and M. Gerstein, *Genome Res.*, **21**, 974 (2011).
17. J. Wang and Z. Zhang, *Genom Proteom Bioinform.*, **19**, 629–640 (2021).
18. F. M. You and S. Cloutier, *Methods Protoc.*, **3** (2020). DOI:10.3390/mps3020028
19. A. Kanapin, et al., *Mol. Plant Microbe Interact.*, **33**, 1112 (2020).
20. A. Kanapin, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 14536 (2022).

Genome-Wide Association Study of Copy Number Variation in Flax Through the Lens of Genome Integrity

M.A. Duk*, A.A. Kanapin*, T.A. Rozhmina**, and A.A. Samsonova*

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

**Flax Institute — a separate subdivision of the Federal Scientific Center for Bast Crops, ul. Lunacharskogo 35, Thorzhok, Tver Region 172002 Russia

Classical methods for identification of genetic variants associated with certain macroscopic phenotypic traits are, as a rule, limited to analyses of single nucleotide polymorphisms. Copy number variations, and more broadly structural variants may provide a plethora of useful information due to the magnitude of the changes they induce. However, their use in genome-wide association studies is seriously limited mostly due to the uncertainties in their discovery (i.e., failure to resolve an event with nucleotide resolution) by computational algorithms from genomic data. Nevertheless, in certain cases, such analyses are possible and may still yield valuable results. Our recent work has revealed genetic variants (single nucleotide polymorphisms) possibly related to phenotypic traits determining fibre quality. Here, we decided to extend the analyses to structural variants, namely copy number variations. Importantly, we use a novel high-coverage dataset allowing for accurate prediction of copy number variations. Overall, we compiled a list of 41 candidate genes associated with five quantitative phenotypic traits. Furthermore, the genome stability metric developed earlier facilitated stratification of copy number variant loci with regard to their stability. On the whole, our analyses suggest that the genomic regions less resilient to external and internal stresses are more susceptible to changes associated with the studied phenotypic traits.

Keywords: copy number variation, genome integrity, *Linum usitatissimum* L., flax fiber, genome-wide association study

ВОЗМОЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА УСТАНОВКЕ ИМПУЛЬСНОГО РЕАКТОРА

© 2023 г. А.В. Власов*, **, Ю.Л. Рижиков*, **, И.В. Манухов**, С.В. Баженов**,
С.А. Куракин*, ***, Т.Н. Муругова*, А.И. Иванов*, В.В. Ской*, А.В. Рогачев*,
Д.П. Вертелецкий****, А.Х. Исламов*, Н. Кучерка*, *****, В.И. Горделий*, А.И. Куклин*.*

*Объединенный институт ядерных исследований, ул. Жолио-Кюри, 6, Дубна Московской области, 141980, Россия

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

***Институт физики Казанского федерального университета, Кремлёвская ул., 16а, Казань, 420111, Россия

****Mainchemproject South, LLC, Ереван 0051, Армения

*****Department of Physical Chemistry of Drugs, Comenius University in Bratislava,
Mlynská dolina, 832 32, Bratislava, Slovakia

#E-mail: kuklin@nf.jinr.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 20.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Малоугловое рассеяние позволяет решать задачи структурной биологии без проведения специальной пробоподготовки, характерной для таких методов, как рентгеновская дифракция на белковых кристаллах или криоэлектронная микроскопия белков. В обзоре приведены примеры использования малоуглового рассеяния для решения биологических задач. Предложено внедрение в практику использования малоуглового рассеяния как способа контроля качества сборки белков и белковых комплексов, а также тестирования идентичности структурной организации биологических объектов в нативном состоянии в подготовленных пробах перед измерениями методами рентгеновской дифракции или криоэлектронной микроскопии. Показаны возможности спектрометра малоуглового нейтронного рассеяния ЮМО на импульсном реакторе ИБР-2 (Лаборатория нейтронной физики Объединенного института ядерных исследований, Дубна, Россия) для решения широкого спектра задач, в том числе в биофизике, структурной биологии и биотехнологии. Рассмотрены основные результаты исследований разнообразных биологических систем с использованием малоуглового рассеяния нейтронов на установке ЮМО. Показаны возможности развития методов структурной биологии с помощью малоуглового рассеяния, в том числе белковой кристаллизации.

Ключевые слова: малоугловое рассеяние, биофизика, структурная биология, мембранные белки.

DOI: 10.31857/S0006302923020096, EDN: CAVHTJ

Несмотря на длинную, более чем полувековую историю исследований нанообъектов, метод малоуглового рассеяния (МУР) считается некоторой экзотикой для целого ряда специалистов, сконцентрированных на решении биологических задач. Частично информацию об исследовании разных биологических образцов на малоугловом спектрометре в Дубне можно найти в работе [1].

Там же есть более подробное изложение некоторых особенностей спектрометра, позволивших

получать кривые рассеяния в широком диапазоне значений модулей векторов длин рассеяния. Есть и некоторый исторический экскурс. Приведено сравнение методов рассеяния, используемых при изучении структурных параметров, включая микроскопию. Актуальным также остается и обзор [2].

Существует фактор, усложняющий расшифровку надмолекулярной структуры методом МУР, — это полидисперсность. С одной стороны, полидисперсным является почти все, что производится в нанометровом диапазоне, и как только станут получаться монодисперсные объекты, можно будет говорить о новом промышленном скачке, а с другой стороны, в нативном виде биологические объекты (белки, комплексы) характеризуются монодисперсностью, но даже в слабо-

Сокращения: МУР — малоугловое рассеяние, МУРН — малоугловое рассеяние нейтронов, МУРР — малоугловое рентгеновское рассеяние, ДМФХ — 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, ДПФХ — 1,2-дипальмитоилфосфатидилхолин, ПОФХ — 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, ДОФХ — 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин.

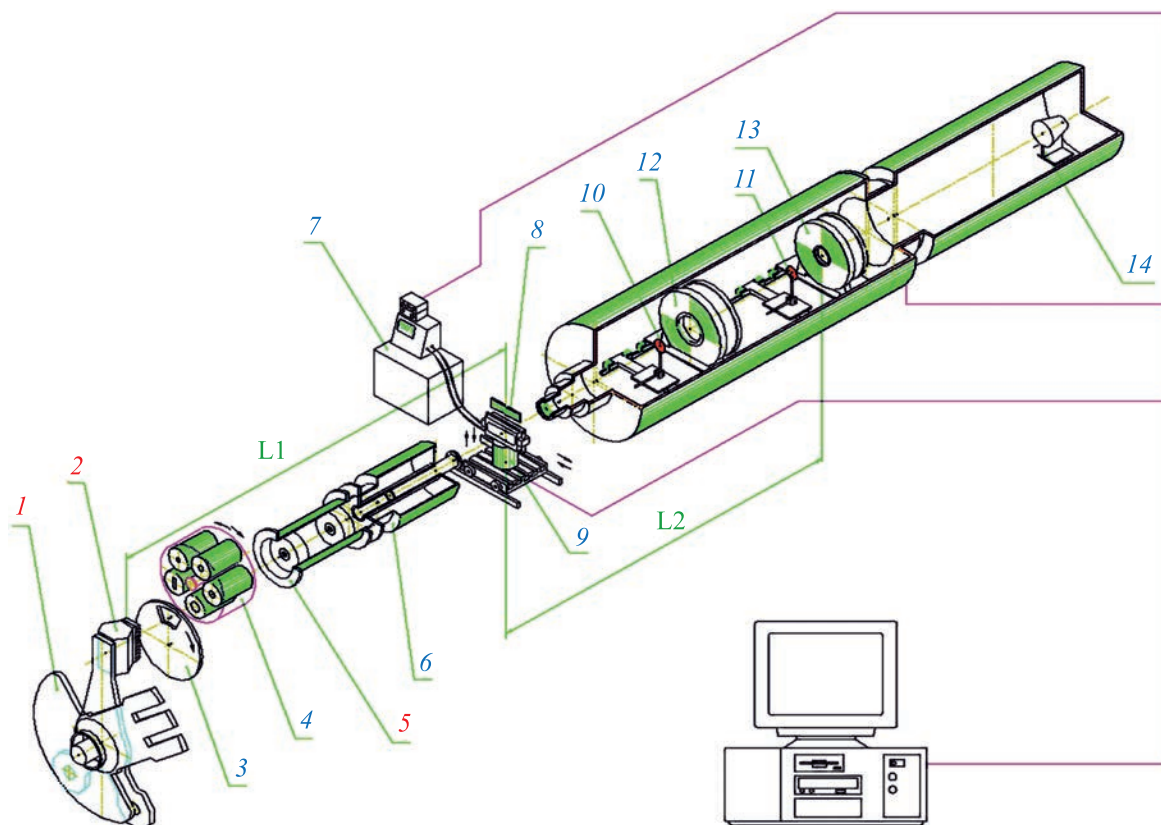


Рис. 1. Принципиальная схема спектрометра ЮМО: 1 – два рефлектора, 2 – зона реактора с замедлителем, 3 – прерыватель, 4 – первый коллиматор, 5 – вакуумная труба, 6 – второй коллиматор, 7 – термостат, 8 – стол образцов, 9 – гониометр, 10 и 11 – ванадиевые стандарты, 12 и 13 – детекторы, 14 – детектор прямого пучка.

концентрированном виде образуются димеры и олигомеры белков. Это ограничивает возможности получать структуры с низким разрешением. Применяя технику сгона на нулевую концентрацию, частично можно избежать влияния этого фактора [3].

Особенностью нейтронов в МУР является определенная «мягкость», что для биологии исключительно важно. На синхротронных источниках потоки столь велики, что приходится их ослаблять с помощью фильтров, чтобы не потерять образец. И хотя мы говорим о высоких потоках импульсного реактора [4] – потоки на порядки ниже, чем на синхротронах и даже на рентгеновских установках [5, 6]. Но импульсный характер работы реактора дает поток с пиковым значением, в 2000 раз превышающим среднее, что позволяет измерять даже слабо рассеивающие белки с концентрацией до процента в тяжеловодном растворе. Существенное различие длин рассеяния нейтронов на водороде и дейтерии позволяет проводить вариацию контраста и определять плотности отдельных частей макромолекулы.

Данный обзор посвящен исследованию биологических объектов методом малоуглового рассеяния нейтронов на примере установки импульсного реактора ИБР-2 (рис. 1) в Объединенном институте ядерных исследований (Дубна Московской области). Отличительными чертами четвертого канала реактора ИБР-2, на котором расположен спектрометр ЮМО, является отсутствие нейтронвода и достаточно большой (около 5 м, включая расстояние под шибером) участок пролета нейтронов в воздухе (в кольцевом коридоре). При этом угол между перпендикулярным направлением к замедлителю и осью канала составляет примерно 18 градусов. Общая длина спектрометра составляет более 40 м.

Основой установки являются детекторы с центральным отверстием и ванадиевым стандартом перед каждым детектором и детектор прямого пучка. Пучок тепловых нейтронов формируется коллиматорной системой (рис. 1, 4, 6), так что попадающие на образец нейтроны имеют максимальное сечение 22 мм (обычно 14 мм) и интенсивность потока на образце до $3 \cdot 10^7$ нейтронов/с [7].

Компьютерно контролируемый первый коллиматор (рис. 1, 4) совместно с юстируемым коллиматором (рис. 1, 6) составляют основу системы формирования пучка нейтронов. На столе образцов размещается платформа с горизонтально перемещаемым перпендикулярно пучку термостатируемым боксом. Стол имеет возможность перемещаться в горизонтальном и вертикальном направлениях. Образцы, как правило, помещаются в алюминиевый бокс (внутри которого расположены каналы для протока жидкости), подогреваемый и охлаждаемый с помощью компьютерно-управляемого термостата с рабочим диапазоном температур от -10°C до 180°C . Одновременно в бокс может помещаться до 25 кювет. Стол образцов находится на воздухе, что позволяет легко монтировать различные оснастки, например: источник света, камеру высокого давления и сам температурный бокс.

Фокусом и основой установки является двухдетекторная система [8, 9]. В свою очередь, ключевым звеном здесь были разработанные еще в конце семидесятых годов и модернизированные кольцевые детекторы тепловых нейтронов [10, 11] и вновь запускаемый позиционно-чувствительный детектор специфической конструкции.

Принцип действия многодетекторной системы состоит в следующем. Часть рассеянных на образце нейтронов регистрируется ближайшим к образцу детектором, другая часть проходит через центральное отверстие этого детектора и регистрируется следующим детектором. Прошедшая через центральное отверстие второго детектора и незарегистрированная часть нейтронов попадает на третий детектор, и так далее. Перекрытие спектров от двух детекторов обеспечивается время-пролетной методикой. На момент написания статьи установка работает с двумя детекторами для регистрации рассеянных нейтронов и одним детектором прямого пучка.

Таким образом, основными специфическими характеристиками спектрометра являются: двухдетекторная система сбора экспериментальных данных, прямая видимость замедлителя с позиции образца, ванадиевые стандарты для получения кривых малоуглового рассеяния в абсолютных значениях сечений, измерение пропускания, и, соответственно, полного нейтронного сечения образца [12, 13].

Разумеется, это далеко не полный список проведенных измерений, однако мы даем довольно широкий спектр исследований, проведенный на спектрометре. В этой работе мы приводим примеры исследований в области структурной биологии, белков и белковых комплексов, липидных систем, а также предлагаем внедрение в практику применение метода МУР при получении белко-

вых структур высокого разрешения комплементарно с методами рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии и функциональными тестами.

Также в нашем обзоре мы рассматриваем исследования биомембран, которые являются ключевыми объектами в биологии и имеют большое значение для медицины. Тонкие (несколько нанометров) квазидвумерные жидкокристаллические мембраны с жесткостью на изгиб в несколько кТ демонстрируют необычные свойства, а их исследования проходят на стыке теоретической и экспериментальной физики. Например, плавление цепей липидных мембран (фазовый переход первого рода) наблюдается как квазикритическое поведение физико-химических свойств мембран и может быть исследовано с помощью метода МУР.

ПРИМЕНЕНИЕ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ СТРУКТУРНОЙ БИОЛОГИИ

Современные задачи структурной биологии имеют высокие требования как к инструментам, необходимым для получения белковых структур высокого разрешения, так и к пробоподготовке образцов для измерений. Так, например, при проведении современной белковой кристаллографии с использованием лазеров на свободных электронах (XFEL — X-ray Free Electron Laser) требуется наличие большого количества белковых кристаллов ($N \sim 10^3 - 10^4$) размером ~ 10 мкм каждый. Все эти кристаллы должны находиться в одной кристаллизационной пробе, состоящей из мембранно-имитирующей среды, образующей липидные мезофазы. При использовании криоэлектронной микроскопии требуется тщательная подготовка сеток, подбор условий нанесения белков на сетки и т. д.

Многopараметрический подбор оптимальных условий для подобного рода подготовки образцов как правило занимает от нескольких месяцев до нескольких лет и является «бутылочным горлышком» для многих задач структурной биологии по получению белковых структур высокого разрешения. Поэтому для некоторых биологических задач крайне эффективным является использование метода малоуглового рассеяния рентгеновских лучей или нейтронов.

Метод малоуглового рассеяния используется для получения структурных данных белковых молекул, липидных и липидно-белковых систем, и т. д. Метод также позволяет охарактеризовать липидные мезофазы, классифицировать их тип симметрии и найти параметры решетки. Хотя использование метода МУР не предполагает получение структур высокого разрешения, он часто

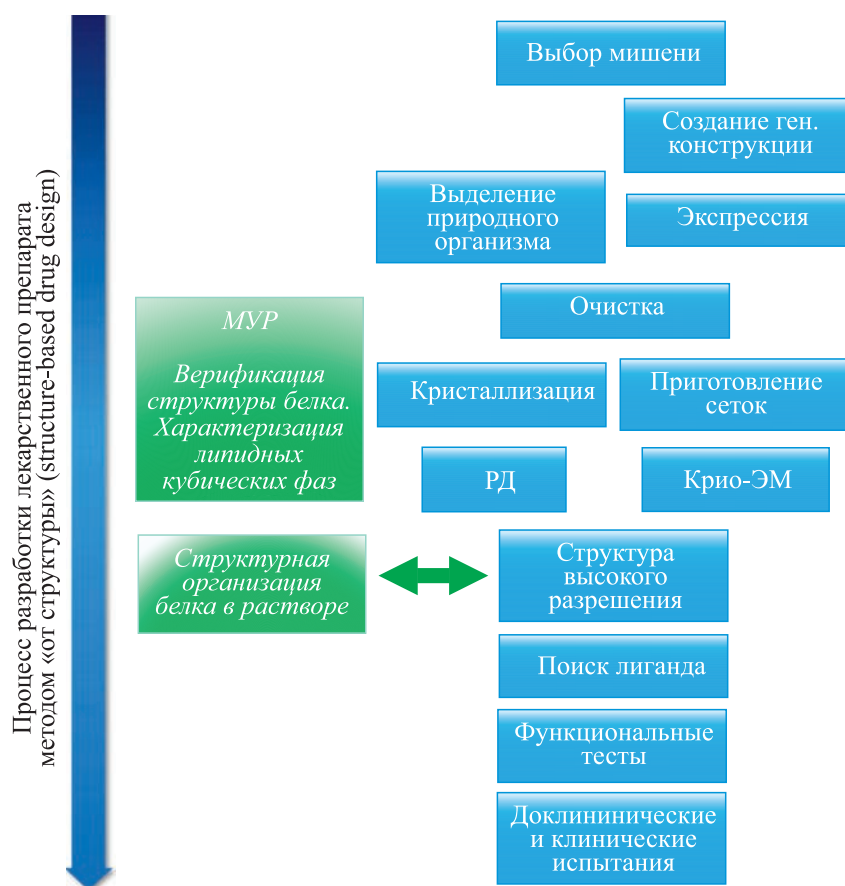


Рис. 2. Процесс разработки лекарственных препаратов методом «от структуры» (structure-based drug design). Курсивом отмечены элементы, которые предлагается использовать в процессе разработки лекарственных препаратов: исследования методом МУР и анализ данных, сравнение структурной организации белка в растворе со структурой высокого разрешения, а также анализ олигомерного состояния белка.

используется комплементарно с другими методами структурной биологии, поскольку служит доказательством идентичности структурной организации исследуемого биологического объекта в нативных условиях и в условиях пробоподготовки для методов рентгеновской кристаллографии (кристалл белка) или криоэлектронной микроскопии (белок, нанесенный на сетку). Очевидно, что условия, когда белок находится в кристаллической решетке или нанесен на сетку для исследований методом криоэлектронной микроскопии, существенно отличаются от нативных и могут сильно влиять на структуру белка или белкового комплекса.

Данная проблема соответствия не решена до сих пор и является ограничением методов структурной биологии. При получении белковых структур высокого разрешения для подтверждения соответствия полученной структуры и исследуемого объекта используются функциональные тесты. Однако такой подход может оказаться не-

состоятельным в случаях, когда конформация белка или белкового комплекса слишком чувствительна к внешним условиям. В таком случае функциональные тесты могут подтвердить функциональность белка, однако, его структурная организация будет отличаться от полученной методами рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии.

Таким образом, сильным доказательством идентичности структур биологических объектов может служить метод МУР, который позволяет получить структурные данные исследуемых образцов (например, белков в растворе) и не требует создания специфических условий при пробоподготовке (рис. 2). В нашем обзоре мы демонстрируем широкий спектр биологических задач, решаемых с помощью МУР как самостоятельно, так и комплементарно с другими методами структурной биологии.

КОНТРОЛЬ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ И БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Метод МУР пока недооценен как метод рутинного анализа и контроля качества структурной организации при биотехнологических производствах ферментов и белковых комплексов. Несмотря на уникальность и высокую стоимость установки для проведения исследований методов МУР, в России есть возможность ее применения в режиме потоковых исследований большого количества образцов. Помимо нейтронного рассеяния метод МУР может быть реализован с источниками рентгеновского излучения, такие установки имеют меньшие габариты и стоимость, что позволит в перспективе развивать данный метод для рутинного применения на производствах в отделах разработок и контроля качества. На сегодняшний день есть опыт применения методов МУР для следующих объектов в биотехнологии:

— Липаза — фермент, катализирующий расщепление липидов. В работе [14] методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) исследовано взаимодействие липазы с липидными мицеллами, которые активируют фермент. Также методом МУР проведены исследования модифицированной липазы [15], в этой работе было показано образование ламеллярной структуры липазы, модифицированной стеариновой кислотой, в *n*-гексане и в водном буфере, и была доказана перспективность такой модификации для биотехнологии.

— Фитаза — фермент, гидролизующий фитиновую кислоту. В работе [16] методом МУР исследовано влияние гликозилирования на межбелковые взаимодействия фитазы. Показано, что гликаны стабилизируют раствор развернутых форм ферментов и предотвращают их агрегацию.

— Ксиланаза — еще один важнейший фермент в биотехнологии, расщепляющий полисахариды ксиланы. В работе [17] МУР применяли для исследования термостабильности фермента, так как для данного фермента термостабильность является одним из важнейших параметров при применении в промышленности [18].

— Амилаза — фермент, расщепляющий крахмал. Методом МУР были получены структурные данные [19], свидетельствующие об образовании ферментом тетрамера, а также был исследован процесс его сборки.

— Лизоцим — важнейший антибактериальный фермент, гидролизующий пептидогликаны [20]. МУР активно применялось для исследования множества параметров данного белка [21–23].

— Шапероны — белки, обеспечивающие корректный фолдинг других белков в процессе синтеза и после поддерживающие их нативную форму за счет рефолдинга [24]. В отличие от апофер-

ритина, самопроизвольно сворачивающегося в правильную конформацию и образующего 24-мерный комплекс в широком диапазоне значений внешних условий [25], многие целевые белки склонны к мисфолдингу и агрегации. Важной биотехнологической задачей при создании штамма-продуцента является подбор реципиента с подходящим набором шаперонно-протеазного комплекса, для экспрессии целевого белка в нативной форме в гетерологичных условиях [26–28]. МУР может применяться не только для проверки качества сборки белков и белковых комплексов в присутствии различных шаперонов в клетке-продуценте, но и в комбинации с другими биотехнологическими, прежде всего биосенсорными, методами [29, 30] для изучения молекулярных механизмов работы самих шаперонов [31].

Также биотехнологические разработки новых рекомбинантных вакцин на основе белка апоферритина и других белков-адъювантов могут сопровождаться применением метода МУР для контроля структурной организации и сборки белковых комплексов. В работе [32] проведены измерения апоферритина методом малоуглового рассеяния. Апоферритин использовали как модельный объект с известным форм-фактором. В работе [33] апоферритин исследован комплементарными методами малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния. В работе [34] показана зависимость димеризации белкового комплекса апоферритина от pH методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), а в работе [35] разработан подход высокоэффективного контроля самосборки химерных рекомбинантных белковых комплексов, использующихся в том числе и для разработки вакцин против SARS-CoV-2. Интересными для биотехнологии являются исследования методом МУР ферригидритных частиц, произведенных микроорганизмами [36, 37], доставки лекарств в липосомах [38], структурные исследования гликозилированных белков [39] или капсидов вирусов [40].

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕТА-АМИЛОИДОВ МЕТОДОМ МУР

Бета-амилоиды представляют собой кластеры из A β -пептидов, которые играют важную роль в развитии болезни Альцгеймера [41]. Исследования методом МУР могут помочь определить структурную организацию кластеров, улучшить понимание процессов их образования и разработать методы терапии, предотвращающие их появление.

Так, например, в работе [42] авторы с помощью МУР показывают структурную организацию A β -пептидов и идентифицируют ключевые стадии формирования амилоидные бляшки, а в работе [43] показывают влияние триазиавина на

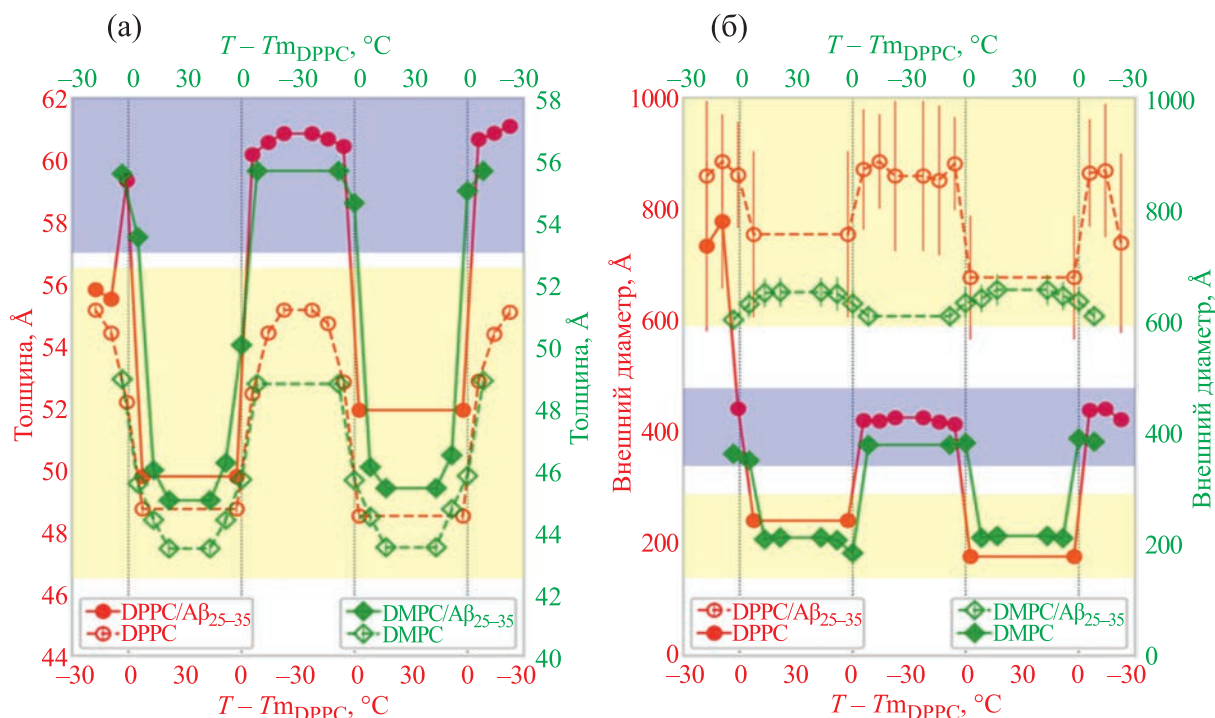


Рис. 3. Изменение толщины модельной мембраны (а) и размеров агрегатов (б) в зависимости от сдвига температуры относительно главного фазового перехода для ДМФХ (ромбы) и ДПФХ (кружки). На графике чистые системы представлены полными фигурами, со встроенным пептидом — заполненными.

диссоциацию кластеров амилоидогенных пептидов. Метод малоуглового рассеяния нейтронов используется комплементарно с методом электронной микроскопии.

Для понимания амилоидогенеза также необходимо исследовать процессы взаимодействия Аβ-пептидов с биологическими мембранами. В работе [44] авторы исследуют такие взаимодействия методом МУР и обнаруживают влияние ионов, гидратации и холестерина на структурную организацию модельных мембран. Также важно влияние температуры на структурную организацию мембран и Аβ-пептидов [45], что показано методом малоуглового рассеяния нейтронов для систем ДПФХ/Аβ₂₅₋₃₅ и ДМФХ/Аβ₂₅₋₃₅. Межбелковое взаимодействие амилоидогенных пептидов и их конформационные изменения исследуются в работе [46], модельная система для транспорта противовирусных препаратов исследована в работе [47].

Использование метода малоуглового рассеяния нейтронов позволило продемонстрировать морфологические изменения в модельных липидных мембранах, вызванные встраиванием амилоид-бета пептида. Показано, что данные изменения связаны непосредственно с фазовым состоянием системы. Изменения, связанные с встраиванием амилоид-бета пептида оказывают влияние как на структуру агрегатов, так и внут-

реннюю структуру мембраны в целом и на ее толщину в частности.

На рис. 3 представлены изменения толщины мембраны и размера агрегата для систем сформированных из липидов димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) и дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Данные липиды отличаются так называемой температурой главного фазового перехода. Данные изменения толщины мембраны и размеров агрегатов представлены в зависимости от температурного сдвига температуры относительно температуры главного фазового перехода. Эти зависимости свидетельствуют об унифицированном характере взаимодействия пептида с мембраной.

Указанные выше морфологические изменения были подтверждены методом просвечивающей электронной микроскопии [48].

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ МУР

Отличным образом методы малоуглового нейтронного рассеяния можно применить к структурным исследованиям различных белковых комплексов от бактериальных до эукариотических.

В работе [49] с помощью малоуглового нейтронного рассеяния на спектрометре ЮМО (им-

пульсный реактор ИБР-2, ОИЯИ, Дубна Московской области) была изучена структура сенсора двухкомпонентной системы — полноразмерного фоторецепторного комплекса сенсорного родопсина с его родственным трансдюсером из экстремофильной археи *N. pharaonis*. Гомодимеры хеморецепторов (или комплексов «родопсин—трансдюсер») в клеточной мембране образуют тримеры, составляющие функциональные единицы. Тримеры димеров (гексамеры, образованные тремя димерами) образуют структурно-функциональную единицу при образовании сигнальных двумерных массивов — компактных мембранных суперкомплексов, отвечающих за усиление входящего сигнала. В упомянутой работе [49] представлена молекулярная модель гексамера (тримера димеров), построенная с помощью комбинации методов малоуглового рассеяния и молекулярного моделирования. Таким образом, показано, что контакт между димерами *NpSRII/NpNtrII* в гексамере опосредован только цитоплазматическими частями, трансмембранные части димеров при этом не контактируют друг с другом, то есть имеет место «tripod»-образная модель, отличная от предложенных ранее в литературе «О»- и «Y»-образных моделей.

Еще один важный белковый комплекс для исследований в том числе и методом малоуглового рассеяния — АТФ-синтаза [50]. В работе [51] получена структура высокого разрешения (2.3 Å) с-ринга АТФ-синтазы из хлоропластов *Spinacia oleracea*, показано наличие дополнительных электронных плотностей внутри с-ринга, не ассоциированных с белком. Также найдены дополнительные плотности в структурах с-рингов из других организмов (от архей до эукариот). Выдвинута гипотеза о возможном наличии изопреноидных хинонов внутри с-рингов различных организмов и найдены ее косвенные экспериментальные подтверждения. В работе [52] продемонстрированы структуры низкого разрешения V-образных димеров АТФ-синтазы из хлоропластов *Spinacia oleracea*, полученные методом малоуглового рассеяния. Таким образом, показана возможность образования димеров АТФ-синтазы из хлоропластов, проведена реконституция АТФ-синтазы в нанодиски, проведены измерения с использованием метода малоуглового рассеяния и обработка данных.

Также исследования методом малоуглового рассеяния применяются для различных белков и белковых комплексов. Так, например, для пигмент-белкового комплекса фикоцианина показана структура тримера методом малоуглового рассеяния [53]. В работе [54] получена структура низкого разрешения модульных нанотранспортеров (рекомбинантных химерных белков, используемых для доставки противораковых препаратов напрямую в опухоли) методом малоуглового

рентгеновского рассеяния. В работе [55] методом малоуглового рассеяния исследовано замедление фотоцикла мембранного белка бактериородопсина при добавлении 100 мМ гуанидин-гидрохлорида. Показана фиксация промежуточного М-состояния белка. Исследование различных состояний фотоциклов протонных помп может быть полезно для различного рода приложений, например, для ориентирования бактериородопсина в пурпурных мембранах и разработан прототип фотоконденсатора на основе бактериородопсина [56].

Перспективным представляется использование МУР для исследования взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. В работе [57] рассматривались стратегии контрастной вариации в МУРР, которые позволяют целенаправленно изучать структуры ДНК или связанных с ней партнеров. Описаны возможности структурных исследований РНК-белковых комплексов методами гидродинамики, МУР и вычислительными методами [58]. Данное направление важно прежде всего для изучения регуляторных белков. Например, белки LuxR-семейства являются регуляторами транскрипции и образуют комплекс с ДНК, активируя и репрессируя различные промоторы [59], причем эффективность образования комплексов может зависеть как от последовательности ДНК, так и от взаимодействия с лигандами [60]. Получение структур белков этого семейства значительно затруднено в силу их низкой растворимости и нестабильности [61], а такие вопросы, как «образуется ли димер до посадки на ДНК или он формируется непосредственно в комплексе с ДНК», все еще не закрыты [62], а в некоторых работах даже встречаются чрезмерно уверенные утверждения по этому поводу, не подтвержденные экспериментальными данными [63].

ИССЛЕДОВАНИЕ ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ МЕТОДОМ МУР

Двухкомпонентные системы отвечают за коммуникацию микроорганизмов с окружающей средой; они присутствуют почти во всех доменах и являются наиболее распространенными сигнальными системами в живой природе [49, 64]. Рецепторы этих систем, как правило, являются трансмембранными белками. Несмотря на широкий интерес научного сообщества к изучению двухкомпонентных систем, в настоящее время были описаны в литературе структуры с высоким разрешением только фрагментов этих белков. Трудности изучения структуры полноразмерных рецепторов двухкомпонентных систем связаны с большим размером и высокой динамичностью их водорастворимой части.

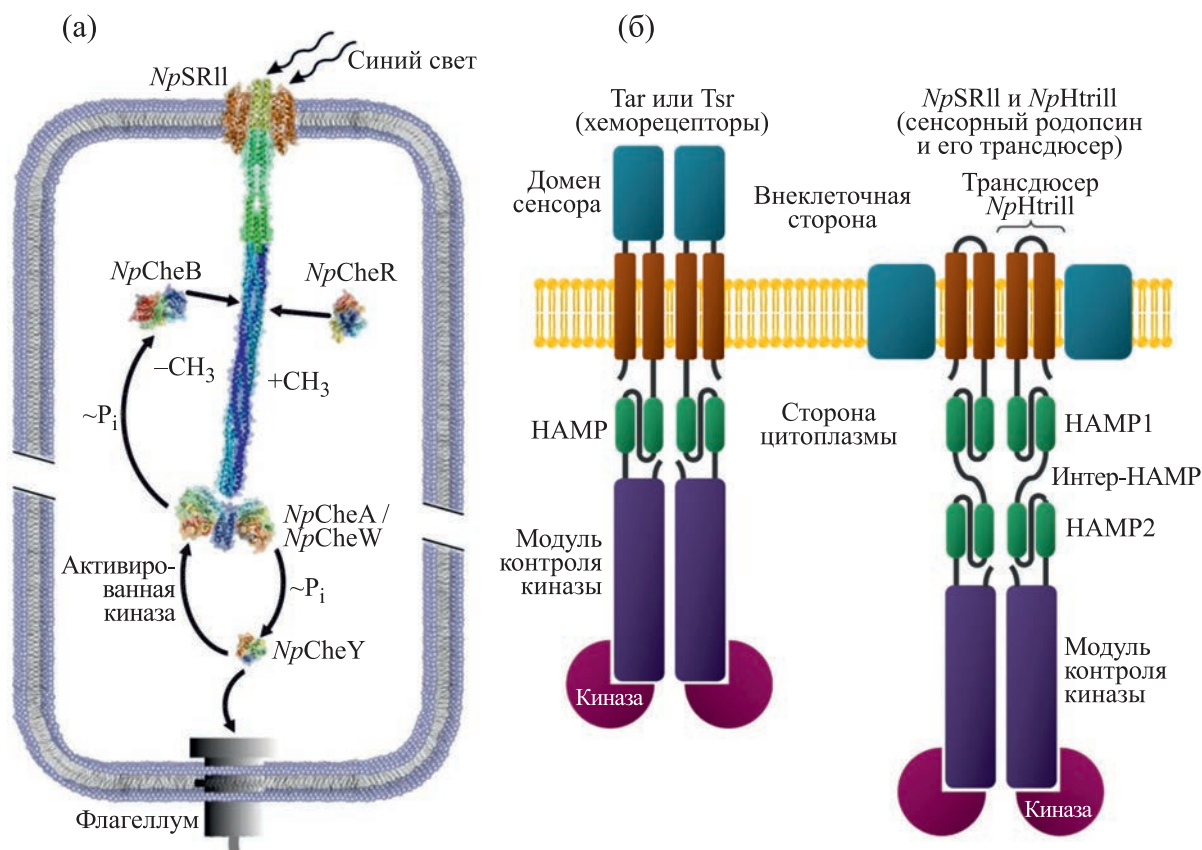


Рис. 4. (а) — Схема сигнального каскада в случае двухкомпонентной системы отрицательного фототаксиса *Natronomonas pharaonis*; (б) — схема доменной архитектуры димера хеморецепторов (Tar и Tsr в комплексе с киназами) из *E. coli* (слева) и димера фотосенсорного комплекса сенсорного родопсина II с его родственником трансдюсером NpHtrII из *N. pharaonis* (справа) [49].

С помощью малоуглового нейтронного рассеяния на спектрометре ЮМО была получена структура сенсора двухкомпонентной системы — полноразмерного фоторецепторного комплекса сенсорного родопсина с его родственником трансдюсером из экстремофильной археи *Natronomonas pharaonis*. Активированный при воздействии света сенсорный родопсин II (NpSRII) индуцирует структурные и/или динамические изменения в трансдюсере (NpHtrII), которые преобразуются двумя НАМР-доменами и передаются вдоль цитоплазматического киназного модуля длиной 200 Å до крайней области цитоплазматической части NpHtrII. Активированная трансдюсером гистидинкиназа CheA (связанная с адаптерным белком CheW) подвергается автофосфорилированию и дополнительно переносит фосфатную группу в регуляторы ответа CheY или CheB. CheY влияет на смещение вращения жгутика, в то время как метилэстераза CheB наряду с метилтрансферазой CheR контролирует механизм адаптации.

Общая схема молекулярного механизма передачи сигнала предполагает последовательные ди-

намические изменения в цитоплазматических доменах (рис. 4). Как хеморецепторы, так и трансдюсеры сенсорных родопсинов демонстрируют различную динамику в соседних модулях, что коррелирует с передачей сигнала вдоль цитоплазматического «стержня». Гомодимеры хеморецепторов (или комплексов «родопсин–трансдюсер») в клеточной мембране образуют тримеры, составляющие функциональные единицы. Тримеры димеров образуют структурно-функциональную единицу при образовании сигнальных двумерных массивов — компактных мембранных супер-комплексов, отвечающих за усиление входящего сигнала.

Представлена молекулярная модель гексамера (тримера димеров) построенная с помощью комбинации методов малоуглового рассеяния и молекулярного моделирования (рис. 5). Таким образом, показано, что контакт между димерами NpSRII/NpHtrII в гексамере опосредован только цитоплазматическими частями, трансмембранные части димеров при этом не контактируют друг с другом, то есть имеет место «tripod»-образ-

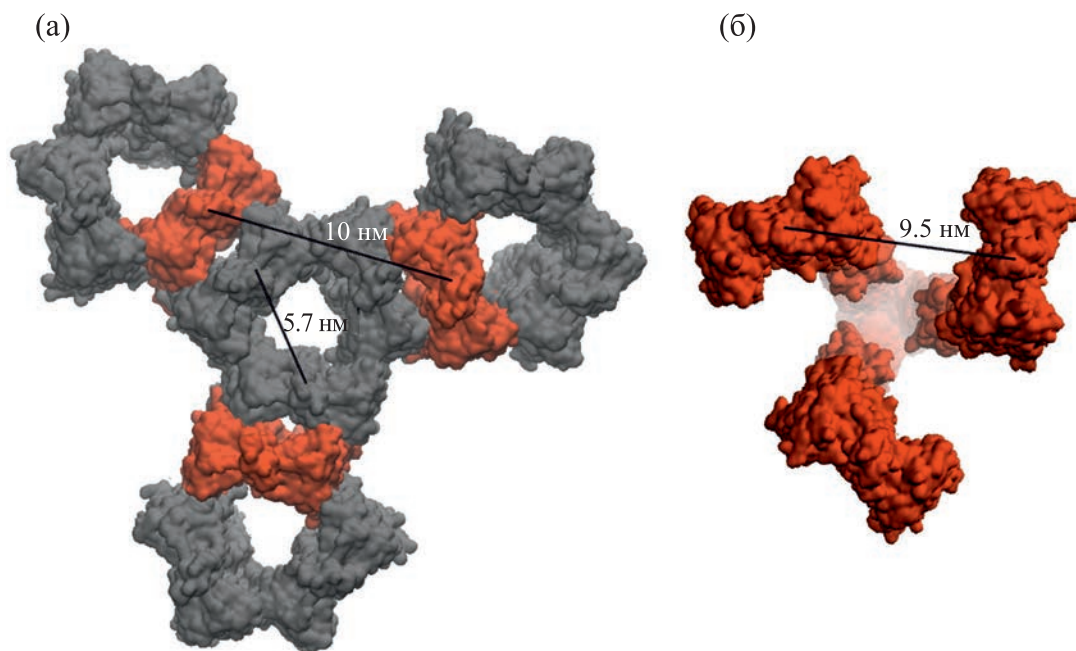


Рис. 5. Изображения трансмембранных доменов комплекса NpSRII/NpHtrII: (а) — фрагмент гексагональной упаковки «О»-образных тримеров димеров; (б) — изображение «tripod»-образного тримера димеров [49].

ная модель, отличная от предложенных ранее в литературе «О»- и «Y»-образных моделей.

Эти результаты в полном объеме изложены в работах [49, 64]. В работе [64] на примере комплекса *NpSRII/NpHtrII* были проанализированы неоднозначности в интерпретации данных малоуглового рассеяния от мембранных белков. Среди существенных факторов, требующих внимания при обработке данных малоуглового рассеяния от мембранных белков выделены такие аспекты, как вклад мембрано-имитирующей среды в профиль малоугловой кривой и полидисперсности по олигомерному состоянию. В работе рассмотрены способы для их преодоления этих неоднозначностей. В работах [49, 64–66] проведены эксперименты по созданию генно-инженерных конструкций, экспрессии и очистке белкового комплекса *NpSRII/NpHtrII*, проведены измерения с использованием методов малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния, обработка и интерпретация данных. В работе [67] также проведены структурные исследования двухкомпонентных сигнальных систем с помощью нейтронного рассеяния. В работе [68] проведена обработка и интерпретация данных малоуглового рассеяния, полученных для сенсорной гистидинкиназы NarQ, выполняющей функцию нитрит-нитратного сенсора *E. coli*.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДНЫХ СИСТЕМ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ МЕТОДОМ МУР

Фазовое состояние липидных систем зависит не только от температуры, но и от приложенного к системе гидростатического давления, особенно в области высоких давлений (более 1 кбар), при этом фазовые переходы при таких условиях могут быть успешно охарактеризованы методом МУРН [69, 70].

Для установки ЮМО в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ была разработана и создана камера для измерений при высоком давлении биологических объектов в растворе методом МУРН [71]. При структурных исследованиях биологических объектов при высоком давлении метод МУРН имеет существенное преимущество перед аналогичным методом МУРР, поскольку широкий ряд материалов — титан, титан-циркониевые сплавы, алюминий, кварц, сапфир — обладают сравнительно низким сечением поглощения и рассеяния тепловых нейтронов, что предоставляет возможность создания прочных и прозрачных для тепловых нейтронов систем окружения образца.

В последнее время проведены успешные исследования фазовых переходов модельных липидных систем с помощью Р-V-T- и МУРН-методов. Так, например, липид ДПФХ в легкой и тяжелой воде был исследован при помощи МУРН при высоких давлениях (от 10 до 400 бар). Показа-

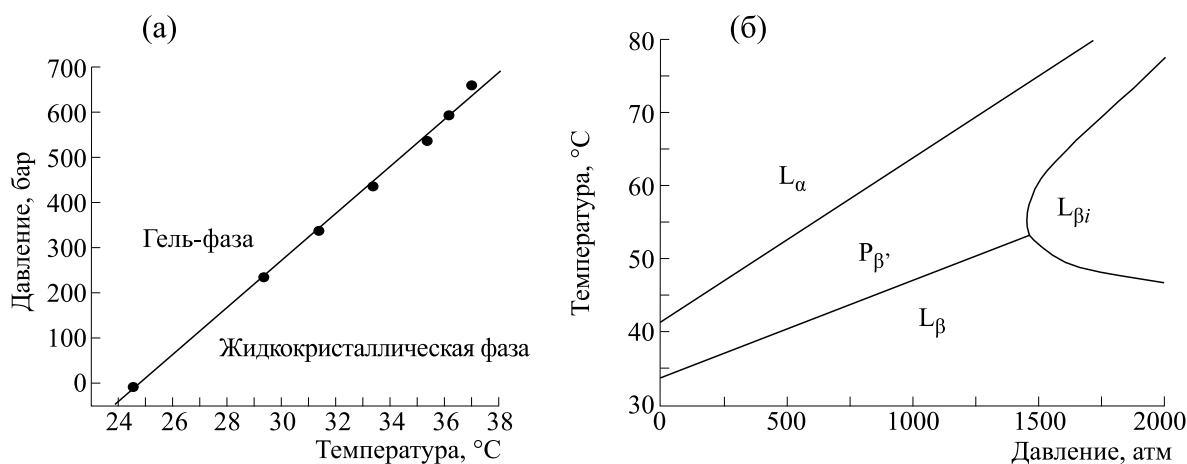


Рис. 6. Фазовые диаграммы ДПФХ: (а) — в диапазоне давлений от 1 до 800 бар и диапазоне температур от 30 до 80°C [73], (б) — в диапазоне давлений 0–2000 атм. и диапазоне температур от 30 до 80°C [74].

но увеличение площади, приходящейся на одну липидную головку, на $6 \text{ \AA}^2$ при фазовом переходе из «рипл-фазы» в жидкокристаллическую фазу [72]. Также многослойные везикулы, образованные липидом ДПФХ, исследовали в более широком диапазоне давлений (от 1 до 800 бар) и температур (20–40°C) в работе [73]. Показано характерное смещение дифракционного пика, соответствующего периоду повторяемости (толщине липидного бислоя и водной прослойки между бислоями), полученного методом МУРР при 20 и 40°C, а также построена фазовая диаграмма в области от 0 до 700 бар и от 23 до 38°C (рис. 6а). По результатам аналогичных исследований в работе [74] показана фазовая диаграмма в диапазоне 0–2000 атм. от 30 до 80°C для четырех фазовых состояния ДПФХ в водном растворе (рис. 6б).

Подробно исследования липидных систем 1,2-дипальмитоилфосфатидилхолин/1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ/ПОФХ) при различных температурах и давлениях описано в работе [75]. Дополнительным инструментом при исследовании биологических объектов методом МУР является метод денсиметрии [76]. Изменение параметров липидных везикул вблизи температуры фазового перехода рассмотрено в работе [77].

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ

Метод МУР может быть эффективно использован для характеристики липидных мезофаз, используемых при кристаллизации мембранных белков. Так, например, показано успешное применение МУР при исследовании кристаллизации бактериородопсина, определен тип симметрии $Pn3m$ липидной кубической фазы в течение всего времени кристаллообразования [78]. Показана

возможность кристаллизации мембранных белков в новых синтезированных матрикс-образующих липидах [79], а также в бицеллах [80] и в нанодисках [81]. Липидные кубические фазы были охарактеризованы методом малоуглового рассеяния, проведена кристаллизация бактериородопсина в липидных кубических фазах из новых матрикс-образующих липидов и получен новый тип кристаллической упаковки бактериородопсина.

В ряде работ показана возможность высокоэффективной характеристики липидных кубических фаз методом малоуглового рассеяния нейтронов, проведены эксперименты в различных условиях, которые позволяют исследовать проблему увеличения диаметров водных каналов в липидных кубических фазах — основную проблему при кристаллизации больших мембранных белковых комплексов методом *in meso* [82–84].

Комплементарно методу МУР может быть использована рамановская спектроскопия белковых кристаллов [85], которая имеет множество применений, начиная от изучения биологических систем и заканчивая медицинскими приложениями. Работа [85] основана на публикации [86] по детектированию субмикронных кристаллов мембранных белков методом когерентного анти-стоксового рамановского рассеяния.

Одним из расширений возможностей белковой кристаллизации является подход, описанный в работе [81], где показана возможность кристаллизации мембранных белков, встроенных в нанодиски, в липидных мезофазах. Еще одним вариантом является кристаллизация мембранных белков из амфигольного окружения [87].

Таким образом, метод МУР активно используется для улучшения методов кристаллизации мембранных белков в липидных мезофазах; для характеристики липидных кубических фаз и

определения параметров решеток различных матрикс-образующих липидов в различных условиях; для исследования мембранных белков, встроенных в нанодиски или амфиполи для доказательства идентичности структурной организации биологических объектов в растворе и в кристаллической решетке.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ

Исследования мембранных систем методом МУР позволяют решать широкий спектр задач. Успешно исследуются липидные и липид-белковые системы. Интересны исследования фоточувствительных мембранных белков родопсинов, которые представляют огромный интерес как с точки зрения фундаментальной биологии и прикладных медицинских применений (например, начиная с оптогенетики [88–93] и заканчивая биоэнергетикой [94]).

Например, исследование структурной организации [95] и супрамолекулярной организации [96] зрительного пигмента родопсина в фоторецепторной модельной мембране методом малоуглового рассеяния нейтронов с вариацией контраста показало наличие во фрагментах «палочек» слоистой структуры с размерами, соответствующими поперечному размеру «дисков». Было показано что родопсин равномерно распределен в мембране, так же, как и в случае с образцами «дисков» выделенных из фрагментов «палочек». Зрительный пигмент родопсин является типичным представителем огромного семейства рецепторов, сопряженных с G-белками. Эти рецепторы в мембране функционируют в димерном или олигомерном состоянии. Однако для родопсина и всего класса A родопсин-подобных рецепторов, сопряженных с G-белками, функциональная роль димерного состояния до сих пор не установлена [95].

Для понимания фундаментальных процессов липид-белкового взаимодействия важны исследования модельных мембран [97]. Например, широко применяются эксперименты методом МУР для определения толщины мембраны и ее изменения при различных условиях (рН, температура, ионная сила, добавки). Толщину мембраны можно легко измерить методом МУР. Например, влияние *n*-декана на толщину липидного бислоя 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ДОФХ) было измерено методом МУР и составило около 2.4 Å [98, 99] (рис. 7), влияние N,N-диметил-N-алкил амин-N-оксидов на бислои ДОФХ также было измерено методом МУР [100].

Методом МУР было исследовано влияние на модельные липидные мембраны различных веществ: ионов [101], антибиотиков [102], холесте-

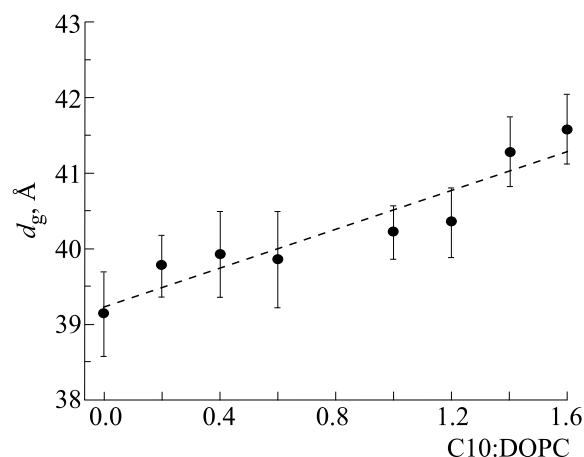


Рис. 7. Влияние *n*-декана на толщину мембраны, сформированной из ДОФХ [98].

рола или мелатонина [103, 104], фруктанов (полимеров фруктозы) [105]; также были исследованы пространственные структуры белков, встроенных в липосомы, например, димерного трансмембранного домена рецептора фактора роста [106].

Существует интересное направление исследований методом МУР фазовых переходов в липидных системах. Так, например, показано необычное поведение параметра расстояния между липидными бислоями в окрестности главного фазового перехода и подчеркнута важность критических флуктуаций [107], исследовано влияние ионов кальция на фазовые переходы в модельных липидных системах [108]. Были исследованы структурные изменения в мембранах, составленных из цвиттер-ионных фосфолипидов различной латеральной площади (ДМФХ, ДПФХ, ПОФХ, ДОФХ) при добавлении биологически значимых катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Co^{2+} . На основе полученных структурных параметров этих липидных бислоев были предложены различные механизмы липид-ионных взаимодействий, которые регулируются посредством латеральной площади, т.е. плотностью упаковки мембраны. В бислоях с плотной упаковкой фосфолипидов (сформированных из ДМФХ и ДПФХ) среднее межлипидное расстояние достаточно мало, что приводит к формированию ионных мостиков «липид–ион–липид», уплотняющих мембрану [109, 110]. С другой стороны, в липидном бислое с менее плотной упаковкой (сформированных из ДОФХ) ионы преимущественно связываются с липидами отдельно (липид-ионные пары), что повышает разупорядоченность липидного бислоя [110]. В случае ПОФХ, среднее межлипидное расстояние в котором примерно равно длине отсечки липид-ионных взаимодействий, соответствующей латеральной площади $\sim 64 \text{ Å}^2$, реализуется смешан-

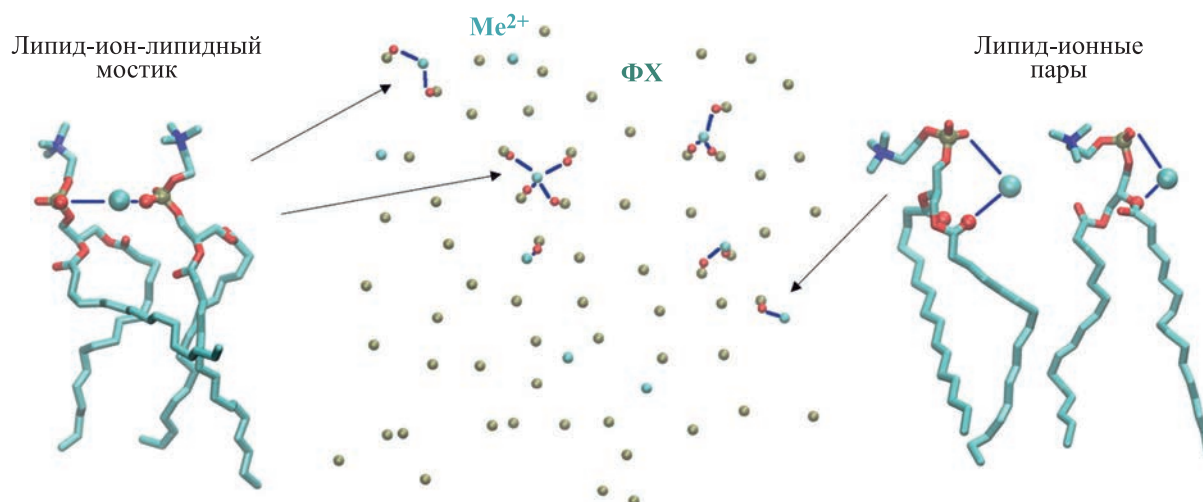


Рис. 8. Предложенные типы липид-ионных взаимодействий, реализующиеся в бислоях с различной плотностью упаковки липидов.

ный тип взаимодействий, при котором влияние ионных мостиков и липид-ионных пар на структуру мембраны взаимно компенсируется (рис. 8) [101].

Еще одним направлением исследований мембранных систем методом МУР является исследование клеточных мембранных органелл, таких как митохондрии [111]. С помощью метода МУРН удалось обнаружить изменение структурной организации митохондриальных крист при осмотическом набухании органелл. Серия работ показывает что в митохондриальных кристах при осмотическом набухании происходит перестройка внутренних мембран митохондрий от ламеллярной к гексагональной упаковке. Данные также подтверждены методом электронной микроскопии [112–114]. Дополнительно исследованы субмитохондриальные частицы методом МУРН, получены их основные характеристики, в частности, установлена толщина мембраны, равная $52.4 \pm 0.7 \text{ \AA}$ [115].

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФРАКТАЛЬНЫХ СТРУКТУР МЕТОДОМ МУР

Фрактальные структуры представляют собой множества объектов, обладающих самоподобием. Другими словами, часть такого множества подобна целому на любых масштабах. Крайне интересно исследовать такие объекты с точки зрения математики, однако, еще более интересно изучать фрактальные структуры в биологических системах. Для исследования фрактальных структур в биологии также можно использовать метод МУР [116, 117].

Фрактальная организация имеет важное значение для понимания механизмов функциониро-

вания биологических систем. Например, на основе работы [116] с использованием спектрометра ЮМО были проведены сравнительные исследования упаковки хроматина на границе фрактального режима (в области малых размеров) в ядрах нормально пролиферирующих и опухолевых клеток [118], а позднее показано, что изменение фрактальных параметров хроматина может являться одним из механизмов эпигенетической регуляции [119].

При исследовании ядер эритроцитов курицы [120] выяснилось, что кривая малоуглового рассеяния ведет себя линейно в «log-log»-представлении интенсивности рассеяния (I) в широком диапазоне значений модуля вектора рассеяния (Q). Такое поведение $I(Q)$ может свидетельствовать о фрактальном характере организации структуры ядер эритроцитов курицы. Поскольку биологические объекты могут быть исключительно монодисперсными [6], для анализа данных необходимо использовать подход детерминистских фракталов, который подробно описан в серии работ [116, 121–125].

Также достаточно подробно описаны работы по исследованию конкретных фрактальных структур. Например, исследование фракталов Вичека [116], множества Кантора [126] или снежинки Коха [127]. Рассмотрены случаи мультифазных фракталов [128] и показано применение вышеописанных подходов для исследования реальных структур, например, композитных мембран [129] (рис. 9).

РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ

Исследование биологических объектов методами малоуглового рассеяния открывают широ-

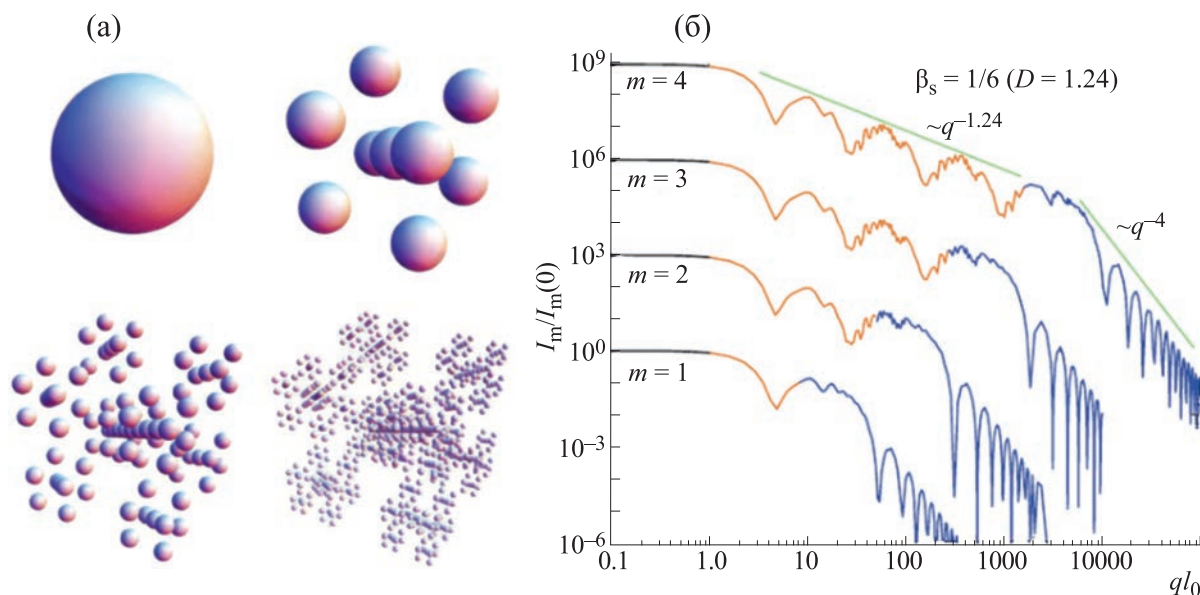


Рис. 9. Обобщенные самоподобные фракталы Вичека: (а) — инициатор и первые три итерации фрактала; (б) — интенсивность рассеяния для первых четырех итераций фрактала [121].

кие возможности развития методов в различных областях, начиная от фундаментальной биологии, структурной биологии, заканчивая биотехнологией и медицинскими приложениями.

В работе [130] показана возможность проведения высокоэффективных экспериментов по малоугловому нейтронному рассеянию на двухдетекторной системе на установке ЮМО. Сравнительный анализ методов МУРН и МУРР показал возможность комплементарного использования рентгеновского и нейтронного рассеяния для решения задач структурной организации белков [131].

Для водорастворимых белков были показаны возможности развития метода малоуглового рассеяния, соединенного с гель-фильтрацией [6], а для мембранных белковых комплексов продемонстрирована важность учета детергентного пояса в мембранной части белкового комплекса при анализе данных МУР и восстановлении трехмерной структуры белкового комплекса [64]. Также разработан метод нахождения основных структурных параметров для спиралевидных структур белковых комплексов на примере белков ResA [132].

Метод МУР также может быть полезен в развитии методов кристаллизации мембранных белков в липидных мезо фазах [79] благодаря высокоэффективной характеристике липидных мезофаз с определением параметра решетки и классификацией типа симметрии. Также потенциально возможно использовать метод МУР при детектировании микрокристаллов белков. Уже существует и разрабатывается ряд методов для ре-

шения аналогичных задач, например детектирование кристаллов с помощью рамановского рассеяния [85], однако метод МУР может оказаться более высокоэффективным и производительным методом, поскольку детектирование дифракционных пиков в образце требует гораздо меньше времени для сбора статистики, чем определение форм-фактора частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейтроны очень деликатны к биологическим объектам, органеллам и тканям. Нейтроны могут широко использоваться для специальных камер, начиная от температурных и заканчивая толсто-стенными камерами для измерений при высоких давлениях. А главное, нейтроны широко используются в так называемом методе вариации контраста и методе меток. Действительно, смесь растворов легкой и тяжелой воды может либо контрастировать часть объекта, либо, наоборот, скрывать лишние детали. Это открывает широкий простор для работы с белками, находящимися в олигомерном состоянии. Дополнительный бонус за счет контрастирования достигается из-за разных концентраций протонов в легкой воде и дейтерия в тяжелой воде (рН и рD соответственно). Это, в свою очередь, усложняет анализ данных, однако открывает новый вектор в исследованиях. Незначительное (до 10%) отличие в свойствах тяжелой воды от легкой может использоваться и для контроля гравиметрического поведения образцов. Всплывание-осаждение и, вообще, равновесное состояние образца харак-

терно для биологических объектов. Применение разноточных легкой и тяжелой воды позволяет частично компенсировать этот эффект для, например, липидных мембран. И, наконец, вариация контраста — пожалуй, единственный метод позволяющий оценить плотности исследуемых объектов на наномасштабной шкале. Таким образом, ожидается дальнейшее увеличение спроса на измерительное время на малоугловых нейтронных установках.

В нашем обзоре мы отметили, что использование МУР принципиально важно для решения задач, связанных с олигомеризацией и с пониманием ограниченности парадигмы «один белок — одна функция». Следовательно, поле применимости МУР становится существенно шире для задач структурной биологии. Метод МУРН имеет свои достоинства и преимущества и является комплементарным к МУРР. Начиная с того факта, что профиль плотности длины рассеяния для мембран и мембранных белков при измерениях методом МУРР довольно сложен по сравнению с профилем плотности при измерениях методом МУРН. Мы предлагаем внедрение МУР в практику биотехнологических работ для контроля качества сборки белков и белковых комплексов, а также тестирования идентичности структурной организации биологических объектов в нативном состоянии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Обзор применимости МУР для исследования образования комплексов LuxR-белков был подготовлен при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1164.2022.1.4. Написание главы «Контроль структурной организации белков и белковых комплексов в биотехнологии» выполнено при финансировании Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект 1022060200069-0-1.6.2; 1.6.4; 1.6.5; 1.6.10; 1.6.19 по теме «Разработка технологии рационального и высокопродуктивного использования агро- и биоресурсов, их эффективной переработки и получения безопасных и качественных источников пищевых и не пищевых продуктов»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. I. Kuklin, O. I. Ivankov, A. V. Rogachev, et al., *Crystallogr. Rep.*, **66** (2), 231 (2021). DOI: 10.1134/S1063774521020085
2. Ю. М. Останевич и И. Н. Сердюк, *Успехи физ. наук*, **137** (5), 85 (1982). DOI: 10.3367/UFNR.0137.198205D.0085
3. A. I. Kuklin, A. N. Ozerin, A. Kh. Islamov, et al., *J. Appl. Crystallogr.*, **36** (3), 679 (2003). DOI: 10.1107/S0021889803006186
4. A. I. Kuklin, A. D. Rogov, Y. E. Gorshkova, et al., *Phys. Part. Nuclei Lett.*, **8** (2), 119 (2011). DOI: 10.1134/S1547477111020075
5. T. N. Murugova, A. V. Vlasov, O. I. Ivankov, et al., *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, **17** (9–10), 1397 (2015).
6. D. V. Zabelskii, A. V. Vlasov, Yu. L. Ryzhykau, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **994** (1), 012017 (2018). DOI: 10.1088/1742-6596/994/1/012017
7. А. И. Куклин, А. Д. Рогов, Ю. Е. Горшкова и др., *Письма в ЭЧАЯ*, **8** (2), 200 (2011).
8. A. I. Kuklin, A. K. Islamov, and V. I. Gordeliy, *Neutron News*, **16** (3), 16 (2005). DOI: 10.1080/10448630500454361
9. А. И. Куклин, А. Х. Исламов, Ю. С. Ковалев и др., *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, № 6, 74 (2006).
10. Б. Н. Ананьев, А. Б. Кунченко, В. И. Лазин и др., *Отчет ОИЯИ № 3-11502* (1978), http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:9414980.
11. Б. Н. Ананьев, Ю. М. Останевич и Е. Я. Пикельнер, *Авт. свид. № 690959* от 14 июня 1979 г.
12. A. G. Soloviev, T. M. Solovjeva, O. I. Ivankov, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **848** (1), 012020 (2017). DOI: 10.1088/1742-6596/848/1/012020
13. А. Г. Соловьев, Т. М. Соловьева, А. В. Стадник и др., *Сообщения ОИЯИ*, P10-2003–86 (2003).
14. D. Pignol, L. Ayzavian, B. Kerfelec, et al., *J. Biol. Chem.*, **275** (6), 4220 (2000). DOI: 10.1074/jbc.275.6.4220
15. T. Maruyama, M. Nakajima, S. Ichikawa, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (4), 1003 (2014). DOI: 10.1271/BBB.65.1003
16. R. Høiberg-Nielsen, P. Westh, and L. Arleth, *Biophys. J.*, **96** (1), 153 (2009). DOI: 10.1529/BIOPHYSJ.108.136408
17. M. Kozak, *Biopolymers*, **83** (6), 668 (2006). DOI: 10.1002/BIP.20605
18. D. E. Stephens, S. Singh, and K. Permaul, *FEMS Microbiol. Lett.*, **293** (1), 42 (2009). DOI: 10.1111/J.1574-6968.2009.01519.X
19. N. P. Chandrasekharan, C. M. Ravenburg, I. R. Roy, et al., *Acta Crystallogr. D: Struct. Biol.*, **76** (4), 357 (2020). DOI: 10.1107/S2059798320002016
20. T. Wu, Q. Jiang, D. Wu, et al., *Food Chem.*, **274**, 698 (2019). DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2018.09.017
21. A. Stradner, F. Cardinaux, and P. Schurtenberger, *J. Phys. Chem. B*, **110** (42), 21222 (2006). DOI: 10.1021/JP0639804
22. Q. Han, K. M. Smith, C. Darmanin, et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **585**, 433 (2021). DOI: 10.1016/J.JCIS.2020.10.024

23. A. Stenstam, G. Montalvo, I. Grillo, and M. Gradziel-ski, *J. Phys. Chem. B*, **107** (44), 12331 (2003). DOI: 10.1021/JP0352783
24. H. Saibil, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **14** (10), 630 (2013). DOI: 10.1038/nrm3658
25. V. V. Sudarev, S. M. Dolotova, S. M. Bukhalovich, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **224** (1), 319 (2022). DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.10.126
26. E. Gnuchikh, A. Baranova, V. Schukina, et al., *PLoS One*, **14** (12), e0226576 (2019). DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0226576
27. E. Y. Gnuchikh, I. V. Manukhov, and G. B. Zavil-gelsky, *Russ. J. Genet.*, **56** (9), 1070 (2020). DOI: 10.1134/S1022795420090070
28. M. N. Konopleva, S. A. Khrulnova, A. Baranova, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **473** (4), 1158 (2016). DOI: 10.1016/J.BBRC.2016.04.032
29. G. B. Zavilgelsky, V. Y. Kotova, M. M. Mazhul', and I. V. Manukhov, *Biochemistry (Moscow)*, **67** (9), 986 (2002). DOI: 10.1023/A:1020565701210
30. Е. Ю. Гнучих, И. В. Манухов и Г. Б. Завильгель-ский, *Биотехнология*, **36** (6), 68 (2020). DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-68-77
31. T. Inobe, M. Arai, M. Nakao, et al., *J. Mol. Biol.*, **327** (1), 183 (2003). DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00087-1
32. D. V. Zabelskii, A. V. Vlasov, Yu. L. Ryzhykau, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **994** (1), 012017 (2018). DOI: 10.1088/1742-6596/994/1/012017
33. T. N. Murugova, A. V. Vlasov, O. I. Ivankov, et al., *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, **17**, 1397 (2015).
34. A. S. Kazantsev, A. V. Vlasov, Y. L. Ryzhykau, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 548 (2018).
35. A. Vlasov, A. Vlasova, S. Bazhenov, et al., in *Proc. 2nd Int. Online Conf. on Crystals (Basel, Switzerland, 2020)*, p. 8466. DOI: 10.3390/IOCC_2020-08466
36. M. Bălăsoiu, S.V. Stolyar, R.S. Iskhakov, et al., *Rom. J. Phys.*, **55** (7–8), 782 (2010).
37. L. Anghel, M. Balasoiu, L. A. Ishchenko, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **351** (1), 012005 (2012). DOI: 10.1088/1742-6596/351/1/012005
38. B. S. Pattni, V. V. Chupin, and V. P. Torchilin, *Chem. Rev.*, **115** (19), 10938 (2015). DOI: 10.1021/ACS.CHEMREV.5B00046
39. A. E. Schmidt, A. V. Shvetsov, A. I. Kuklin, et al., *Crys-tallogr. Rep.*, **61** (1), 149 (2016). DOI: 10.1134/S1063774516010223
40. V. V. Egorov, A. A. Shaldzhyan, A. N. Gorshkov, et al., *J. Surf. Investig.*, **10** (2), 322 (2016). DOI: 10.1134/S1027451016020063
41. T. Kondela, P. Hrubovčák, D. Soloviov, et al., *Springer Proc. Physics*, **266**, 265 (2022). DOI: 10.1007/978-3-030-80924-9_10
42. O. M. Selivanova, A. K. Surin, Yu. L. Ryzhykau, et al., *Langmuir*, **34** (6), 2332 (2018). DOI: 10.1021/acs.lang-muir.7b03393
43. V. V. Egorov, Y. A. Zabrodskaya, D. V. Lebedev, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **848** (1), 012022 (2017). DOI: 10.1088/1742-6596/848/1/012022
44. O. I. Ivankov, E. V. Ermakova, T. N. Murugova, et al., *Adv. Biomembranes Lipid Self-Assembly*, **31**, 185 (2020). DOI: 10.1016/BS.ABL.2020.02.002
45. O. Ivankov, T. N. Murugova, E. V. Ermakova, et al., *Sci. Rep.*, **11** (1), 1 (2021), DOI: 10.1038/s41598-021-01347-7
46. V. V. Kadochnikov, V. V. Egorov, A. V. Shvetsov, et al., *Crystallogr. Rep.*, **61** (1), 98 (2016). DOI: 10.1134/S1063774516010089
47. Я. А. Забродская, Ю.Е. Горшкова, А.-П. С. Шуры-гина и др., *Кристаллография*, **66** (6), 902 (2021). DOI: 10.31857/S0023476121050258
48. O. Ivankov, T. N. Murugova, E. V. Ermakova, et al., *Sci. Rep.*, **11** (1), 1 (2021), DOI: 10.1038/s41598-021-01347-7
49. Y. L. Ryzhykau, Ph. S. Orekhov, M. I. Rulev, et al., *Sci. Rep.*, **11** (1), 10774 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-89613-6
50. A. V. Vlasov, S. D. Osipov, N. A. Bondarev, et al., *Cell. Mol. Life Sci.*, **79** (3), 1 (2022). DOI: 10.1007/S00018-022-04153-0
51. A. V. Vlasov, K. V. Kovalev, S.-H. Marx, et al., *Sci. Rep.*, **9** (1), 18547 (2019), DOI: 10.1038/s41598-019-55092-z
52. A. V. Vlasov, Y. L. Ryzhykau, V. I. Gordeliy, and A. I. Kuklin, *FEBS J.*, **284** (s1), 87 (2017).
53. G. V. Tsoraev, E. A. Protasova, E. A. Klimanova, et al., *Struct. Dynamics*, **9** (5), 054701 (2022). DOI: 10.1063/4.0000164
54. Y. V. Khramtsov, A. D. Vlasova, A. V. Vlasov, et al., *Acta Crystallogr. D: Struct. Biol.*, **76** (12), 1270 (2020). DOI: 10.1107/S2059798320013765
55. A. I. Kuklin, A. V. Vlasov, Yu. L. Ryzhykau, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 129 (2018).
56. A. Vlasov, Y. Kovalev, Y. Ryzhykau, et al., *FEBS J.*, **283** (S1), 218 (2016).
57. J. M. Tokuda, S. A. Pabit, and L. Pollack, *Biophys. Rev.*, **8** (2), 139 (2016). DOI: 10.1007/S12551-016-0196-8/FIGURES/3
58. T. R. Patel, G. Chojnowski, Astha, et al., *Methods*, **118–119**, 146 (2017). DOI: 10.1016/J.JMETH.2016.12.002
59. J. Zhang, B. Liu, D. Gu, et al., *Nucl. Acids Res.*, **49** (6), 3274 (2021). DOI: 10.1093/NAR/GKAB150
60. S. V. Bazhenov, E. S. Scheglova, V. V. Fomin, et al., *Russ. J. Genetics*, **58** (2), 143 (2022). DOI: 10.1134/S1022795422020028
61. Г. Б. Завильгельский и И. В. Манухов, *Генетика*, **30** (3), 337 (1994).
62. M. N. Konopleva, S. A. Khrulnova, A. Baranova, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **473** (4), 1158 (2016). DOI: 10.1016/J.BBRC.2016.04.032
63. A. M. Stevens, Y. Queneau, L. Soulère, et al., *Chem. Rev.*, **111** (1), 4 (2011). DOI: 10.1021/CR100064S
64. Y. L. Ryzhykau, A. V. Vlasov, P. S. Orekhov, et al., *Acta Crystallogr. D: Struct. Biol.*, **77** (11), 1386 (2021). DOI: 10.1107/s2059798321009542
65. Y. L. Ryzhykau, M. Y. Nikolaev, D. V. Zabelskii, et al., *FEBS J.*, **284**, 154 (2017).
66. Yu. L. Ryzhykau, M. I. Rulev, D. V. Zabelskii, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 577 (2018).
67. Y. L. Ryzhykau, in *Life Sciences at Frank Laboratory of Neutron Physics*, Ed. by N. Kučerka, O. Culicov, D. Chudoba, et al. (Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, 2021), pp. 12–13.
68. V. Nazarenko, A. Remeeva, Yu. Ryzhykau, et al., *FASEB J.*, **35** (S1), 05129 (2021). DOI: 10.1096/FASE-BJ.2021.35.S1.05129

69. C. R. Haramagatti, A. Islamov, H. Gibhardt, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8** (8), 994 (2006). DOI: 10.1039/B513588E
70. N. Gorski, J. Kalus, A. I. Kuklin, and L. S. Smirnov, *J. Appl. Cryst.*, **30** (5), 739 (1997). DOI: 10.1107/S0021889897002860
71. N. I. Gorski, A. N. Ivanov, A. I. Kuklin, and L. S. Smirnov, *High Pressure Res.*, **14** (1–3), 215 (2006). DOI: 10.1080/08957959508200922
72. D. Soloviov, Y. Zabashta, L. Bulavin, et al., *Macromol. Symp.*, **335** (1), 58 (2014). DOI: 10.1002/MASY.201200122
73. D. V. Solov'ev, A. I. Kuklin, P. K. Utrobin, et al., *J. Surf. Investig.*, **5** (1), 7 (2011). DOI: 10.1134/S1027451011010174
74. D. V. Soloviov, L. Bulavin, V. I. Gordeliy, et al., *Nucl. Phys. Atom. Energy*, **13** (1), 83 (2012).
75. D. V. Soloviov, Yu. E. Gorshkova, O. I. Ivankov, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **351** (1), 012010 (2012). DOI: 10.1088/1742-6596/351/1/012010
76. V. V. Skoi, M. I. Rulev, A. S. Kazantsev, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 584 (2018).
77. M. Rulev, A. A. Pavlova, O. I. Ivankov, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 569 (2018).
78. R. Efremov, G. Shiryaeva, G. Bueldt, et al., *J. Cryst. Growth*, **275** (1–2), e1453 (2005). DOI: 10.1016/J.JCRYSGRO.2004.11.235
79. A. Ishchenko, L. Peng, E. Zinovev, et al., *Cryst. Growth Des.*, **17** (6), 3502 (2017). DOI: 10.1021/acs.cgd.7b00458
80. T. N. Murugova, O. I. Ivankov, Yu. L. Ryzhykau, et al., *Sci. Rep.*, **12** (1), 11109 (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-13945-0
81. M. Nikolaev, E. Round, I. Gushchin, et al., *Cryst. Growth Des.*, **17** (3), 945 (2017). DOI: 10.1021/acs.cgd.6b01631
82. A. Vlasov, et al., in *Abstr. VII Eur. Conf. on Neutron Scattering* (St-Petersburg, 2019), p. 631.
83. A. V. Vlasov, et al., *FEBS J.*, **282** (SI 1), 234 (2015).
84. Yu. L. Ryzhykau, et al., *FEBS J.*, **282** (SI 1), 235 (2015).
85. A. V. Vlasov, N. L. Maliar, S. V. Bazhenov, et al., *Crys-tals (Basel)*, **10** (1), 38 (2020). DOI: 10.3390/cryst10010038
86. G. M. Arzumanyan, N. V. Doroshkevich, K. Z. Matmatkulov, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **138** (41), 13457 (2016). DOI: 10.1021/jacs.6b04464
87. V. Polovinkin, I. Gushchin, M. Sintsov, et al., *J. Mem-brane Biol.*, **247** (9–10), 997 (2014). DOI: 10.1007/s00232-014-9700-x
88. R. Astashkin, K. Kovalev, S. Bukhdruker, et al., *Nature Commun.*, **13** (1), 6460 (2022). DOI: 10.1038/s41467-022-34019-9
89. V. Borshchevskiy, K. Kovalev, E. Round, et al., *Nature Struct. Mol. Biol.*, **29** (5), 440 (2022). DOI: 10.1038/s41594-022-00762-2
90. T. Balandin, D. Volkov, A. Alekseev, et al., *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 109 (2022). DOI: 10.1007/978-1-0716-2329-9_5
91. T. I. Rokitskaya, N. L. Maliar, S. A. Siletsky, et al., *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 259 (2022). DOI: 10.1007/978-1-0716-2329-9_12
92. K. Kovalev, R. Astashkin, V. Gordeliy, and V. Cherezov, *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 125 (2022). DOI: 10.1007/978-1-0716-2329-9_6
93. A. Alekseev, V. Gordeliy, and E. Bamberg, *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 71 (2022). DOI: 10.1007/978-1-0716-2329-9_3
94. A. V. Vlasov, Y. S. Kovalev, P. K. Utrobin, et al., *Opto-electron. Adv. Mater., Rapid Commun.*, **11** (1–2), 65 (2017).
95. T. B. Feldman, O. I. Ivankov, T. N. Murugova, et al., *Dokl. Biochem. Biophys.*, **465**, 420 (2016). DOI: 10.1134/S1607672915060186
96. T. B. Feldman, O. I. Ivankov, A. I. Kuklin, et al., *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, **1861** (10), 183000 (2019). DOI: 10.1016/J.BBAMEM.2019.05.022
97. V. I. Gordeliy, L. V. Golubchikova, A. I. Kuklin, et al., *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **93**, 252 (1993).
98. D. Uhríková, N. Kučerka, A. Islamov, et al., *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, **1611** (1–2), 31 (2003). DOI: 10.1016/S0005-2736(02)00705-8
99. D. Uhríková, P. Balgavý, N. Kučerka, et al., *Biophys. Chem.*, **88** (1–3), 165 (2000). DOI: 10.1016/S0301-4622(00)00211-8
100. M. Belička, N. Kučerka, D. Uhríková, et al., *Eur. Bio-phys. J.*, **43**, 179 (2014). DOI: 10.1007/S00249-014-0954-0
101. S. Kurakin, O. Ivankov, V. Skoi, et al., *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 680 (2022). DOI: 10.3389/FMOLB.2022.926591/BIBTEX
102. M. Hereć, A. Islamov, A. Kuklin, et al., *Chem. Phys. Lipids*, **147** (2), 78 (2007). DOI: 10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2007.03.007
103. J. Gallová, D. Uhríková, A. Islamov, et al., *Gen. Physiol. Biophys.*, **23**, 113 (2004).
104. T. Murugova, O. Ivankov, E. Ermakova, et al., *Gen. Physiol. Biophys.*, **39** (2), 135 (2020). DOI: 10.4149/GPB_2019054
105. I. J. Vereyken, V. Chupin, A. Islamov, et al., *Biophys. J.*, **85** (5), 3058 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74724-9
106. E. V. Bocharov, K. S. Mineev, P. E. Volynsky, et al., *J. Biol. Chem.*, **283** (11), 6950 (2008). DOI: 10.1074/jbc.M709202200
107. A. Kuklin, D. Zabelskii, I. Gordeliy, et al., *Sci. Rep.*, **10** (1), 5749 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-62577-9
108. Y. E. Gorshkova, A. I. Kuklin, and V. I. Gordeliy, *J. Surf. Investig.*, **11** (1), 27 (2017). DOI: 10.1134/S1027451016050499
109. S. A. Kurakin, E. V. Ermakova, A. I. Ivankov, et al., *J. Surf. Investig.*, **15** (2), 211 (2021). DOI: 10.1134/S1027451021020075
110. N. Kucerka, E. Ermakova, E. Dushanov, et al., *Lang-muir*, **37** (1), 278 (2021). DOI: 10.1021/ACS.LANG-MUIR.0C02876
111. T. N. Murugova, I. M. Solodovnikova, V. I. Yurkov, et al., *Neutron News*, **22** (3), 11 (2011). DOI: 10.1080/10448632.2011.598800
112. T. N. Murugova, V. I. Gordeliy, A. K. Islamov, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 524 (2006).
113. Т. Н. Муругова, В. И. Горделий, А. И. Ку克林 и др., *Кристаллография*, **52** (3), 545 (2007).
114. T. N. Murugova, V. I. Gordeliy, A. I. Kuklin, et al., *Crystallogr. Rep.*, **52**, 521 (2007). DOI: 10.1134/S1063774507030339
115. T. N. Murugova, V. I. Gordeliy, A. K. Islamov, et al., *Materials Structure*, **13** (2), 68 (2006).

116. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *Phys. Rev. E*, **106** (2), 024108 (2022). DOI: 10.1103/PHYSREVE.106.024108
117. M. Bălăsoiu and G. M. Arzumanyan, *Modern Trends in Nanoscience* (Editura Academiei Române, Bucharest, 2013).
118. В. В. Исаев-Иванов и др., *Физика твердого тела*, **52** (5), 996 (2010).
119. D. V. Lebedev, Ya. A. Zabrodskaia, V. Pipich, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **520** (1), 136 (2019). DOI: 10.1016/J.BBRC.2019.09.116
120. D. V. Lebedev, M. V. Filatov, A. I. Kuklin, et al., *Crystallogr. Rep.*, **53** (1), 110 (2008). DOI: 10.1134/S1063774508010136
121. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *Phys. Rev. E*, **84** (3), 036203 (2011). DOI: 10.1103/PHYSREVE.84.036203
122. E. M. Anitas, V. A. Osipov, A. I. Kuklin, and A. Yu. Cherny, *Rom. J. Phys.*, **61** (3–4), 457 (2016).
123. A. Yu. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *Rom. J. Phys.*, **60** (5–6), 658 (2015).
124. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, A. I. Kuklin, et al., *J. Surf. Investig.*, **4** (6), 903 (2010). DOI: 10.1134/S1027451010060054
125. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *J. Appl. Crystallogr.*, **50** (3), 919 (2017). DOI: 10.1107/S1600576717005696
126. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, A. I. Kuklin, et al., *J. Appl. Crystallogr.*, **43** (4), 790 (2010). DOI: 10.1107/S0021889810014184
127. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **19** (3), 2261 (2017). DOI: 10.1039/C6CP07496K
128. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *J. Appl. Crystallogr.*, **47** (1), 198 (2014). DOI: 10.1107/S1600576713029956
129. E. M. Anitas, I. Bica, R. V. Erhan, et al., *Rom. Journ. Phys.*, **60** (5–6), 653 (2015).
130. A. I. Kuklin, A. I. Ivankov, D. V. Soloviov, et al., *J. Phys. Conf. Ser.*, **994** (1), 012016 (2018). DOI: 10.1088/1742-6596/994/1/012016
131. A. I. Kuklin, T. N. Murugova, O. I. Ivankov, et al., *J. Phys. Conf. Ser.*, **351** (1), 012009 (2012). DOI: 10.1088/1742-6596/351/1/012009
132. D. V. Lebedev, D. M. Baitin, A. Kh. Islamov, et al., *FEBS Lett.*, **537** (1–3), 182 (2003). DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00107-8

Possibilities of Studying Biological Objects on a Pulsed Reactor

A.V. Vlasov*, **, Yu.L. Ryzykau*, **, I.V. Manukhov, S.V. Bazhenov**, S.A. Kurakin*, ***, T.N. Murugova*, A.I. Ivankov*, V.V. Skoy*, A.V. Rogachev*, D.P. Verteletskiy****, A.Kh. Islamov*, N. Kucherka*, *****, V.I. Gordeliy*, and A.I. Kuklin***

*Joint Institute for Nuclear Research, ul. Joliot-Curie 6, Dubna, Moscow region, 141980 Russia

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

***Institute of Physics, Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 16a, Kazan, 420111 Russia

****Mainchemproject South, LLC, Yerevan 0051, Armenia

*****Department of Physical Chemistry of Drugs, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, 832 32, Bratislava, Slovakia

Small-angle scattering makes it possible to solve structural biology problems without specific sample preparation, which is typical for methods such as X-ray diffraction of protein crystals or cryo-electron microscopy of proteins. In our review, it is shown how to use small-angle scattering to address biological problems. The use of small-angle scattering is suggested for applications as a tool to control the quality of the assembly of proteins and protein complexes and to test the identity of the structural organization of biological objects in the native state and in prepared samples before measurements by X-ray diffraction or cryo-electron microscopy. This work demonstrates the possibilities of the small-angle neutron scattering spectrometer YuMO based on the IBR-2 pulsed reactor (Laboratory of neutron physics, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia) to solve a whole array of problems, with an eye toward applying these in biophysics, structural biology, and biotechnology. This review presents and discusses the main findings of the studies of various biological systems obtained by using the setup small-angle scattering of neutrons YuMO. The possibilities of development of structural biology methods with the help of small-angle scattering, including protein crystallization, are shown.

Keywords: small-angle scattering, biophysics, structural biology, membrane proteins

УДИВИТЕЛЬНАЯ МАКРОМОЛЕКУЛА ДНК: КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЕЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ И МНОГООБРАЗИЕ УОТСОН–КРИКОВСКИХ КОНФОРМАЦИЙ ДУПЛЕКСА

© 2023 г. В. Полтев*,#, В. Домингез*, А. Руиз*, А. Дерябина*, Э. Гонзалез*

*Автономный Университет Пуэблы, Пуэбла, 72570, Мексика

#E-mail: poltev@fcfm.buap.mx

Поступила в редакцию 06.12.2022 г.

После доработки 06.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Рассматривается развитие представлений о пространственной структуре ДНК и механизмах ее формирования, начиная с открытия двойной спирали до наших дней. Прослеживаются пути и методы моделирования пространственной структуры на разных этапах исследования главной молекулы жизни. На основании результатов расчетов внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий субъединиц макромолекулы обсуждается удивительная целесообразность ее молекулярной структуры, ее приспособленность к выполнению важнейших биологических функций. Приводятся новые данные о существенном вкладе химически однородного конформационно лабильного сахара-фосфатного остова в формирование пространственной структуры ДНК, зависящей от последовательности оснований. Многообразие конформационных возможностей ДНК проявляется в образовании как дуплексов (а также триплексов и квадруплексов) с разной геометрией пар оснований, так и дуплексов с уотсон-криковскими парами нуклеозидов, содержащих локальные конформации, соответствующие разным областям торсионных углов сахара-фосфатного остова (разным конформационным классам). Эти классы, на основании наших расчетов, могут быть разделены на две группы. К первой группе относятся те локальные конформации, в которых торсионные углы близки к одному из минимумов энергии его изолированного минимального повторяющегося фрагмента, а ко второй — конформации, в которых один или несколько из этих углов отличаются от ближайшего минимума более, чем на 30° . Закономерности формирования локальной пространственной структуры этих двух групп существенно отличаются.

Ключевые слова: ДНК, пространственная структура, многообразие конформаций, сахара-фосфатный остов, компьютерное моделирование, молекулярная механика, теория функционала плотности, неэмпирические расчеты.

DOI: 10.31857/S0006302923020102, EDN: CAVHTJ

НЕМНОГО ИСТОРИИ

Открытие в 1953 году Дж. Уотсоном и Ф. Криком пространственной структуры ДНК [1] дало, хотя пока только в принципе, ответ на вопрос о том, как, с точки зрения физики, могут воспроизводиться и развиваться живые системы. Из модели, содержащей две комплементарные полинуклеотидные цепочки, с азотистыми основаниями 4 типов и повторяющимися фрагментами химически однородного сахара-фосфатного остова (СФО), следуют, в общих чертах, механизмы хра-

нения, воспроизведения, использования и эволюционных изменений генетического материала. С тех пор изучению этого биополимера посвящены многие тысячи исследований, выполненных с применением широкого спектра экспериментальных и теоретических методов. К настоящему времени (по состоянию на 9 ноября 2022 г.) в базе данных нуклеиновых кислот NDB [2] собраны координаты атомов более 12432 структур фрагментов нуклеиновых кислот и их комплексов с другими молекулами, построенных по экспериментальным данным и с привлечением расчетно-теоретических методов. Этот постоянно пополняющийся материал позволяет делать все более интересные новые обобщения о Главной Молекуле Жизни и механизмах ее биологического

Сокращения: СФО — сахара-фосфатный остов, ММ — молекулярная механика, дДМФ — дезоксидинуклеозид монофосфат, кдДМФ — комплекс комплементарных дДМФ, УКД — уотсон-криковские дуплексы, КК — конформационный класс дДМФ.

функционирования. Более 60 лет назад, будучи студентом кафедры биофизики физического факультета МГУ, по предложению и под руководством Льва Александровича Блюменфельда первый автор этой статьи начал заниматься исследованием ДНК и ее компонентов [3], что и продолжает делать все последующие годы своей научной деятельности.

Эта статья состоит из двух частей, в первой из которых кратко описывается развитие представлений о ДНК, ее пространственной структуре, конформационной подвижности и вкладе субъединиц в свойства этой удивительной макромолекулы, необходимые для выполнения ею своих функций. На примере некоторых прошлых исследований прослеживается развитие методов молекулярного моделирования и его вклад в формирование современных представлений о ДНК как о конформационно лабильном и структурно многообразном биополимере. Во второй части статьи приводятся некоторые новые результаты исследований, выполненных авторами данной публикации в последние месяцы, как иллюстрация продолжающегося по мере накопления экспериментальных данных и расширения возможностей применения расчетно-теоретических методов уточнения наших представлений о «неисчерпаемой» макромолекуле ДНК.

Первые результаты молекулярного моделирования. Само открытие двойной спирали ДНК в 1953 г. (как и открытие двумя годами ранее структур регулярных α - и β -участков белка) стало возможным благодаря молекулярному моделированию, что в то время означало «ручное» построение модели молекулы из проволочных, картонных и деревянных фрагментов, обозначающих атомы, химические связи и целые субъединицы макромолекулы. Успех в построении модели ДНК объясняется не только «мощной интуицией» авторов этого открытия, но и комплексным использованием при построении модели результатов экспериментальных исследований физическими (рентгеноструктурный анализ волокон ДНК и ее субъединиц), химическими (молекулярная структура мономеров, таутомерные формы оснований и водородные связи между ними) и биологическими (правила Чаргаффа) методами. Такое «ручное» моделирование на новом уровне, с использованием профессионально разработанных и промышленно изготовленных пластиковых моделей атомов и химических связей, потом еще не одно десятилетие (до того, как персональные компьютеры стали общедоступными) широко использовалось для построения и визуализации фрагментов нуклеиновых кислот и их комплексов с другими молекулами.

До конца 70-х годов прошлого века модели пространственной структуры макромолекулы

ДНК основывались на результатах рентгеноструктурных исследований волокон синтетических полинуклеотидов с повторяющимися моно-, ди- и тринуклеотидными последовательностями [4]. По таким данным были построены более детальные, чем по первым, «до-утсон-криковским» данным, модели регулярных дуплексов. Их пространственные структуры оказались зависящими от повторяющейся нуклеотидной последовательности, от содержания в образце воды и противоионов, но для заключения о возможности непрерывного изменения конформационных параметров в зависимости от окружения и об изменении локальной пространственной структуры вдоль цепи прямых структурных данных было недостаточно; этот вопрос и не обсуждался. Начиная с 60-х годов прошлого века необходимость молекулярного моделирования с использованием расчетно-теоретических методов становилась все более очевидной. При этом уже в первые десятилетия после открытия Уотсона и Крика было ясно, что это моделирование должно основываться на приближенных классических (или полуклассических) представлениях. Достаточно строгие квантово-механические методы, по необходимости, приближенные в применении к любым многоатомным системам, еще долго не могли быть успешно применимы к количественным оценкам энергии и конформационных характеристик даже простых фрагментов ДНК. Тем временем метод молекулярной механики (ММ), хоть и под другими названиями, уже успешно применялся к исследованиям органических молекул и их кристаллов. Описание принципов метода ММ, его истории и современного (на тот период) состояния приведено в главе, написанной первым автором этой статьи [5]. Здесь мы только упомянем основные черты этого метода, важные в связи с его ролью в изучении пространственной структуры ДНК от первых приближенных оценок до настоящего времени, когда применение квантово-механических методов стало не только необходимым, но и реально возможным, хотя пока для изучения только сравнительно простых фрагментов ДНК. Метод ММ можно рассматривать как обобщение и количественное представление, с помощью математических выражений, схематического изображения молекул в классической химии. Набор таких выражений вместе с численными коэффициентами для расчета энергии молекулы или надмолекулярного комплекса называют силовым полем. ММ — это метод классической физики, метод «механистического» (то есть с помощью ньютоновской механики) описания квантовых систем. Важной чертой метода ММ является предположение об аддитивности энергий взаимодействия отдельных атомов и взаимодействий разной физической природы. Хотя каждому типу взаимодействий (например, кулоновскому, дис-

персионному или изменению длин связей и валентных углов) соответствует свой член суммарной энергии, физический смысл имеет только общая энергия, которая может быть сопоставлена с экспериментальными данными, а не отдельные слагаемые, которые могут существенно отличаться в разных силовых полях. Этот метод, внесший существенный вклад в первые десятилетия изучения ДНК, до сих пор остается единственно возможным для моделирования крупных фрагментов биополимеров, а также для предварительных оценок конформационных состояний и конформационных возможностей их фрагментов перед расчетами более строгими, но все равно приближенными, и более затратными квантово-механическими методами.

Первые оценки энергии взаимодействий в ДНК.

Несмотря на появившийся сразу же после открытия двойной спирали интерес физиков, физико-химиков и математиков к деталям строения ДНК, к изучению взаимного влияния ее субъединиц и взаимодействий разной физической природы, первая публикация, содержащая попытку оценить количественно, хоть и очень приближенно, вклад некоторых взаимодействий в формирование и стабильность двойной спирали, появилась только в конце первого десятилетия после открытия Уотсона и Крика. В 1962 г. Де Во и Тиноко [6] опубликовали первые количественные оценки энергии взаимодействия между основаниями в модели ДНК, используя приближение молекулярных точечных диполей, то есть расчет взаимодействий точечных диполей, помещенных в центры оснований, расположенных как в модели В-формы двойной спирали. Суммарная энергия взаимодействия между двумя основаниями в паре или в стопке предполагалась равной сумме взаимодействий постоянных диполей (кулоновские электростатические взаимодействия), постоянного диполя одной молекулы с индуцированным диполем другой (индукционные взаимодействия) и между двумя индуцированными диполями (лондоновские дисперсионные взаимодействия). Такое приближение не позволило получить даже качественно правильные результаты (например, энергия взаимодействия в комплементарной паре А:Т получалась положительной), но сама проблема количественной оценки изменения энергии при образовании или при изменении конформации ДНК была сформулирована и привлекла внимание целого ряда исследователей (включая первого автора этой статьи). Вскоре в работе Д. Бредли с соавторами [7] было показано, что такое «дипольное» приближение непригодно для оценки взаимодействия оснований, независимо от локализации диполей и замены точечных диполей «реальными», то есть имеющими размеры. Авторы работы [7] предложили «монопольное приближение», они вычисляли энергию взаимо-

действия молекул, предположив, что главный вклад в энергию взаимодействия оснований вносят взаимодействия постоянных зарядов, помещенных на каждом из атомов одной молекулы с зарядами на атомах другой молекулы, а сами заряды при этом вычислялись с помощью полупирических методов квантовой химии. Это было первым указанием на необходимость расчета атом-атомных взаимодействий в теоретических исследованиях пространственной структуры ДНК. В работе Нэша и Бредли [8] это приближение было использовано для поиска минимумов энергии взаимодействия между двумя основаниями, находящимися в одной плоскости. При этом учитывались и ван-дер-ваальсовы взаимодействия в приближении модели «твердых тел», то есть атомы не могли располагаться ближе друг к другу, чем сумма их ван-дер-ваальсовых радиусов. Полученные в работе [8] минимумы энергии соответствуют взаимным положениям оснований с водородными связями, которые практически совпадают с полученными позже самыми разными расчетными методами (включая наиболее строгие из возможных квантово-механических методов и последние версии силовых полей ММ). В следующих работах, которые можно рассматривать как продолжение работ Бредли с соавторами [7, 8], для расчетов взаимодействия между основаниями ДНК были предложены модели, представляющие каждую молекулу в виде совокупности точечных зарядов, диполей и квадрупольных, расположенных не только на атомах, но и на связях [9], которые рассчитывались методами квантовой механики, но представляли собой хоть и усложненное, но все равно классическое представление квантовой системы. Результаты таких расчетов (см., например, работы [9, 10]) уже тогда не имели преимуществ по сравнению с результатами «классической» молекулярной механики, а теперь могут представлять интерес только для истории изучения внутримолекулярных взаимодействий в ДНК.

Применение метода молекулярной механики на первых этапах изучения пространственной структуры ДНК. Широкое использование и выработка параметров метода ММ для применения к расчетам нуклеиновых кислот начались через несколько лет после того, как этот метод уже успешно применялся к исследованию пространственной структуры и взаимодействий белковых фрагментов. Эту ситуацию можно объяснить «специальной ролью» ДНК как носителя генетической информации, для которого можно было бы ожидать «специфических» сил между основаниями, которые являются сопряженными молекулами с делокализованной π -электронной системой. В то время бытовало мнение, что электронный обмен между основаниями в комплементарных парах и обменные взаимодействия в стопках параллель-

ных оснований вносят решающий вклад в биологическое функционирование ДНК. Потребовалось несколько лет, прежде чем А. Пуллман и Б. Пуллман, пионеры применения квантово-механического подхода к биологическим молекулам, написали: «Возможные вклады резонансной энергии стабилизации посредством делокализации электронов через водородные связи для горизонтальных взаимодействий и перекрывание их электронных облаков или перенос заряда для вертикальных взаимодействий, оказывается, много меньше по порядку величины, чем стабилизация, обусловленная силами Ван-дер-Ваальса—Лондона» [11]. Однако интересно отметить, что несмотря на «отставание» в применении ММ к нуклеиновым кислотам по сравнению с его применением к белкам, некоторые, теперь кажущиеся очевидными, нововведения в ММ для исследования биополимеров были сначала предложены для расчетов нуклеиновых кислот и только затем использованы в расчетах белков. Например, это уже упоминавшийся выше учет взаимодействия между эффективными зарядами на атомах и разные параметры для разных электронных конфигураций одного и того же типа атомов.

Первый автор данной статьи оказался первым исследователем, начавшим в 1967 г. применять молекулярную механику (этот термин, как и термин «силовое поле», не применялся тогда к подобным расчетам) к теоретическому изучению взаимодействий между субъединицами (сначала только между азотистыми основаниями) ДНК [12] и предложившим для этого самосогласованный набор потенциальных функций. При этом предполагалась усредненная по экспериментальным данным геометрия каждого из оснований. Для сравнения, в предложенных несколько позднее параметрах Шераги для расчетов белков [13] предполагалась фиксированная геометрия пептидной группы и некоторых аминокислот. Энергия каждого из атом-атомных взаимодействий содержала электростатический член, индукционную составляющую (вскоре исключенную по причине малого вклада для наших систем и для избегания учета неаддитивности атом-атомных и фрагмент-фрагментных взаимодействий) и члены, соответствующие лондоновской дисперсионной энергии и близкодействующему отталкиванию. При этом заряды на атомах рассчитывались простейшими полуэмпирическими методами квантовой химии (параметризованными так, чтобы воспроизводить дипольные моменты рассматриваемых и подобных им молекул). Коэффициенты члена дисперсионной энергии первоначально оценивались по приближенной формуле Лондона (и поэтому изначально зависели от электронной конфигурации атома), а для оценки близкодействующего отталкивания использовались несколько увеличенные (в отличие от мно-

гих существовавших тогда силовых полей) ван-дер-ваальсовы радиусы атомов. На следующем этапе эти коэффициенты были уточнены по результатам расчетов молекулярных кристаллов родственных соединений. Предложенный набор коэффициентов был затем дополнен нами путем включения параметров для учета взаимодействий сахаро-фосфатного остова [14] и взаимодействий с молекулами воды [15]. Эта простая атом-атомная схема, коэффициенты которой уточнялись (как и для всех силовых полей ММ) по мере появления новых экспериментальных данных, широко использовалась в 70-х и 80-х годах прошлого века не только нами и нашими коллегами, но и другими исследователями. С помощью этой схемы удалось объяснить ряд экспериментальных данных, а также предсказать некоторые свойства ДНК до появления данных эксперимента. К таким предсказаниям можно отнести предсказание возможности значительных изменений конформационных параметров двойной спирали без существенного изменения энергии [16], путей возникновения всех транзиций и трансверсий при биосинтезе ДНК [17] и структуры фрагментов ДНК с «неправильными» парами оснований [18]. Первые экспериментальные данные о структуре фрагментов дуплекса с «неправильными» парами появились вскоре после наших публикаций на эту тему. До этого основным путем включения в ДНК «неправильных» оснований при биосинтезе считался переход одного из оснований образующейся пары в редкую таутомерную форму с сохранением геометрии СФО каждой цепочки и взаимного положения двух цепочек [19], как было предложено еще Уотсоном и Криком [1].

Теперь это силовое поле, не учитывающее некоторые слагаемые суммарной энергии (что было вполне оправданно для наших систем, предполагающих фиксированными длины химических связей и многие валентные углы), только иногда используется нами и нашими коллегами. Это связано не с тем, что разработаны более адекватные методы, а с переходом практически всех исследователей, применяющих методы ММ (а ранее и квантовой механики), к использованию стандартных компьютерных программ со встроенными силовыми полями, позволяющих проводить расчеты широкого спектра молекулярных комплексов и не предполагающих возможность изменений или дополнений силовых полей каждым пользователем. В те годы прошлого века, когда предлагались и широко использовались наши параметры, компьютерные программы, как правило, составлялись и модифицировались самими исследователями и их коллегами применительно к конкретной задаче. Предложенные нами более полувека назад параметры метода ММ конечно же требуют (как и параметры других силовых полей) дополнительного уточнения с использова-

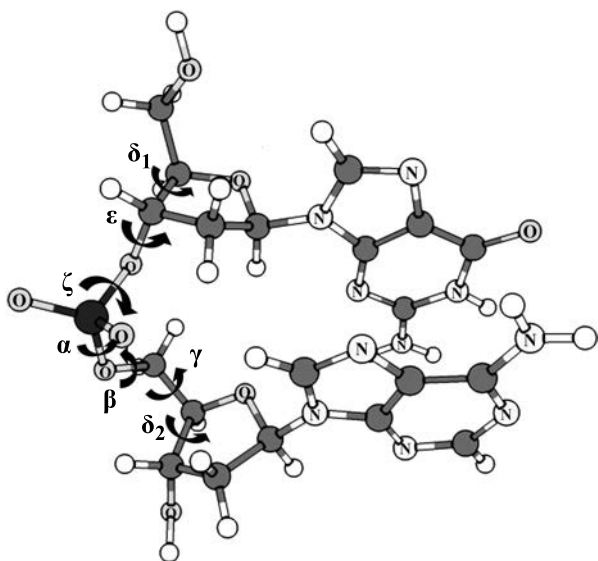


Рис. 1. Молекулярная структура и обозначения торсионных углов сахаро-фосфатного остова дДМФ (dGpA).

нием более широкого набора экспериментальных данных и наиболее строгих результатов квантово-механических расчетов, но и в прежнем виде они до сих пор дают в некоторых случаях более адекватные результаты расчетов простых фрагментов ДНК, чем силовые поля, разработанные и уточненные в этом веке [20]. Но наше силовое поле не может быть использовано в новых версиях современных, разработанных коллективами программистов-профессионалов, наиболее распространенных программ, таких как AMBER [21] или CHARMM [22].

Экспериментальное изучение пространственной структуры фрагментов ДНК на атомарном уровне и ее конформационная подвижность. Новый этап исследований пространственной структуры нуклеиновых кислот начался в 1980-х годах прошлого века с появлением возможности получения и рентгенографического исследования монокристаллов фрагментов двойной спирали (впоследствии и других конформаций полинуклеотидов). Результаты для первого такого фрагмента, самокомплементарного додекануклеотида dCdGdCdGdAdAdTdCdGdCdG, часто называемого додекамером Дрю–Дикерсона [23], сначала показались неожиданными и вызывающими сомнения. Оказалось, что конформационные параметры (как торсионные углы СФО и упаковка колец дезоксирибозы, так и взаимные положения оснований в соседних парах) изменяются в широких пределах и зависят от последовательности оснований. В последующие годы усилиями исследователей разных стран были кристаллизованы и расшифрованы десятки полинуклеотидных фраг-

ментов, анализ которых демонстрировал широкий диапазон изменения локальных конформационных параметров двойной спирали в пределах «канонических» В- и А-семейств конформаций. Возможность таких согласованных изменений конформационных параметров (в частности, изменений торсионных углов в пределах 30°) и зависимость локальной конформации двойной спирали от последовательности оснований, ранее предсказанные расчетами методом ММ (например, [16]) и казавшиеся очевидными из общих теоретических соображений, становятся общепринятыми. С тех пор количество описанных на атомарном уровне структур фрагментов нуклеиновых кислот и их комплексов увеличивается с каждым годом (и месяцем), также расшифровываются все более сложные структуры. Анализ этих данных (собранных в базе данных NDB [2]) позволяет не только делать новые обобщения о пространственной структуре ДНК в связи с ее биологической функцией, но и ставит перед исследователями новые вопросы. В следующих разделах мы обсуждаем часть этих вопросов, основываясь на результатах наших расчетов элементарных фрагментов ДНК, выполненных в последние пятнадцать лет, и приведем некоторые наши новые данные о вкладе отдельных субъединиц ДНК в ее биологическое функционирование.

МЕТОДИКА РАСЧЕТОВ

Рассматриваемые системы. Рассматриваются элементарные фрагменты одиночной цепи ДНК (нейтрализованные ионом Na^+ дезоксидинуклеозид-монофосфаты (дДМФ) и двойной спирали (комплементарные комплексы дДМФ – кдДМФ), а также молекулы, соответствующие элементарным фрагментам сахаро-фосфатного остова, то есть дДМФ, в которых оба основания заменены на атомы водорода. Молекулярная структура одного из дДМФ и обозначения его торсионных углов представлены на рис. 1. Геометрические характеристики дДМФ соответствуют таковым для динуклеотидных фрагментов, рассматриваемых Шнейдером и др. [24] в их анализе и классификации конформаций элементарных фрагментов цепи ДНК.

В таком фрагменте реализуются все существенные для конформационного состояния цепи взаимодействия соседних субъединиц (между основаниями, оснований со своим и соседним сахаром, между соседними сахарами, обоих оснований и сахаров с фосфатной группой, а также каждой из субъединиц с ионом Na^+). Элементарные фрагменты двойной спирали, кдДМФ, включают также взаимодействия между субъединицами комплементарных цепей, а элементарные фрагменты СФО исключают влияние оснований

и позволяют оценить вклад монотонного остова в формирование локальных конформаций полинуклеотида. При подготовке структур к расчетам начальную конфигурацию каждого из фрагментов строили по координатам атомов соответствующих фрагментов экспериментально определенных структур комплементарных дуплексов, приведенных в банке данных нуклеиновых кислот. При этом атомы водорода и ионы натрия помещались в их наиболее вероятные положения.

Методы расчетов. Описание и обоснование методов расчета энергии систем и используемых при этом программ приводится в каждой из наших предыдущих публикаций. Здесь мы только упомянем методы и программы, с помощью которых были получены неопубликованные ранее результаты. Для расчетов энергии и поиска ее локальных минимумов методом ММ был использован программный комплекс AMBER [21] с силовым полем BSC1 [25]. Полученные при этом результаты обозначены в таблицах как ММ. Расчеты квантово-механическими методами проводили с использованием программного комплекса Gaussian09 [26]. Результаты, полученные с их применением обозначены как РВЕ (метод теории функционала плотности с функционалом РВЕР-ВЕ и базисным набором волновых функций 6-31G*), M05-2X (метод теории функционала плотности с функционалом M05-2X, учитывающим дисперсионные взаимодействия, с тем же базисным набором) и MP2 (квантово-механический *ab initio* метод с использованием базисного набора 6-31G**). Все минимумы энергии, найденные квантово-механическими методами, были подтверждены расчетами частот колебаний.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Удивительная целесообразность молекулярной структуры ДНК и многообразие ее конформаций. Эволюционная приспособленность структуры ДНК к выполнению ее генетических функций была отмечена сразу же после открытия Уотсоном и Криком двойной спирали. Сочетание в макромолекуле практически жестких и плоских субъединиц (двух пуриновых (pur) и двух пиримидиновых (pyr) оснований, образующих комплементарные пары) с химически однородным и конформационно лабильным сахаро-фосфатным остовом позволяет как хранить информацию (образовывать достаточно стабильную двойную спираль), так и считывать и копировать ее (при расплетании спирали). В первые же годы после построения модели двойной спирали была отмечена важность различия в стабильности двух пар оснований (Ade:Thy с двумя водородными связями и Gua:Cyt с тремя водородными связями), а также отличий в форме и размерах между двумя типами оснований (между пуринами и пирими-

динами) в уотсон-криковских парах. Уотсон-криковские дуплексы (УКД) имеют ряд интересных конформационных особенностей, некоторые из которых мы проанализируем здесь с привлечением результатов наших расчетов [27–34], выполненных в течение последних 15 лет. Эти данные иллюстрируют вклад пространственной структуры УКД в функционирование генетического материала и вклад молекулярной структуры субъединиц полинуклеотидной цепи в формирование ее уникальной пространственной структуры. Мы будем обозначать как «УКД» любые антипараллельные полинуклеотидные дуплексы, содержащие комплементарные уотсон-криковские пары оснований и оба нуклеозида в анти-ориентации основания относительно сахара. Это определение отличается от принятого по умолчанию со времен открытия двойной спирали представления о УКД как о канонической А- или В-конформации (или, потом, о соответствующих семействах конформаций) тем, что включает возможность существования в УКД разных областей торсионных углов СФО.

Уже первые наши расчеты [27], проведенные для нескольких дДМФ с использованием в качестве начальной стандартной В-конформации, позволили выявить ряд интересных особенностей формирования пространственной структуры ДНК. В следующих работах эти результаты были распространены на дДМФ всех 16 возможных последовательностей нуклеозидов в VI- и AI-конформациях, а затем и в AII- и VII-конформациях (в последнем случае это оказалось преждевременным; отсутствие экспериментальных данных для многих последовательностей не позволило тогда обнаружить, что для VII-конформаций эти закономерности более сложны [34]).

Результаты расчетов показали, что для дДМФ с любой нуклеотидной последовательностью есть локальные минимумы энергии с конформационными параметрами, характерными для AI- и VI-семейств конформаций, то есть существование этих конформаций предопределено молекулярной структурой элементарных фрагментов одичной цепи. Этот вывод объясняет эволюционный выбор полинуклеотидной химической структуры как вещества наследственности. В этих же работах было показано, что в минимумах энергии дДМФ с последовательностями оснований «pur–pur» или «pur–pyr» наблюдается существенное перекрытие колец соседних по цепи оснований, а для дДМФ с последовательностями «pyr–pur» и «pyr–pyr» перекрытие незначительно или совсем отсутствует. Эта закономерность, обнаруженная Р. Дикерсоном в 1998 г. [35] в тогда еще не столь многочисленных построенных по экспериментальным данным структурах и наблюдаемая для «канонических» VI- и AI-конформаций УКД (а также, как мы обнаружили

впоследствии, и некоторых других конформаций), определяется взаимодействиями в элементарном фрагменте одной цепи дуплекса, дДМФ. Анализ результатов расчетов показал, что направленность сахаро-фосфатного остова и предпочтительные области его торсионных углов вместе с различиями геометрии пуринов от пиримидинов определяют зависимость пространственной структуры этих конформаций УКД от нуклеотидной последовательности. Расчеты элементарного фрагмента СФО показали, что торсионные углы экспериментально наблюдаемых VI- и AI-конформаций УКД близки (в пределах 30°) к локальным минимумам СФО. Мы подробнее обсудим конформационные возможности СФО ниже, используя наши новые данные. Здесь же укажем только на тот вывод, что химически однородный СФО вносит существенный вклад не только в формирование различных конформаций УКД, но и в зависимость пространственной структуры УКД от последовательности оснований. Другие полинуклеотидные дуплексы, не-УКД, такие как левоспиральные Z-формы, параллельные и хугстиновские дуплексы или дДМФ с не-уотсон-криковскими парами, не обеспечивают эту столь важную для биологической роли ДНК зависимость [32].

Уже в 80–90-х годах прошлого века рассмотрение конформационных характеристик фрагментов ДНК, депонированных в базе данных NDB, показало, что конформационное разнообразие минимальных фрагментов одиночной цепи ДНК не ограничивается только A-, B- и Z-семействами (последнее семейство не относится к УКД, поскольку имеет син-ориентацию сахара относительно основания, то есть другую область гликозидного торсионного угла χ пуриновых нуклеозидов, поэтому здесь мы такие конформации не рассматриваем). B-семейство было подразделено на два – VI («классическую» B-форму) и VII, отличающиеся между собой областями двух торсионных углов ζ и ϵ (рис. 1). Если для семейства VI эти углы находятся в областях гош[–] и транс соответственно, то для семейства VII эти области изменяются на транс (ζ) и гош[–] (ϵ). После обнаружения конформаций VII были выявлены фрагменты, соответствующие дДМФ, с локальной конформацией AII (отличающейся от AI областями углов α и γ), а также целый ряд других локальных конформаций, в том числе такие, которые содержат один нуклеозид, имеющий гликозидный торсионный угол χ и упаковку дезоксирибозы, характерную для формы B (C2'-эндо или близкие), а другой нуклеозид, имеющий эти характеристики, типичные для формы A (упаковка сахара C3'-эндо). Б. Шнейдер с соавторами (см., например, работы [24, 36, 37]) уже более десяти лет проводят анализ и классификацию конфор-

маций элементарных фрагментов полинуклеотидной цепочки. В последних публикациях они обозначают классы этих фрагментов как NtC, динуклеотидный конформационный класс, который соответствует рассматриваемым нами конформациям дДМФ. Мы будем далее обозначать эти конформационные классы как КК и анализировать, основываясь на результатах расчетов, отличие геометрических и энергетических характеристик экспериментально обнаруженных и оптимизированных конформаций элементарных фрагментов, принадлежащих разным классам. Оказалось, что многие из экспериментально наблюдаемых КК имеют области торсионных углов СФО, совместимые с УКД. В основном эти КК мы рассматриваем в наших последних работах. Не останавливаясь на деталях отнесения конформаций дДМФ к тому или иному классу, отметим только, что VI-конформация относится к классу VB00, VII – к классу VB07, AI – к классу AA00. Встречается также целый ряд других КК, обозначаемых как BB (оба нуклеозида в B-подобной конформации), например, BB04 (промежуточный между VB00 и VB07) или BB12 (где торсионные углы α , β и γ находятся в областях, отличных от VB00 и VB07) и классы с обозначениями AB (первый нуклеозид в форме A, второй – B) и BA (первый нуклеозид имеет конформацию B, второй – A). Различия конформаций дДМФ, принадлежащих к трем КК (VB00, VB07 и BB12) и торсионные углы, вызывающие это отличие, показаны на рис. 2. На рис. 3 различия структуры СФО этих КК продемонстрированы их наложением, так, чтобы гликозидные связи в 5'-нуклеозиде всех трех структур совпадали.

Важно отметить, что, если на первых этапах исследования пространственной структуры ДНК рассматривались различия характеристик фрагментов двойной спирали, состоящих из нескольких нуклеотидных пар (включая число пар на виток, положение оснований одной пары относительно другой и относительно оси спирали, взаимное положение оснований в паре), то экспериментально обнаруженное многообразие КК относится к элементарным фрагментам одной полинуклеотидной цепи. Многие структуры с фрагментами УКД, координаты которых имеются в базе данных NDB, содержат элементарные фрагменты полинуклеотидных цепей, относящиеся к нескольким КК. Это ставит задачу исследования причин такого многообразия и вклада взаимодействий субъединиц цепи в образование разных КК, а также задачу выяснения роли этого многообразия и отдельных КК в биологическом функционировании ДНК. Некоторые последние наши результаты на пути решения этих задач обобщаются в следующем разделе.

Роль сахаро-фосфатного остова в формировании и конформационных особенностях разных

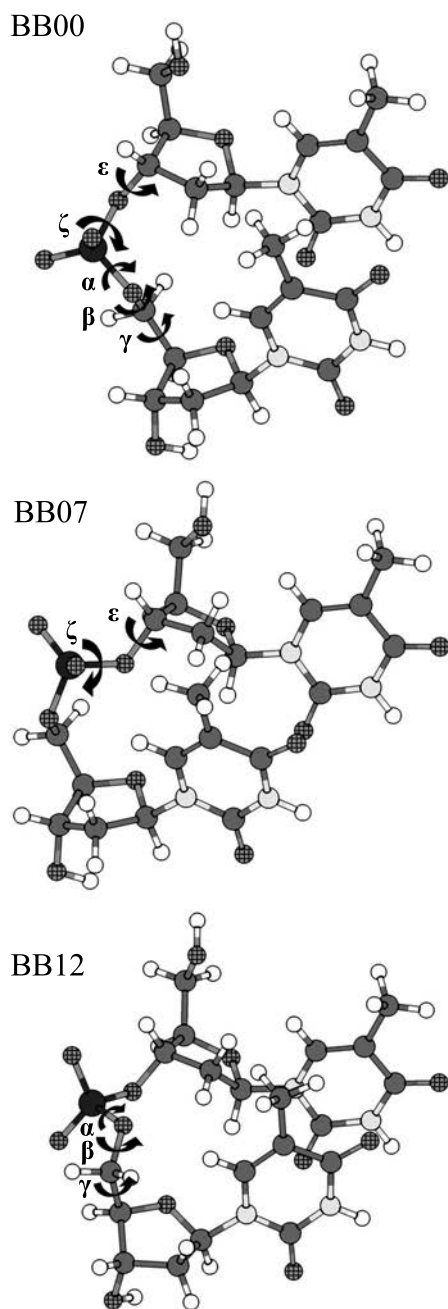


Рис. 2. Конформации дДМФ (dTpdT), принадлежащие трем КК. Стрелками обозначены торсионные углы, области значений которых различаются в разных КК.

классов уотсон-криковских дуплексов. Само существование разных конформационных классов, то есть разных наборов торсионных углов СФО дуплексов, соответствующих В- или А- структурам ДНК, наводит на мысль о важной роли СФО. Мы сделали вывод об этой роли в первой же работе, посвященной квантово-механическому исследованию минимальных фрагментов полинуклеотидной цепи [27], до того, как многообразие КК

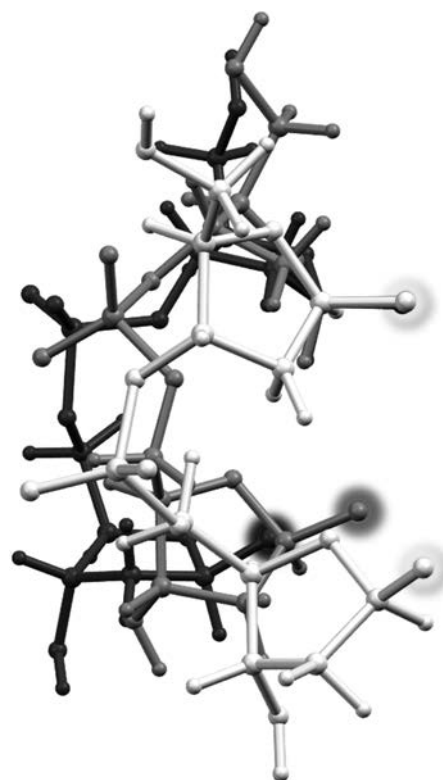


Рис. 3. Конформации СФО трех КК УКД (ВВ00 — черный цвет, ВВ07 — светлый, ВВ12 — серый), наложенные так, чтобы совпадали положения атомов С1 и направления гликозидных связей в полинуклеотидной цепи С5' нуклеозида. Сферами обозначены атомы водорода, на которые заменены основания цепи при построении СФО по координатам соответствующего дДМФ.

было систематизировано и классифицировано в работах Б. Шнейдера с соавторами (см., например, работу [24]). В последующих работах [30, 31] мы показали, что направленность сахаро-фосфатного остова и предпочтительные области его торсионных углов вместе с различиями геометрии пуринов от пиримидинов определяют зависимость пространственной структуры ВІ- и АІ-конформаций УКД от нуклеотидной последовательности. Многообразие экспериментально наблюдаемых КК УКД ставит вопрос о механизмах их формирования, о роли взаимодействий субъединиц ДНК в том, что в УКД реализуются разные наборы торсионных углов, совместимые с такой структурой. Можно было бы предположить, что это многообразие связано с внешними факторами (например, с взаимодействиями с другими молекулами в кристалле), но анализ конформационных предпочтений разных нуклеотидных последовательностей указывает на то, что это не может быть не только единственной, но и главной причиной существования разных КК. Опре-

деляющей является роль молекулярной структуры самой ДНК.

В течение последних нескольких лет мы провели расчеты и оптимизацию широкого набора дДМФ, кдДМФ и СФО, соответствующих 16 часто встречающимся КК, в которых представлены различные наборы торсионных углов СФО, совместимые с УКД. Предварительные результаты анализа этих расчетов были нами недавно опубликованы [34], подробное описание значительной части этой работы приведено в диссертации В. Домингес и будет опубликовано позднее, после более углубленного анализа и дополнительных расчетов. Рассматриваемые КК включают как наиболее изученные ранее конформации, такие как ВВ00 (канонические структуры семейства ВI), ВВ07 (ВII), АА00 (АI) и АА01 (АII), так и ряд других, достаточно часто встречающихся в банке данных. Среди них — семь КК с обоими сахарами, характерными для В-конформаций (ВВ02, ВВ04, ВВ07, ВВ12, ВВ13, ВВ10 и ВВ15), а также пять КК с одним из сахаров, характерным для В-конформаций, а другим — характерным для А-конформаций (ВА01, ВА05, ВА08, ВА09 и ВА16). Количество дДМФ, относящихся к рассмотренным классам, превышает 70% от их общего числа в банке данных, то есть рассмотренная выборка КК может считаться вполне представительной, учитывая, что часть дДМФ в структурах фрагментов ДНК, представленных в банке данных, не соответствует УКД (например, Z-конформации, квадруплексы, одноцепочечные участки), а еще 18.9% дДМФ не отнесены ни к одному из КК [24].

Здесь мы сосредоточимся на результатах, относящихся к сахаро-фосфатному остову и приведем дополнительные соображения о важном вкладе СФО в удивительную целесообразность молекулярной структуры ДНК, в ее приспособленность к выполнению важнейших биологических функций. Кроме важности этого вклада в структуру и функционирование ДНК, рассмотрение СФО позволяет на время обойти некоторые трудности оценки взаимодействий во фрагментах ДНК, рассмотренные нами недавно [20], в частности, трудности, связанные с учетом стекин-г-взаимодействий оснований и относительных вкладов стекинга и Н-связей. В результате оптимизации геометрии фрагментов СФО нескольких дДМФ для каждого из рассматриваемых КК, используя разные расчетные методы, было найдено по несколько локальных минимумов энергии, отличающихся между собой значениями торсионных углов (иногда значительно, а иногда в пределах всего нескольких градусов) и энергии (от нескольких десятых до нескольких ккал/мол). Было выявлено, что минимумы энергии СФО для одного КК могут соответствовать торсионным углам другого КК, а иногда торсионным углам, не соответствующим ни одному из классифициро-

ванных в работе [24] КК. По этим результатам каждый из рассмотренных (и, можно предположить, всех) КК, допускающих образование УКД, может быть отнесен к одной из двух групп — КК, имеющие средние экспериментальные значения торсионных углов, отличающиеся от одного из локальных минимумов энергии отдельного фрагмента СФО этого класса не более чем на 30°, и КК, для которых хотя один (а большей частью два или три) из средних торсионных углов экспериментальных структур отличается от его значения в любом локальном минимуме энергии отдельного СФО этого КК больше, чем на 30° [34]. Хотя выбор точной величины отличий (30°) в некоторой степени субъективен, его обоснованием можно считать то, что соответствующие торсионные углы экспериментальных структур дДМФ, принадлежащих каждому из рассмотренных КК, могут отличаться друг от друга до 60°, а от средней величины этого угла — до 30°. Поэтому конформации первой группы КК будем называть соответствующими, а второй группы не соответствующими минимумам энергии СФО. Результаты анализа расчетов дДМФ и кдДМФ указывают на то, что в подавляющем большинстве этих фрагментов, относящихся к первой группе, соблюдаются закономерности формирования пространственной структуры, выявленные нами ранее [27, 31] для «канонических» ВI- и АI-конформаций и упомянутые в предыдущем разделе. Рассмотрение большего числа экспериментальных структур и оптимизация геометрии СФО некоторых из них выявили исключения из этих правил; для некоторых КК эти исключения составляют до 10% проанализированных структур. Для понимания причин существования этих исключений предстоит как более детальный анализ экспериментальных структур, так и оптимизация разными методами большего числа дДМФ, кдДМФ и СФО. Для КК, относящихся ко второй группе, наблюдается более сложная картина — хотя для ряда дДМФ соблюдаются такие же закономерности, как для КК первой группы, для других КК второй группы дДМФ и кдДМФ не могут быть подходящими моделями для предсказания закономерностей формирования их пространственной структуры, которая зависит и от взаимодействий с соседними фрагментами и/или с другими молекулами. Составление процента дДМФ каждого из КК (по данным [24] от общего количества дДМФ во фрагментах ДНК, имеющих в базе данных NDB, с их принадлежностью к одной из двух групп позволяет заключить, что более половины дДМФ всех рассмотренных нами КК относятся к первой группе. Это более чем в три раза превышает процент дДМФ в КК, относящихся ко второй группе. По нашим уточненным данным, конформационные семейства ВI, АI и АII относятся к первой группе. Большинство ВII (ВВ07) конфор-

маций дДМФ, как показало наше рассмотрение, относятся ко второй группе КК.

К первой группе относятся девять рассмотренных КК (AA00, AA01, BB00, BB01, BB10, BB12, BA01, BA05, BA09), ко второй — семь (BB02, BB04, BB07, BB13, BB15, BA08 и BA16). Торсионные углы СФО, отвечающие одному или нескольким наиболее глубоким минимумам энергии, рассчитанным разными методами, приведены в нашей недавней работе [34]. Более глубокий анализ этих и полученных нами в самое последнее время результатов расчетов СФО позволяет сделать дополнительные выводы, которые мы иллюстрируем здесь на примере нескольких выбранных КК. Среди этих классов — рассмотренные ранее BB00, BB07, AA00 и классы, отнесенные к первой группе, — BB12, отличающийся от класса BB00 торсионными углами α , β и γ , а также BA05 и BA01, отличающиеся от BB00 более, чем на 30° , только углом δ_2 , связанным с упаковкой кольца дезоксирибозы второго нуклеотида.

В табл. 1 приведены средние значения торсионных углов СФО для дДМФ этих КК (по данным работы [24]) и отличия от них рассчитанных нами разными методами углов отдельных молекул СФО в наиболее глубоком минимуме, для класса BB07 — в двух наиболее глубоких минимумах энергии. Первый из этих минимумов, полученный оптимизацией СФО одного из дДМФ, отвечающего КК BB07, соответствует наименьшему из всех минимумов отклонению от средних экспериментальных значений торсионных углов (хотя и большему, чем 30° для одного из них), а второй — наименьшим относительным значениям энергии. Анализ расчетных данных показал, что иногда два различных КК могут считаться одним с точки зрения энергии соответствующих СФО, дДМФ, кДМФ. Например, к каноническому семейству конформаций VI следует отнести два КК — BB00 и BB01, торсионные углы СФО которых отличаются в среднем всего на 7° , а конформационные параметры в минимумах энергии СФО, дДМФ и кДМФ для одинаковых нуклеотидных последовательностей совпадают. Одним классом с точки зрения внутримолекулярных взаимодействий можно также считать BA01 и BA05, имеющие такое же среднее отличие значений соответствующих углов СФО одного КК от другого, близкие значения гликозидных торсионных углов и общие минимумы энергии СФО. Из анализа результатов этой таблицы можно заключить, что, в подавляющем большинстве случаев, отличия средних экспериментальных значений торсионных углов от соответствующих значений в минимумах энергии СФО, полученных разными методами, достаточно малы и часто имеют одинаковое направление (в сторону больших или меньших значений по сравнению со средним экс-

периментальным значением для этого класса). Имеющиеся существенные отличия (например, угла δ_2 класса BB12, полученного методом теории функционала плотности с функционалом M05-2X) связаны с тем, что мы приводим данные для наиболее глубокого минимума, а другой, несколько менее глубокий минимум, полученный этим методом, имеет близкие к полученным другими методами значения углов. Более близкого соответствия значений, полученных разными методами, трудно и ожидать, учитывая различия методов расчета (*ab initio*, теория функционала плотности, ММ). При отнесении КК к одной из двух групп мы старались учесть результаты всех методов, в большинстве случаев это отнесение соответствует результатам, полученным каждым из примененных методов. В некоторых случаях, правда, приходилось игнорировать результат, полученный одним из методов для одной из нескольких рассмотренных конформаций данного класса. Например, оптимизация СФО методом MP2 одного из рассмотренных дДМФ, принадлежащего к BB00 классу, дает структуру, соответствующую минимуму энергии класса BA05, тогда как оптимизация других СФО этим методом и этого СФО другими методами приводит к минимуму, соответствующему КК BB00. Подобная ситуация наблюдалась при оптимизации СФО двух дДМФ, принадлежащих к КК AA00, а оптимизация СФО одного из дДМФ, принадлежащих к классу BA05, приводила к минимуму, соответствующему BB00.

Представляет интерес сравнение энергий молекул, соответствующих минимальным фрагментам СФО разных КК. При расчетах каждым из применяемых нами методов наиболее глубокий из минимумов соответствует VI-семейству конформаций, наиболее часто встречающемуся во фрагментах ДНК и ее комплексов, представленных в банке данных. Это относится к найденным минимумам, как соответствующим определенным КК, так и к минимумам, не соответствующим ни одному из КК; как для рассматриваемых здесь КК, так и других, в том числе не соответствующих УКД (например, Z-конформациям). В табл. 2 приведены значения энергии в наиболее глубоких минимумах для каждого из рассматриваемых здесь КК, рассчитанные разными методами и отнесенные к энергии минимума для класса BB00 (и BB01). Интересной характеристикой набора торсионных углов СФО, соответствующих этому классу, является то, что такие же наборы реализуются в других конформациях дДМФ, например, в хугстиновских и параллельных дуплексах, а также в квадруплексах.

Стоит отметить, что мы не проводили систематический конформационный анализ фрагмента СФО. Эта задача требует слишком много ком-

Таблица 1. Средние значения торсионных углов СФО рассмотренных КК

КК	Метод	δ_1	ϵ	ζ	α	β	γ	δ_2
BV00, BV01	<BV00> [24]	138	183	258	304	180	44	138
	<BV01> [24]	131	181	266	301	176	49	120
	PBE	-1	+24	+18	-9	-11	+5	-2
	M05-2X	+7	+10	+16	-9	-17	+5	+2
	MP2	+5	+14	+18	-11	-16	+4	+2
	MM	+5	+11	+24	-13	-9	+5	0
BA05, BA01	<BA05> [24]	131	184	269	296	169	52	104
	<BA01> [24]	136	189	255	300	161	53	88
	PBE	+6	+24	+14	+5	+4	+4	-11
	M05-2X	+9	+5	+5	-1	-2	+6	-9
	MP2	+9	+24	+17	-8	+4	+4	-4
	MM	+3	+14	+17	-7	+5	0	+8
BV12	<BV12> [24]	140	196	280	257	76	171	140
	PBE	-2	+9	-6	+19	+7	+6	-8
	M05-2X	+1	+7	-2	+14	+3	+7	+25
	MP2	+1	+5	-5	+20	+5	+7	-7
	MM	0	+2	-4	+24	-3	+15	-2
AA00	<AA00> [24]	82	206	288	293	173	55	82
	PBE	+20	-19	-12	0	-5	0	+10
	M05-2X	+20	-24	-11	+1	-3	+2	+19
	MP2	+20	-24	-11	+2	-5	+1	+17
	MM	+16	-21	-4	-3	-1	-2	+29
BV07	<BV07> [24]	144	247	169	297	141	46	141
	PBE	-15	+ <u>31</u>	-12	-5	-16	-3	-3
		-8	- <u>49</u>	0	-6	+ <u>45</u>	+2	-4
	M05-2X	-17	+ <u>31</u>	-19	-6	-25	-3	+3
		-3	- <u>52</u>	-3	-2	+ <u>48</u>	+2	+1
	MP2	-14	+ <u>33</u>	-14	-5	-22	-6	+3
		-5	- <u>52</u>	-3	-2	+ <u>40</u>	+1	0
	MM	-12	+29	-12	-2	- <u>37</u>	0	-3
		-7	- <u>37</u>	-6	-6	- <u>47</u>	-1	-12

Примечание. Приведены значения углов в градусах (по данным работы [24]) и отклонения от этих значений соответствующих углов в наиболее глубоких минимумах энергии, рассчитанных разными методами. В случаях, когда два КК имеют одинаковый минимум энергии СФО, приведены отклонения от средних значений первого из них. Жирным шрифтом выделены средние значения торсионных углов каждого КК, отличающиеся от соответствующих значений для класса BV00. Для КК BV07 приведены отличия для двух минимумов энергии. Подчеркнуты отличия торсионных углов от средних для КК большие, чем 30°.

пьютерного времени и не очень интересна с точки зрения исследования ДНК. Мы оптимизировали структуры СФО, соответствующие выбранному КК УКД. Многие другие минимумы СФО могут не соответствовать не только УКД, но и вообще полинуклеотидной цепочке из-за слишком коротких контактов атомов оснований. Такими могут быть и минимумы, получае-

мые при оптимизации геометрии СФО, соответствующих второй группе КК.

Отсутствие среди полученных нами минимумов структур с более выгодной, чем для VI-конформаций, энергией не исключает их существования, хотя и делает его мало вероятным для КК, соответствующих УКД. Интересно отметить, что порядок увеличения энергии СФО при переходе

Таблица 2. Относительные значения энергии (ккал/мол) в наиболее глубоких минимумах, полученные при оптимизации фрагментов СФО рассматриваемых КК

КК	PBE	M05-2X	MP2	ММ
BB00, BB01	0.0	0.0	0.0	0.0
BA05, BA01	1.51	2.38	2.09	2.75
BB12	2.30	2.72	3.23	4.51
AA00	2.85	3.60	3.71	3.49
BB07	5.14	5.46	5.44	8.91
BB07	2.18	3.05	3.30	8.51

Примечание. Первый минимум для СФО BB07 соответствует наименьшему отклонению торсионных углов от среднего значения для КК, а второй — несколько большему отклонению, но менее положительной относительной энергии.

от одного КК к другому сохраняется при расчетах всеми тремя используемыми нами квантово-механическими методами (а также в отдельных, не-систематических расчетах с функционалом PBE и расширенным набором базисных функций, 6-311G(d)), но не во всех результатах, полученных методом ММ.

Анализ результатов оптимизации СФО позволяет заключить, что многие, но не все дДМФ в составе имеющихся в банке данных двуспиральных участков ДНК имеют торсионные углы СФО близкие к локальным минимумам его отдельного минимального фрагмента. Анализ показывает, что многие часто встречающиеся КК дДМФ имеют конформацию СФО, близкую к наиболее глубоким минимумам. Эти результаты можно рассматривать, как дополнительное подтверждение удивительной целесообразности молекулярной структуры главной биомолекулы. Вместе с тем они требуют дополнительных, более широких и глубоких исследований физической природы и вклада взаимодействий отдельных субъединиц ДНК в образование конформаций УКД, не соответствующих минимумам энергии СФО (отвечающих КК второй группы). Такие исследования нами сейчас проводятся.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Национальную суперкомпьютерную лабораторию Юго-востока Мексики (LNS), члена сети национальных лабораторий Национального совета по науке и технологиям (CONACYT), за представление компьютерных ресурсов и техническое сопровождение и поддержку. Авторы также благодарят В.М. Анисимова (Национальная лаборатория Аргонн, США) за интерес к работе и полезное обсуждение результатов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Автономного университета Пуэблы (Пуэбла, Мексика).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature*, **171**, 964 (1953).
2. H. M. Berman, W. K. Olson, D. L. Beveridge, et al., *Biophys. J.*, **63**, 751 (1992).
3. Б. И. Сухоруков, В. И. Полтев и Л. А. Блюменфельд, Докл. АН СССР, **149**, 1380 (1963).
4. A. G. W. Leslie, S. Arnott, R. Chandrasekaran, and R. L. Ratliff, *J. Mol. Biol.*, **143**, 49 (1980).
5. V. Poltev, In *Handbook of Computational Chemistry*, Ed. by J. Leszczynski et al. (Springer Int. Publ., Switzerland, 2017), p. 21.
6. H. DeVoe and I. Tinoco, *J. Mol. Biol.*, **4**, 500 (1962).
7. D. F. Bradley, S. Lifson, and B. Honig, In *Electronic Aspects of Biochemistry*, Ed. by B. Pullman (Acad. Press Inc., New York, 1964), p. 77.
8. H. A. Nash and D. F. Bradley, *J. Chem. Phys.*, **45**, 1380 (1964).
9. J. Langlet, P. Claverie, F. Caron, and J. C. Boeue, *Int. J. Quant. Chem.*, **20**, 299 (1981).
10. N. Gresh, P. Claverie, and A. Pullman, *Int. J. Quant. Chem.*, **29**, 101 (1986).
11. A. Pullman and B. Pullman, *Adv. Quant. Chem.*, **4**, 267 (1968).
12. В. И. Полтев и Б. И. Сухоруков, Биофизика, **12**, 763 (1967).
13. F. A. Momany, R. McGuire, A. Burgess, and H. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, **79**, 2361 (1975).

14. В. Б. Журкин, В. И. Полтев и В. Л. Флорентьев, Молекуляр. биология, **14**, 1116 (1980).
15. V. I. Poltev, T. I. Grokhlina, and G. G. Malenkov, J. Biomol. Struct. Dyn., **2**, 413 (1984).
16. V. E. Khutorsky and V. I. Poltev, Nature, **264**, 483 (1976).
17. В. И. Полтев и В. И. Брусков, Молекуляр. биология, **11**, 661 (1977).
18. V. P. Chuprina and V. I. Poltev, Nucl. Acids Res., **11**, 5205 (1983).
19. M. Topal and J. Fresco, Nature, **263**, 285 (1976).
20. В. Полтев, А. Дерябина, В. Домингес и др. Биофизика, **64**, 243 (2019).
21. D. A. Case, H. M. Aktulga, K. Belfon, et al., *AMBER 2021* (University of California, San Francisco, 2021).
22. K. Vanommeslaeghe and A. D. MacKerell, Jr., Biochim. Biophys. Acta, **1850**, 861 (2015).
23. R. E. Dickerson and H. R. Drew, J. Mol. Biol., **149**, 761 (1981).
24. J. Černý, P. Božíková, J. Svoboda, and B. Schneider, Nucl. Acids Res., **48**, 6367 (2020).
25. I. Ivani, P. D. Dans, A. Noy, et al., Nat. Methods, **13**, 55 (2016).
26. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, et al., *Gaussian-09 Revision D.01* (Gaussian Inc, Wallingford, CT, USA, 2009).
27. V. I. Poltev, V. M. Anisimov, V. I. Danilov, et al., J. Biomol. Struct. Dyn., **25**, 563 (2008).
28. V. I. Poltev, V. M. Anisimov, V. I. Danilov, et al., Int. J. Quant. Chem., **110**, 2548 (2010).
29. V. I. Poltev, V. M. Anisimov, V. I. Danilov, et al., Comput. Theor. Chem., **975**, 69 (2011).
30. V. I. Poltev, V. M. Anisimov, V. I. Danilov, et al., Biopolymers, **101**, 640 (2014).
31. В. И. Полтев, В. М. Анисимов, К. Санчес и др., Биофизика, **61**, 259 (2016).
32. V. Poltev, V. M. Anisimov, V. Dominguez, et al., J. Mol. Model., **24**, 46 (2018).
33. V. Poltev, V. M. Anisimov, V. Dominguez, et al., In *Proc. of Advances in Quantum Systems in Chemistry, Physics, and Biology*, Ed. by L. Mammì et al. (Springer: Cham, Germany, 2020), p. 233.
34. V. Poltev, V. M. Anisimov, V. Dominguez, et al., Computation, **9**, 98 (2021).
35. R. E. Dickerson, In *Structure, Motion, Interaction and Expression of Biological Macromolecules*, Ed. by R. H. Sarma and M. H. Sarma (Adenine Press, Albany, NY, 1998), p. 17.
36. D. Schneider, P. Božíková, I. Nečasová, et al., Acta Crystallogr. D, **74**, 52 (2018).
37. D. Svozil, J. Kalina, M. Omelka, and B. Schneider, Nucl. Acids Res., **36**, 3690 (2008).

The Marvelous DNA Macromolecule: Computer Modeling of DNA 3D Structure and Diversity of Watson-Crick Duplex Conformations

V. Poltev*, V. Dominguez*, A. Ruiz*, A. Deriabina*, and E. Gonzalez*

**Autonomous University of Puebla, Puebla 72570, Mexico*

The work reviews the development of ideas about the 3D structure of DNA and the mechanisms of its formation, from the discovery of the Double Helix to the present day. It tracks the methods of modeling the 3D structure at different stages of the study of the main molecule of life. The discussion underscores a marvelous expedient in DNA molecular structure and its adaptability to important biological functions based on the results of calculations of the intra- and intermolecular interactions of macromolecule subunits. The work presents new data about substantial contribution of chemically monotonous and conformationally flexible sugar-phosphate backbone to the formation of sequence-dependent 3D structure of DNA. The diversity of the conformational possibilities of DNA is visible both in the formation of duplexes (as well as triplexes and quadruplexes) with different geometric parameters for base pairs and in the formation of duplexes with Watson-Crick nucleoside pairs containing local conformations corresponding to different regions of the torsion angles of the sugar-phosphate backbone (different conformational classes). Based on our calculations, these classes can be divided into two groups. The first group includes local conformations in which the torsion angles are close to one of energy minima of its isolated elemental repeating fragment, and the second group consists of conformations with one or more of these angles deviating from that of the nearest energy minimum by more than 30°. The regularities of the formation of the local 3D structure of these two groups differ significantly.

Keywords: DNA, 3D structure, diversity of conformations, sugar-phosphate backbone, computer modeling, molecular mechanics, density functional theory, nonempirical calculations

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ УРАВНЕНИЙ КОЛМОГОРОВА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ

© 2023 г. © 2023 г. А.П. Кручинина*,[#], Н.В. Куликовская*,^{##}

*Механико-математический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1, Москва, 119912, Россия

[#]E-mail: anna.kruchinina@math.msu.ru

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

Поступила в редакцию 13.07.2021 г.

После доработки 02.11.2022 г.

Принята к публикации 03.11.2022 г.

Предложен способ определения динамических свойств проводимости потенциал-зависимых ионных каналов с несколькими последовательно расположенными энергетическими барьерами, названными воротными частицами, с помощью теории марковских случайных процессов с непрерывным временем и дискретным множеством состояний. Число состояний принималось равным числу энергетических барьеров в канале плюс одно. Если принять гипотезу, что случайные потоки переключающие воротные частицы между открытым и закрытым состояниями являются пуассоновскими, то математическое описание состояния системы одноименных каналов будет иметь вид системы линейных дифференциальных уравнений Колмогорова для вероятностей состояний. С помощью этой модели и результатов испытаний по протоколу «Volt-Clamp», представленных в открытой печати, можно получить зависимость фиксированных значений мембранного потенциала от интенсивностей пуассоновских потоков для многих типов калиевых каналов. Параметры входящих в уравнение Колмогорова функций, описывающих интенсивность перехода ионов сквозь канал, восстанавливаются с помощью обобщенного метода наименьших квадратов. Приводятся примеры определения интенсивностей переходов для двух видов потенциал-зависимых калиевых каналов — «задержанного выпрямления» (IKdr, две идентичные активационные воротные частицы) и канала с быстрыми процессами активации и инактивации (IKa, три идентичные активационные и одна инактивационная воротные частицы). Показано, что активация и деактивация канала описывается решением общего уравнения Колмогорова.

Ключевые слова: интенсивность потока событий, уравнения Колмогорова, ионные токи, протокол VOLT-CLAMP, метод наименьших квадратов.

DOI: 10.31857/S0006302923020114, EDN: CAYUJM

Посвящается памяти В.И. Курилова

ИОННЫЕ ТОКИ ВОЛОСКОВЫХ КЛЕТОК

В 1952 г. А.Л. Ходжкин и А.Ф. Хаксли решили задачу разделения ионных токов и определения их параметров при помощи предложенного экспериментального протокола Volt-Clamp [1]. Они проводили исследования на гигантском аксоне кальмара и предположили, что их метод применим и к другим клеткам.

В настоящее время исследователи постоянно раскрывают основные физические и химические свойства функционирования ионных каналов на основе сочетания вычислительных методов, результатов рентгеновской кристаллографии и мо-

лекулярно- динамического моделирования [2]. Конечная цель исследований состоит не только в том, чтобы извлечь из множества экспериментальных данных основные принципы строения каналов, но и внедрить их в искусственные системы как датчики электрического напряжения. Часто предлагаются «скоростные» модели потенциал зависимых каналов, в которых предполагается, что поры канала находятся в нескольких стабильных конфигурациях, а процесс прохождения ионов изображается как переход ионов из одной стабильной конфигурации в следующую с вероятностью, заданной постоянной скоростью, зависящей от потенциала [3]. Скоростные модели мо-

гут дать лишь приблизительную картину процесса прохода ионов. Модели такого типа связаны с экспериментальными результатами с помощью математических выражений для потоков ионов, и, их можно использовать для оценки параметров кинематики каналов. Исследования также выявили существование ряда специфических катион-связывающих участков, расположенных вдоль узкой поры канала, предполагая, что ионы K^+ могут буквально «перепрыгивать» (*hop*) от одного места связывания к другому по мере продвижения в канале. В поддержку этой точки зрения было обнаружено, что конфигурации ионов могут соответствовать энергетическим ямам одинаковой глубины и что переносу ионов противостоят лишь небольшие энергетические барьеры. Эти «скоростные» модели прохождения могут быть переведены в кинетические модели и использованы для аппроксимации экспериментальных данных [7]. Такой подход можно применять для проверки прогнозов модели на основе структурных и вычислительных исследований, а также для связывания экспериментальных результатов со структурными объектами в канальном белке.

Результаты работы А.Л. Ходжкина и А.Ф. Хаксли [1] можно считать образцом применения «скоростной» модели канала, так как они были представлены в виде аналитических функций $\alpha(V)$ и $\beta(V)$, выражающих зависимость числа переходов за единицу времени (далее называемых *интенсивностями переходов воротных частиц*, или просто — *интенсивностями*). Эти переходы происходят при конформационных перестройках канального белка, которые обеспечивают перемещение ионов между внутренней и внешней стороной мембраны) из открытого состояния в закрытое ($\beta(V)$) и обратно ($\alpha(V)$) [5, 8].

Физиологи, исследовавшие вестибулярный и слуховой аппарат животных, определили характеристики калиевых, натриевых и кальциевых токов в волосковых клетках и в первичных нейронах. Однако в основном приводятся не функции $\alpha(V)$ и $\beta(V)$, а стационарные проводимости каналов и постоянные времени для токов. В случаях описания каналов со многими воротными частицами это приводит, например, к тому, что постоянные времени переходных процессов при одном и том же потенциале мембраны, но при разных начальных условиях (в режимах активации и деактивации мембраны) оказываются различными, что противоречит основному предположению о том, что интенсивности зависят только от потенциала. Такие случаи, возможно, связаны с трудностями определения постоянных времени на тестовых потенциалах близких к значению потенциала покоя клетки. Далее мы, используя математическую модель, покажем, что никакого парадокса не возникает, и несмотря на большие

шумы в данных в окрестности потенциала покоя клетки, возможно восстановить значения функций $\alpha(V)$ и $\beta(V)$ и уточнить по ним значения постоянных времени для разных каналов.

В настоящее время новые технические возможности при проведении экспериментов на возбудимых рецепторных клетках животных приводят к необходимости дополнительного математического описания ионной проводимости клеточных мембран и анализа получающихся при моделировании результатов для их трактовки и дальнейшего использования.

Для описания изменения вероятностей состояний каналов в форме марковских процессов с помощью обыкновенных дифференциальных уравнений [6] требуется, чтобы были известны интенсивности переходов между состояниями канала. Зависимость вероятностей от потенциала представляется, например, традиционными формулами Ходжкина–Хаксли [1]. Такое описание позволяет выбрать интервал и длительность тестового потенциала, на котором проводится исследование каждого тока, а также определить вид аппроксимирующих функций для анализа записей тока клетки, получаемых как результат испытаний по протоколу «*Volt-Clamp*». В этих опытах производятся записи изменения тока через определенный тип каналов возникающего при мгновенных переходах потенциала клетки между фиксированными уровнями. Полученные графики аппроксимируются функциями времени с известными параметрами. В результате получают наборы значений параметров аппроксимирующей функции, описывающей изменение силы тока, для каждого фиксированного значения потенциала мембраны. Затем на основе этой таблицы определяются экспериментальные значения интенсивностей для этих значений мембранного потенциала.

Для получения параметров интенсивностей в традиционном аналитическом виде предлагается использовать квазирегулярный метод наименьших квадратов для монотонных гладких функций, который изложен далее. Приводятся примеры определения интенсивностей для двух типов калиевых каналов в мембранах волосковых клеток вестибулярных органов лягушки по результатам экспериментов, описанных в работе [7].

Математическая модель перехода между состояниями ионного канала. Для построения математической модели переходного процесса, наблюдаемого в эксперименте, рассмотрим традиционный метод исследования свойств ионных каналов — метод регистрации тока при испытаниях по протоколу «*Volt-Clamp*», использованный Ходжкиным и Хаксли. При испытаниях потенциал мембраны исследуемой клетки V_m сначала длительно удерживается на постоянном значении

$V_m = V_{\text{hold}}$, а затем мгновенно переключается на потенциал $V_m = V_{\text{test}}$ (индексом «m» здесь и далее будем обозначать переменные и параметры, относящиеся к мембране клетки). При этом мгновенно изменяются интенсивности переходов воротных частиц между открытыми и закрытыми состояниями во всех ионных каналах и начинается переход вероятностей открытого состояния каналов от стационарного значения при потенциале мембраны $V_m = V_{\text{hold}}$ к стационарному значению при $V_m = V_{\text{test}}$. Поддержание потенциала на заданном значении во время этого переходного

процесса осуществляет электрическая схема, подающая в клетку ток I_{com} , который компенсирует изменения мембранного тока клетки. Обработка записей компенсирующего тока позволяет найти характеристики исследуемых ионных каналов.

Если параметры протокола (потенциалы V_{hold} и V_{test} и длительности их действия) подобраны так, что возникающий ток является током через калиевые каналы одного заданного типа, то изменение общего мембранного тока может быть описано уравнением

$$I_{\text{com}}(t) = C_m \frac{dV_m}{dt} + G_K P_{\text{open}}(t)(V_{\text{test}} - E_K) + G_l(V_{\text{test}} - E_l)$$

с начальными условиями $V_m(t=0) = V_{\text{hold}}$, и $P_{\text{open}}(t=0) = P_{\text{open}}(V_{\text{hold}})$, где вероятностная мера числа каналов, открытых в момент времени t . Параметры равновесного потенциала и проводимости ионнеселективного тока утечки E_l и G_l обычно бывают известны до начала обработки основных результатов, и ток утечки может быть компенсирован. Реверсный потенциал калиевого тока E_K также можно считать известным, если известны концентрации калия в протоплазме и вне клетки. Обозначим C_m — емкость клеточной мембраны и G_K — максимальная проводимость каналов изучаемого типа определяемые экспериментально.

Так как схема с отрицательной обратной связью обеспечивает равенство $\frac{dV_m}{dt} = 0$, и ток утечки компенсирован, то в результате опыта регистрируется ток $I_{\text{com}}(t) = P_{\text{open}}(t)G_K(V_{\text{test}} - E_K)$. Во всех дальнейших вычислениях мы будем предполагать, что величины G_K и E_K известны и можно для каждого значения V_{test} получить зависимость от времени для вероятности открытого состояния канала: $P_{\text{open}}(t) = \frac{I_{\text{com}}(t)}{G_K(V_{\text{test}} - E_K)}$.

Следуя Ходжкину и Хаксли, сделаем два предположения: общая проводимость клеточной мембраны для однотипных ионных каналов равна сумме проводимостей большого количества отдельных каналов; проводимость каждого канала зависит от функционирования входящих в его состав воротных частиц.

Пусть каждая воротная частица в случайные моменты времени, образующие случайные пуассоновские потоки событий, переходит из открытого состояния в закрытое со средней скоростью $\beta(V)$ и из закрытого в открытое со средней скоростью $\alpha(V)$, где V — электрический потенциал мем-

браны клетки. Если все воротные частицы (k) в канале включены последовательно и управляют независимыми потоками событий, то кинетика ионного канала может быть представлена размеченным графом с числом состояний $k+1$:

$$S_{0\beta_1}^{\alpha_0} S_{1\beta_2}^{\alpha_1} S_2^{\alpha_2} \dots S_{k-1\beta_k}^{\alpha_{k-1}} S_k^{\alpha_k} \quad (1)$$

В каждый момент времени все каналы, у которых открыты i ворот, находятся в состоянии S_i , и с каждым состоянием процесса с номером i можно связать значение вероятности нахождения в этом состоянии $P_i^k(t)$, (верхний индекс соответствует общему числу воротных частиц в канале, а нижний индекс соответствует числу открытых

ворот). Очевидно, что $\sum_{j=0}^{k+1} P_j^k(t) = 1$. В состоянии S_k все ворота открыты и проводимость мембраны клетки для соответствующего ионного тока в момент времени t определяется произведением $P_k^k(t)G_{\text{tot}}$, где $G_{\text{tot}} = Ng$, N — общее число однотипных каналов в мембране клетки и g — проводимость одного канала.

Вместо графа канала в форме (1), который соответствует последовательному прохождению ионов через ряд ворот, можно использовать граф с параллельным расположением воротных частиц. Граф (1) возникает при предположении, что в канале существуют последовательно расположенные энергетические ямы, проход через которые закрывается с интенсивностью $\beta_i(V)$, а открывается с интенсивностью $\alpha_i(V)$. Параллельное расположение соответствовало бы возможности открытия канала только в случае присутствия около его входа одновременно всех k частиц.

Если все управляющие потоки являются пуассоновскими и взаимно независимыми, то процесс графа (1) является марковским процессом

[6] с конечным числом дискретных состояний и непрерывным временем. В этом случае изменение вероятностей $P_i^k(t)$ описывается системой уравнений Колмогорова:

$$\frac{dP_i^k(t)}{dt} = -P_i^k(t)(\alpha_i + \beta_i) + \alpha_{i-1}P_{i-1}^k(t) + \beta_{i+1}P_{i+1}^k(t), \quad (2)$$

$$i = 1 \dots k, \alpha_k = 0, \beta_{k+1} = 0$$

при начальных условиях, отвечающих условиям нормировки: $P_0^k(t=0) = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^k(0)$.

Задача идентификации характеристик ионных каналов. В этой работе мы предполагаем, что можно рассматривать процессы быстрой активации и относительно медленной инактивации разделенными во времени. Положим, что в канале находятся k активационных и одна инактивационная частица.

Рассмотрим случай, когда все k воротные частицы идентичны и каждая имеет интенсивности переходов α и β , тогда интенсивности переходов в цепи состояний (1) будут равны:

$$\alpha_0 = k\alpha, \alpha_1 = (k-1)\alpha, \dots, \alpha_{k-1} = \alpha;$$

$$\beta_1 = \beta, \beta_2 = 2\beta, \dots, \beta_k = k\beta.$$

Когда потенциал мембраны постоянен, и интенсивности не зависят от времени, существует стационарное решение системы уравнений (2) и соотношения для стационарных значений вероятностей stP_i^k имеют вид

$$stP_0^k = \beta^k / (\alpha + \beta)^k,$$

$$\dots,$$

$$stP_i^k = C_k^i \alpha^i \cdot \beta^{k-i} / (\alpha + \beta)^k,$$

$$\dots,$$

$$stP_k^k = \alpha^k / (\alpha + \beta)^k,$$

а система уравнений (2) имеет k характеристических корней:

$$\lambda_1 = -(\alpha + \beta), \lambda_2 = -2(\alpha + \beta), \dots, \lambda_k = -k(\alpha + \beta).$$

В условиях проведения экспериментов по протоколу «Volt-Clamp», принято использовать разные обозначения для соответствующих значений потенциала: $V(t=0^-) = V_{hold}$ и $V(t=0^+) = V_{test}$. Такая запись равносильна предположению, что мембрана как конденсатор мгновенно перезаряжается. В дальнейшем мы будем придерживаться этой гипотезы и введем ряд обозначений:

$$\lambda_k = -k(\alpha(V_{test}) + \beta(V_{test})), \tau_k(V_{test}) = -\frac{1}{\lambda_k}$$

$$m_{st}(V_{test}) = \sqrt[k]{stP_{open}(V_{test})} = \frac{\alpha(V_{test})}{\alpha(V_{test}) + \beta(V_{test})} \quad (3)$$

$$stP_{open}(V_{test}) = \left[\frac{\alpha(V_{test})}{\alpha(V_{test}) + \beta(V_{test})} \right]^k = m_{st}^k,$$

где $stP_{open}(V_{test})$ – стационарная вероятность пребывания ионного канала в открытом состоянии.

Представим решение уравнений (2) с учетом введенных обозначений (3) в виде

$$P_{open}(t) = P_k^k(t) = stP_{open}(V_{hold}) + C_1(1 - e^{-t/\tau}) + C_2(1 - e^{-2t/\tau}) + \dots + C_k(1 - e^{-kt/\tau}). \quad (4)$$

Запись решения системы уравнений (2) в форме (4) позволяет показать роль в переходном процессе каждого из членов суммы с различными показателями экспонент.

Возможность такого изменения вероятности предполагает, что интенсивности переходов из закрытого в открытое состояние и обратно принимают новые значения $\alpha(V_{test})$ и $\beta(V_{test})$ за время порядка пикосекунд, а $\tau(V_{test})$ имеет порядок от единиц миллисекунд до десятков и сотен миллисекунд.

Покажем, как выражаются коэффициенты решения (4) $C_1, C_2, \dots, C_k$ через интенсивности переходов воротных частиц в случаях $k = 1, 2, 3$.

Случай одной частицы. Пусть в канале есть только одна активационная воротная частица, $k = 1$ и цепь имеет два состояния:

$$\text{Close} \xrightleftharpoons[\beta]{\alpha} \text{Open}.$$

Тогда уравнение для вероятности открытого состояния канала $P_1^1(t) = P_{open}(t)$:

$$\frac{dP_{open}}{dt} = \alpha(V_{test})(1 - P_{open}) - \beta(V_{test})P_{open}$$

с начальным условием

$$P_{open}(0) = stP_{open}(V_{hold}) = \frac{\alpha(V_{hold})}{\alpha(V_{hold}) + \beta(V_{hold})}.$$

Его решение

$$P_{open}(t) = stP_{open}(V_{hold}) + C_1(1 - e^{-t/\tau_1(V_{test})})$$

$$C_1 = \frac{stP_{open}(V_{test}) - stP_{open}(V_{hold})}{1 - stP_{open}(V_{hold})} = \frac{\alpha(V_{test})}{\alpha(V_{test}) + \beta(V_{test})} - \frac{\alpha(V_{hold})}{\alpha(V_{hold}) + \beta(V_{hold})}, \quad (5)$$

где τ_1 и $stP_{open}(V_{hold})$ выражаются в соответствии с уравнениями (3).

Случай двух частиц. При двух активационных частицах схема канала, представима в виде $\text{Close}_{\beta}^{2\alpha} S_1^{\alpha} \text{Open}$ и уравнения (2) с начальными условиями приобретают вид

$$\begin{aligned} \frac{dP_{S_1}}{dt} &= -(\alpha(V_{\text{test}}) + \beta(V_{\text{test}})) P_{S_1} + 2\beta(V_{\text{test}}) P_{\text{open}} + 2\alpha(V_{\text{test}})(1 - P_{S_1} - P_{\text{open}}), \\ \frac{dP_{\text{open}}}{dt} &= \alpha(V_{\text{test}}) P_{S_1} - 2\beta(V_{\text{test}}) P_{\text{open}}, \\ P_{\text{open}}(0) &= stP_{\text{open}}(V_{\text{hold}}) = \left(\frac{\alpha(V_{\text{hold}})}{\alpha(V_{\text{hold}}) + \beta(V_{\text{hold}})} \right)^2, \\ P_{S_1}(0) &= stP_{S_1}(V_{\text{hold}}) = 2\alpha(V)\beta(V) \left(\frac{1}{\alpha(V) + \beta(V)} \right)^2 \Big|_{V=V_{\text{hold}}}. \end{aligned} \quad (6)$$

Решение уравнений (6) имеет вид

$$P_{\text{open}}(t) = stP_{\text{open}}(V_{\text{hold}}) + C_1 \left(1 - e^{-t/\tau(V_{\text{test}})}\right) + C_2 \left(1 - e^{-2t/\tau(V_{\text{test}})}\right). \quad (7)$$

Постоянные коэффициенты решения (7) в обозначениях (3):

$$\begin{aligned} C_1 &= 2k_1 - k_2 \cdot \tau(V_{\text{test}}), \\ C_2 &= -k_1 + k_2 \cdot \tau(V_{\text{test}}), \\ k_1 &= stP_{\text{open}}(V_{\text{test}}) - stP_{\text{open}}(V_{\text{hold}}), \\ k_2 &= 2\beta(V_{\text{test}}) stP_{\text{open}}(V_{\text{hold}}) + \alpha(V_{\text{test}}) stP_{S_1}(V_{\text{hold}}). \end{aligned} \quad (8)$$

Случай трех частиц. При наличии трех активационных частицах схема канала ($k=3$) представима в виде $\text{Close}_{\beta}^{3\alpha} S_1^{2\alpha} S_2^{\alpha} \text{Open}$ и уравнения (2) с начальными условиями приобретают следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{dP_{\text{open}}}{dt} &= \alpha(V_{\text{test}}) P_{S_2} - 3\beta(V_{\text{test}}) P_{\text{open}}, \\ \frac{dP_{S_1}}{dt} &= (-2\alpha(V_{\text{test}}) - \beta(V_{\text{test}})) P_{S_1} + 2\beta(V_{\text{test}}) P_{S_2} + 3\alpha(V_{\text{test}})(1 - P_{S_1} - P_{\text{open}} - P_{S_2}), \\ \frac{dP_{S_2}}{dt} &= 2\alpha(V) P_{S_1} - (2\beta(V) + \alpha(V)) P_{S_2} + 3\beta(V) P_{\text{open}} \Big|_{V=V_{\text{test}}}, \\ P_{\text{open}}(0) &= stP_{\text{open}}(V_{\text{hold}}) = \left(\frac{\alpha(V_{\text{hold}})}{\alpha(V_{\text{hold}}) + \beta(V_{\text{hold}})} \right)^3, \\ P_{S_1}(0) &= stP_{S_1}(V_{\text{hold}}) = 3\alpha(V_{\text{hold}})\beta^2(V_{\text{hold}}) \left(\frac{1}{\alpha(V_{\text{hold}}) + \beta(V_{\text{hold}})} \right)^3, \\ P_{S_2}(0) &= stP_{S_2}(V_{\text{hold}}) = \frac{3\alpha^2(V_{\text{hold}}) \cdot \beta(V_{\text{hold}})}{(\alpha(V_{\text{hold}}) + \beta(V_{\text{hold}}))^3}. \end{aligned} \quad (9)$$

Они имеют решение

$$\begin{aligned}
 P_{\text{open}}(t) &= \text{st}P_{\text{open}}(V_{\text{hold}}) + C_1 \left(1 - e^{-t/\tau(V_{\text{test}})}\right) + C_2 \left(1 - e^{-2t/\tau(V_{\text{test}})}\right) + C_3 \left(1 - e^{-3t/\tau(V_{\text{test}})}\right), \\
 C_1 &= 3k_1 - 2.5k_2 \cdot \tau(V_{\text{test}}) - 0.5k_3 \cdot \tau^2(V_{\text{test}}), \\
 C_2 &= -3k_1 + 4k_2 \tau(V_{\text{test}}) + k_3 \tau^2(V_{\text{test}}), \\
 C_3 &= k_1 - 1.5k_2 \tau(V_{\text{test}}) - 0.5k_3 \cdot \tau^2(V_{\text{test}}), \\
 k_1 &= \text{st}P_{\text{open}}(V_{\text{test}}) - \text{st}P_{\text{open}}(V_{\text{hold}}), \\
 k_2 &= -3\beta(V_{\text{test}}) \cdot \text{st}P_{\text{open}}(V_{\text{hold}}) + \alpha(V_{\text{test}}) \cdot \text{st}P_{S_2}(V_{\text{hold}}), \\
 k_3 &= -4\beta(V_{\text{test}}) \alpha(V_{\text{test}}) \cdot \text{st}P_{S_2}(V_{\text{hold}}) + 4\alpha^2(V_{\text{test}}) \text{st}P_{S_1}(V_{\text{hold}}), \\
 \text{st}P_{\text{open}}(V_{\text{test}}) &= \left[\frac{\alpha(V_{\text{test}})}{\alpha(V_{\text{test}}) + \beta(V_{\text{test}})} \right]^3.
 \end{aligned} \tag{10}$$

Аналогично результатам для $\text{st}P_{\text{open}}(V_{\text{test}})$, получаемым при гипотезе о последовательном расположении воротных частиц в каналах (граф (1)), при параллельном расположении воротных частиц стационарные вероятности открытого состояния канала были бы такими же (см. (3), но увидеть участие в переходных процессах составляющих с разными степенями экспонент было бы сложнее.

Таким образом, если считать известными интенсивности переходов для одной воротной частицы, то полностью становятся известными все характерные свойства канала, имеющего k идентичных воротных частиц.

Мы предлагаем определять интенсивности переходов в два этапа.

На первом этапе из экспериментов по протоколам «Volt-Clamp» можно получить оценки параметров зависимости стационарных значений вероятностей открытия канала $\text{st}P_{\text{open}}(V)$ от потенциала. Пусть

$$m(V)^i = \text{st}P_{\text{open}}(V) = \left(\frac{\alpha(V)}{\alpha(V) + \beta(V)} \right)^i, \tag{11}$$

предполагая, что число воротных частиц в канале равно i .

Для уменьшения влияния погрешностей по полученным измерениям $\text{st}P_{\text{open}}(V)$ строится оценка $\tilde{m}$ с использованием аппроксимации функцией Больцмана в степени i :

$$\tilde{m}^i(V) = (1 + \exp((V - V_{1/2})/s))^{-i}. \tag{12}$$

При этом определяется степень i и соответствующие ей параметры функции Больцмана: сдвиг $V_{1/2}$, делитель s и степень i , минимизирующие сумму квадратов невязки в точках V_{test} . После этого во всех дальнейших вычислениях будем вместо $m(V)$ использовать приближение (12).

Второй этап использует априорную информацию о связях между стационарной вероятностью открытого состояния каждой воротной частицы и постоянной времени установления этой вероятности с интенсивностями входящего и выходящего потоков:

$$\frac{\alpha}{\beta} = \frac{m}{1-m}, \quad \tau = \frac{1}{\alpha + \beta}. \tag{13}$$

Если в результате экспериментов по протоколу «Volt-Clamp» известны значения вероятности открытия $m_e(V_{\text{test}})$ (экспериментальные данные будем обозначать индексом «е») и выполнено приближение (4) для определения $\tau_e(V_{\text{test}})$, то получим точечные оценки для интенсивностей:

$$\alpha_e(V_{\text{test}}) = \frac{\tilde{m}(V_{\text{test}})}{\tau_e(V_{\text{test}})}, \quad \beta_e(V_{\text{test}}) = \frac{1 - \tilde{m}(V_{\text{test}})}{\tau_e(V_{\text{test}})}. \tag{14}$$

Пусть по формулам (14) вычислены интенсивности для каждого значения потенциала $V = V_{\text{test}}$.

Зададим вид аналитического представления $\alpha(V)$ и $\beta(V)$:

$$\begin{aligned}
 \alpha(V) &= f^1(u) = u / (1 - e^{-u}), \text{ где } u = a_\alpha V + b_\alpha, \\
 \beta(V) &= f^2(u) = e^{-u}, \text{ где } u = a_\beta V + b_\beta.
 \end{aligned} \tag{15}$$

Задача аппроксимации $\alpha(V)$ и $\beta(V)$ сводится к поиску коэффициентов $a_\alpha, b_\alpha, a_\beta, b_\beta$ в выражениях (15). Для их определения мы используем квази-регулярный метод наименьших квадратов, предложенный В.И. Куриловым и описанный в приложении.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве примера использования предлагаемого способа получения оценок для интенсивностей $\alpha(V)$ и $\beta(V)$ переходов между состояниями в ионных каналах с несколькими воротными частицами воспользуемся результатами опытов, опубликованных в работе [7]. Мы остановились

Таблица 1.

1	Экспериментальные значения стационарной вероятности открытия активационной воротной частицы в канале I_{Kdr}														
	V_{test} , мВ	–85	–80	–75	–70	–65	–60	–55	–50	–40	–30	–20	0	10	20
	m_{exp}	0.025	0.065	0.087	0.15	0.27	0.43	0.6	0.73	0.85	0.96	0.99	0.995	1	1
2	Экспериментальные значения постоянной времени I_{Kdr}														
	V_{test} , мВ	–85	–80	–75	–70	–65	–55	–40	–30	–20	–10	0			
	τ_{exp} , мс	6	8.5	11	17	23	32	26	15	8.5	5.6	3			
3	Экспериментальные значения стационарной вероятности открытия отдельной активационной воротной частицы и постоянной времени в канале I_{Ka}														
	V_{test} , мВ	–70	–65	–60	–50	–45	–40	–35	–30	–25	0				
	n_{exp}	0.016	0.044	0.102	0.33	0.415	0.613	0.73	0.815	0.88	0.99				
	τ_e , мс	2.63	3.2	3.69	4.8	5.18	4.7	3.9	2.9	2.3	0.5				
4	Нормированные максимальные значения тока I_{Ka} при учете инактивации														
	V , мВ	–120	–110	–80	–70	–60	–40	–20							
	h_{exp}	0.9924	0.99016	0.9774	0.31317	0.0344	0.0027	0.0000163							
5	Постоянная времени инактивации тока I_{Ka} , зависящая от потенциала мембраны														
	V , мВ	–120	–110	–100	–80	–70	–60								
	τ_i , мс	4.3	11	70	280	153	44								

на этой работе, так как авторы приводят подробное описание условий проведения исследования потенциал-зависимых калиевых токов типа I_{Kdr} и I_{Ka} .

Характеризуя ток I_{Kdr} , так называемый «ток задержанного выпрямления», авторы работы [3] подтверждают общепринятую гипотезу, что калиевые ионные каналы типа I_{Kdr} содержат по две активационные воротные частицы. Влияние инактивационных частиц на времена приводимых записей тока (до 120 мс) из-за большой величины их постоянных времени можно пренебречь.

По приведенным в работе [7] графикам были получены значения максимальной проводимости и экспериментальной стационарной вероятности открытого состояния каналов. Применяв аппроксимацию (12) при $i = 2$ и объединив данные для режимов активации и деактивации тока получили значения $stm_{exp}(V_{test})$, представленные в табл. 1 (раздел 1). Аппроксимация была проведена с помощью алгоритма Левенберга (LMA), входящего в пакет программ pClamp. Параметры аппроксимации (12): $V_{1/2} = -58.12$ мВ и $s = 7.14$ мВ.

Затем для некоторых тестовых потенциалов были получены постоянные времена τ при использовании аппроксимации вероятности открытого состояния каналов формулой (7) и процедуры «экспоненциальная, кумулятивная вероятность» в пакете pClamp. Для режима активации мембраны $st_{open}(V_{hold} = -60 \text{ мВ}) = 0.185$, для режима деактивации $st_{open}(V_{hold} = -10 \text{ мВ}) = 1.0$. Объединив результаты вариантов активации и деактивации, мы получили ряд значений $\tau = \tau_e(V_{test})$, приведенных в табл. 1 (раздел 2).

При $V_{test} -50$ мВ и -60 мВ найденные нами в режимах активации и деактивации постоянные времена имели значимый разброс и были исключены из рассмотрения. При остальных тестовых потенциалах значения $\tau(V_{test})$ были сопоставимы с данными, приведенными на рис. 4в в работе [7], с учетом того, что авторы статьи приводят результаты для режима деактивации умноженными на два.

По экспериментальным данным $m_{exp}(V_{test})$ и $\tau_e(V_{test})$ были получены оценки интенсивностей $\alpha_e(V_{test})$ и $\beta_e(V_{test})$ по формулам (14). Модель для

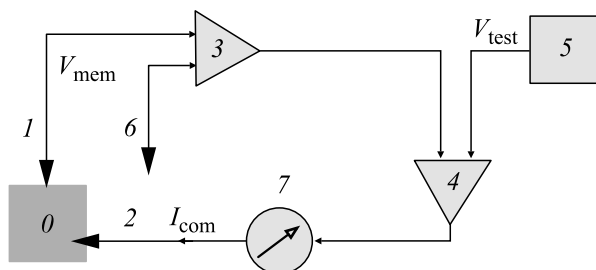


Рис. 1. Электрическая схема установки для проведения испытаний на гигантском аксоне кальмара в виде, приведенном в работе [1]. Генератором управляющих напряжений (5) создается тестовый потенциал. Электродом (1) измеряется V_m — потенциал мембраны клетки (0), который после инвертирования (3) подается на устройство сравнения (4), где вырабатывается ток пропорциональный разности потенциалов. Этот ток измеряется регистрирующим устройством (7) и поступает в клетку через электрод (2). (6) — Внеклеточный электрод — датчик нуля.

аппроксимации интенсивностей аналитическими функциями представлена формулами (15). Подбор величин параметров a_α , b_α , a_β , b_β проводили по алгоритму, последовательно минимизирующему невязки для каждой из двух интенсивностей квазирегулярным методом наименьших квадратов, описанным в приложении.

Объединив результаты случаев активации и деактивации, мы получили ряд значений τ , приведенных в табл. 1 (раздел 2).

При полученных значениях: $(a_\alpha, b_\alpha) = (0.0628, -2.163)$ и $(a_\beta, b_\beta) = (0.0872, 9.16)$ на рис. 2а,б построены графики интенсивностей, постоянной времени и вероятности открытого состояния для активационных воротных частиц в канале I_{Kdr} , из которых видно, что возможно единообразное описание постоянной времени переходных процессов изменения вероятностей для открытого

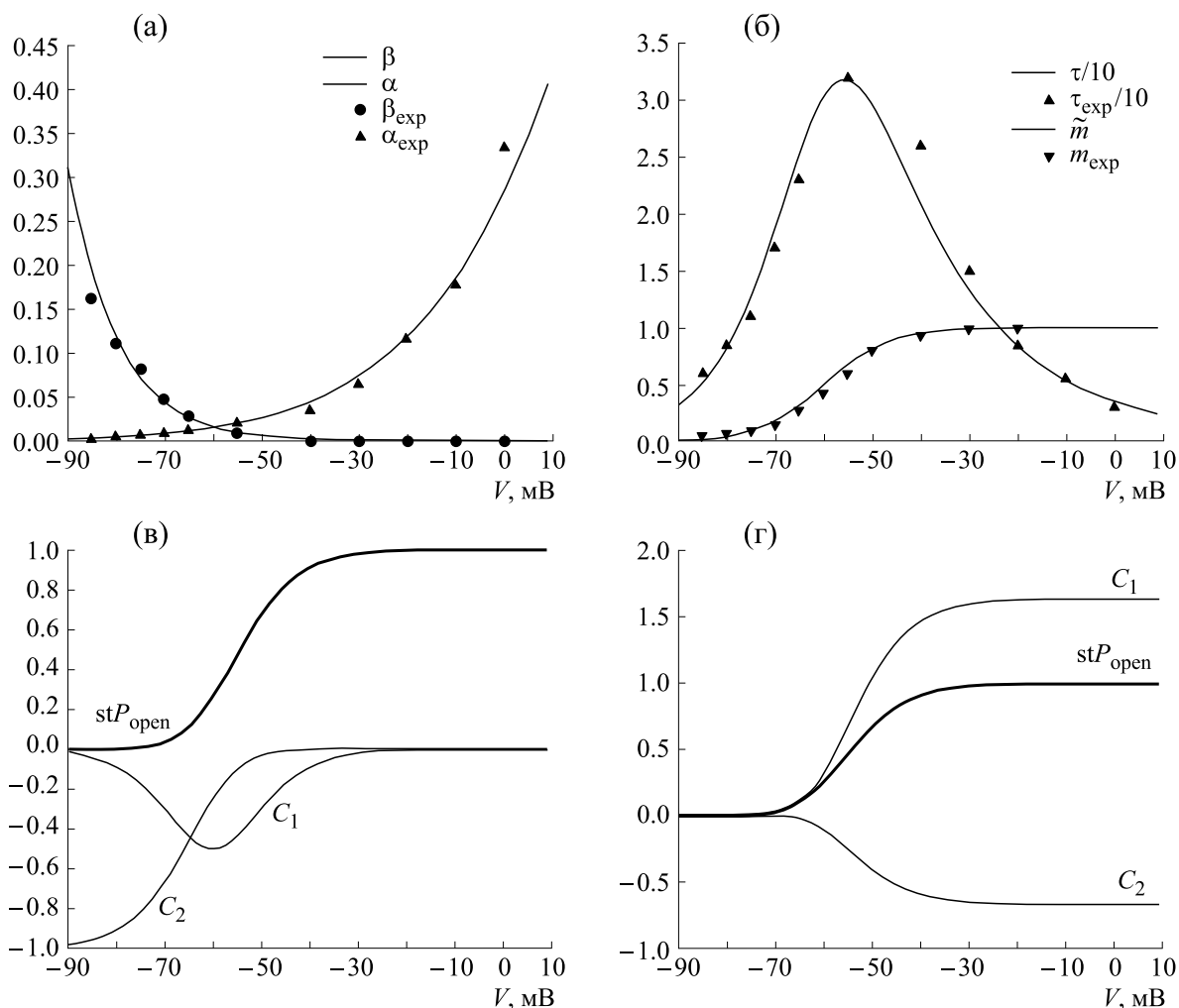


Рис. 2. (а) — Результат аппроксимации интенсивностей для активационных воротных частиц в канале I_{Kdr} формулами (14); (б) — постоянная времени и вероятность открытого состояния канала I_{Kdr} , вычисленные с использованием полученных интенсивностей; (в) и (г) — зависимости от тестового потенциала коэффициентов $C_1(V_{test})$ и $C_2(V_{test})$.

состояния ионного канала во всем диапазоне тестовых потенциалов. На рис. 2в,г показано, как изменяются константы C_1 и C_2 в формуле (7) в зависимости от тестового потенциала в режимах активации и деактивации. Из формулы (7) видно, что при больших значениях времени вероятность открытого состояния каждого канала равна

$$stP_{open}(V_{test}) = stP_{open}(V_{hold}) + C_1 + C_2,$$

а в течение всего переходного процесса C_1 и C_2 определяют относительный вклад членов с показателями экспонент τ и $\tau/2$. Оказывается, что в режиме деактивации C_1 и C_2 отрицательны и это создает впечатление более быстрого переходного процесса. Особенно это заметно при тестовых потенциалах ниже -60 мВ, когда C_2 становится по абсолютной величине больше, чем C_1 .

Дополнительно рассмотрим приводимые в той же статье результаты определения характеристик быстро активирующегося и обладающего заметной инактивацией калиевого тока I_{Ka} . Традиционно считается, что каналы этого тока включают по три одинаковых активационных частицы и по одной инактивационной. Активация имеет сходные параметры в мембранах многих исследованных клеток. Инактивация же может проходить по-разному. Результаты авторов работы [7] показывают, что все каналы I_{Ka} в мембранах волосковых клеток саккулюса лягушки имеют одинаковые активационные частицы, но у одной части каналов постоянная времени инактивации зави-

сит от потенциала, а в другой части постоянная времени инактивации неизменна и равна 74 мс, т.е. не зависит от потенциала. Однако стационарные значения вероятности открытого состояния у всех инактивационных ворот одинаковы.

Для этого тока определение параметров интенсивностей для активационных и инактивационных воротных частиц можно проводить независимо, так как их постоянные времени различаются на один-два порядка. Поэтому можно назначить переключения управляющего потенциала в испытаниях «Volt-Clamp» таким образом, что на одном отрезке времени регистрируемый ток изменяется под действием активации, а на другом отрезке — под действием инактивации.

Покажем это на примере опытов, описанных в цитируемой работе [7], где на рис. 5 приводятся результаты активационного протокола для тока I_{Ka} . Волосковые клетки сначала долгое время удерживались на потенциале -10 мВ, при котором оба калиевые тока были полностью инактивированы. Затем потенциал удерживался в течение 100 мс на значении -100 мВ, при котором за это время инактивация I_{Ka} может восстановиться до единицы, а I_{Kdr} остается инактивированным. Затем включаются деполяризующие потенциалы из диапазона $(-80 \dots +30)$ мВ, действующие больше одной секунды. При этом протоколе было зарегистрировано семейство компенсирующих токов, демонстрирующих высокую степень инактивации

$$I(t) = G_{max} \cdot (V_{test} - E_K) \cdot P_{open}^{ac}(V_{test}) \cdot P_{open}^{in}(V_{test}). \quad (16)$$

Допустим, что на начальном этапе действия деполяризующего напряжения (от 0 до t_{max}) вероятность активации t вырастает до своего максимального значения $stP_{open}^{ac}(V_{test}) = (stm)^3$ и затем остается постоянной, а вероятность инактивации

до момента $t = t_{max}$ не успевает значительно измениться, то есть $P_{open}^{in} = 1$ (как при $t = 0$ (когда $V_{hold} = -100$ мВ). При этом значения максимумов тока для каждого V_{test} равны:

$$\max I(t) = G_{max} \cdot (V_{test} - E_K) \cdot stP_{open}^{ac}(V_{test}). \quad (17)$$

Действуя в порядке, описанном подробно для тока I_{Kdr} , мы на отрезке времени $(0 - t_{max})$ выполнили аппроксимацию согласно формуле (10) и получили для $i = 3$ точечные значения $m_e(V_{test})$, представленные в табл. 1 (раздел 3), для которых по формулам (14) были определены экспериментальные значения $\alpha_e(V_{test})$ и $\beta_e(V_{test})$ и получено их приближенное формульное описание (14) с коэффициентами $(a_\alpha, b_\alpha) = (0.0492, 0.0111)$ и $(a_\beta, b_\beta) = (4.383, 1.1439)$.

На рис. 3а,б показаны результаты вычислений интенсивностей, постоянной времени и вероятности открытого состояния для активационных воротных частиц в канале I_{Ka} . На рис. 3в,г показано, как изменяются константы C_1 , C_2 и C_3 в формуле (10) в зависимости от тестового потенциала в режимах активации и деактивации. Из формулы (10) видно, что при больших значениях времени вероятность открытого состояния каждого канала равна

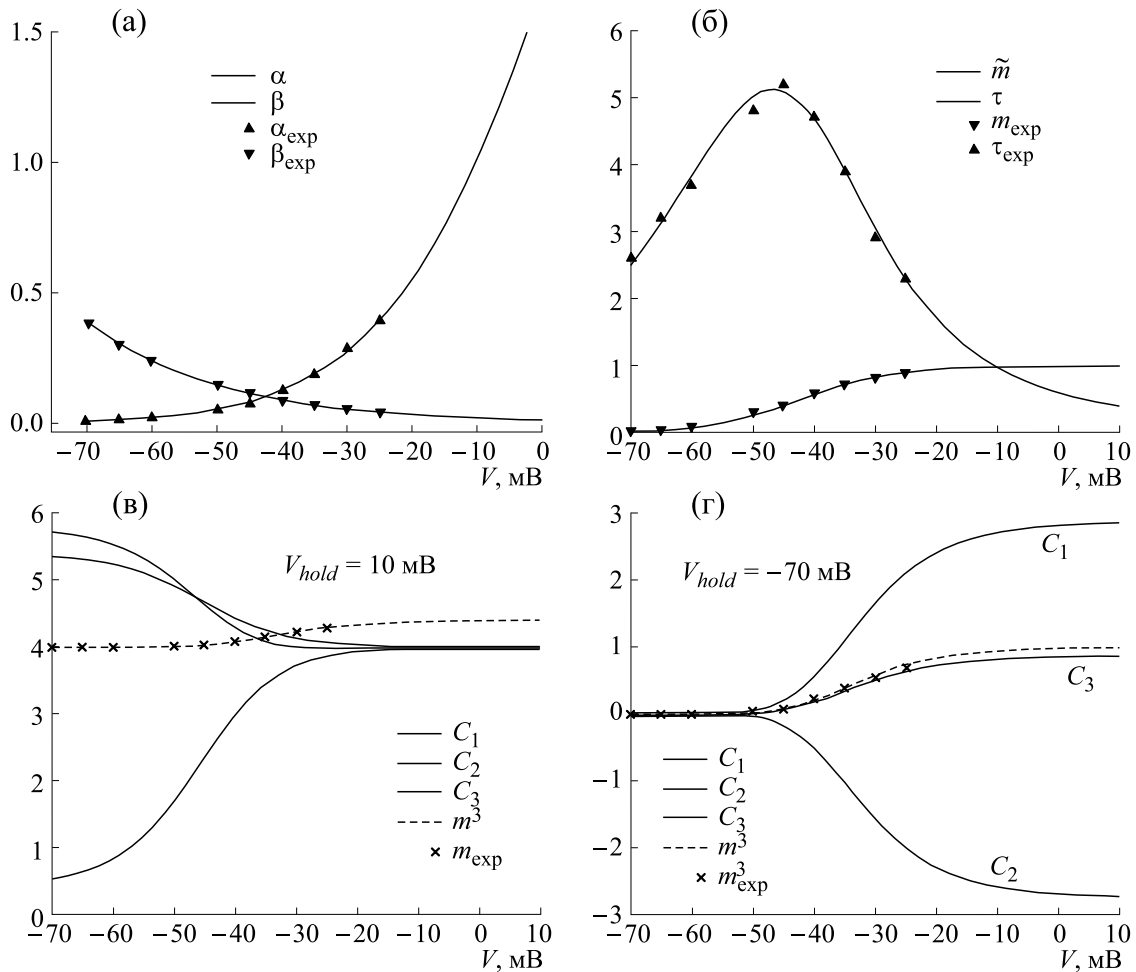


Рис. 3. (а) — Результат аппроксимации интенсивностей для активационных воротных частиц в канале I_{Ka} формулами (15) при $(a_\alpha, b_\alpha) = (0.0492, 0.0111)$ и $(a_\beta, b_\beta) = (4.383, 1.1439)$. (б) — Вычисленные с использованием полученных интенсивностей зависимости постоянной времени и вероятности открытого состояния канала I_{Ka} (параметры функции Больцмана $s = 7.425$, $V_{1/2} = -42.13$ мВ) от V . (в) и (г) — Для режимов активации ($V_{hold} = -70$ мВ) и деактивации ($V_{hold} = 10$ мВ) построены зависимости от тестового потенциала коэффициентов C_1 , C_2 и C_3 формулы (10) для представления тока в виде (4).

$$stP_{open}(V_{test}) = stP_{open}(V_{hold}) + C_1 + C_2 + C_3,$$

а в течение всего переходного процесса C_1 , C_2 и C_3 определяют относительный вклад в переходный процесс членов с показателями экспонент τ , $\tau/2$, $\tau/3$.

На рис. 4 приведены графики изменения во времени трех составляющих, входящих в выражения для вероятности открытия P_{open} активационных ворот I_{Ka} в режимах активации (переход от -70 мВ к -40 мВ, рис. 4а) и деактивации (переход от 0 мВ к -40 мВ, рис. 4б). Постоянная времени в обоих случаях равна 4.657 мс, а переходные процессы выглядят различно. Особенно хорошо это видно на рис. 4в, где они показаны в общем масштабе на оси ординат.

Для определения интенсивностей инактивационной воротной частицы в каналах I_{Ka} , зависящих от потенциала мембраны, нужно разделить каждое значение $I(t)$ (формула (16)) на его максимум (формула (17)) чтобы получить зависимости $P_{open}^{in}(t)|_{V=V_{test}}$. Установившиеся значения $P_{open}^{in}(t)|_{V=V_{test}}$ соответствуют стационарной вероятности открытого состояния инактивационной воротной частицы, обозначенной в таблице как

$$h_{exp}(V_{test}) = stP_{open}^{in}(V_{test}) = \frac{1}{1 + \exp\left(\left(V_{1/2}^{in} - V_{test}\right) / s^{in}\right)},$$

которую аппроксимируем функцией Больцмана с параметрами $s = -4.4413$, $V_{1/2} = -88.304$.

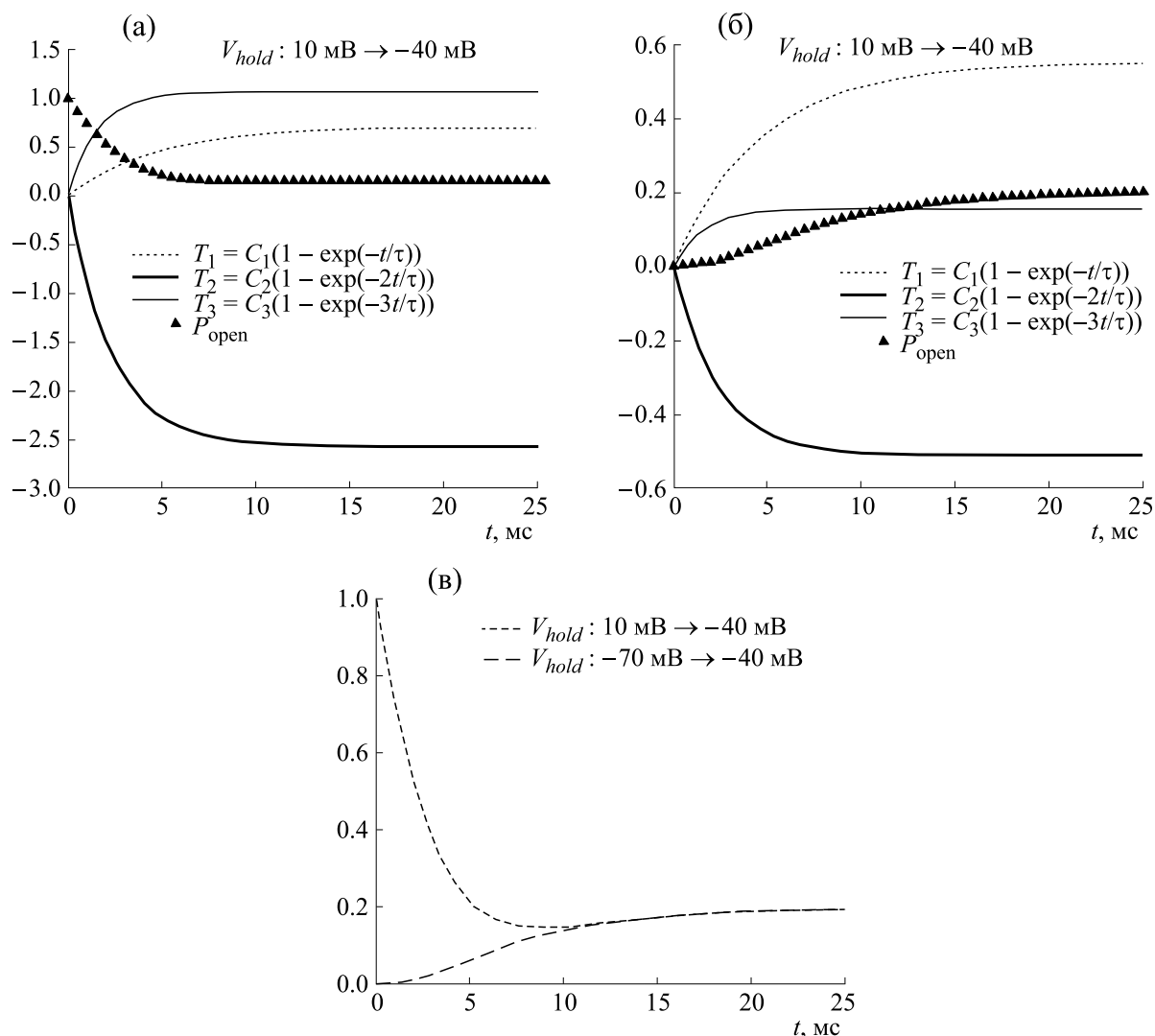


Рис. 4. Изменение во времени трех составляющих с постоянными времени τ , $\tau/2$ и $\tau/3$, входящих в P_{open} I_{Ka} : (а) — активация, (б) — деактивация, (в) — сравнение изменения вероятности открытого состояния каналов для случаев (а) и (б).

Если принять гипотезу о разделении каналов I_{Ka} по виду инактивации на две группы с долями от общего числа W_1 и $W_2 = 1 - W_1$, то аппрокси-

мацию графиков тока для определения $\tau_1(V_{test})$ нужно проводить по формуле

$$P_{open}^{in}(t'')(V = V_{test}) = sth_{test} + (-sth_{test} + sth_{hold}) \cdot [W_1 e^{-t''/\tau_1} + W_2 e^{-t''/74}],$$

$$P_{open}^{in}(t)(V = V_{test}) = h_{test} + (-h_{test} + h_{hold}) \cdot [W_1 e^{-t/\tau_1} + W_2 e^{-t/74}],$$

где $t'' = t - t_{max}$ и sth_{test} — значения нормированного тока, аппроксимированные функцией Больцмана, значения W_1 и W_2 определяются дополнительными экспериментами, а через sth_{hold} обозначено значение тока в начальный для аппроксимации момент времени t_{max} . Численные

результаты аппроксимации представлены в табл. 1 (раздел 5).

На основании данных табл. 1 (раздел 5) аналогично предыдущим примерам определяли $\alpha_e(V_{test})$ и $\beta_e(V_{test})$, полученные при аппроксимации формулами (14) коэффициенты равнялись:

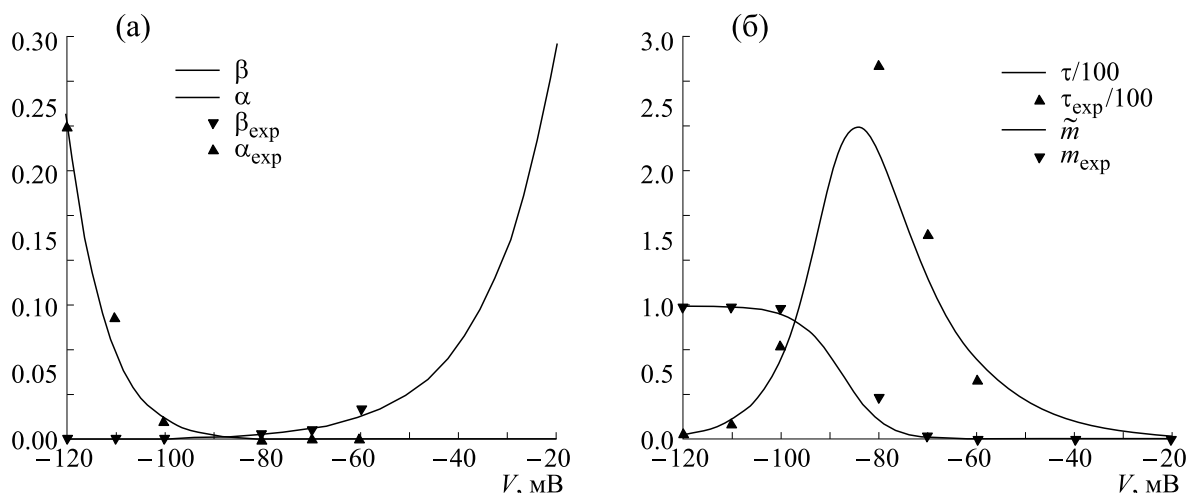


Рис. 5. (а) — Интенсивности и стационарная вероятность открытого состояния I_{Ka} ; (б) — постоянные времени инактивации I_{Ka} .

$(a_\alpha, b_\alpha) = (-0.0718, -0.1797)$ и $(a_\beta, b_\beta) = (-0.2166, -23.94)$.

Графики интенсивностей, стационарной вероятности открытого состояния и постоянной времени соответствующие этим коэффициентам показаны на рис. 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ функционирования ионных каналов с помощью их описания как марковских процессов позволяет выбрать параметры для протоколов «Volt-Clamp» и объяснить некоторые значительные разногласия при определении постоянных времени отдельных воротных частиц.

Ходжкин и Хаксли определяли интенсивности переходов для одной воротной частицы, выбрав вид их аналитического представления. При вычислениях они использовали записи токов по протоколам, соответствующим режимам активации токов, указав, что деактивация происходит по простой экспоненте. Подробного анализа деактивации они не приводят. Возможно, для нейрона эти режимы менее заметны, чем режимы активации. Однако, для описания мембранного потенциала волосковых клеток вестибулярных органов существенным является описание их функционирования в области потенциала покоя. В этом диапазоне постоянные времени максимальны, а их восстановление из опытных данных затруднено из-за малых амплитуд тока. Поэтому именно при режимах деактивации удастся полу-

чить надежные оценки параметров токов при потенциалах ниже потенциала покоя клетки.

Основная рекомендация: при выборе длительности интервала записи траекторий тока в режиме «Volt-Clamp»: нужно ориентироваться на длительность переходных процессов при потенциалах близких к потенциалу покоя клетки, причем для этого диапазона потенциалов особенно полезно определять постоянную времени по оконечному отрезку записей, так как на этой части траекторий остается только составляющая с самым большим значением постоянной времени τ . Затем, используя эту оценку τ , можно выяснить присутствуют ли составляющие с постоянными времени, близкими к $\tau/2$, $\tau/3$ и т.д. на начальном отрезке траекторий тока. Наличие таких составляющих покажет, каким должно быть принято число однотипных воротных частиц при описании канала. Если же быстрые составляющие имеют постоянные времени, далекие от $\tau/2$, $\tau/3$..., то можно предположить, что воротные частицы в канале неоднородны. В этом случае модель для аппроксимации траекторий тока можно получить, решая уравнения Колмогорова (2) в общем виде.

Наш анализ также показал, что в протоколы испытаний необходимо включать варианты деактивации мембраны на гиперполяризованные потенциалы, т.к. только при этих условиях можно определить τ для диапазона, где устанавливается $P_{open}(V_{test}) \ll 1$.

Обычно для проведения аппроксимации траекторий тока необходимо указывать начальные

величины параметров приближения. Для этого можно воспользоваться найденными при известных интенсивностях $\alpha_e(V_{\text{test}})$ и $\beta_e(V_{\text{test}})$ значениями амплитуд переходных процессов $C_1, C_2, \dots$ для каналов со сходными свойствами. Особенно это поможет в случаях, когда C_1 и C_2 имеют разные знаки и близки по абсолютной величине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что процессы активации и деактивации воротных частиц описываются уравнения Колмогорова (2). Постоянные решения уравнений (2) и интенсивности переходов воротных частиц могут быть определены квазирегулярным методом наименьших квадратов.

Приведенная модель функционирования ионных каналов (2) в виде системы обыкновенных дифференциальных уравнений Колмогорова позволяет определять входящие в нее микропараметры с помощью макроизмерений токов от всей клетки. Такими микропараметрами являются интенсивности потоков событий управляющих переключениями состояний гипотетических воротных частиц в потенциал зависимых ионных каналах. Поэтому описанная модель имеет тип «скоростной» модели и лишь уточняет некоторые положения модели Ходжкина–Хаксли [1]. Знание аналитической зависимости интенсивностей потоков от потенциала позволит описывать процесс функционирования волосковой клетки при произвольных движениях головы животного, что актуально для вестибулярных исследований, создания вестибулярных протезов и корректоров.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Квазирегулярный метод наименьших квадратов.

Рассмотрим общую задачу: пусть имеются наблюдения $y_1, \dots, y_n$, соответствующие значениям функции $f(ax + b)$ с параметрами (a, b) в точках $x_1, \dots, x_n$, и эти наблюдения сопровождаются отклонениями

$$\varepsilon_i = y_i - f(ax_i + b), i = 0, \dots, n.$$

Ставится задача нахождения оптимальных значений (a_0, b_0) для пары (a, b) , обеспечивающих минимум сумме квадратов отклонений $\sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2$,

что формально записывается следующим образом:

$$(a_0, b_0) = \underset{(a,b)}{\operatorname{argmin}} \sum_{i=0}^n \varepsilon_i^2. \quad (18)$$

Случай линейной функции. Задачи минимизации (18) для линейной функции $f(u) = u$ сводится к регулярному методу наименьших квадратов. Оптимальные значения (a_0, b_0) определяются из следующих выражений:

$$y = f(u), u = a_0 x + b_0, \quad (19)$$

$$a_0 = \operatorname{cov}(y, u) / \operatorname{cov}(u, u), b_0 = E(y) - a_0 E(u), \quad (20)$$

где ковариация $\operatorname{cov}(z_1, z_2)$ двух величин z_1 и z_2 и математическое ожидание $E(z)$ величины z определяется по формулам:

$$\operatorname{cov}(z_1, z_2) = E(z_1 z_2) - E(z_1) E(z_2), E(z) = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^n z_i.$$

Случай нелинейной функции. Если функция $f(u)$ не является линейной функцией, то задача нахождения оптимальных значений (a_0, b_0) параметров (a, b) усложняется. Для случая, когда функция $f(u)$ монотонная и гладкая, может быть применен квазирегулярный метод наименьших квадратов, позволяющий находить квазиоптимальные значения параметров (a, b) . Поиск решения задачи (18) заменяется нахождением значений:

$$(\dot{a}_0, \dot{b}_0) = \underset{(a,b)}{\operatorname{argmin}} \sum_{i=0}^n (f^{-1}(y_i) - (ax_i + b))^2. \quad (21)$$

Задача (21) решается регулярным методом наименьших квадратов (20) при условии, что мы умеем находить значения обратной функции $f^{-1}(y)$ [4].

Оценка погрешности квазирегулярного метода. Проведем оценку погрешности предлагаемого квазирегулярного метода наименьших квадратов. Для этого совершим ряд формальных шагов.

С учетом обозначений (19) имеем:

$$f^{-1}(z) = u = \dot{a}_0 x + \dot{b}_0,$$

$$y = f(a_0 x + b_0) = f(\dot{a}_0 x + \dot{b}_0) + \varepsilon = z + \varepsilon.$$

Тогда справедливо с точностью до членов второго порядка малости:

$$f^{-1}(y) = f^{-1}(z + \varepsilon) = f^{-1}(z) + \frac{df^{-1}(z)}{dz} \varepsilon = f^{-1}(z) + \frac{\varepsilon / \frac{df(u)}{du} \Big|_{u=f^{-1}(z)}}{1}. \quad (22)$$

Используя выражение (22), можем переписать задачу (18) в виде:

$$(a_o, b_o) = \operatorname{argmin}_{(a,b)} \sum_{i=0}^n \frac{\varepsilon_i^2}{\left| \frac{df(u)}{du} \right|_{u=ax_i+b}}. \quad (23)$$

Выражения (18) и (23) отличаются тем меньше, чем меньше отличаются значения производной $\left| \frac{df(u)}{du} \right|_{u=ax_i+b}$ для разных точек x_i . Отметим, что свойства монотонности и гладкости функции $y = f(u)$ являются существенными для применимости к этой функции квазирегулярного метода наименьших квадратов. Так, свойство монотонности обеспечивает существование обратной функции $f^{-1}(y)$. Гладкость $f(u)$ необходима для получения оценки (23).

Применение квазирегулярного метода наименьших квадратов. Применим описанный метод к задаче описания проводимости ионных каналов. Нам необходимо оценить значения параметров из уравнения (12):

$$\tilde{\alpha} = f_1(u_1) = u_1 / (1 - e^{-u_1}), \text{ где } u_1 = a_\alpha V + b_\alpha,$$

$$\tilde{\beta} = f_2(u_2) = e^{-u_2}, \text{ где } u_2 = a_\beta V + b_\beta.$$

$$\text{Как и ранее, } \alpha_e(V) = \frac{m(V)}{\tau_e(V)} \text{ и } \beta_e(V) = \frac{1 - m(V)}{\tau_e(V)}.$$

В качестве критерия согласования берем минимум невязки:

$$\sum_{i=0}^m (\tau_e(V) - \tilde{\tau}_e(V))^2 \rightarrow \min. \quad (24)$$

Поиск обратной функции для $f_2(u)$ не представляется сложным:

$$f_2^{-1}(y) = -\ln(y).$$

Для обратной функции $f_1(u)$ выражения в элементарных функциях не существует. Для поиска значений обратной функции можно воспользоваться методом касательных, так как наша функция гладкая. Можно найти, что обратная для $f_1(u)$ функция имеет выражение через функцию Ламберта:

$$f_1^{-1}(y) = y + W(-ye^{-y}),$$

где $W(z)$ — функция Ламберта, определяемая как решение уравнения

$$z = W(z)e^{W(z)}.$$

Решение данного уравнения реализовано в открытых и проприетарных пакетах. В данном слу-

чае использовались решения пакета Matlab[®]. Решение данного уравнения имеет несколько ветвей. В данной задаче выбирается действительное решение, удовлетворяющее свойству обратного, к заданной функции на рассматриваемом множестве значений.

Задача (24) может быть разделена на две, относительно функций α и β . Таким образом, проблема сводится к последовательному поиску значений параметров (a_α, b_α) , минимизирующих невязку

$$\varepsilon_\alpha = \sum_{i=0}^n (\tilde{\alpha}(V_i) - \alpha_e(V_i))^2,$$

и параметров (a_β, b_β) —

$$\varepsilon_\beta = \sum_{i=0}^n (\tilde{\beta}(V_i) - \beta_e(V_i))^2.$$

В силу непрерывности функций (11) и (13), минимизируя выражения (25) и (26), мы будем решать задачу (24).

К решению каждой из задач (25) и (26) применим квазирегулярный метод наименьших квадратов, в силу монотонности и гладкости функций $\alpha(V)$ и $\beta(V)$.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Математические методы анализа сложных систем».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. L. Hodgkin and A.F. Huxley, J. Physiol., **17**, 500 (1952).
2. J. L. Carvalho-de-Souza, A. Saponaro, C. Bassetto Jr, et al., Adv. Physics, **10** (7), 1 (2022).
3. B. Hille, *Ionic channels of excitable membranes*, 3rd ed. (Sunderland, MA, 2021).
4. Н. Р. Дрейпер и Г. Смит, *Прикладной регрессионный анализ* (Диалектика, М., 2007).

5. А. Б. Рубин, Биофизика (Изд-во МГУ, М., 2004).
6. Е. С. Вентцель и Л. А. Овчаров, *Теория случайных процессов и ее инженерные приложения* (Наука, М., 1991).
7. L. Catacuzzeno, B. Fioretti, and F. Franciolini, *J. Neurophysiol.*, **90**, 3688 (2003).
8. S. Lee, A. Banerjee, and R. MacKinnon, *PLoS Biol.*, **7** (7), 1 (2009).

On the Use of Kolmogorov Equations for Determining Ion Channels Characteristics

A.P. Kruchinina* and N.V. Kulikovskaya**

*Faculty of Mechanics and Mathematics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119912 Russia

The paper proposes a method for determination of the dynamic properties of conduction within voltage-gated ion channels with several sequentially located energy barriers named gate particles using a theory of Markov random processes in continuous time and with a discrete state space. The number of states was taken equal to the number of energy barriers in the channel plus one. If the hypothesis that random flows switching gate particles between an open and a closed are Poisson process, is true, then mathematical description of the system's state of similar channels can be a system of Kolmogorov linear differential equations for state probabilities. Using this model and based on Volt-Clamp test results, published in open access journals, it is possible to find out how fixed values of membrane potential depend on the intensities of Poisson process for different types of potassium channels. Function parameters, that describe the intensity of ion transition across the channel, in the Kolmogorov equation can be restored using the generalized least squares method. This paper contains the examples of determining the intensities of transitions for two types of voltage-dependent potassium channels known as «delayed rectifier potassium channels» (IKdr, two identical activation gate particles) and channels with fast activation and inactivation processes (IKa, three identical activation and one inactivation gate particles). It is shown that channel activation and deactivation is described by solving the general Kolmogorov equation.

Keywords: events flow intensity, Kolmogorov equations, ion currents, VOLT-CLAMP protocol, least squares method

ДВА СУБКОМПАРТМЕНТА ГЛАДКОГО ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В ПЕРИСИНАПТИЧЕСКИХ ОТРОСТКАХ АСТРОЦИТОВ: УЛЬТРАСТРУКТУРА И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В СИНАПСАХ ГИППОКАМПА И НЕОКОРТЕКСА

© 2023 г. Е.А. Шишкова*, В.В. Рогачевский*.*

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

#E-mail: ckpet.icb.ras@gmail.com

Поступила в редакцию 03.02.2023 г.

После доработки 03.02.2023 г.

Принята к публикации 17.02.2023 г.

Перисинаптические отростки астроцитов, участвуя в работе трехчастного синапса, отвечают на его активацию локальной деполяризацией с высвобождением ионов кальция из внутриклеточных депо в узлах ветвления отростков и проявляют локальные или генерализованные кальциевые события. Однако по результатам первых электронно-микроскопических исследований сформировалось мнение, что терминальные ламеллы астроцитов лишены каких-либо органелл, включая основное депо ионов кальция астроцитов — цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума (sER). Анализ цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума действительно может быть ограничен их слабым электронным контрастом, исследованием астроцитарных отростков на одиночных срезах и недостаточным оптическим разрешением используемых приборов. В данной работе с использованием просвечивающей электронной микроскопии и 3D-реконструкции на серийных срезах мы провели анализ отростков астроцитов в синапсах гиппокампа и коры мозга мыши. В результате усиления контраста элементарных мембран впервые показано, что перисинаптические отростки астроцитов с морфологией тонких веточек содержат два типа цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума и микровезикулы. В отличие от веточек, мембранные органеллы в терминальных ламеллах представлены лишь короткими фрагментами тонких цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума и микровезикулами, группы которых имеют тенденцию располагаться в непосредственной близости от активных зон наиболее активных синапсов. В работе обсуждается вопрос адекватности применения альтернативных методов электронной микроскопии в исследованиях астроцитарного микроокружения синапсов и структурно-функциональные аспекты компартментализации цистерн гладкой эндоплазматической сети в перисинаптических отростках астроцитов.

Ключевые слова: перисинаптические и терминальные отростки астроцитов, гладкий эндоплазматический ретикулум, гликоген, просвечивающая электронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, 3D-реконструкция.

DOI: 10.31857/S0006302923020126, EDN: CAZEOI

Наиболее поразительной особенностью ультраструктуры астроцитов, в отличие от нейронов, является чрезвычайно сложная пространственная организация их разветвленных и взаимосвязанных отростков, что накладывает существенные ограничения на анализ их взаимодействия с

синапсами не только методами высокоразрешающей световой, но и электронной микроскопии [1]. Дистальный отдел отростков представлен контактирующими с синапсами периферическими отростками и узлами их ветвления [2, 3], в которых наблюдаются спонтанные Ca^{2+} -события или фокусы локальной деполяризации со значительной Ca^{2+} -компонентой в ответ на электрическую стимуляцию входящих аксонов [4]. Результаты этих электрофизиологических и имиджинговых экспериментов предполагают наличие в периферических отростках депо ионов Ca^{2+} .

Сокращения: sER — гладкий эндоплазматический ретикулум, PAP — перисинаптические отростки астроцитов, TAP — терминальные отростки астроцитов, SEM — сканирующая электронная микроскопия, 3D — трехмерный, IP3R — рецептор инозитол трифосфата, RyR — рецептор рианодина, PSD — постсинаптическое уплотнение..

Но если в нейронах гладкая эндоплазматическая сеть достаточно подробно описана [5–7], то ультраструктура и распределение органелл в перисинаптических отростках астроцитов до сих пор не изучены в должной мере [1]. Тем не менее, на иллюстрациях в ряде работ можно видеть цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума (sER) в перисинаптических отростках в непосредственной близости от интерфейсов «аксон–шипик» (с использованием просвечивающей электронной микроскопии – рис. 31 в работе [8], рис. 2, 5 и 7 в работе [9], рис. 1 и 5 в работе [10], рис. 2 и 5 в работе [11], рис. 2 и 3 в работе [12], рис. 1 и 5 в работе [13], рис. 4 в работе [14]; с использованием серийного сканирования поверхности блока (SBF-SEM) – рис. 5 в работе [15]). Наряду с цистернами sER в перисинаптических отростках было показано наличие иммуноточечных на глиотрансммиттеры и их транспорте слабоконтрастных микровезикул, сходных с синаптическими [16, 17]. Однако, поскольку кластеры этих микровезикул невозможно было обнаружить в периферических отростках, существует серьезный скептицизм в отношении Ca^{2+} -зависимого высвобождения глиотрансммиттеров [1].

Более десяти лет назад была акцентирована необходимость анализа ультраструктуры нейрон-глиального взаимодействия с применением сложных и затратных по времени методов трехмерной (3D) реконструкции с высоким пространственным разрешением [1]. Первая попытка анализа sER в астроцитарных отростках с применением 3D-реконструкции была предпринята на серии негативов, полученных при увеличении $\times 6\text{K}$ и отсканированных с разрешением 1200 dpi [18], что дает финальное разрешение изображения 3.4 нм/пиксель и приблизительно соответствует порядку разрешений сканирующей электронной микроскопии с сфокусированным ионным пучком (FIB-SEM) – 8–4 нм/пиксель (см., например, работу [7]). В работе [18] авторы не использовали такие усилители контраста как ферри- или ферроцианид калия или тиокарбонгидразид [19, 20], поэтому, как и в пионерской работе на одиночных срезах [21], так и в результате анализа серийных срезов, органеллы в периферических отростках обнаружены не были. В результате, несмотря на ряд приведенных выше фактов наличия органелл в перисинаптических отростках, закрепилось устойчивое мнение, что периферические отростки астроцитов лишены каких-либо органелл, включая элементы эндоплазматической сети, поэтому астроцитарные отростки по настоящее время классифицируют на ветви, содержащие органеллы, и свободные от органелл листочки или ламеллы [2, 22]. Обнаружение органелл и, в частности, цистерн sER в отростках астроцитов действительно может быть ограничено их слабым электронным контрастом, исследова-

нием астроцитарных отростков на одиночных срезах или недостаточным оптическим разрешением используемых приборов. Данная работа отчасти заполняет этот пробел.

В литературе присутствует довольно широкая терминология отростков астроцитов [1], в которой наибольшую путаницу вносят два термина: «перисинаптические астроцитарные отростки» и «периферические астроцитарные отростки» с одинаковой аббревиатурой РАР. Поскольку *en passant* отростки или веточки, проходящие рядом с синапсами, также можно считать перисинаптическими, то для большей ясности здесь и далее мы будем именовать дистальные отростки астроцитов в целом как перисинаптические (РАР), будь то *en passant* или оканчивающиеся вблизи синапсов, и терминальные (ТАР), которые оканчиваются, как будет видно по ходу изложения, в значительной части вблизи активных зон синапсов. В данной работе мы сфокусировались главным образом на анализе ТАР, но содержащим протяженные цистерны sER веточкам также уделили внимание.

С использованием просвечивающей электронной микроскопии серийных ультратонких срезов мы провели анализ отростков астроцитов в синапсах гиппокампа и слоя I сенсомоторной коры мозга мыши с применением 3D-реконструкции синапсов. Вследствие усиления контраста элементарных мембран путем двойного осмирования с феррицианидом калия в значительной степени возрастает и электронная плотность гранул гликогена, богато представленных в РАР астроцитов слоя I коры [23]. Во избежание интерференции изображений поперечных сечений цистерн sER, имеющих сходные диаметры с β -гранулами гликогена, мы воспользовались феноменом быстрой посттравматической разборки гликогена в результате эктаназии путем цервикальной дислокации. Остающиеся в РАР мало-размерные органеллы на малых увеличениях по морфологии и размерам были сходны с гранулами гликогена. Однако при разрешениях изображений, в 10–15 раз превышающих достижимые разрешения в сканирующей электронной микроскопии (SEM), становится очевидно, что эти органеллы имеют мембранную природу.

Анализ свободных от гранул гликогена РАР на серийных срезах показывает, что РАР астроцитов с морфологией тонких веточек содержат микровезикулы и два типа цистерн sER. Изменение морфологии от одного типа sER к другому по ходу одной цистерны предполагает взаимосвязанность двух компартментов sER. Как сужение цистерн до диаметра ~ 20 нм и менее, так и наличие в отростках коротких тонких фрагментов sER предполагает фрагментацию sER с отщеплением от расширенных цистерн тонких коротких фраг-

ментов. В отличие от тонких веточек мембранные органеллы в ТАР представлены лишь короткими тонкими цистернами sER и микровезикулами. Результаты 3D-реконструкции обнаруживают нестохастическое распределение микровезикул и фрагментов тонких цистерн в РАР; цистерны sER и группы микровезикул имеют тенденцию располагаться в непосредственной близости от активных зон наиболее активных синапсов.

Сопоставление с данными иммуноэлектронной микроскопии [16, 17] позволяет считать тонкие sER как ультраструктурной основой и первичным звеном развития спонтанных и индуцированных Ca^{2+} -событий в ТАР, так и необходимым условием для Ca^{2+} -зависимого везикулярного высвобождения глиотрансммиттеров вблизи активных синапсов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фиксация ткани мозга. В эксперименте использованы самцы мышей линии C57BL/6 (возраст 3 месяца, масса 26–31 г). Одно животное анестезировали изофлураном до снижения частоты дыхательных движений. Эвтаназию другого проводили путем цервикальной дислокации. После декапитации мозг извлекали и к 110–140 с после декапитации получали готовые слайсы толщиной ~0.5 мм при помощи ручного триммера оригинальной конструкции с частотой движения лезвия 80–90 Гц. Получение коронарных срезов проводили на охлажденной силиконовой подложке непосредственно в капле предоблученного в микроволновой печи фиксатора с температурой 4°C, содержащего 3% формалина и 1.25% глутарового альдегида на 0.1 М натрий-какодилатном буфере, содержащем 2 мМ CaCl_2 , 4 мМ MgCl_2 и 50 мМ сахарозы. Временной диапазон между декапитацией и погружением трех-пяти срезов ткани во флакон с тем же фиксатором не превышал 2.5 мин. Флаконы с тканью, содержащие 5 мл того же фиксатора с исходной температурой 4°C, облучали микроволнами при мощности магнетрона 100 Вт в холодной точке микроволновой печи в режиме 20 с вкл./20 с охлаждение/20 с вкл.; температура фиксатора после облучения по данным точечного термометра не превышала 30°C. Спустя 6 ч хранения срезов ткани в фиксаторе при 4°C последний был заменен на вторичный фиксатор без формалина, но содержащий 2.5% глутарового альдегида. Срезы во вторичном фиксаторе были обработаны микроволнами, как описано выше, и оставлены в фиксаторе при 4°C. Спустя сутки образцы были трижды отмыты в вышеуказанном буфере при помощи микроволн.

Постфиксация и заключение ткани в смолы. Образцы постфиксировали дважды. Сначала – 3.5 ч при комнатной температуре в 1%-м растворе вос-

становленного с феррицианидом калия OsO_4 на 0.1 М какодилатном буфере, содержащем 0.01% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и 50 мМ сахарозы. 1.5% феррицианида калия ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) добавляли непосредственно перед использованием. Далее образцы были отмыты деионизированной водой в течение ночи. Затем образцы фиксировали в 1%-м растворе OsO_4 на деионизированной воде с 0.01% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ также в течение 3.5 ч при комнатной температуре. Далее образцы были отмыты деионизированной водой и оставлены в ней на сутки при 4°C. После этого ткань обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола, в 100%-м этаноле и 100%-м ацетоне и пропитывали смесью смол со 100%-м ацетоном в объемном отношении 1:1 в течение суток при 4°C (соотношение смесей смол EMBED812/NMA и EMBED812/DDSA составляло 3:7). Образцы переносили в смесь смол без ацетона и полимеризовали 24 ч при 37°C, а затем – 48 ч при 60°C.

Приготовление и контрастирование срезов. Для получения ультратонких срезов на поверхности отвержденных блоков с тканью затачивали пирамидки в области слоев I и II–III сенсомоторной коры и в дистальной относительно сом нейронов зоне слоя *Str. radiatum* в CA1-области гиппокампа. Срезы номинальной толщиной 50–70 нм получали при помощи алмазного ножа на ультрамикротоме EM UC6 (Leica, Германия). Срезы монтировали на гидрофилизированные в тлеющем разряде медные бленды с пленкой-подложкой из пиолоформа, укрепленной аморфным углеродом. Контрастировали срезы последовательно солями лантаноидов (Uranyless [24]) и модифицированным тройным свинцовым красителем Сато [25].

Получение, обработка и анализ изображений. Изображения серийных срезов слоев I и II–III коры мозга фотографировали на фотопленку в режиме монтажа из 2×3 взаимно перекрывающихся кадров при прямом увеличении ×12K на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1200EX (Jeol, Япония). Микрофотографии одиночных срезов получали при прямом увеличении ×6–30K. Вращением сеточки серийные срезы ориентировали так, чтобы длинная сторона каждого отдельного среза в серии располагалась параллельно длинной стороне негатива (условная ось X), что позволяло в последующем оценить степень поперечного сжатия срезов, происходящего в процессе их получения (по условной оси Y). Полученные негативы оцифровывали с использованием сканера Perfection V700 (Epson, Япония) с разрешением 2400 dpi. Значения фактического увеличения получали на основе калибровочной реплики (2160 линий на 1 мм; SPI 02902-AB), отснятой на тех же увеличениях. В результате фактическое разрешение одного пикселя изображения, полученного при ×6, ×12, ×15 и

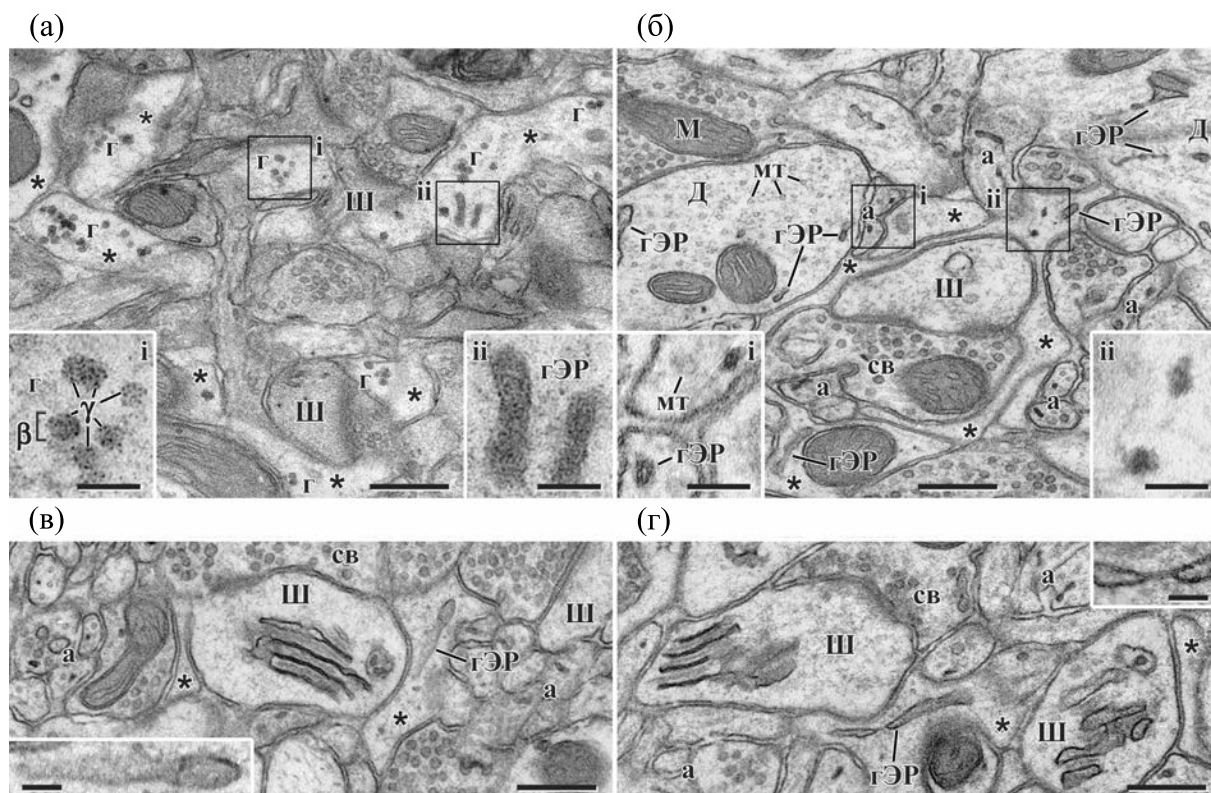


Рис. 1. Ультраструктура органелл астроцитарных отростков в нейропиле слоя I сенсомоторной коры мыши. (а) — Декапитация после глубокой анестезии; (б)–(г) — декапитация после цервикальной дислокации, без анестезии. Звездочками помечены профили сечений перисинаптических астроцитарных отростков. На изображении нейропила анестезированного животного на панели (а) почти во всех профилях астроцитарных отростков можно наблюдать одиночные гранулы гликогена или их скопления. Стоит обратить внимание на полное отсутствие гранул гликогена на панелях (б)–(г). Условные обозначения и сокращения: i и ii — области, представленные на большем увеличении; а — сечения немиелинизированных аксонов; г — гликоген (β - и γ -частицы); гЭР — гладкий эндоплазматический ретикулум; Д — дендриты; М — митохондрия; мт — микротрубочки; СВ — синаптические везикулы; Ш — головка дендритного шипика. Номинальная толщина среза на панели (а) — 70 нм, на панелях (б)–(г) — 50–60 нм. Шкалы на основных панелях — 250 нм, на врезках i и ii — 100 нм, на врезках панелей (в) и (г) — 50 нм.

$\times 30K$, составляло 1.7, 0.85, 0.67 и 0.34 нм соответственно. Эластичную сшивку отдельных кадров в бесшовный монтаж и сборку серий монтажей в стек взаимовыровненных изображений проводили при помощи плагина TrakEM2 для ImageJ [26]. Для оценки средних значений поперечного сжатия срезов измеряли диаметры не менее 300 синаптических везикул в возбуждающих синапсах по осям X и Y по 100 везикул в начале, в середине и в конце серии. Вычисленную степень сжатия срезов использовали для пропорционального растяжения изображений по оси Y . После нивелирования сжатия срезов рассчитывали фактическую среднюю толщину срезов в серии методом измерения диаметров цилиндрических структур [27]. Качественный анализ, 3D-реконструкцию и измерения диаметров цистерн sER проводили в программе Reconstruct 1.1.0.1 [28], визуализацию 3D-объектов — в программе 3ds Max (Autodesk Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор метода эвтаназии для демаскирования цистерн sER. Для лучшей визуализации цистерн sER после глутаральдегидной фиксации ткани мы использовали двойное осмиривание с феррицианидом калия и контрастирование срезов с уранилацетатом, лантаноидами или танинами и солями свинца. Но независимо от способа окраски ультратонких срезов усиление контраста мембран в процессе фиксации с $K_3[Fe(CN)_6]$ значительно усиливает и контраст гликогеновых гранул [29–31].

На рис. 1а представлен фрагмент нейропила слоя I сенсомоторной коры мозга мыши в состоянии глубокой анестезии. Ранее было отмечено, что среди слоев коры в слое I концентрация гранул гликогена максимальна [23]. В светлых профилях сечений астроцитарных отростков отчетливо наблюдается большое число бета-гранул гликогена. Гранулы с диаметрами порядка 20–

30 нм имеют типичную для них морфологию с наличием рассеянных по профилю высоко электронно-плотных белковых гамма-частиц (увеличенная область i) размером $\sim 3\text{--}5$ нм [32–35]. В отдельных профилях астроцитов среди гранул гликогена можно наблюдать фрагменты цистерн sER, сходные по диаметрам и электронной плотности с гранулами гликогена (увеличенная область ii). Однако по периферии элементарной мембраны цистерн на цитоплазматическом и люминальном листе бислоя, как и в люмене цистерн, также можно видеть частицы с высокой электронной плотностью, сходные по размерам с гамма-частицами гликогена, что делает их поперечные сечения практически неотличимыми от гликогена. В богатых гликогеном тканях, в гепатоцитах и миоцитах, бета-гранулы гликогена плотно ассоциированы с цистернами эндоплазматического ретикулума [36–39]. По-видимому, сходная ультраструктурная организация гликогенолитического комплекса свойственна и отросткам астроцитов [35, 40]. Так, в центре левой части рис. 1а расположено плотное скопление гранул, среди которых присутствуют поперечные сечения цистерн ретикулума, но ввиду сходства их морфологии с гранулами гликогена идентифицировать их чрезвычайно сложно.

Демаскировать цистерны sER можно, выбрав соответствующий метод эвтаназии и химической фиксации, которые сами по себе могут вносить значительный вклад в экспериментальные данные [41–43]. Так, если анестезия в течение часа не меняет количество гликогена в мозге или печени [44, 45], то ишемия в результате прекращения кровоснабжения или декапитации неанестезированного животного приводит к восполнению концентрации лактата в мозге за счет быстрой разборки гликогена в астроцитах [46, 47] и более чем десятикратному снижению его концентрации в течение одной-двух минут в результате взрывной посттравматической активации сенсорных входов [48–53]. Фиксация путем транскардиальной перфузии анестезированных животных также сильно снижала количество гликогена в мозге по сравнению с микроволновой эвтаназией [23]. Но перфузии предшествовала отмывка в течение 5 мин, а первичный этап фиксации занимал не менее 10 мин. При том, что перисинаптические отростки астроцитов — очень подвижные структуры как *in vitro*, так и *in vivo* [54, 55], любая задержка химической фиксации может значительно влиять на структуру как самих отростков астроцитов, так и лабильных цистерн sER. Поэтому, чтобы демаскировать цистерны sER в астроцитарных отростках, освободив поле зрения от гликогена, мы воспользовались феноменом быстрой посттравматической разборки гликогена в результате цервикальной дислокации с последующей быстрой фиксацией ткани мозга

путем иммерсии и последующей микроволновой обработки, которая, как известно, обеспечивает превосходную сохранность ультраструктуры [56–58].

Перисинаптические отростки астроцитов содержат два типа контрастных цистерн sER. В результате вышеописанных процедур мы получили препараты ткани мозга с астроцитарными отростками, свободными от гранул гликогена. На рис. 1б представлен астроцитарный отросток, изолирующий синапс, дендритный шипик и пресинаптический бутон, от окружающего нейропиля. В просветленной цитоплазме астроцитарных отростков можно наблюдать лишь три типа органелл: митохондрию в расширенном профиле отростка; тангенциальные сечения цистерн sER с диаметрами 30–60 нм, сходные по ширине с цистернами sER в дендритах, а также органеллы сходные по размерам сечений с тонкими «нитевидными» цистернами sER немиелинизированных аксонов. Такие органеллы имеют чуть меньший диаметр (около 10–30 нм, врезка ii на рис. 1б) и электронную плотность, по сравнению с нитевидными цистернами в аксонах (врезка i на рис. 1б).

При анализе даже большого поля изображения расширенные цистерны sER в периферических астроцитарных отростках встречаются редко, но иногда их можно наблюдать не только рядом с головками дендритных шипиков (рис. 1б), но и в непосредственной близости от синаптической щели или интерфейса аксон-шипик (рис. 1в,г). Но в результате предварительного анализа серийных срезов создается впечатление, что такие профили перисинаптических отростков, содержащих длинные (от 0.1 до 3 мкм и более) расширенные цистерны sER, представляют собой тонкие протяженные веточки астроцита, проходящие вблизи синапса. В большинстве же терминальных отростков астроцита, как это будет показано в ходе дальнейшего изложения, органеллы представлены короткими фрагментами «нитевидных» цистерн и/или группами малоразмерных структур, сходных с поперечными сечениями таких цистерн.

Если в высококонтрастных тонких цистернах sER аксонов липидный бислой и люмен цистерны как правило хорошо прослеживаются даже на небольших увеличениях порядка $\times 8K$ с разрешением изображения 1.33 нм/пиксель (рис. 1б, врезка i), то несмотря на общее усиление контраста мембран, органеллы с диаметрами сечений 12–22 нм, представленные на врезке ii на рис. 1б, имеют едва ли прослеживаемые бислой и центральный просвет. Данные органеллы не имеют свойственных гликогеновым гранулам электронно-плотных частиц размером $\sim 3\text{--}5$ нм, но все же остается неясно, не являются ли они резистентными к разборке «элементарными» бета-частица-

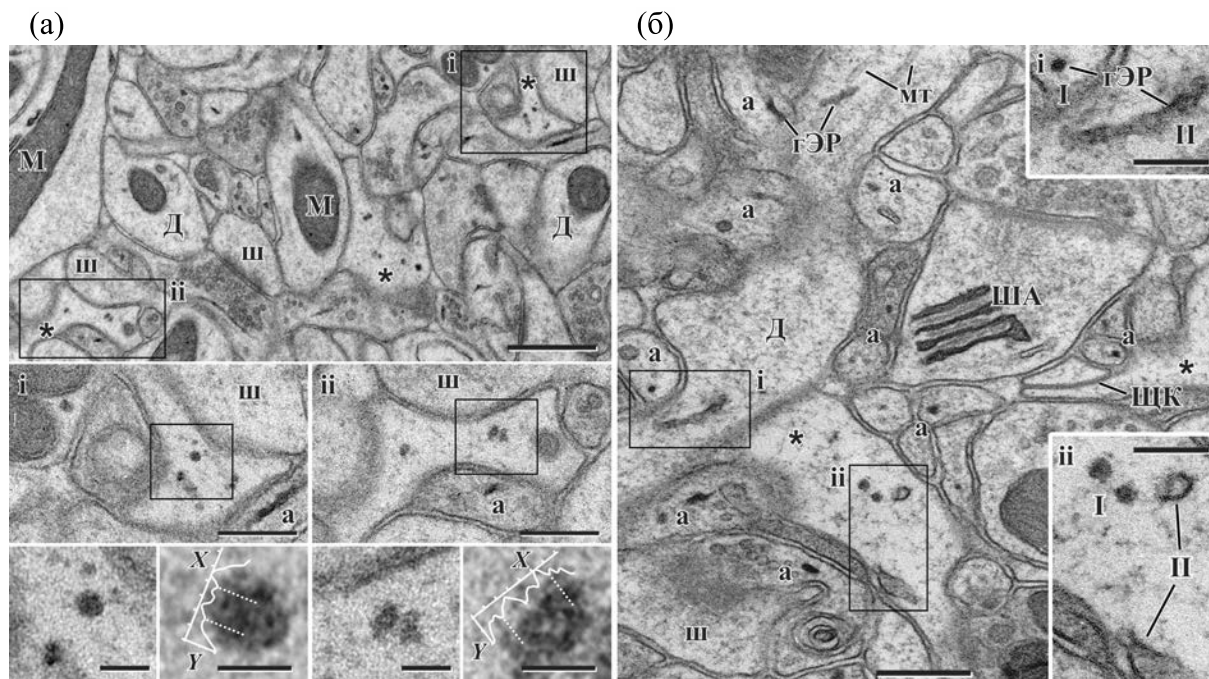


Рис. 2. Ультраструктура цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума в отростках астроцитов и нейронов гиппокампа. (а) — Изображение нейропиля молекулярного слоя СА1-области гиппокампа получено при прямом увеличении микроскопа $\times 6K$ с финальным разрешением изображения 1.7 нм/пиксель. Внутри профилей астроцитарных отростков (помечены звездочками) темные точки неотличимы по электронной плотности и размерам от гранул гликогена. Увеличенные фрагменты i и ii получены при $\times 15K$ и $\times 30K$ с финальным разрешением изображения 0.67 и 0.34 нм/пиксель соответственно. Увеличенные изображения дополнены диаграммами относительной электронной плотности (ось Y, шкала серого от 0 до 100%), измеренной с усреднением по 10 пикселям изображения, вблизи осей, проходящих через окончания пунктирных линий (ось X, шаг деления 5 нм). Наибольшие и наименьшие диаметры органелл на увеличенных фрагментах врезок i и ii по осям X/Y составляют 17/25 и 24/16 нм соответственно. Диаметры поперечных сечений органелл на врезках i и ii (в среднем ~ 20 нм) чуть меньше или соответствуют поперечным диаметрам (~ 20 – 30 нм) тонких электронно-плотных «нитевидных» цистерн, тангенциальные или продольные сечения которых можно наблюдать в соседних немиелинизированных аксонах. (б) — Изображение из той же области гиппокампа получено при прямом увеличении микроскопа $\times 30K$. Электронная плотность просвета цистерн sER типа I и типа II и их элементарных мембран в астроцитах сходны с таковыми у цистерн sER в аксонах, дендритах и шипиковом аппарате в нейронах. Условные обозначения и сокращения: i и ii — области, представленные на большем увеличении; I — тонкие нитевидные контрастные цистерны типа I; II — цистерны типа II с контрастной мембраной и расширенным до 30–60 нм люменом; а — сечения немиелинизированных аксонов; гЭР — гладкий эндоплазматический ретикулум; Д — дендриты; М — митохондрии; мт — микротрубочки; Ш — головка дендритного шипика; ША — шипиковый аппарат; ЩК — щелевой контакт. Шкала на основной панели (а) — 500 нм, на врезках i и ii панели (а) — 100 нм, на увеличенных фрагментах — 50 и 25 нм соответственно увеличению; на основной панели (б) — 250 нм, на врезках панели (б) — 100 нм.

ми гликогена [59] с гидродинамическим радиусом ~ 12 нм и диаметром ~ 24 нм. Как отмечалось ранее, интерпретация морфологии тонких цистерн осложняется также и тем, что фиксация с восстановленным осмием приводит как к волнообразному искривлению мембран sER [31], так и к коллапсу люмена до столь малых размеров, что его уже невозможно идентифицировать с помощью FIB-SEM с разрешением изображения в 4 нм/пиксель [7].

Чтобы убедиться, что наблюдаемые нами малоразмерные органеллы в отростках астроцитов имеют мембранную природу, мы проанализировали их на больших увеличениях. Если на увеличении $\times 6K$ (рис. 2а) такие органеллы ни по размерам, ни по электронной плотности совершенно

неотличимы от бета-гранул гликогена (увеличенная область i), то более детальный их анализ на изображениях с финальным рабочим разрешением 0.67 и 0.34 нм/пиксель, что в 10–15 раз превышает стандартное разрешение SEM, позволил четко идентифицировать такие объекты как структуры, имеющие мембранную природу. При удачно прошедшем сечении через такие органеллы можно отчетливо наблюдать центральный просвет цистерны и трехслойную элементарную мембрану толщиной в 4 нм, с центральным светлым слоем в ~ 1.5 – 2.0 нм, соответствующим слою гидрофобных липидных хвостов, и аморфным электронно-плотным материалом, декорирующим бислой как со стороны люмена, так и цитоплазмы. Несмотря на «шум», создаваемый

аморфным материалом по периферии мембраны, наличие бислоя отражается и в минимумах, и в максимумах относительной электронной плотности по ходу осей, проходящих через центры органелл (рис. 2а, увеличенные области на врезках i и ii).

В результате усиления контраста мембран при беглом осмотре нейропиля наибольшее внимание привлекают электронно-плотные цистерны sER в аксонах и в чуть меньшей степени в дендритах (рис. 2б). Для удобства дальнейшего анализа мы условно обозначили сечения тонких контрастных цистерн в аксонах и в астроцитах как цистерны типа I, а цистерны с расширенным просветом в отростках астроцитов и в дендритах, включая их специализированную форму — шипиковый аппарат, мы отнесли к цистернам типа II (рис. 2б, врезки i и ii).

sER дендритов нейронов и шипиковый аппарат вовлечены в развитие ключевых феноменов синаптической пластичности мозга — потенциации и депрессии синаптической передачи, высвобождая ионы Ca^{2+} через рецепторы инозитол трифосфата (IP3Rs) [60, 61] или рианодина (RyR) [62] и обеспечивая обратный захват ионов кальциевой АТФазой эндоплазматического ретикула (SERCA) [63, 64]. Иммунореактивность на RyR наблюдается и в немиелинизированных аксонах [64, 65], проведение импульса по которым сопровождается быстрыми всплесками Ca^{2+} в аксоплазме [66]. Весьма вероятно, что высокая электронная плотность цистерн как шипикового аппарата, так и цистерн sER в аксонах и дендритах во многом определяется высокой концентрацией в них мембранных белков, в том числе ответственных за Ca^{2+} -регуляцию проведения сигнала и синаптической передачи. Как можно видеть на рис. 2б, цистерны типа I и типа II в астроцитарных отростках сходны по электронной плотности и контрасту с цистернами sER в отростках нейронов — в немиелинизированных аксонах, дендритах и дендритных шипиках. Поэтому весьма вероятно, что электронная плотность цистерн sER в перисинаптических отростках астроцитов также формируется за счет высокой концентрации в них белков, в том числе связанных с ионным обменом и внутриклеточной сигнализацией.

Пул мембранных органелл ТАР представлен микровезикулами и короткими фрагментами цистерн типа I. Ранее было показано, что «нитевидные» цистерны в немиелинизированных аксонах имеют длину до нескольких микрон, соединяя *en passant* бутоны по ходу нервного волокна [7]. По данным флуоресцентной микроскопии инициация спонтанных кальциевых событий в астроцитах происходит на уровне их перисинаптических отростков с последующим распространением

ионов Ca^{2+} в более крупные веточки [3]. Поэтому весьма интригующим было бы предположить наличие таких цистерн в терминальных астроцитарных отростках, которые могли бы обеспечивать центростремительное распространение волны ионов Ca^{2+} от окончаний терминальных отростков до узлов их ветвления или веточек. Однако неизвестно, имеют ли цистерны типа I в астроцитах сходную организацию с цистернами аксонов. При беглом просмотре изображений нейропиля можно обратить внимание на наличие большого числа как строго поперечных сечений контрастных цистерн в немиелинизированных аксонах, так и присутствие в них тангенциальных или продольных сечений sER (рис. 2б). Но обнаружить такие же сечения цистерн в астроцитарных отростках не удастся даже при просмотре большой площади среза. Поэтому остается неясным, являются ли цистерны типа I астроцитов протяженными цистернами или короткими их фрагментами, или даже отдельными везикулами.

Для решения этого вопроса мы провели анализ цистерн sER на серийных срезах. С использованием оптического диссектора мы подсчитали плотность синапсов в гомогенном нейропиле двух слоев сенсомоторной коры. В слоях I и II—III она составляла 188 ± 16 и 154 ± 8 ($\text{mean} \pm \text{SE}$, $n = 3$) в 100 мкм^3 соответственно. Несмотря на отсутствие достоверных различий в плотности, большее значение предполагало охват большего числа синапсов в одном поле зрения, поэтому дальнейший анализ цистерн sER мы проводили в нейропиле слоя I коры. Анализ не менее 200 мкм^3 нейропиля слоя I сенсомоторной коры показал отсутствие в астроцитарных отростках протяженных цистерн типа I, сходных с теми, что наблюдаются в немиелинизированных аксонах (белая стрелка в правой части срезов 1–6 на рис. 3а; врезка ii на срезе 4 на рис. 3а). В данной работе мы не проводили масштабного количественного анализа цистерн sER, но детальный качественный анализ даже ограниченного объема нейропиля позволяет составить представление об организации и распределении цистерн типа I в терминальных перисинаптических астроцитарных отростках. Так, в результате 3D-реконструкции сегментов синапсов по шести серийным изображениям, представленным на рис. 3, в терминальных отростках вблизи шести синапсов мы обнаружили лишь восемь цистерн типа I (отмечены стрелками на врезках i–iii на рис. 3б и 3в). Профили цистерн типа I можно было проследить лишь на двух-трех и редко на четырех срезах в серии, что при рассчитанной толщине срезов (42 нм) составляет не более ~130–170 нм (ТАР справа от щелевого контакта на четвертом-пятом срезах и врезка i на четвертом-шестом срезах на рис. 3а). Мы не наблюда-

дали проникновения в ТАР ни цистерн типа II, ни цистерн ретикулума, ассоциированного с митохондриями (рис. 3б,в). Другие органеллы в ТАР были представлены только одиночными везикулами или их группами.

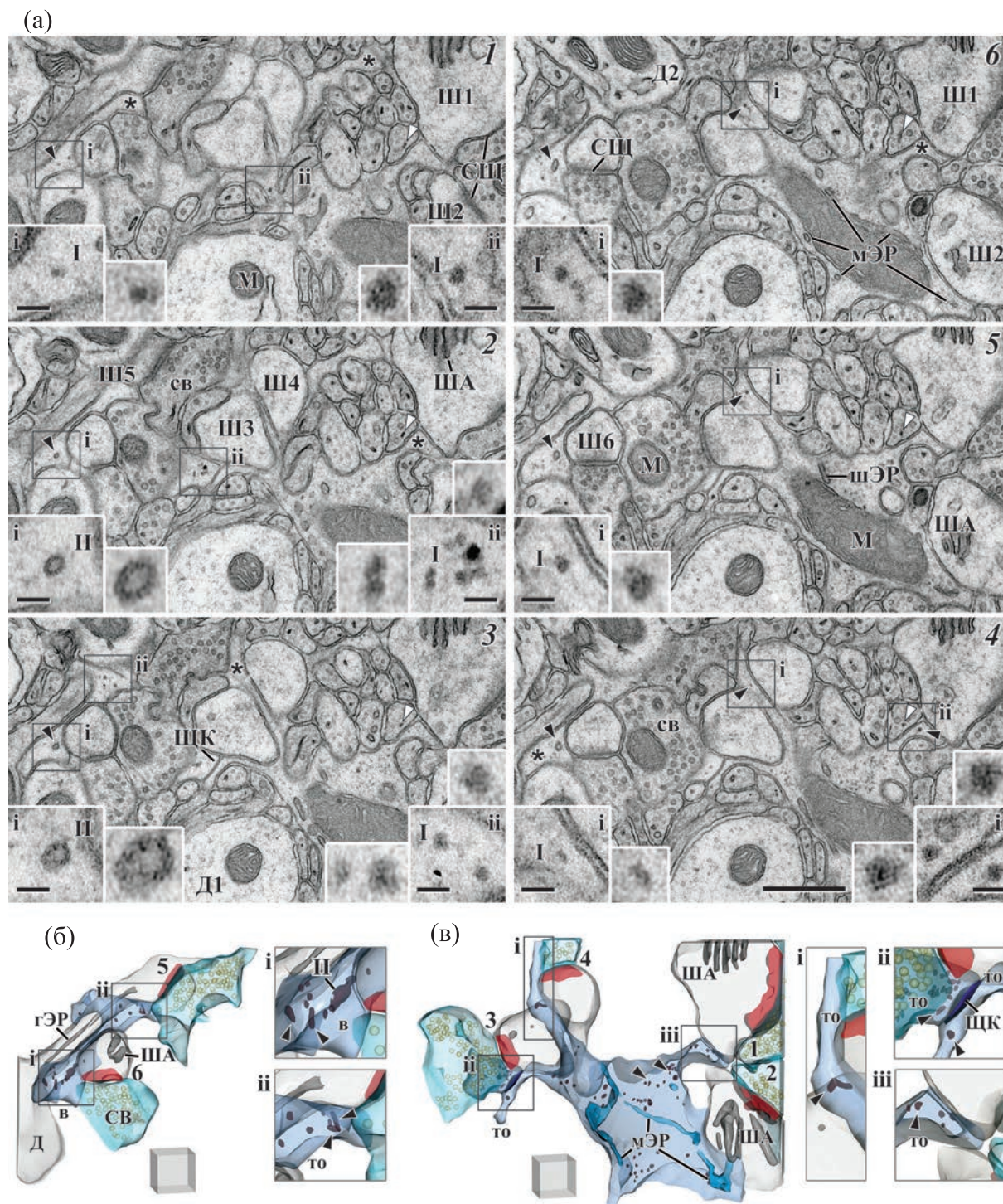
Ранее с использованием иммуноэлектронной микроскопии в перисинаптических отростках астроцитов было показано наличие сходных с синаптическими, но меньшего размера (~30 нм) микровезикул, иммунореактивных на антитела к везикулярным транспортерам глутамата, целлубреину и коагонисту глутаматных NMDA рецепторов D-серину, который высвобождается Ca^{2+} -зависимым образом [16, 17, 67]. Вполне вероятно, что и наблюдаемые нами везикулы, обладая сходными размерами, представляют собой пул микровезикул, содержащих глиотрансмиттеры.

Анализ серий изображений отростков позволяет наблюдать микровезикулы прикрепленные к плазматической мембране, в том числе с образованием омега-подобных профилей (не показано) по типу частичного слияния синаптических везикул с мембраной аксонального бутона. Однако неясно, отражают ли такие профили процесс высвобождения их содержимого, или же интернализацию фрагмента мембраны в форме кавеолы. В то же время на рис. 3а можно видеть постепенное сужение цистерны типа II (черные стрелки на срезах 6-1 слева) с диаметром ~40 нм в цистерну типа I с диаметром ~15–20 нм (врезки i на срезах 3-1 на рис. 3а). Цистерны кортикального sER эукариот — динамичные структуры, подверженные непрерывной перестройке, слиянию и расщеплению [68, 69]. Наблюдаемое на рис. 3а сужение цистерны с увеличением кривизны липидного слоя может быть признаком отщепления тонких коротких фрагментов sER от кончиков цистерн [70] с формированием коротких цистерн типа I. Сужение цистерны типа II можно наблюдать и на врезке рис. 1г. В массе сужение цистерн до считанных нанометров можно наблюдать в нейритах в развивающемся мозге, особенно в конусах роста, в которых происходит активная перестройка sER [31]. Отщепление нанометровых везикулярных фрагментов («везикулярный» sER) от протяженных цистерн было показано в миелинизированных аксонах на серийных срезах и после импрегнации sER тетроксидом осмия [5, 71]. Способствовать расщеплению цистерн sER в астроцитах мог бы как высокий уровень экспрессии ATL3 [72], с наиболее слабой среди атластинов способностью сшивать фрагменты sER [73], так и значительная подвижность перисинаптических отростков [54, 55, 74]. Но с другой стороны, результаты иммуноэлектронной микроскопии показывают наличие кавеолина-1 внутри перисинаптических отростков астроцитов [17], что предполагает интернализацию плазматической

мембраны в форме кавеол. Поэтому непонятно, являются ли источником коротких цистерн типа I более протяженные цистерны типа II, или же они образуются в результате захвата части плазматической мембраны в форме микровезикул и их слияния в трубчатые структуры, подобно тому, как это происходит в эндосомах пресинаптических бутонов [75]. Иными словами, вопрос состоит в том, являются ли наблюдаемые нами цистерны типа I производными протяженной эндоплазматической сети или представляют собой кавеосомы/эндосомы [76], сходные по своей морфологии с цистернами sER.

На изолированной культуре кортикальных астроцитов и в переживающих срезах гиппокампа было показано, что доминантным источником ионов Ca^{2+} для запуска кальциевых событий и высвобождения глиотрансмиттеров являются два внутриклеточных депо ионов Ca^{2+} : RyR- и IP3R-зависимые [67, 77–79]. При этом значительное число работ свидетельствует о проявлении Ca^{2+} -событий на периферии астроцитарного ветвления, в маленьких веточках астроцитарной сети (см. обзор [80]). Так же и фокусы деполяризации наблюдаются в дистальных отростках в непосредственной близости от синапсов, при этом скорость нарастания потенциала в них в ответ на высокочастотную стимуляцию снижается почти на 40% в среде с двукратно сниженной $[\text{Ca}^{2+}]_o$ [4]. Все эти данные предполагают наличие в ТАР цистерн sER, несущих IP3R или RyR. Однако по настоящее время данные о наличии RyR или IP3R в РАР, подтвержденные методами иммуноэлектронной микроскопии, отсутствуют.

В работе [17] иммуноцитохимически было показано наличие в РАР специфического маркера sER — Ca^{2+} -связывающего белка кальретикулина. Интересно, что метки на кальретикулин не перекрывались с метками на транспортер глутамата VGLUT1, а метки на VGLUT1 не были локализованы с метками на кавеолин-1. Отсутствие колокализации предполагало наличие отдельных пулов везикул, несущих VGLUT1 и кавеолин-1. Одновременного иммуномечения на кальретикулин и кавеолин-1 авторы не проводили, но отмечали, что если метка на кавеолин-1 располагалась на сходных с синаптическими микровезикулах, то метка на кальретикулин — над трубчатыми структурами. Согласно рис. 3 в работе [17] и рис. 6 в дополнительном материале к ней метка на кальретикулин располагалась над цистернами шириной ~40–60 нм, над сужающимися их участками до ~20 нм и над короткими фрагментами цистерн с диаметром ~16 нм. Размеры таких фрагментов сходны с размерами наблюдаемых нами цистерн типа I. Также и в пресинаптических бутонах иммунная метка на IP3R наблюдается



только в sER, но не в эндосомах [63]. Данные факты в совокупности с результатами иммуноэлектронной микроскопии [17] позволяют с высокой степенью вероятности считать, что обнаруженные нами цистерны типа I имеют эндомембранное происхождение и являются компонентами внутриклеточного депо ионов Ca^{2+} . Неясно, яв-

ляются ли цистерны типа I элементарными фрагментами депо в ТАР, или пул микровезикул гетерогенен и наряду с везикулами, содержащими глиотрансмиттеры, включает и кальциосомы (см. обзор [81]). Тем не менее, являясь единственными фрагментами sER в ТАР, цистерны типа I, по-видимому, представляют собой ультраструктурную

Рис. 3. Ультраструктура цистерн sER в астроцитарных отростках в нейропиле слоя I сенсомоторной коры мозга мыши. (а) — Фрагмент из шести срезов (1–6) в серии, характеризующий морфологию и распределение цистерн sER в терминальных астроцитарных отростках в непосредственной близости от активных зон синапсов. Фрагменты изображений серийных срезов захватывают шесть синапсов в окружении двух отростков астроцита — тонкой веточки с терминальным отростком вблизи синапсов Ш5–Ш6 слева и широкой веточки, содержащей митохондрию с перимитохондриальными цистернами ретикулума, от которой отходят терминальные отростки вблизи синапсов Ш1–Ш4. Астроцитарные отростки помечены звездочками. Стоит обратить внимание на то, что ни цистерна типа II из тонкой веточки, ни одна из цистерн sER, ассоциированного с митохондрией, не распространяется в ТАР, которые содержат только микровезикулы и цистерны sER типа I. В центре правой части панели (а) выделена область с цистерной типа I в терминальном отростке, которая прослеживается только на трех срезах (врезка i на срезах 4–6 панели (а); врезка i на панели (в)). Справа от щелевого контакта цистерну типа I можно проследить только на двух срезах (срезы 4 и 5 панели (а); врезка iii панели (в)). С учетом рассчитанной средней толщины срезов в серии (42 нм) длина этих цистерн составляет 84 и 126 нм соответственно. См. детальное описание в основном тексте. (б) — 3D-реконструкция фрагмента дистальной тонкой веточки и терминальной перисинаптической ламеллы астроцита. Фрагмент тонкой веточки содержит цистерну sER типа II (II на врезке i), а также микровезикулы и цистерны типа I (отмечены стрелками на врезках i–iii). Тонкий уплощенный участок терминального отростка, отходящий от веточки к синапсу 5, лишен цистерн sER и микровезикул, но их можно наблюдать в расширении терминального отростка вблизи интерфейса «аксон–шипик» (врезка ii). (в) — Фрагмент расширенной астроцитарной веточки или узла ветвления терминальных перисинаптических отростков астроцита, содержащего митохондрию (не показана) и ассоциированные с ней цистерны гладкого и шероховатого ER. Цистерны типа I и микровезикулы проявляют дифференциальное распределение в ТАР, которое коррелирует с морфологическими критериями активности синапсов. См. детальное описание в основном тексте. Условные обозначения и сокращения: в — веточка астроцита, Д1 и Д2 — дендриты, М — митохондрии, мЭР — ассоциированный с митохондриями эндоплазматический ретикулум, СВ — синаптические везикулы, СЩ — синаптическая щель, то — терминальный отросток, Ш1–Ш6 — головки дендритных шипиков, соответствуют номерам синапсов 1–6 на 3D-реконструкции; ША — шипиковый аппарат, шЭР — фрагмент шероховатого компартмента эндоплазматического ретикулума, ЩК — щелевой контакт между ТАР. В электронной версии РАР окрашены серо-голубым, шипики — серым, sER шипиков и шипиковый аппарат — темно-серым, пресинаптические бутоны — аквамариновым, PSD — красным, цистерны типа I и типа II и микровезикулы — темно-коричневым. Шкала на основной панели (а) — 500 нм, на врезках — 50 нм; шкалы на панелях (б) и (в) — куб с гранью 250 нм.

основу и первичное звено в развитии Ca^{2+} -событий в ТАР.

Цистерны sER типа I и микровезикулы в ТАР локализованы с активными зонами активных синапсов. Подавляющее число спонтанных Ca^{2+} -событий в астроцитарной сети не распространяется центробежно по веточкам астроцита, а локально затухает [3]. Также и стимуляция входов к группе синапсов приводит к возникновению кратковременных разного размера фокусов деполяризации ТАР [4]. Это говорит о том, ответы периферических астроцитарных отростков на синаптическую активность и спонтанная Ca^{2+} -активность ТАР могут быть связаны как с активностью конкретного синапса, с которым контактирует отросток, так и со структурной организацией самого ТАР.

Мы провели пилотный анализ распределения цистерн sER и везикул в ТАР, представленных на рис. 3. Если шесть реконструированных синапсов упорядочить по возрастанию признаков их зрелости и функциональной активности, таких как размер постсинаптического уплотнения (PSD) [82] или активной зоны синапса и степени организации цистерн sER и шипикового аппарата [6], можно обнаружить взаимосвязь между активностью синапса и распределением цистерн типа I и микровезикул. Так, дендритный шипик 4 лишен не только шипикового аппарата, но и отдельных цистерн sER, что наряду с макулярной формой и диаметром PSD ~250 нм свидетельствует о слабой

активности синапса. В ТАР вблизи этого синапса расположена единственная цистерна типа I, удаленная от интерфейса «аксон–шипик» на 260 нм (врезка i на срезах 4–6 на рис. 3а и 3в). Шипик 5 также лишен шипикового аппарата, но в его ножке расположена цистерна sER, доходящая до головки с PSD диаметром ~275 нм (срезы 1–4 на рис. 3а и 3б). Его пресинаптический бутон содержит большее число синаптических везикул, а в непосредственно прилегающем к синаптической щели ТАР (звездочка на срезе 1 на рис. 3а) можно наблюдать две коротких цистерны типа I и несколько микровезикул (врезка ii на срезе 3 на рис. 3а, врезка ii на рис. 3б). В головке шипика 6 с диаметром PSD ~270 нм можно видеть цистерны слабо развитого шипикового аппарата (срез 1 на рис. 3а и 3б), значительное число синаптических везикул в бутоне, а в прилегающей тонкой веточке РАР расположены микровезикулы, цистерны типа I и длинная цистерна типа II, проходящая в непосредственной близости от синаптической щели (черная стрелка в левой части серии изображений на рис. 3а, врезка i на рис. 3б). При том, что в головке шипика 3 можно наблюдать лишь отдельные цистерны sER, в его ножке располагается хорошо развитый шипиковый аппарат (не показан), а PSD диаметром ~340 нм свидетельствует о значительно большей его активности по сравнению с синапсами 4–6. В перисинаптическом астроцитарном отростке справа от щелевого контакта расположена короткая цистерна типа I, тогда как в отростке с большей площадью контакта с

синаптической щелью (слева от щелевого контакта) можно наблюдать как цистерну типа I, так и не менее 10 микровезикул (врезки ii на рис. 3в и срезе 2 на рис. 3а). Также и вблизи интерфейсов «аксон—шипик» высокоактивных синапсов 1 и 2, один из которых обладает высокоразвитым шипиковым аппаратом и наибольшей площадью PSD, можно наблюдать скопления микровезикул и цистерн типа I (врезка ii на срезе 4 на рис. 3а; врезка iii на рис. 3в). Синапсы 1 и 2 на смежных срезах в серии (не показано) имеют большую площадь контакта с ТАР по сравнению с синапсами 3–6, соответственно и большее число микровезикул и цистерн типа I вблизи с границами интерфейсов «аксон—шипик».

Очевидно, что распределение цистерн sER в ТАР не случайно и результат пилотного анализа всего лишь шести близлежащих синапсов свидетельствует о тенденции микровезикул и цистерн типа I располагаться вблизи синаптических щелей или интерфейсов «аксон—шипик» тех синапсов, которые имеют характерные признаки высокой активности. Такое распределение мембранных органелл в РАР согласуется с относительным числом деполяризуемых ТАР в результате высокочастотной стимуляции и пропорцией грибовидных дендритных шипиков. Простой расчет по рис. 4 в работе [4] показывает, что если в фокальной плоскости толщиной 1 мкм и площадью 100 мкм² наблюдается ~25 фокусов деполяризации, то с учетом плотности синапсов в слоях II–III коры (см. выше) отношение числа спотов деполяризации к плотности синапсов составит 25/154 (~1/6 или ~16%). Это значение приблизительно соответствует или чуть больше пропорции наиболее активных синапсов, образованных на грибовидных шипиках (см., например, работы [83, 84]). На рис. 3 из шести синапсов лишь один имеет высокоразвитый шипиковый аппарат, а два из шести синапсов имеют большую площадь PSD. Вероятно, при нормальных физиологических условиях только ТАР этих наиболее крупных синапсов могли бы проявлять деполяризацию, тогда как активация ТАР менее активных синапсов могла бы происходить в результате развития судорожных состояний. В этом отношении интересно было бы исследовать ультраструктуру и перераспределение sER в ТАР в состоянии эпилепсии, поскольку при развитии эпилептического статуса наблюдается как снижение величины Ca²⁺-событий, так и сопряжения астроцитов посредством щелевых контактов [85].

В отличие от дендритных шипиков, которые сохраняют форму часы, дни и месяцы [86, 87], РАР — это очень пластичные структуры, меняющие свою форму как *in vitro*, со скоростью до 500 нм в минуту, так и *in vivo* [54, 55, 74]. Локальный фотолиз связанного глутамата вблизи синап-

са приводит к увеличению его изоляции астроцитарными ламеллами [55], что объясняется высокой аффинностью глиальных клеток к нейротрансмиттерам [88] и селективной ассоциацией РАР с наиболее активными синапсами [10]. Если в шипиках транспорт цистерн sER и везикул осуществляется миозинами II, VI, V [89], то о механизмах транспорта эндомембран в РАР ничего не известно. Поскольку кортикальный sER связан с цитоскелетом [68], то в отсутствие активного транспорта мембранные органеллы могли бы затягиваться в ламеллы пассивным образом одновременно с их ростом в окружении синапса. Однако тенденция цистерн типа I и микровезикул располагаться группами вблизи синаптической щели активных синапсов позволяет предполагать существование механизма активного направленного транспорта мембранных органелл в ТАР. Потенциальным мотором в этом процессе мог бы служить немышечный миозин Va, который в культивируемых астроцитах осуществляет направленный везикулярный транспорт [90].

Выше мы отмечали отсутствие в ТАР расширенных цистерн типа II. При том, что ТАР часто имеют форму сильно уплощенных ламелл, протиснутых между отростками нейронов, затягивать крупные цистерны типа II в ТАР, как это происходит в шипиках, в минутных временных интервалах было бы энергетически невыгодно. В то же время нанометровые размеры элементарных цистерн sER могут способствовать их мобильности, облегчая направленную транспортировку через уплощенные участки. Если движение ламелл к активированному синапсу занимает минуты [55], то перестройка структуры кортикального sER занимает считанные секунды [68, 69]. Пластичность ТАР в совокупности с быстрой перестройкой sER и мобильностью его элементов могли бы обеспечивать быструю тонкую настройку нейрон-глиального взаимодействия в синапсах в зависимости от пресинаптической активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы предприняли первую попытку более детально исследовать sER в отростках астроцитов, ультраструктурные детали которого лежат не только за пределами оптического разрешения SEM-методов, широко используемых в анализе синапсов, но и за пределом разрешений просвечивающей электронной микроскопии, обычно используемых при анализе нервной ткани посредством 3D-реконструкций. В последние несколько лет были опубликованы работы по определению количества и распределению гранул гликогена в окружении синапсов на основе SEM (FIB-SEM — [47, 91]; SBF-SEM — [92]). Наши результаты показывают, что по крайней мере

часть органелл в РАР, воспринимаемых на SEM-изображениях как гранулы гликогена, в действительности имеют мембранную природу и представляют собой микровезикулы или сечения коротких фрагментов sER. С учетом того, что число микровезикул и цистерн sER может быть значительно меньше числа гранул гликогена, наблюдаемых в условиях анестезии, полученные нами данные не подвергают сомнению значимость исследований гликогена в РАР методами SEM, но предостерегают от возможности получения при подсчете числа гранул преувеличенных значений.

Мы не уделяли достаточного внимания эндоплазматическому ретикулуму в веточках астроцитов и ассоциированному с митохондриями, как впрочем и другим органеллам, имеющим мембранную природу, таким как эндосомы, мультивезикулярные тела, и органеллам, связанным с лизосомальной деградацией, фокусируясь лишь на упущенном по настоящее время звене в развитии Ca^{2+} -событий и в индукции Ca^{2+} -зависимого высвобождения глиотрансмиттеров — на потенциальном депо ионов Ca^{2+} в астроцитах в непосредственной близости от пре- и постсинаптических компартментов. Результаты показывают, что хотя ТАР и лишены вышеперечисленных органелл, в них присутствуют мембранные органеллы нанометровых размеров, которые разрешимы только на увеличениях, позволяющих четко идентифицировать элементарные мембраны. Нанометровые размеры и концентрация этих органелл вблизи интерфейсов «аксон—шипик» предполагают их активный транспорт в тончайшие отростки астроцитов и динамическое перераспределение между синапсами с разной функциональной активностью.

Наличие таких органелл поднимает как минимум несколько технических и фундаментальных вопросов. Можно ли облегчить визуализацию наноразмерных органелл в РАР в условиях анестезии, без элиминации гранул гликогена? Как эти органеллы распределены в окружении синапсов различных типов, форм и размеров? Могут ли цистерны sER расщепляться до микровезикул и гетерогенны ли пул последних? Какова буферная емкость для ионов Ca^{2+} у тонких коротких фрагментов sER и достаточна ли она для запуска Ca^{2+} -событий? В какой степени физическая изоляция интерфейса «аксон—шипик» функционально более значима, чем присутствие в ТАР цистерн sER и микровезикул с глиотрансмиттерами? Некоторые из этих вопросов можно решить как усовершенствованием протоколов фиксации ткани и контрастирования ультратонких срезов, так и детальным количественным анализом sER и микровезикул в ТАР на основе 3D-реконструкций си-

напсов, тогда как другие требуют интеграции комплементарных экспериментальных подходов.

В целом факты, представленные в данной работе, могут служить основой для смены парадигмы «отсутствия органелл в терминальных отростках астроцитов» на парадигму, которая предполагает динамическую регуляцию состава и числа органелл в перисинаптических ламеллах в зависимости от активности синапса, и открывает новые перспективы в исследованиях нейрон-глиального взаимодействия и понимании функциональной роли астроцитарного микроокружения в пластичности трехчастного синапса и развитии патологических процессов в мозге.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена на оборудовании ЦКП ПНЦБИ РАН (№670266, <http://www.cckp-rf.ru/cckp/670266/>).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания ПНЦБИ РАН (№075-00957-23-01) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90068).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Эксперименты на анестезированных и неанестезированных животных проведены в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 2010/63/EU. Все примененные международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Reichenbach, A. Derouiche, and F. Kirchhoff, *Brain Res. Rev.*, **63**, 11 (2010).
2. B. S. Khakh and M. V. Sofroniew, *Nature Neuroscience*, **18**, 942 (2015).
3. M. Arizono, V. V. G. K. Inavalli, A. Panatier, et al., *Nature Commun.*, **11**, 1906 (2020).
4. M. Armbruster, S. Naskar, J. P. Garcia, et al., *Nature Neurosci.*, **25**, 607 (2022).
5. J. Špaček and A. R. Lieberman, *J. Cell Sci.*, **46**, 129 (1980).
6. J. Špaček and K. M. Harris, *J. Neurosci.*, **17**, 190 (1997).

7. Y. Wu, C. Whiteus, C. S. Xue, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E4859 (2017).
8. J. Špaček, *Anat. Embryol.*, **171**, 235 (1985).
9. J. Špaček and K. M. Harris, *J. Comp. Neurol.*, **393**, 58 (1998).
10. R. Ventura and K. M. Harris, *J. Neurosci.*, **19**, 6897 (1999).
11. M. A. Xu-Friedman, K. M. Harris, and W. G. Regehr, *J. Neurosci.*, **21**, 6666 (2001).
12. C. Genoud, C. Quairiaux, and P. Steiner, *PLoS Biol.*, **4**, e343 (2006).
13. M. R. Witcher, S. A. Kirov, and K. M. Harris, *Glia*, **55**, 13 (2007).
14. K. Chounlamountry and J.-P. Kessler, *Glia*, **59**, 655 (2011).
15. M. Bellesi, L. de Vivo, G. Tononi, et al., *BMC Biol.*, **13**, 66 (2015).
16. P. Bezzi, V. Gundersen, J. L. Galbete, et al., *Nature Neurosci.*, **7**, 613 (2004).
17. L. H. Bergersen, C. Morland, L. Ormel, et al., *Cereb Cortex*, **22**, 1690 (2012).
18. I. Patrushev, N. Gavrilov, V. Turlapov, et al., *Cell Calcium*, **54**, 343 (2013).
19. M. J. Karnovsky, In *Abstr. Book of the 11th Annual Meet. of the American Society for Cell Biology*, Abstracts 284, 146 (1971).
20. A. M. Seligman, H. L. Wasserkrug, and J. S. Hanker, *J. Cell Biol.*, **30**, 424 (1966).
21. B. Fernandez, I. Suarez, and G. Gonzalez, *Anat. Anz.*, **156**, 31 (1984).
22. A. Semyanov and A. Verkhratsky, *Trends Neurosci.*, **44**, 781 (2021).
23. Y. Oe, O. Baba, H. Ashida, et al., *Glia*, **64**, 1532 (2016).
24. N. Benmeradi, B. Payre, and S. L. Goodman, *Microsc. Microanal.* **21** (Suppl. 3), 721 (2015).
25. T. Hanaichi, T. Sato, T. Iwamoto, et al., *J. Electron Microsc.* (Tokyo), **35**, 304 (1986).
26. S. Saalfeld, R. Fetter, A. Cardona, et al., *Nature Methods*, **9**, 717 (2012).
27. J. C. Fiala, K. M. Harris, *J. Microsc.*, **202**, Pt 3, 468 (2001).
28. J. C. Fiala, *J. Microsc.*, **218** (Pt 1), 52 (2005).
29. W. C. De Bruijn, *J. Ultrastruct. Res.*, **42**, 29 (1973).
30. L. A. Langford and R. E. Coggeshall, *Anat. Rec.*, **197**, 297 (1980).
31. E. A. Shishkova, I. V. Kraev, and V. V. Rogachevsky, *Biophysics*, **67**, 5, 752 (2022).
32. P. Drochmans, *J. Ultrastruct. Res.*, **6**, 141 (1962).
33. J. P. Revel, *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 104 (1964).
34. L.-E. Thornell, *J. Ultrastruct. Res.*, **49**, 157 (1974).
35. C. Prats, T. E. Graham, and J. Shearer, *J. Biol. Chem.*, **293**, 19, 7089 (2018).
36. K. K. Rybicka, *Tissue Cell*, **28**, 3, 253 (1996).
37. M. L. Entman, S. S. Keslensky, A. Chu, et al., *J. Biol. Chem.*, **255**, 13, 6245 (1980).
38. Y. Hirata, M. Atsumi, Y. Ohizumi, et al., *Biochem. J.*, **371**, 81 (2003).
39. C. Lavoie, L. Roy, J. Lanoix, et al., *Prog Histochem Cytochem.*, **46**, 1 (2011).
40. M. S. Muller, R. Fox, A. Schousboe, et al., *Glia*, **62**, 526 (2014).
41. S. P. J. Brooks, B. J. Lampi, and C. G. Bihun, *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.*, **38**, 19 (1999).
42. C. W. Scouten, R. O'Connor, and M. Cunningham, *J. Microsc. Today*, **14**, 3, 26 (2006).
43. R. Kasukurthi, M. J. Brenner, Amy M. Moore, et al., *J. Neurosci. Methods*, **184**, 303 (2009).
44. S. R. Nelson, D. W. Schulz, J. V. Passonneau, et al., *J. Neurochem.*, **15**, 1271 (1968).
45. F. D. Morgenthaler, D. M. Koski, R. Kraftsik, et al., *Neurochem. Int.*, **48**, 616 (2006).
46. L. F. Obel, M. S. Müller, A. B. Walls, et al., *Front. Neuroenergetics*, **4**, 3, 1 (2012).
47. J. S. Coggan, D. Keller, C. Calò, et al., *PLoS Comput. Biol.*, **14**, 8, e1006392 (2018).
48. O. H. Lowry, J. V. Passonneau, F. X. Hasselberger, et al., *J. Biol. Chem.*, **239**, 18 (1964).
49. H. Watanabe and J. V. Passonneau, *Brain Res.*, **66**, 147 (1974).
50. R. A. Swanson, S. M. Sagar, and F. R. Sharp, *Neurol. Res.*, **11**, 24 (1989).
51. R. A. Swanson, M. M. Morton, S. M. Sagar, et al., *Neuroscience*, **51**, 2, 451 (1992).
52. T. Matsui, T. Ishikawa, H. Ito, et al., *J. Physiol.*, **590**, 607 (2012).
53. M. K. Brewer and M. S. Gentry, in *Advances in Neurobiology*, **23: Brain Glycogen Metabolism (Springer Nature Switzerland AG, 2019), pp. 17–81.**
54. J. Hirrlinger, S. Hulsman, and F. Kirchhoff, *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2235 (2004).
55. Y. Bernardinelli, J. Randall, E. Janett et al., *Curr. Biol.*, **24**, 1679 (2014).
56. G. R. Login and A. M. Dvorak, *Histochem. J.*, **20**, 373 (1988).
57. G. R. Login and A. M. Dvorak, *The Microwave Tool Book* (Beth Israel Hospital, 1994).
58. F.E. Jensen and K.M. Harris, *J. Neurosci. Methods*, **29**, 217 (1989).
59. M. A. Sullivan, S. T. N. Aroney, S. Li, et al., *Biomacromolecules*, **15**, 660 (2014).
60. T. Satoh, C. A. Ross, A. Villa, et al., *J. Cell Biol.*, **111**, 615 (1990).
61. N. Holbro, Å. Grunditz, and T. G. Oertner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15055 (2009).
62. P. Jedlicka, A. Vlachos, S. W. Schwarzacher, et al., *Behav. Brain Res.*, **192**, 12 (2008).
63. K. Takei, H. Stukenbrok, A. Metcalf, et al., *J. Neurosci.*, **12**, 489 (1992).
64. A. H. Sharp, P. S. McPherson, T. M. Dawson, et al., *J. Neurosci.*, **13**, 3051 (1993).
65. H. Shimizu, M. Fukaya, and M. Yamasaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11998 (2008).
66. R. Barzan, F. Pfeiffer, and M. Kukley, *Front. Neurosci.*, **10**, 135 (2016).
67. J.-P. Mothet, L. Pollegioni, G. Ouanounou, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5606 (2005).
68. Y. Du, S. Ferro-Novick, and P. Novick, *J. Cell Sci.*, **117**, 2871 (2004).
69. J. Espadas, D. Pendin, R. Bocanegra, et al., *Nature Commun.*, **10**, 5327 (2019).
70. S. Wang, H. Tukachinsky, F. B. Romano, et al., *eLife*, **5**, e18605 (2016).
71. J. D. Lindsey and M. H. Ellisman, *J. Neurosci.*, **5**, 12, 3135 (1985).
72. N. Rismanchi, C. Soderblom, J. Stadler, et al., *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 11, 1591 (2008).

73. X. Hu and F. Wu, *Prot. Cell*, **6**, 4, 307 (2015).
74. M. Krzisch, S. G. Temprana, L. A. Mongiat, et al., *Brain Struct. Funct.*, **220**, 4, 2027 (2015).
75. G. Matthews, *Neuron*, **44**, 223 (2004).
76. R. G. Parton and K. Simons, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 185 (2007).
77. N. J. Willmott, K. Wong, and A. J. Strong, *J. Neurosci.*, **20**, 5, 1767 (2000).
78. X. Hua, E. B. Malarkey, V. Sunjara, et al., *J. Neurosci. Res.*, **76**, 86 (2004).
79. M. W. Sherwood, M. Arizono, C. Hisatsune, et al., *Glia*, **65**, 3, 502 (2017).
80. E. Shigetomi, S. Patel, and B. S. Khakh, *Trends Cell Biol.*, **26**, 4, 300 (2016).
81. J. Meldolesi and T. Pozzan, *J. Cell Biol.*, **21**, 142, 1395 (1998).
82. Y. Takumi, V. Ramírez-León, P. Laake, et al., *Nature Neurosci.*, **2**, 7, 618 (1999).
83. M. G. Stewart, N. I. Medvedev, V. I. Popov, et al., *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 3368 (2005).
84. V. I. Popov, N. I. Medvedev, I. V. Patrushev, et al., *Neuroscience*, **149**, 549 (2007).
85. A. Plata, A. Lebedeva, P. Denisov, et al., *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 215 (2018).
86. A. Matus, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **15**, 76 (2005).
87. A. J. G. D. Holtmaat, J. T. Trachtenberg, L. Wilbrecht, et al., *Neuron*, **45**, 279 (2005).
88. A. H. Cornell-Bell, P. G. Thomas, and S. J. Smith, *Glia*, **3**, 322 (1990).
89. M. E. Brown and P. C. Bridgman, *J. Neurobiol.*, **58**, 1, 118 (2004).
90. S. J. Stachelek, R. A. Tuft, L. M. Lifschitz, *J. Biol. Chem.*, **276**, 35652 (2001).
91. C. Cali, J. Baghabra, D.J. Boges, et al., *J. Comp. Neurol.*, **524**, 23 (2016).
92. M. Bellesi, L. de Vivo, S. Koebe, et al., *Front. Cell Neurosci.*, **12**, 308 (2018).

Two Subcompartments of the Smooth Endoplasmic Reticulum in Perisynaptic Astrocytic Processes: Ultrastructure and Distribution in Hippocampal and Neocortical Synapses

E.A. Shishkova* and V.V. Rogachevsky*

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

Perisynaptic astrocytic processes involved in the tripartite synapse functioning respond to its activation by local depolarization with calcium release from the intracellular stores inside nodes of astrocytic processes and develop local and generalized calcium events. However, based on the first electron microscopy studies a point of view was formed that terminal astrocytic lamellae are devoid of any organelles, including the main astrocytic calcium store – the cisternae of the smooth endoplasmic reticulum. Indeed, analysis of smooth endoplasmic reticulum cisternae could be limited by their weak electron contrast, the studying of astrocytic processes on single sections, and insufficient optical resolution of the equipment used. Here, by using serial section transmission electron microscopy and 3D reconstructions, we analyzed astrocytic processes in murine hippocampal and cortical synapses. As a result of unit membranes contrast enhancement, it was shown for the first time that perisynaptic processes of astrocytes with a morphology of thin branchlets contain two types of smooth endoplasmic reticulum cisternae and microvesicles. Unlike branchlets, membrane organelles inside terminal lamellae were comprised by only short fragments of thin smooth endoplasmic reticulum cisternae and microvesicles, whose groups tend to be located in close proximity to active zones of the most active synapses. We speculate both on reliability of the alternative methods in electron microscopy while studying astrocytic microenvironment of synapses and structure-function aspects of smooth endoplasmic reticulum cisternae compartmentalization inside the perisynaptic processes of astrocytes.

Keywords: perisynaptic and terminal astrocytic processes, smooth endoplasmic reticulum, glycogen, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, 3D reconstruction

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СОСТАВ БЕЛКОВ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ

© 2023 г. Т.П. Кузьменко^{*,#}, М.В. Парчайкина^{*}, Э.С. Ревина^{*},
М.Ю. Гладышева^{*}, В.В. Ревин^{*}

^{*}Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва,
Большевикская ул., 68, Саранск, 430005, Россия

[#]E-mail: zyuzina-tatjana@mail.ru

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 28.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Исследовано изменение содержания нейротрофических факторов и белкового состава мембран соматических нервов крысы при повреждении и выживании нервов на фоне действия клобетазола. Показано, что внутримышечное введение препарата по сравнению с его использованием в составе гидрогелевых систем, полученных из микробных полисахаридов, оказывает более выраженное действие на увеличение уровня нейротрофических факторов роста и структурных белков, ответственных за восстановительные процессы, а также стабилизирует содержание общей белковой фракции поврежденных соматических нервов. Меньшая деградация белков травмированного нервного проводника при внутримышечном введении клобетазола вероятно обусловлена большей доступностью препарата при инъекции, чем при его медленном высвобождении из гидрогелевого композита. Кроме этого, увеличение количества ДНК и отдельных белковых фракций указывает на способность клобетазола участвовать в активации генов, связанных с ремиелинизацией. Мы полагаем, что клобетазол активирует синтез нейротрофических факторов роста, запуская тем самым фосфатидилинозитол-3-киназный и митогенактивируемый протеинкиназный сигнальные пути, осуществляющие регуляцию процессов перестройки цитоскелета и аксонального роста, а также активацию синтеза структурных и аксональных белков, необходимых для восстановления функциональной активности травмированных нервных проводников.

Ключевые слова: соматические нервы, травма нерва, нейротрофические факторы роста, клобетазол, регенерация нерва, гидрогелевые системы.

DOI: 10.31857/S0006302923020138, EDN: CAZXGE

В зарубежной и отечественной литературе в настоящее время все большее внимание уделяется роли нейротрофических факторов в функционировании нервной системы. Известно, что нейротрофические факторы являются важнейшими регуляторами процессов пролиферации и дифференцировки нейронов, а также способствуют поддержанию их жизнеспособности за счет участия в контроле физиологического развития и сохранения структурной и функциональной целостности нейронов. Оказываемые данными факторами эффекты реализуются через взаимодействие с различными видами рецепторов семейства тирозинкиназы (Trk-рецепторами) и p75NTR-рецепторами из семейства рецепторов фактора некроза опухоли. Связывание нейротрофических факторов с рецепторами Trk и p75NTR активирует нисходящие сигнальные каскады, в

частности, фосфатидилинозитол-3-киназный (PIK3/Akt) и митогенактивируемый протеинкиназный (MAPK/ERK) сигнальные пути, что способствует дифференцировке и выживаемости нейронов [1, 2].

В настоящее время проблема регуляции различных сигнальных путей для повышения эффективности восстановления поврежденных периферических нервов представляет особый интерес. В связи с ростом количества травматических повреждений периферических нервов, а также из-за низкой эффективности восстановления их функциональной активности необходима разработка новых подходов и способов ускорения регенерационных процессов в травмированных нервных проводниках. Учитывая значимость данной проблемы, в последние годы возрастает интерес исследователей к поиску потенциальных терапевтических агентов — веществ, усиливаю-

Сокращение: NGF — фактор роста нервов.

щих нейропротекцию и стимуляцию регенерации [3–8].

Среди различных классов физиологически активных веществ представляют интерес растительные полифенолы [9], компоненты внеклеточного матрикса [10], но недавно появились сообщения, что глюкокортикоиды, в частности, клобетазол и миконазол [11], проявляют высокую эффективность в интенсификации процесса миелинизации в культурах мозжечковых срезов и *in vivo* у мышей. Системная доставка этих веществ значительно увеличивала количество новых олигодендроцитов и усиливала ремиелинизацию в экспериментальной модели очаговой демиелинизации. Исследования показали, что клобетазол способствует миелинизации в клетках предшественниках олигодендроцитов посредством связывания с глюкокортикоидным рецептором [12]. Кроме этого, клобетазол в значительно меньших концентрациях обладает более выраженным действием по сравнению с другими наружными кортикостероидами [13].

По данным ряда авторов, клобетазол может усиливать дифференцировку и пролиферацию нейрональных стволовых клеток за счет активации нейротрофических факторов, в частности, фактора роста нервов (NGF), нейротрофина-3 и мозгового нейротрофического фактора [14–16]. Помимо этого, клобетазол обладает способностью кортикостероидов подавлять воспалительный ответ в клетках, что может приводить к уменьшению образования глиальных рубцов, ограничивающих разрастание аксонов и регенерацию [16].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных способности клобетозола стимулировать регенерационные механизмы в поврежденной нервной ткани, его роль в активации механизмов регенерации при патологии соматических нервов остается недостаточно изученной. Кроме того, все большее внимание исследователей привлекают гидрогели, способные аккумулировать активные вещества и тем самым поддерживать постоянный приток биологически активных веществ, в частности клобетазола в область повреждения [17, 18].

Исходя из вышесказанного, целью данной работы было изучение регуляторной роли нейротрофических факторов на количественное содержание ДНК и состав белков при действии клобетазола. Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

— исследовать изменение содержания нейротрофических факторов, ДНК, общего белка и отдельных белковых фракций соматических нервов при дегенеративных и регенеративных процессах в соматических нервах на фоне действия клобетазола при его внутримышечном введении и ис-

пользовании в составе гидрогеля из микробных полисахаридов, обеспечивающего постоянный приток действующего вещества в процессе регенерации поврежденных соматических нервов;

— установить взаимосвязь между изменением уровня нейротрофинов и белковым составом травмированного нервного проводника на фоне использования клобетазола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили седалищные нервы крыс породы *Wistar* со средней массой 250 ± 50 г. Для проведения эксперимента был использован клобетазол в гидрогелевых системах.

Подготовка гидрогеля. Для приготовления гидрогеля использовали 8%-й леван и 2%-й альгинат, которые смешивали в соотношении 1 : 1. Для полимеризации гидрогеля использовали 2%-й раствор CaCl_2 , участвующий в полимеризации геля и образующий ионные сшивки с полисахаридами.

Для определения цитотоксичности гидрогеля с помощью МТТ-теста на линии клеток легких эмбриона человека использовали растворы 0.8%-го левана и 0.2%-го альгината натрия, поскольку исходный раствор с 8%-м леваном и 2%-м альгинатом натрия обладает высокой вязкостью и затрудняет проведение данного теста. Линии клеток легких эмбриона человека культивируют в среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка, пенициллина, стрептомицина, глутамина (все — «PanEco», Россия). Клетки снимали с планшетов 0.25%-м раствором трипсина-ЭДТА («PanEco», Россия) и рассаживали в 96-луночный планшет в концентрации 10000 кл/луночка. Затем к клеткам добавляли исследуемые вещества (гидрогель, состоящий из 0.2%-го раствора альгината, 0.8%-го раствора левана, клобетазола в концентрации 0.025 мг/мл, а также эти компоненты по отдельности) с шагом разведения 1 : 2. В качестве контроля к клеткам добавляли среду без препаратов. Цитотоксическое действие материала оценивали с помощью 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (МТТ, Sigma Aldrich, США) в концентрации 5 мг/мл согласно методике, описанной в работе [19].

Инкубировали 3.5 ч для образования фиолетовых кристаллов формазана. Затем кристаллы растворяли с помощью раствора диметилсульфоксида на планшетном шейкере 20 мин при температуре 37°C. Оптическую плотность измеряли на мультимодальном ридере Varioscan Lux (Thermo Scientific, США) при длине волны 570 нм против референсной 650 нм. Жизнеспособность оценивали как отношение оптической плотности образца к контролю и выражали в процентах.

Опытные группы. Все животные были разделены на пять групп. 1-я группа — животные без повреждения седалищного нерва (интактные) служила контролем. Животные 2-й опытной группы подвергались перерезке седалищного нерва. Животным 3-й опытной группы после перерезки седалищного нерва внутримышечно вводили клобетазол в концентрации 0.25 мг/кг объемом 100 мкл. У животных 4-й опытной группы после перерезки проксимальную часть нерва обволакивали гидрогелем (8%-й леван, 2%-й альгинат). Для 5-й опытной группы животных гидрогель готовили с добавлением клобетазола, конечная концентрация которого составила в гидрогеле 0.25 мг/мл. Седалищные нервы извлекали через 7, 14 и 30 суток и проводили количественную оценку содержания общего белка, отдельных белковых фракций, а также определяли количественную динамику NGF и нейротрофина-3.

Регистрация потенциалов действия. Отпрепарированные седалищные нервы крысы помещали в раствор Рингера с температурой 37°C, через который осуществляли постоянное продувание кислорода. Измерение осуществляли при следующих параметрах: амплитуда возбуждающего стимула 1.5 В, длительность 0.3 мс, частота раздражения 100 имп/с [20].

Гомогенизация. Седалищные нервы измельчали с помощью гомогенизатора POTTER S (Sartorius, Германия) в пробирке со стеклянным пестиком в 0.8 М сахарозе (весовое соотношение нервов и раствора сахарозы 1 : 2) при 4°C.

Определения количества факторов роста нервов и нейротрофина-3. Для определения количества факторов роста NGF и нейротрофина-3 использовали гомогенат нерва. Количественную оценку молекул проводили методом иммуноферментного анализа с использованием специальных коммерческих наборов (Cloud-Clone Corp., Китай). Опытные образцы, калибраторы и холостые образцы инкубировали в предварительно сенсibilизированных антителами планшетках в течение часа в соответствии с инструкциями производителя. После этого этапа инкубировали с детектирующим агентом А, проводили промывки для удаления несвязанных антител с последующей инкубацией в течение 1 часа с детектирующим агентом В. Наконец, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин добавляли с целью взаимодействия его с ферментным конъюгатом и получения цвета раствора. После добавления стоп-реагента останавливали реакцию и незамедлительно приступали к измерению на спектрофотометре, в котором определяли оптическую плотность каждой лунки при поглощении 450 нм (BioTek, США). Результаты были получены из кривых серийного разведения с известными концентрациями, выраженными в пг/мл.

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле. При подготовке образцов для электрофоретического разделения белков образцы подвергали делипидизации в смеси хлороформ:метанол:вода (1:2:0,8). Центрифугировали при 10 000g 4°C в течение 10 минут. Затем ресуспендировали в дистиллированной воде, гомогенизировали, центрифугировали при 10 000g, 4°C в течение 10 минут (3 раза).

Концентрацию белка в полученных пробах измеряли методом Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [21]. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре (Shimadzu, Япония) при длине волны 650 нм.

Состав белков соматических нервов изучали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли [22]. Расчет молекулярной массы исследуемого белка осуществляли по его электрофоретической подвижности, используя метод репрессиионного анализа.

После электрофоретического разделения белки переносили на поливинилиденфторидную мембрану методом электроблоттинга на оборудовании Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США) при напряжении 25 В в течение 7 мин. Контроль переноса белков осуществляли красителем Ponceau S (Bio-Rad, США).

Визуализацию, документацию и количественный анализ полученных белковых гелей осуществляли с помощью геля документирующей системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Обработку результатов проводили в программе ImageLab.

Иммунодетекцию белков проводили следующим образом. Мембрану с белками инкубировали в течение часа в блокирующем буфере — 5%-м растворе обезжиренного молока на основе фосфатно-солевого буфера с Твин-20. После этого мембрану инкубировали с первичными антителами к GAP-43 (разведение 1:5000) в течение ночи при 4°C в блокирующем буфере. Затем мембрану трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере с Твин-20 и инкубировали со вторичными антителами в течение часа при комнатной температуре. Повторяли процедуру отмывки и затем проводили визуализацию. Белки визуализировали на приборе Gel Doc XR+ и обрабатывали с помощью программы ImageLab.

Определение концентрации ДНК. Седалищные нервы измельчали с помощью гомогенизатора POTTER S (Sartorius, Германия) в пробирке со стеклянным пестиком в буфере TE1 при 4°C. Выделение ДНК проводили по методу, описанному в работе [23]. Измерение концентрации проводили на спектрофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, США) при длине волны 260 нм.

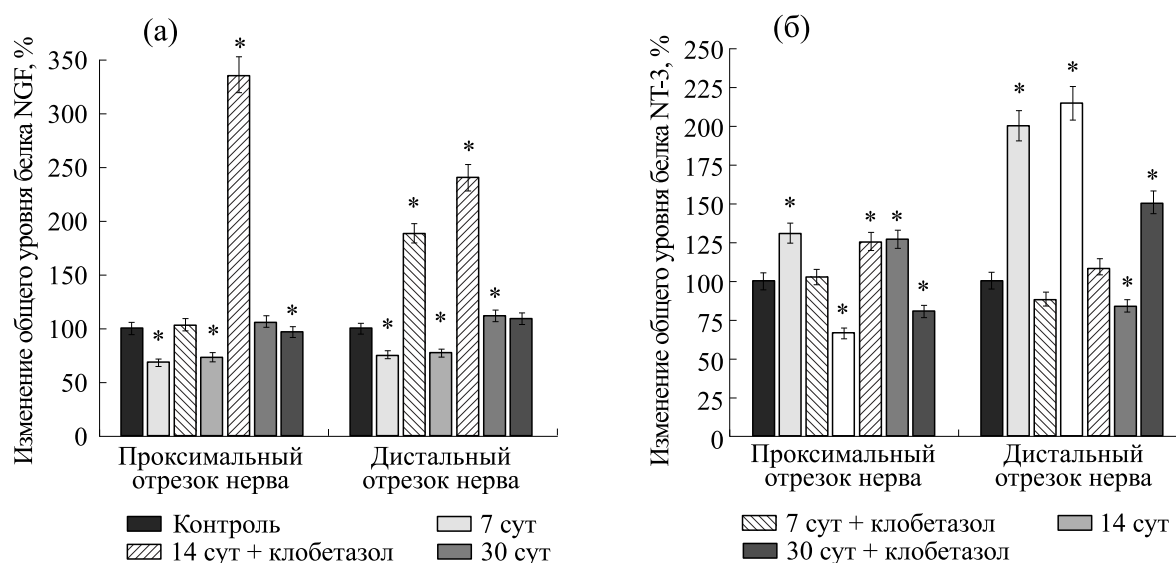


Рис. 1. Влияние клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг на изменение общего уровня белка NGF (а) и нейротрофина-3 (б) в поврежденных соматических нервах; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2016. Сравнение вариантов опытов проводили при 5%-м уровне значимости по t -критерию Стьюдента. Данные представлены как среднее значение и стандартная ошибка ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами показано, что при повреждении соматических нервов активируются различные сигнальные пути, участвующие в регуляции процессов дегенерации и регенерации нервных проводников. Для более эффективного протекания регенерационных процессов в нервной клетке необходима активация различных механизмов, опосредуемая введением экзогенных веществ, в частности клобетазола. В основе действия секретруемых факторов роста, обладающих нейротрофическим действием, таких как фактор роста нервов, нейротрофин-3 и нейротрофин-4, лежит их взаимодействие с низкоаффинным рецептором p75NTR и различными изоформами рецепторов, которые относятся к семейству тирозинкиназных рецепторов. Связывание нейротрофических факторов с Trk-рецептором запускает PIK3/Akt и сигнальный путь митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK/ERK), а также приводит к активации сигнального комплекса серинтреониновой протеинкиназы mTOR, в результате чего происходит синтез белков, необходимых для аксональной регенерации и наблюдается восстановление способности проводить потенциал дей-

ствия травмированными нервными проводниками [24].

Из литературных данных известно, что при повреждении нерва его центральный и периферический отрезки претерпевают различные изменения [25]. Поэтому представляется интересным исследование глубины развития дегенерационных процессов и влияния клобетазола на процессы регенерации в каждом из участков поврежденного нервного проводника.

Исходя из вышесказанного, на первом этапе эксперимента мы провели исследование уровня NGF в проксимальном и дистальном участках нерва после перерезки, а также внутримышечного введения клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг и использования действующего вещества в составе гидрогеля из расчета 0.25 мг/мл.

В результате этого эксперимента выявлено снижение уровня NGF в проксимальном отделе нерва на 31.7 и 26.7% относительно контроля через 7 и 14 суток после повреждения соответственно. Количественное содержание NGF на 30-е сутки составило 106.4% по отношению к контролю (рис. 1а). В дистальном отделе нерва через 7 и 14 суток после повреждения происходило снижение уровня NGF на 24.4 и 22.7% относительно контроля. Количественное содержание NGF на 30-е сутки увеличилось на 11.8% по отношению к контролю.

На фоне введения клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг в проксимальном отрезке нерва отмечается увеличение количественного содержания NGF в 3,36 раза по сравнению с контролем к 14-м суткам наблюдения. На 7-е и 30-е сутки достоверных изменений не наблюдалось. В серии

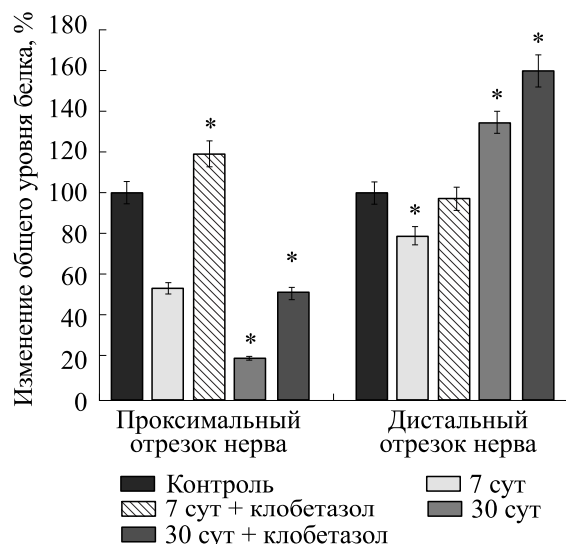


Рис. 2. Влияние гидрогеля на изменение общего уровня белка NGF в поврежденных соматических нервах; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

опытов с использованием препарата в дистальном отделе нерва происходят следующие изменения: концентрация NGF увеличилась в 1.88 и 2.4 раза соответственно по отношению к контролю спустя 7 и 14 суток эксперимента. На 30-е сутки после повреждения наблюдалось увеличение содержания NGF на 9.1% выше уровня контроля.

Помимо изменения уровня NGF, в проксимальном отделе нерва после его перерезки происходит увеличение концентрации NT-3 к 7-м и 30-м суткам наблюдения на 30.7 и 27.2% соответственно по сравнению с контролем (рис. 16). В дистальном его участке на 7-е сутки наблюдения концентрация нейротрофина превышает контроль в 2 раза, а на 14-е сутки — в 2.14 раза. Увеличение продолжительности воздействия травмы до 30-ти суток сопровождается снижением уровня нейротрофина-3 на 16.2% относительно контроля.

В варианте опыта с клобетазолом в концентрации 0.25 мг/кг в проксимальном отрезке нерва синтез NT-3 увеличился на 25.4% к 14-м суткам эксперимента, а к 30-м суткам его уровень снизился на 19.7% по сравнению с контролем.

В серии опытов с использованием препарата в дистальном отделе нерва происходят следующие изменения: спустя 7 суток после повреждения уровень нейротрофина снизился на 11.5% по отношению к контролю, однако на 14 и 30 сутки после повреждения данные показатели превышают контрольные значения на 9.0% и 50.8% соответственно.

В следующей серии опытов нами было проведено исследование уровня NGF в проксимальном

и дистальном участках нерва после перерезки и с участием гидрогеля с добавлением клобетазола и без него (рис. 2).

Было показано снижение уровня NGF в проксимальном отделе нерва при влиянии гидрогеля на 30-е сутки эксперимента на 80% по сравнению с контрольными значениями. Стоит отметить, что на 7-е сутки при использовании гидрогеля с клобетазолом синтез фактора роста превышал контрольные значения на 20%.

В дистальной части поврежденного нерва синтез NGF происходит наиболее интенсивно, и при наложении гидрогеля к 30-м суткам наблюдения содержание фактора роста увеличивалось на 34% относительно контроля. Добавление в гидрогель клобетазола способствовало увеличению концентрации фактора роста на 60% по сравнению с контрольным значением.

Из литературы известно, что активация Akt в процессе запуска фосфатидилинозитол-3-киназного сигнального пути сопровождается антиапоптотическим эффектом за счет экспрессии генов, участвующих в дифференцировке и выживаемости клеток. Таким образом, фосфатидилинозитол-3-киназа и серин-треониновая киназа Akt, активируемые при участии факторов роста, опосредуют рост аксонов. В этом сигнальном пути образование фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата приводит к фосфорилированию Akt, которая, в свою очередь, вызывает фосфорилирование факторов транскрипции из семейства FOXO, киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3) и регуляторов комплекса 1 мишени рапамицина у млекопитающих (mTORC1), контролирующих синтез белков в клетке [26, 27]. С другой стороны, показано, что ERK1/2, один из участников MAP-киназного сигнального пути, также связан с активацией ветвления и аксонального роста нервных волокон за счет экспрессии антиапоптотических факторов транскрипции [28].

Учитывая вышеприведенные данные, на следующем этапе мы провели серию экспериментов по исследованию изменения концентрации ДНК, общего содержания белка и отдельных белковых фракций в дистальном и проксимальном отрезках поврежденного нервного проводника на фоне внутримышечного введения клобетазола.

Было показано, что к 14-м суткам наблюдения содержание ДНК в проксимальном отделе нерва после его перерезки снизилось на 15.3% относительно контроля, а на 30-е сутки эксперимента ее концентрация приблизилась к контрольным значениям (рис. 3а).

В дистальном отрезке нерва содержание ДНК спустя 7, 14 и 30 суток наблюдения уменьшилось на 18.8, 66.2 и 64.3% соответственно по сравнению с контролем. Было показано, что при действии клобетазола из расчета 0.25 мг/кг в прокси-

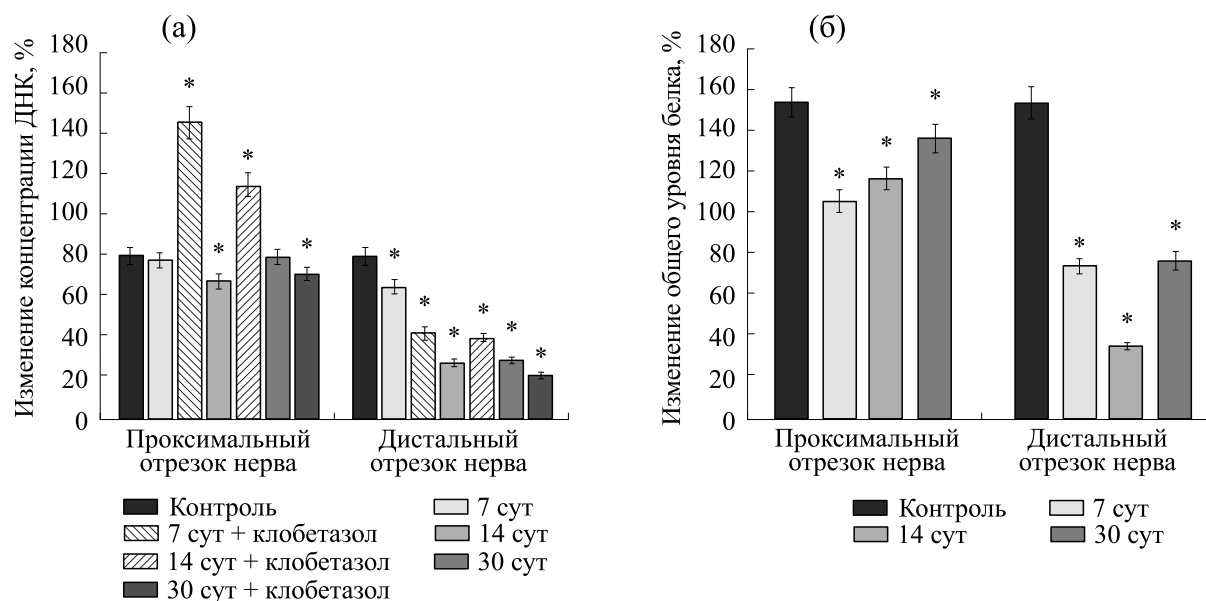


Рис. 3. Изменение концентрации ДНК (а) и общего содержания белка (б) в поврежденных соматических нервах в норме (контроль) и при перерезке нерва; * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

мальном отделе нерва после его травмы концентрация ДНК возрастала в 1.8 и 1.4 раза на 7-е и 14-е сутки относительно контрольных значений.

Наиболее ранние изменения белкового состава нерва обнаруживались уже в первые семь суток после повреждения нерва (рис. 3б). Это согласуется с литературными данными, указывающими на то, что дегенерационные процессы развиваются в течение пяти-семи суток после травмы нервного проводника [29].

Так, в проксимальной части нерва спустя семь суток после травмы содержание белка уменьшилось на 30,7% по отношению к контролю. К 30-м суткам его уровень в поврежденных соматических нервах остается ниже контрольного значения на 10.5%. В дистальном отделе наблюдалось существенное снижение содержания белка к 14-м суткам эксперимента более чем в четыре раза по отношению к контролю. К 30-м суткам наблюдения этот показатель по-прежнему остается ниже контрольного значения на 50%.

Таким образом, при перерезке нервного проводника в обоих его участках наблюдается снижение количества белка, но наиболее выраженные изменения происходят в его дистальном отрезке из-за исчезновения центральной регуляции и усиления дегенерационных процессов в результате отсутствия регуляторных механизмов.

Выживание нейронов также поддерживается с участием MAPK/ERK-зависимой внутриклеточной сигнализации. Из литературы известно, что нейрофиламенты нервной ткани, составляющие основу цитоскелета, участвуют в обеспечении

медленного аксонального транспорта [30]. В частности, тубулин входит в состав цитоплазматических микротрубочек, которые наряду с белками промежуточных филаментов играют важную роль в образовании внутриклеточного скелета. В росте аксонов под действием нейротрофинов принимает участие большое количество малых G-белков, которые преобразуют активный цитоскелет, MAP-киназы, опосредующие эти эффекты, а также белки семейства MAP, ассоциированные с микротрубочками и стабилизирующие тубулиновый цитоскелет. Среди многочисленных семейств малых G-белков выделяют два семейства, осуществляющих регуляцию роста аксона и связанных с ним перестройками актинового цитоскелета. Во-первых, это семейство малых G-белков Rho, активация которых приводит к изменению морфологии клетки, а именно Ras1 и Cdc42 в ГТФ-связанной форме взаимодействуют с p21-активируемой серин/треониновой киназой PAK1. После этого, PAK1 фосфорилирует различные мишени, среди которых имеются белки-регуляторы полимеризации актина, в частности Arp 2/3 и белок филамин А, отвечающие за ветвление актиновых фибрилл) и белки-регуляторы динамики тубулинового цитоскелета. Ко второй группе малых G-белков относятся белки из семейства Ras-белков. Так, G-белок Rit1 из этого семейства запускает ветвление и аксональный рост путем активации митоген-активируемой протеинкиназы ERK1/2 [31-33]. Кроме этого, для выявления регенерирующих аксонов чаще других в экспериментальных исследованиях используют белок GAP-43, который синтезируется

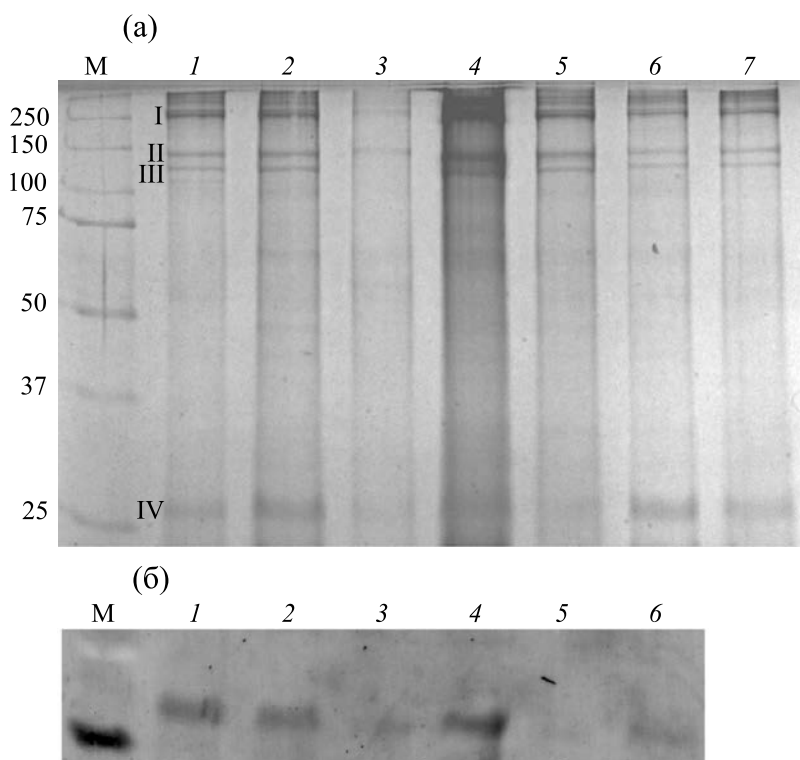


Рис. 4. Электрофореграмма белков (а) и вестерн-блот анализ уровня GAP-43 (б) поврежденных соматических нервов, выделенных через 7, 14 и 30 суток после перерезки: М — маркер; 1 — контроль; 2 — проксимальный участок, 7 суток; 3 — дистальный участок, 7 суток; 4 — проксимальный участок, 14 суток; 5 — дистальный участок, 14 суток; 6 — проксимальный участок, 30 суток; 7 — дистальный участок, 30 суток; I — нейрофиламенты-Н, II — нейрофиламенты-М, III — тубулин; IV — GAP-43.

во время роста аксонов при развитии нейронов и регенерации аксонов в периферической и центральной нервной системе [34].

Исходя из этого, на следующем этапе эксперимента методом электрофореза в полиакриламидном геле был изучен качественный состав белковой фракции исследуемых интактных и поврежденных нервов. В интактном нерве были выявлены белки нейрофиламентов-Н (190–200 кДа), нейрофиламентов-М (140–160 кДа), тубулина (110 кДа), GAP-43 (27 кДа) (рис. 4).

Согласно результатам проведенных исследований, в проксимальном отрезке нерва через 14 суток после травмы отмечалось снижение содержания нейрофиламента-Н и тубулина на 22.8 и 22.0% соответственно, а с увеличением послеоперационных сроков до 30 суток их уровень возрастал на 9.8 и 34.8% по сравнению с контрольными значениями. Содержание нейрофиламента-М спустя семь суток после перерезки снизилось на 12.2%, а к 30-м суткам возросло на 13.8% относительно контроля. Следует отметить, что уровень GAP-43 возрастает как на 7-е, так и на 30-е сутки эксперимента в 1.3 и в 2.3 раза соответственно по сравнению с неповрежденным нервом (рис. 5).

В дистальном отрезке нерва через семь суток после повреждения количественное содержание фракций NF-Н, NF-М и тубулина уменьшилось более чем в два раза относительно контроля (рис. 5).

Было показано, что содержание нейрофиламента-Н, нейрофиламента-М и тубулина на 30-е сутки возросло относительно контроля на 39.7, 26.0 и 14.5% соответственно. Интенсивность GAP-43 снизилась к 14 суткам наблюдения на 40.4%, однако с увеличением времени повреждающего воздействия до 30 суток отмечается увеличение данного показателя в 1.6 раза по сравнению с контрольным значением.

Известно, что после перерезки в нервном проводнике начинаются процессы демиелинизации в результате выработки оксида азота (NO), альфа-фактора некроза опухоли и протеаз, что сопровождается нарушением или полной потерей аксональной проводимости. В клетке происходит повышенная экспрессия натриевых каналов, приводящая к временному восстановлению аксональной проводимости, что вызывает усиленный приток ионов Ca^{2+} , который в конечном итоге активирует многочисленные ферментные каскады, включая аксональный кальпаин [35]. Вероятнее

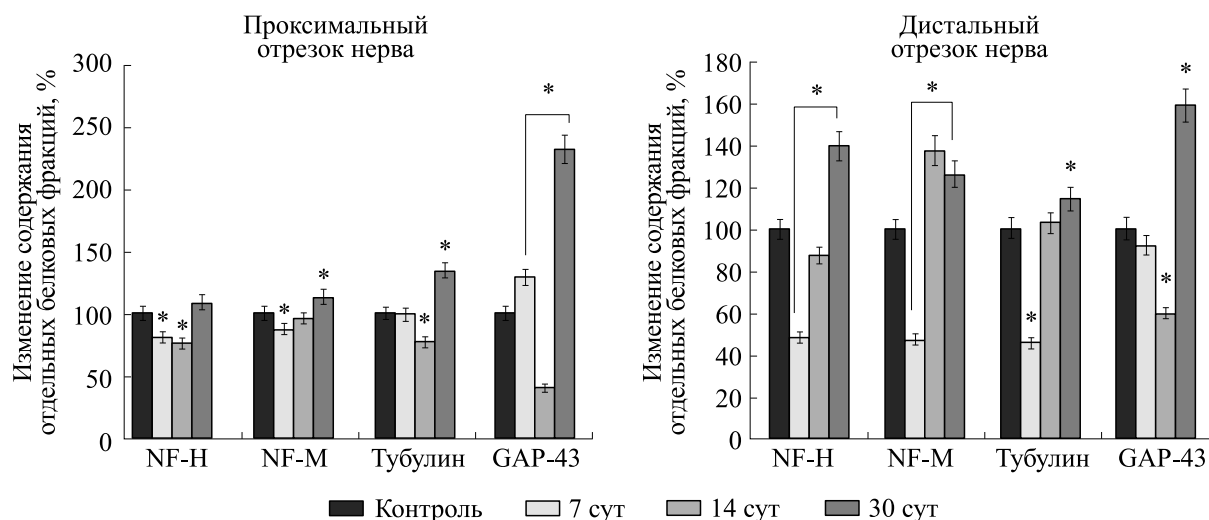


Рис. 5. Изменение содержания отдельных белковых фракций в поврежденных соматических нервах; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

всего, кальпаин разрушает множество нейронных белков, с чем и связано снижение содержания белка как в проксимальном, так и в дистальном отделе на протяжении семи суток наблюдения. В то же время в ответ на повреждение клетка начинает синтезировать белки, участвующие в регенерации нерва. Так, с увеличением времени повреждающего воздействия до 30 суток в проксимальном отделе нерва начинается синтез структурных белков, в частности, NF-H, NF-M, тубулина, что свидетельствует о репаративной регенерации ми-

елиновых оболочек нервных волокон, которая активно протекает до 50-х суток эксперимента [36].

Как уже упоминалось нами выше, нейротрофические факторы способны запускать сигнальные пути, направленные на усиление метаболических и синтетических путей в нервной клетке, в частности активировать синтез белков. В этой связи, клобетазол может выступать в качестве эффективного биологически активного соединения, влияющего на регенерационные процессы [11] и нервную проводимость [16] за счет регуляции механизмов, опосредованных действием нейротрофических факторов.

Было показано, что при воздействии клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг в проксимальном отделе нерва содержание белка снизилось на 59.6% по сравнению с контролем к 7-м суткам после травмы. В этой же серии опытов на 14-е сутки наблюдения уровень белка остается ниже контрольного значения на 45.6% (рис. 6), а спустя 30 суток после перерезки количественное содержание белка незначительно превышает контроль (на 5.3%).

На фоне действия препарата в дистальном отрезке нерва спустя 7 и 14 суток эксперимента наблюдается существенное снижение содержания белка на 40.0 и 72.6% соответственно по отношению к контролю. Увеличение времени повреждающего воздействия до 30 суток сопровождается небольшим возрастанием количества белка (до уровня 51% по отношению к интактному нерву).

Электрофоретический анализ белковой фракции поврежденных соматических нервов при введении клобетазола из расчета 0.25 мг/кг показал, что в проксимальном участке интенсивнее прояв-

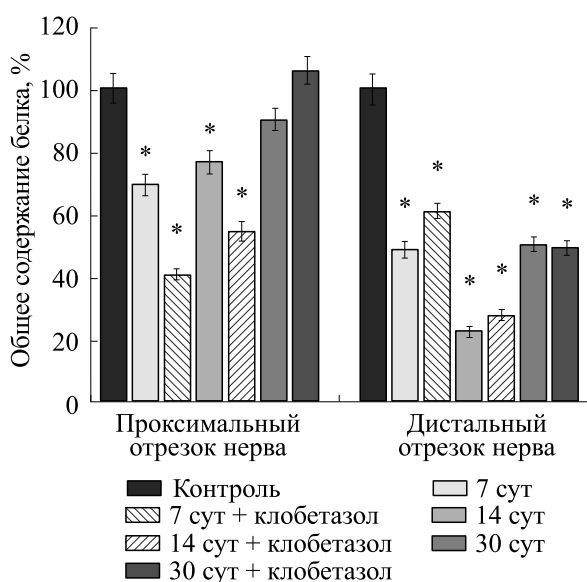


Рис. 6. Влияние клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг на общее содержание белка в поврежденных соматических нервах крысы; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

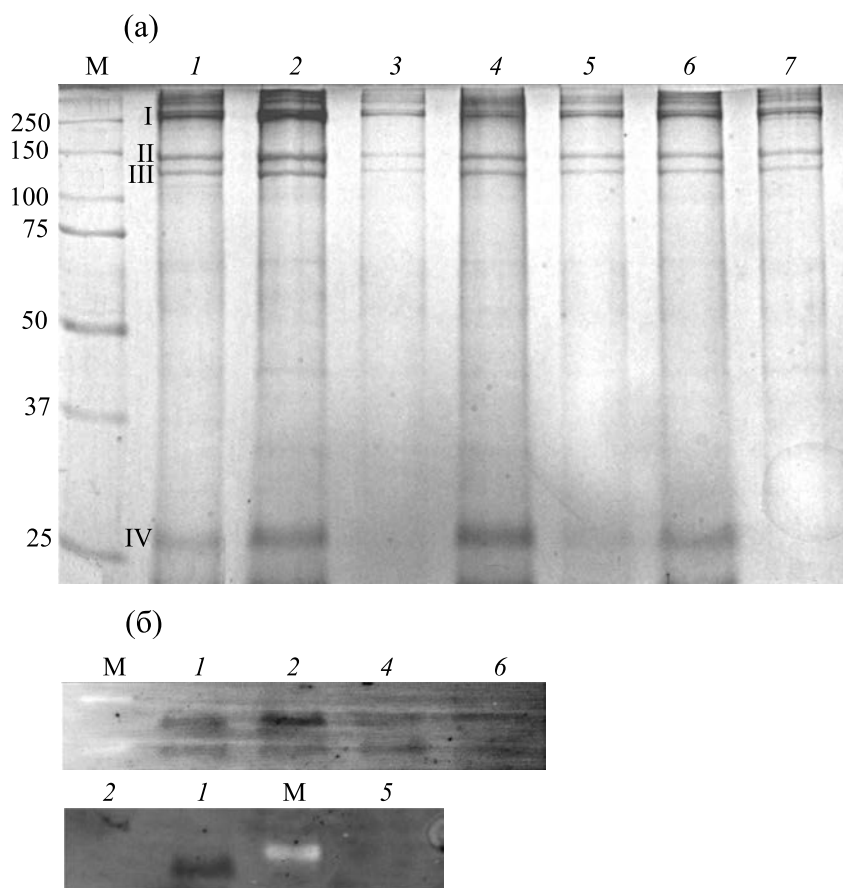


Рис. 7. Электрофореграмма белков (а) и вестерн-блотт анализ уровня GAP-43 (б) в поврежденных соматических нервов крысы при введении клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг: М — маркер; 1 — контроль; 2 — проксимальный участок, 7 суток; 3 — дистальный участок, 7 суток; 4 — проксимальный участок, 14 суток; 5 — дистальный участок, 14 суток; 6 — проксимальный участок, 30 суток; 7 — дистальный участок, 30 суток; I — нейрофиламенты-Н, II — нейрофиламенты-М, III — тубулин; IV — GAP-43.

ляются белки цитоскелета на 30-е сутки по сравнению с контрольной пробой, а белки, связанные с аксональным ростом, — как на 14-е, так и на 30-е сутки после повреждения (рис. 7).

В проксимальной части поврежденного нерва при воздействии клобетазола из расчета 0,25 мг/кг произошло снижение содержания NF-Н и NF-М на 18.6 и 15.7% к 14-м суткам эксперимента, а к 30-м суткам данные показатели увеличились на 88.2 и 41.8% соответственно по сравнению с контролем. В серии опытов с введением препарата содержание тубулина также снизилось на 29.5% к 7-м суткам наблюдения, а к 30-м суткам его содержание возросло на 39.9% относительно контроля. Следует отметить, что уровень GAP-43 также меняется: к 7-м суткам его содержание уменьшается в 1.32 раза, а на 14-е и 30-е сутки превышает контроль в 1.8 и 2.7 раза соответственно (рис. 8).

Исследование белковой фракции дистального отрезка поврежденных нервных проводников в варианте опыта с введением препарата показало

увеличение содержания нейрофиламента-Н в 1.5 раза по сравнению с контролем к 30-м суткам эксперимента в серии опытов с введением клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг. При этом содержание нейрофиламента-М снизилось на 26.9% к 7-м суткам наблюдения, а к 30-м суткам стало равным контролю. Содержание тубулина в течение 14 суток находилось в пределах погрешности контрольного значения, а к 30-м суткам увеличилось на 26% относительно уровня контроля. На 7-е и 30-е сутки интенсивность белковой фракции GAP-43 резко снизилась — на 88.2 и 44.9% соответственно по сравнению с контролем, а к 14-м суткам уровень GAP-43 превышал контрольные значения на 14.5% (рис. 8).

Электрофоретический анализ показал, что в варианте опыта с клобетазолом наблюдается снижение содержания нейрофиламента-М относительно контроля в проксимальном отделе нерва на протяжении 14-ти суток эксперимента. В дистальном же его отрезке происходит снижение белков цитоскелета.

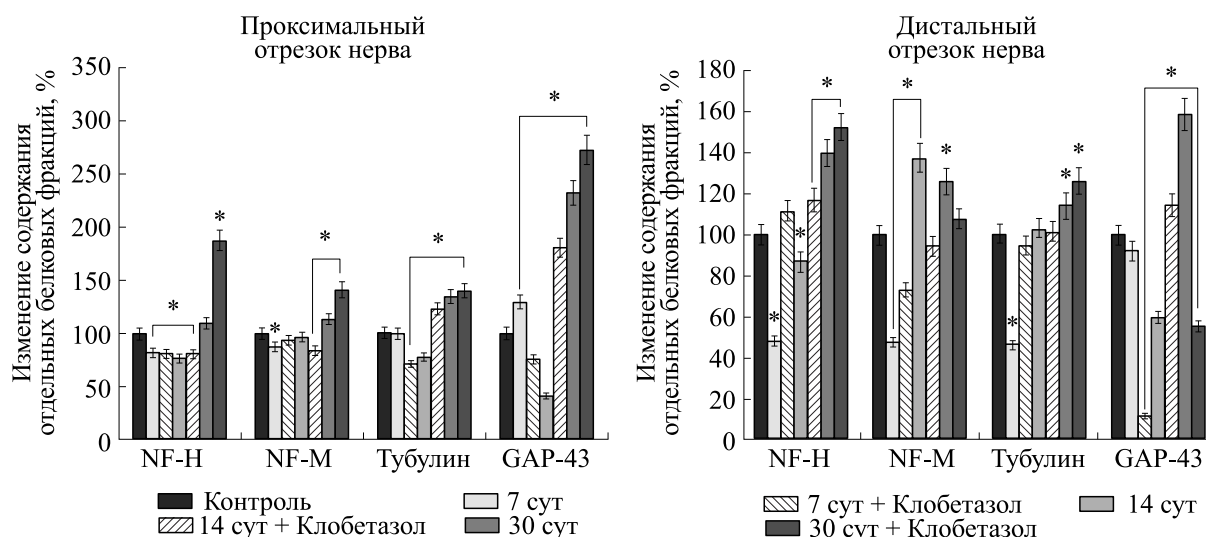


Рис. 8. Влияние клобетазола в концентрации 25 мг/кг на содержание отдельных белковых фракций в поврежденных соматических нервах крысы; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Следует отметить, что к 30-м суткам наиболее выраженные изменения белкового состава наблюдаются в проксимальном участке нерва при введении клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг, что сопровождается увеличением общего белка на 15.8% по сравнению с поврежденным нервом без воздействия препарата. При этом отмечается увеличение содержания белковых полос NF-M и тубулина.

В литературе имеются сообщения, указывающие на способность клобетазола участвовать в стимуляции пролиферации шванновских клеток и активации генов, связанных с ремиелинизацией [37]. Важное значение шванновских клеток, как клеток, осуществляющих миелинизацию нервных волокон, обусловлено их способностью синтезировать нейротрофические факторы, в частности, фактор роста нервов и нейротрофин-3. Связывание факторов роста со своими рецепторами p75NTR и Trk включает сигнальную цепь от активированного Ras, в которой сигнал передается через фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) на группу белков, играющих ключевую роль в контроле над организацией и динамикой цитоскелетных систем, актиновых микрофиламентов и микротрубочек [38]. Вероятнее всего, клобетазол способствует увеличению содержания факторов роста, играющих важную роль в стимуляции синтеза нейрофиламентов и тубулина. Об этом свидетельствуют полученные нами данные об увеличении количества ДНК в этих же условиях эксперимента, что однозначно свидетельствует об усилении регенерационных процессов в нерве.

В настоящее время в фармакологической индустрии широко применяются различные носители для доставки лекарственных препаратов. Данное направление имеет ряд преимуществ перед традиционными способами введения лекарственных препаратов: носители обеспечивают контроль над высвобождением, способствуют защите от ферментативного и химического разложения и повышают эффективность и/или снижают токсичность лекарств, а также сглаживают неравномерную скорость поступления активных веществ в область повреждения. Поэтому следующим этапом нашего исследования было изучение влияния клобетазола в составе гидрогеля на изменение концентрации ДНК в каждом из отрезков поврежденного нервного проводника. Проведение МТТ-теста выявило, что гидрогель, состоящий из 0.8%-го раствора левана, 0.2%-го раствора альгината и клобетазола в концентрации 0.025 мг/мл, оказывает статистически значимое цитотоксическое действие на клетки легких эмбриона человека (рис. 9). Наименьшее цитотоксическое действие наблюдается при разведении исходных компонентов в 128 раз, выживаемость клеток при этом составляет 72%.

Было установлено, что на 7-е сутки эксперимента при использовании гидрогеля в проксимальном отделе нерва отмечается снижение концентрации ДНК на 19.2% относительно контроля, но уже на 30-е сутки после перерезки концентрация ДНК становится равной контрольным значениям (рис. 10а). При добавлении в гидрогель клобетазола в конечной концентрации 0.25 мг/мл на 30-е сутки после перерезки нерва

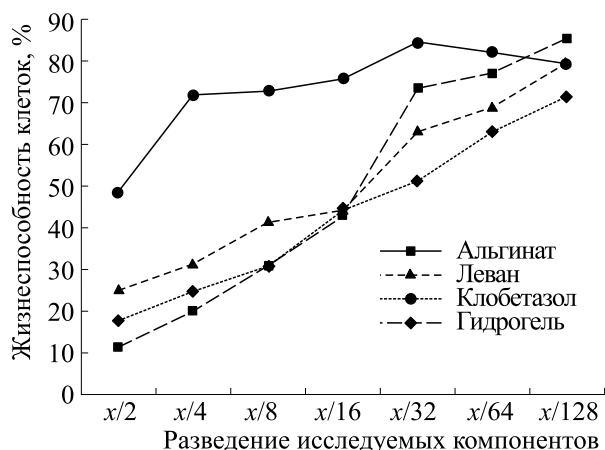


Рис. 9. Определение жизнеспособности клеток при влиянии гидрогеля и отдельных его компонентов.

концентрация ДНК значительно увеличивается — на 45.5% относительно контроля. Таким образом, увеличение содержания ДНК в проксимальном отрезке нерва свидетельствует об активации регенерационных процессов в нервном проводнике после травмы.

Согласно вышеприведенным литературным данным, активация генов, связанных с ремиелинизацией, сопровождается запуском сигнальных путей, осуществляющих регуляцию процессов перестройки цитоскелета и аксональных белков, в связи с чем необходимо было исследовать изменение содержания общего белка и отдельных белковых фракций в поврежденных соматических нервах на фоне использования клобетазола в со-

ставе гидрогеля. В ходе проведенного исследования было показано, что на 7-е и 30-е сутки после перерезки и использования гидрогеля без препарата содержание общего белка в проксимальном отделе нерва меньше на 31.2 и 27.4% по сравнению с контрольными значениями. При добавлении в гидрогель клобетазола в конечной концентрации 0.25 мг/мл на 30 сутки после перерезки нерва в его проксимальном отрезке содержание общего белка равно контрольным показателям (рис. 10б).

Анализ электрофореграммы поврежденных белков при добавлении гидрогеля, содержащего клобетазол в конечной концентрации 0.25 мг/мл, показал, что в проксимальном отделе интенсивнее проявляются белки цитоскелета на 30-е сутки по сравнению с аналогичной серией эксперимента без добавления клобетазола (рис. 11а,в).

В проксимальной части поврежденного нерва при наложении гидрогеля после перерезки нерва произошло снижение содержания белков цитоскелета: NF-H и NF-M на 68.3 и 79.9% соответственно, тубулина — на 74.7% к 7-м суткам эксперимента. К 30-м суткам данные показатели увеличились по сравнению с 7-ми сутками эксперимента, но были снижены на 31.0, 65.5 и 34.5% соответственно по сравнению с контролем (рис. 11б).

Содержание GAP-43 в течение 7 и 30 суток эксперимента было ниже контрольных значений — на 59.6 и 24.6% соответственно. В серии опытов с введением препарата в гидрогель содержание NF-H и тубулина к 30-м суткам наблюдения уве-

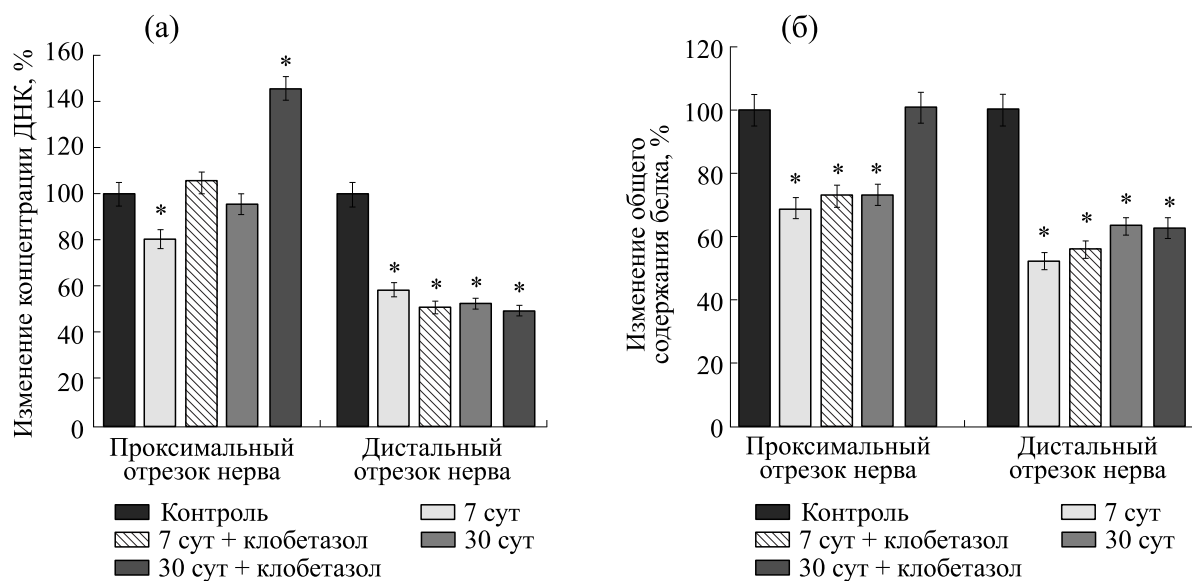


Рис. 10. Изменение концентрации ДНК (а) и общего содержания белка (б) в поврежденных соматических нервах через 7 и 30 суток после перерезки при влиянии гидрогеля.

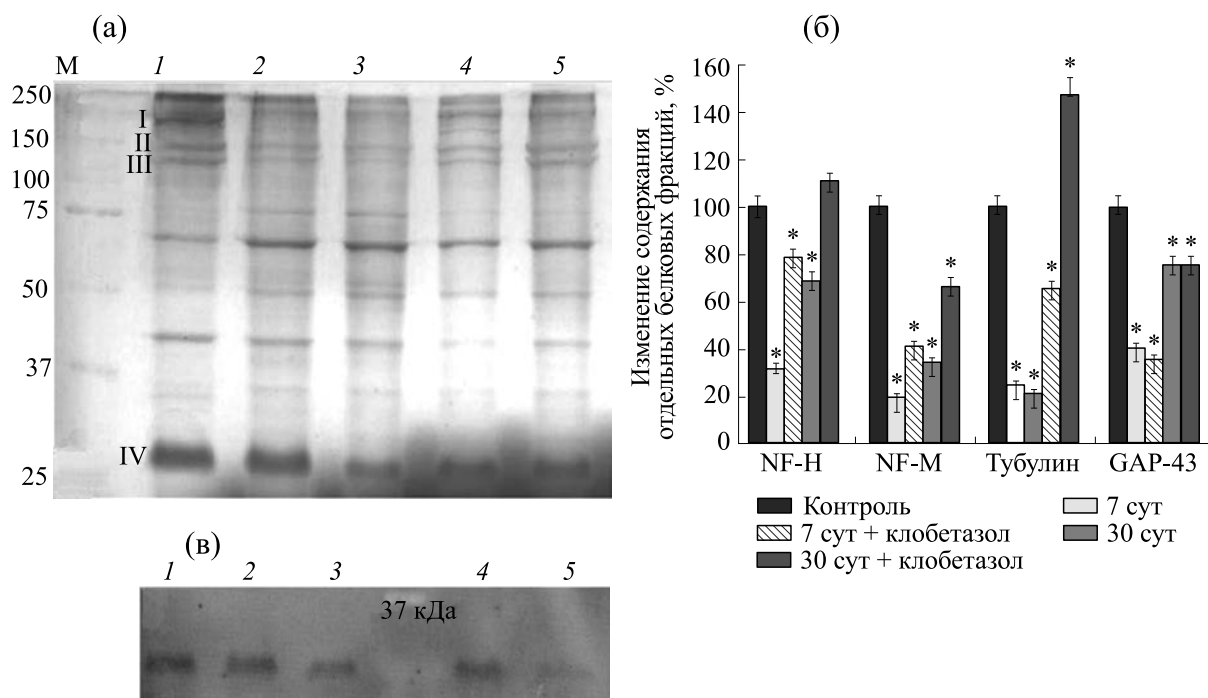


Рис. 11. Электрофореграмма белков (а), изменение отдельных белковых фракций поврежденных нервов (б) и вестерн-блот анализ уровня GAP-43 (в) при влиянии гидрогеля: М — маркер; 1 — контроль; 2 — 7 суток; 3 — 7 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; 4 — 30 суток; 5 — 30 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; I — нейрофиламенты-Н, II — нейрофиламенты-М, III — тубулин, IV — GAP-43; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

личилось на 11.0 и 47.2% соответственно по сравнению с контролем.

Таким образом, постоянное присутствие и приток действующего вещества из гидрогеля способствует меньшей деградации белков поврежденного нерва в процессе дегенерации. Следует отметить, что на 30-е сутки наибольшее воздействие действующее вещество оказывает на синтез тубулина: его содержание увеличилось на 47.2% относительно контрольных значений. Однако при заданной постановке эксперимента введение клобетазола в составе гидрогеля негативно повлияло на синтез маркера аксонального роста — GAP-43.

Известно, что важнейшей характеристикой, отражающей эффективность протекания регенерационных процессов является способность нервных волокон проводить потенциал действия. В результате полученной травмы проводимость нерва заметно снижается в проксимальном его участке и полностью утрачивается в дистальном отрезке нервного проводника. С увеличением времени эксперимента восстановление способности проведения потенциала действия с небольшой амплитудой отмечается только в проксимальном отрезке нерва за счет сохранения центральной иннервации, благодаря которой осуществляется четкая регуляция и контроль над

функциональным состоянием нервных проводников. Было показано, что использование препарата в составе гидрогеля оказывает менее выраженное действие на восстановление проводимости нервных волокон по сравнению с увеличением амплитуды потенциалов действия до контрольных значений в серии опытов с внутримышечным введением клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг (рис. 12). Таким образом, полученные нами данные по исследованию влияния клобетазола на содержание фактора роста нервов, ДНК и отдельных белковых фракций в проксимальном и дистальном отрезках травмированного нервного проводника коррелируют с восстановлением функциональной активности поврежденных соматических нервов.

ВЫВОДЫ

Исходя из полученных результатов, введение клобетазола усиливает восстановительные процессы в травмированном нерве: наблюдается увеличение уровня нейротрофических факторов роста (NGF и нейротрофин-3), нормализация содержания отдельных белковых фракций, синтез ДНК, структурных белков (нейрофиламенты-Н, нейрофиламенты-М, тубулин), а также ключевого маркера аксонального роста белка GAP-43 как

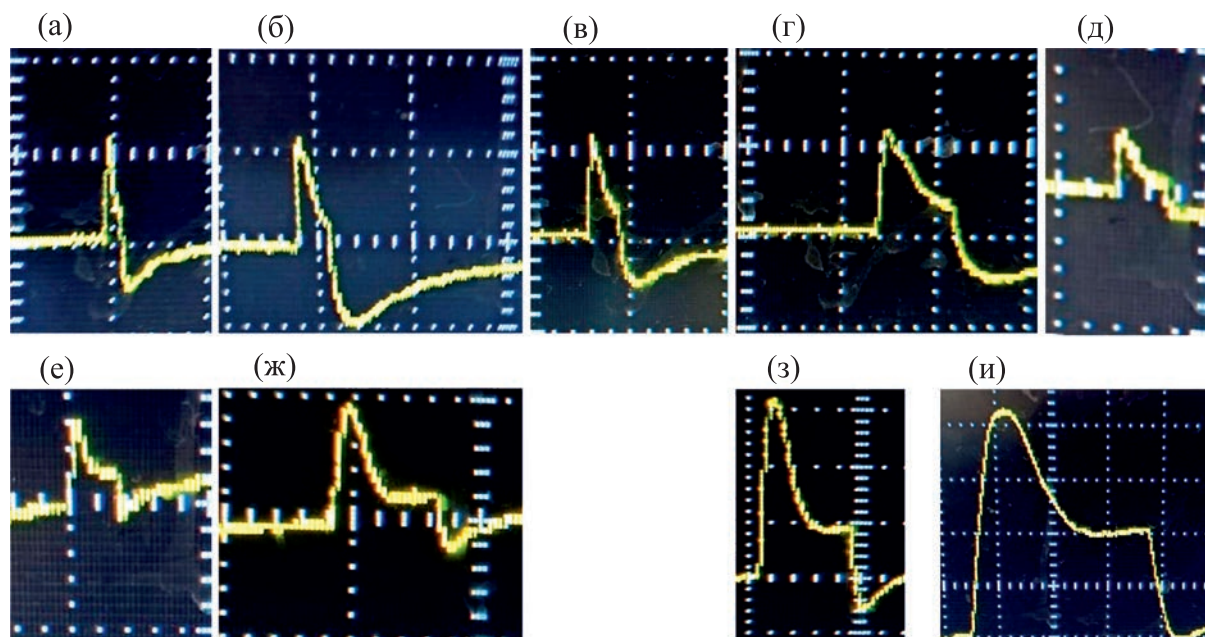


Рис. 12. Потенциал действия соматического нерва крысы: интактный нерв (а); инкубация в растворе Рингера 5 мин (б) и 20 мин (в); инкубация в растворе клобетазола 0.25 мг/мл 5 мин (г) и 20 мин (д); 24 сутки после повреждения (е) и при в/м введении клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг (ж); 24 сутки после перерезки и наложения геля без вещества (з) и с клобетазолом в концентрации 0.25 мг/мл геля (и). Масштаб по шкале потенциала: (а)–(ж) – 100 мВ на клетку, (з)–(и) – 20 мВ на клетку; масштаб по времени: (а) – 0.5 мс, (б, в, д, е) – 0.25 мс, (г, ж, з) – 0.1 мс, (и) – 0.025 мс на клетку.

в проксимальном, так и в дистальном отрезках нервного проводника. Эти данные также согласуются с восстановлением способности соматических нервов проводить потенциал действия на фоне действия клобетазола, что свидетельствует об эффективном протекании регенерационных процессов в травмированных нервных проводниках. Проведя сравнительный анализ внутримышечного введения препарата и его использования в составе полимера из микробных полисахаридов, было показано, что внутримышечное использование клобетазола сопровождалось усиленным синтезом не только белков цитоскелета, но и белков, связанных с аксональным ростом, ответственных за восстановительные процессы в нервной ткани на протяжении всего периода эксперимента. Таким образом, внутримышечное введение клобетазола способствует более выраженному синтезу ДНК, нейротрофических факторов и белковых фракций по сравнению с использованием клобетазола в составе гидрогеля. В результате внутримышечного введения препарата стабилизация белкового состава поврежденных соматических нервов наблюдается на более ранних сроках после травмы, и стимуляция регенерационных механизмов за счет активации синтеза ДНК в поврежденной нервной ткани протекает наиболее эффективно. Менее выраженный эффект клобетазола в составе гелевого препарата,

по-видимому, объясняется более медленным его выходом из гелевого композита.

Таким образом, полученные нами результаты исследований согласуются с литературными данными, указывающими на способность клобетазола участвовать в активации синтеза нейротрофических факторов шванновскими клетками за счет связывания с глюкокортикоидными рецепторами нервных клеток. Вероятнее всего на фоне увеличения уровня нейротрофинов происходит активация фосфатидилинозитол-3-киназного пути, что сопровождается синтезом белков и возрастанием их количественного содержания, а также уровня нейрофиламентов и тубулина. Кроме этого, важная роль в аксональной регенерации отводится сигнальному пути митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK/ERK), поскольку малые G-белки, являющиеся участниками этого сигнального пути, осуществляют регуляцию процессов перестройки цитоскелета и рост аксонов. Увеличение уровня ДНК и восстановление способности проводить потенциал действия поврежденными нервными проводниками указывает на активизацию процессов регенерации в соматических нервах после травмы. Таким образом, клобетазол опосредует синтез нейротрофических факторов, которые запускают PIK3/Akt и MAPK/ERK сигнальные пути, в результате чего повышается экспрессия различных факторов

транскрипции, контролирующих синтез отдельных белковых фракций, в том числе белков цитоскелета и белков аксонального роста, необходимых для восстановления функциональной активности поврежденных нервных волокон. Об этом же свидетельствует появление потенциала действия и способности нерва к его проведению.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках фундаментальной НИР № г/б 16-20 (ГЗ 01 10 0210059 611) «Поиск и выделение из природных источников продуцентов полисахаридов и их полногеномный анализ с целью увеличения продуктивности и создания функциональных материалов нового поколения с широким спектром применения, обладающих сверхнизкой теплопроводностью, плотностью, антибактериальными и регенерирующими свойствами».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минвуза от 13.11.1984 г. № 742).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. X. Zhang, X. He, Q. Li, et al., *Stem Cell Rep.*, **9** (8), 1256 (2017).
2. K. Sánchez-Alegría, M. Flores-León, E. Avila-Muñoz, et al. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3725 (2018).
3. V. V. Revin, M. A. Yudanov, and G. V. Maksimov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **142** (2), 191 (2006).
4. S. I. Pinyaev, T. P. Kuzmenko, N. V. Revina, et al., *BioMed Res. Int.*, **2019**, 1–9 (2019).
5. M. V. Isakina, N. V. Revina, and V. V. Revin, *Biol. Med.*, **7** (2), (2006).
6. Z. Du, O. Bondarenko, D. Wang, et al., *J. Cell Physiol.*, **231** (6), 1301 (2016).
7. O. Bota and L. Fodor, *Drug Metab. Rev.*, **51** (3), 266 (2019).
8. П. К. Мирошникова, А. В. Люндуп, Н. П. Бацаленко и др., *Вестн. РАМН*, **73** (6), 388 (2018).
9. V. V. Revin, S. I. Pinyaev, M. V. Parchaykina, et al., *Front. Physiol.*, **10**, 384 (2019).
10. F. Gonzalez-Perez, E. Udina, and X. Navarro, *Int. Rev. Neurobiol.*, **108**, 257 (2013).
11. F. J. Najm, M. Madhavan, A. Zaremba, et al., *Nature*, **522** (7555), 216 (2015).
12. S. Morisaki, M. Nishi, and H. Fujiwara, *Glia*, **58**, 954 (2010).
13. А. Н. Хлебникова, *Фармакотерапия в дерматоневрологии*, **5**, 124 (2010).
14. X. Fontana, M. Hristova, and C. Da Costa, *J. Cell Biol.*, **198**, 127 (2012).
15. T. M. Brushart, M. Aspalter, J. W. Griffin, et al., *Exp. Neurol.*, **247**, 272 (2013).
16. W. Shi, S. Bi, Ya. D. et al., *Exp. Ther. Med.*, **18** (2), 1258 (2019).
17. И. Я. Бозо, А. И. Билялов, М. О. Мавликеев и Р. В. Деев, *Гены и клетки*, **14** (1), 16 (2019).
18. D. Nunes, S. Andrade, M. J. Ramalho, et al. *Polymers (Basel)*, **14** (5), 1010 (2022).
19. T. Mosmann. *J. Immunol., Methods*, **65**, 55 (1983).
20. В. В. Ревин, Дис. ... д-ра биол. наук (Институт биологической физики АН СССР, Минск, 1990).
21. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
22. U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
23. L. L. Boodram, in *Protocol Online — Your Lab's Reference Book — online database of research protocols in a variety of life science fields* (2006). <http://www.protocolonline.org/prot/Protocols/Extraction-of-genomic-DNA-from-whole-blood-3171.html>.
24. F. Ahmed, E. Zapata-Mercado, S. Rahman, and K. Hristova. *Biophys J.*, **120** (1), 55 (2021).
25. А. И. Продан, Л. М. Бенгус и А. А. Сиренко, *Ортопедия, травматология и протезирование*, **3** (2), 66 (2010).
26. H. Querfurth and H. K. Lee, *Mol. Neurodegener.*, **16** (1), 44 (2021).
27. H. Huang, H. Liu, R. Yan, and M. Hu, *Neurochem. Res.*, **42** (12), 3515 (2017).
28. S. R. Hutton, J. M. Otis, E. M. Kim, et al., *J. Neurosci.*, **37** (34), 8102 (2017).
29. M. Caillaud, L. Richard, J.-M. Vallat, et al. *Neural Regen. Res.*, **14** (1), 24 (2019).
30. A. Yuan, M. V. Rao, Veeranna, and R.A. Nixon, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **9** (4), a018309 (2017).
31. C. Galindo-Romero, B. Vidal-Villegas, J. Asís-Martínez, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (19), 10896 (2021).
32. J. E. Kim, Y. H. Cho, and T. B. Seo, *J. Exerc. Rehabil.*, **16** (2), 141 (2020).
33. Q. Cai, G. Wu, M. Zhu, et al., *Life Sci.*, **248**, 117465 (2020).
34. D. Chung, A. Shum, and G. Caraveo, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 567537 (2020).
35. S. Y. Cheng, S. C. Wang, M. Lei, et al., *Neural Regen. Res.*, **13** (3), 556 (2018).
36. С. С. Архипова, И. С. Рагинов, А. Р. Мухитов и Ю. А. Чельшев, *Морфология*, **135** (3), 29 (2009).
37. L. Zhang, W. Yang, H. Xie, et al., *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **5** (3), 1426 (2019).
38. А. Е. Ковражкина, Л. В. Стаховская, О. Д. Разинская и А. В. Сердюк, *Журн. неврологии и психиатрии*, **5**, 143 (2018).

Influence of Neurotrophic Factors on Protein Composition during Somatic Nerve Injury and Regeneration

T.P. Kuzmenko*, M.V. Parchaikina*, E.S. Revina*, M.Yu. Gladysheva*, and V.V. Revin*

**National Research Ogarev Mordovia State University, Bol'shevistskaya ul. 68, Saransk, 430005 Russia*

The quantity of neurotrophic factors and the protein composition of somatic nerve membranes in rats during injury and survival of nerves under the action of clobetasol have been explored. It has been shown that the drug administered intramuscularly produces more pronounced effect on the increase in the level of neurotrophic growth factors and structural proteins responsible for recovery processes than the drug released from hydrogel derived from microbial polysaccharides as well as stabilizes the content of the total protein fraction of damaged somatic nerves. Proteins of the injured neural conductor are less degraded during intramuscular injection of clobetasol probably because of better availability of the drug administered by injection than availability of the drug administered (slow drug release) from hydrogel composite. In addition, an increase in the amount of DNA and some protein fractions indicates that clobetasol is able to participate in an activation of genes associated with remyelination. We suppose that clobetasol can stimulate synthesis of neurotrophic growth factors, thereby triggering phosphatidylinositol-3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways that regulate the processes of cytoskeletal reorganization and axonal growth, as well as enhance the rate of synthesis of structural and axonal proteins necessary to restore the functional activity of injured nerve conductors.

Keywords: somatic nerves, nerve injury, neurotrophic growth factors, clobetasol, nerve regeneration, hydrogel systems

КАЛОРИМЕТРИЯ ПЛАВЛЕНИЯ ЯДЕР КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ МАГНИЯ

© 2023 г. Г.Я. Коломийцева*, А.Н. Прусов*,[#], Е.А. Коломийцева**, Т.А. Смирнова*, ***

*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/40, Москва, 119992, Россия

**МИРЭА – Российский технологический университет, просп. Вернадского, 78, Москва, 119454, Россия

***ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН, Тимирязевская ул., 42, Москва, 127550, Россия

[#]E-mail: prusov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 03.08.2022 г.

После доработки 27.10.2022 г.

Принята к публикации 01.11.2022 г.

С помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии определили термодинамические параметры деконденсации внутриядерного хроматина клеток печени крысы, индуцированной понижением концентрации ионов магния от 5 до 0 мМ. Процесс плавления хроматина в диапазоне температур 70–100°C происходит в последовательности: плавление кор-гистонов, плавление релаксированной ДНК, плавление топологически напряженной ДНК. Было установлено, что $T_{пл}$ и ΔH отдельных пиков также зависят от концентрации ионов Mg^{2+} в буфере. В ядрах с конденсированным хроматином ионы Mg^{2+} в концентрации 5 мМ существенно в сравнении с развернутым хроматином увеличивали $T_{пл}$ кор-гистонов (на ~7°C), но при этом понижали $T_{пл}$ ядерной ДНК как в релаксированном, так и в напряженном состоянии (на ~2.5°C и ~7.5°C соответственно). При этом в присутствии ионов Mg^{2+} энтальпия плавления пиков существенно увеличивалась. В то же время снижение полимерности внутриядерной ДНК нивелирует стабилизирующее кор-гистоны действие ионов Mg^{2+} . Повышение концентрации ионов Mg^{2+} выше 5 мМ вызывает появление нового пика с $T_{пл}$ выше 100°C, который, возможно, отражает термическое поведение неких Mg-индуцированных агрегатов. Обсуждаются возможные механизмы, объясняющие особенности термического поведения хроматина внутри ядра.

Ключевые слова: ядро, хроматин, катионы Mg^{2+} , дифференциальная сканирующая калориметрия, термодинамика, торсионное напряжение ДНК.

DOI: 10.31857/S000630292302014X, EDN: CBBIGP

Эукариотическая ДНК хранится и функционирует внутри ядра диаметром в несколько мкм в виде динамического комплекса с гистонами и кислыми белками – хроматина, чья структура до сих пор остается главной интенсивно изучаемой, но до сих пор плохо понятой проблемой молекулярной биологии [1].

Структурной единицей хроматина служит нуклеосома, где короткий отрезок ДНК (146 пар оснований) делает 1.75 оборота левовращающей спирали вокруг положительно заряженного октамера гистоновых белков (кор-гистонов H2A, H2B, H3 и H4) с отрезком линкерной ДНК переменной длины в 20–80 пар оснований. Нуклеосомные частицы, объединенные линкерной ДНК, формируют отрицательно заряженную хро-

матиную фибриллу толщиной 10 нм, известную как «бусы на нитке».

Установлено, что концентрация фосфатов ДНК в клетке меняется по клеточному циклу от 50–300 мМ фосфатов в интерфазе до 340–600 мМ фосфатов в митотической хромосоме [2]. Этот процесс, известный как конденсация хроматина (образование структур высшего порядка), чрезвычайно важен не только для эффективного хранения и защиты генетического материала, но и, как полагают, служит одним из способов регуляции генной экспрессии [3], а также необходим для выполнения других важных биологических функций таких как репликация, репарация, рекомбинация и др. [4].

На сегодняшний день действующими являются две парадигмы структур высшего порядка в хроматине – иерархические и полимерные [5–8]. Современные технологии исследования хроматина (криомикроскопия, 3С- и более высокие Hi-C-методики и др.) дают все больше аргументов

Сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия, ТЭА – триэтанолламин, NEM – N-этилmaleimид.

для жидкоподобной модели хроматина *in vivo*, которая предполагает, что 10-нм фибриллы конденсируются в нерегулярный и динамический полимерный ансамбль и свидетельствуют в пользу полимерной модели с «межпальцевой» укладкой элементарных 10-нм фибрилл. В зависимости от среды (эндогенных катионов, кроудинга, ионной силы и т.д.) нерегулярная и динамичная 10-нм фибрилла в ядре может формировать различные структуры, включая растянутые, завернутые, пересекающиеся, петлеобразные, колончатые [8].

Точный физический механизм индуцируемых катионами притяжений одноименно заряженных полимеров, лежащий, как полагают, в основе феномена компактизации, все еще остается неясным, хотя в последние годы этой проблеме уделяется особенно много внимания [9]. Предложено несколько электростатических моделей [10–12], но ни одна из них не в состоянии полностью объяснить весь накопленный экспериментальный материал.

В отличие от ДНК, чья индуцируемая поливалентными катионами конденсация *in vitro* интенсивно изучается многие годы [13], эксперименты с хроматином и его составными структурами (кор-частицами, нуклеосомами, выделенным и реконструированным хроматином) относительно немногочисленны [14–19], а исследований взаимодействия катионов с хроматином внутри ядра почти нет из-за ограниченности адекватных методов исследований и трудностей в интерпретации результатов [20, 21].

Вместе с тем известно, что высшая структура хроматина может нарушаться при выделении его из ядер [22], поэтому эксперименты *in vitro* на выделенном хроматине не всегда могут отражать ситуацию *in vivo*.

Магний и кальций — основные двувалентные катионы, участвующие в конденсации хроматина в клетке [23]. Эти ионы используются для выделения ядер с конденсированной структурой хроматина, характерной для его состояния *in situ* [24]. Катионы Mg^{2+} влияют на механические свойства ядер, изменяя их пластичность [25].

Причины компактного состояния ядерного хроматина следует искать в особенностях его структуры и окружения в ядре [26]. Хроматин в ядре находится в ограниченном объеме и в высокой концентрации, в условиях кроудинга и в среде с полиаминами и катионами металлов, totalная концентрация которых значительна (от 2 до 40 мМ) [27–29], и, как теперь показано, имеет пластичную нуклеосомную структуру, обеспечивающую его жидкокристаллическое поведение [30].

В нашей работе мы приводим данные об изменении энергетического состояния хроматиновых доменов внутри ядер клеток печени крысы, индуцируемом ионами магния. Эксперименты бы-

ли выполнены методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на суспензии ядер клеток печени крысы, выделенных в присутствии ионов Mg^{2+} . Результаты дают возможность предположить участие межфибриллярных взаимодействий, индуцируемых магнием, в ослаблении внутрицепочечных взаимодействий ДНК. Сообщается об увеличении магнием стабильности гистонового кора, коррелирующей с дестабилизацией ДНК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные ядра получали из печени самок белых крыс массой 100–150 г [31]. Гомогенизацию печени и дальнейшие процедуры проводили в растворе №1 следующего состава: 20 мМ ТЭА (триэтаноламин)-HCl, pH 7.6, 30 мМ NaCl и 10 мМ $MgCl_2$, содержащем 10% сахарозы, 0.2 мМ фенилметилсульфонил фторида (Sigma, США) и 4 мМ N-этилmaleимида (NEM) (Sigma, США). Гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин, осадок смешивали с раствором №2 следующего состава: 20 мМ ТЭА-HCl, pH 7.6, 30 мМ NaCl и 5 мМ $MgCl_2$, содержащим 2.5 М сахарозы, 0.2 мМ фенилметилсульфонил фторида и 4 мМ NEM до конечной концентрации сахарозы 2.1 М и центрифугировали при 50000 g в течение 45 мин. Осадок ядер ресуспендировали в растворе №2 без сахарозы и без NEM и осаждали 5 мин при 1000 g. Выделенные и очищенные таким образом ядра хранили при $-60^{\circ}C$ в 60%-м глицерине. Перед использованием аликвоты ядер промывали раствором, содержащим 20 мМ ТЭА-HCl, pH 7.6, 30 мМ NaCl и 5 мМ $MgCl_2$, и ресуспендировали в соответствующих растворах для ДСК.

Содержание ДНК и РНК в препаратах ядер определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Hitachi-124 (Япония) по методу, описанному в работе [32]. Концентрацию ДНК выражали в молях нуклеотидов, используя молекулярную массу одного нуклеотида 330 Да.

Электрофорез белков выполняли в 15%-м SDS-полиакриламидном геле, электрофорез ДНК проводили в 1%-м агарозном геле в боратном буфере.

Дифференциальная сканирующая калориметрия суспензии ядер. Суспензию изолированных ядер клеток печени крысы (0.5 мг ДНК на мл, или 1.5 мМ нуклеотидов) помещали в платиновую ячейку микрокалориметра ДАСМ-4 (НПО «Био-прибор», Пушино) и сканировали в температурном диапазоне 25–130°C со скоростью 2°C в мин. Суспензии ядер предварительно дегазировали. Ячейку сравнения заполняли соответствующим буфером. Обработку данных проводили в программе «Agina 2», разработанной в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

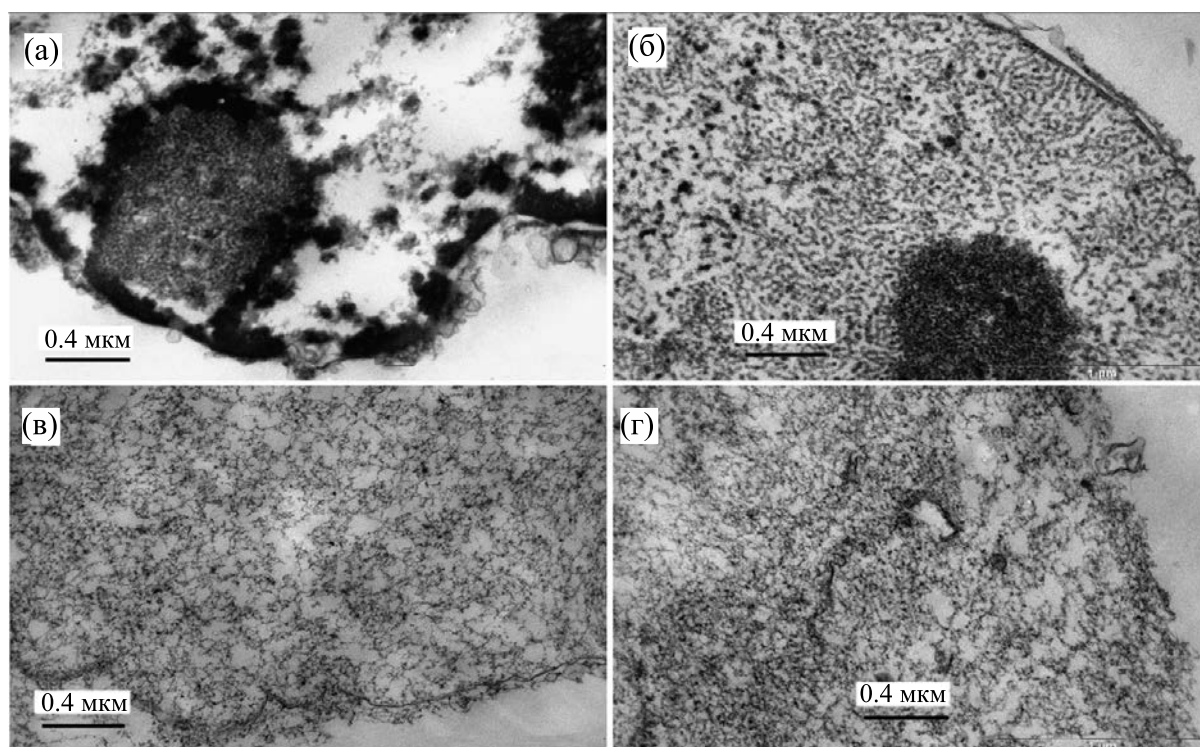


Рис. 1. Электронные микрофотографии изолированных ядер клеток печени крысы в растворе 20 мМ ТЭА, pH 7.6, содержащем 5 мМ $MgCl_2$ (а), 1 мМ $MgCl_2$ (б), 0.1 мМ $MgCl_2$ (в), 1 мМ ЭДТА (г).

МГУ. Программа записывала кривую зависимости избыточной теплоемкости образца от температуры. Из кривой вычиталась приборная базовая линия теплопоглощения буфера и химическая базовая линия, которую вычисляли по формуле $(1 - \alpha) \cdot C_H + \alpha \cdot C_D$, где C_H и C_D — теплоемкости нативного и денатурированного состояний, а α пропорциональна количеству денатурировавшего вещества, т. е. $\alpha = S_1/S$, где S_1 — площадь под пиком, ограниченная кривой сверху, базовой линией снизу и данной температурой справа, а S — общая площадь под пиком. Сигнал (в мкВт) нормировали на концентрацию и скорость прогрева и переводили в стандартные для теплоемкости единицы измерения (кДж/моль·град) путем умножения на коэффициент $k = M \cdot 0.06 / C \cdot V \cdot \nu$, где ν — скорость нагрева в град/мин, V — объем ячейки в мл, C — концентрация макромолекул в мг/мл, M — молекулярная масса образца в кДа.

Деконволюцию термограмм проводили по программе Origin 7.

Электронная микроскопия. Образцы фиксировали 1%-м глutarовым альдегидом в соответствующем буфере (исходный 25%-й глutarальдегид нейтрализовали до pH 7.0 добавлением NaOH) при 4°C в течение 1.5 ч, а затем 1%-м OsO_4 в течение 1 ч, дегидратировали и заключали в эпон. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB

III (LKB, Швеция), контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для характеристики структуры хроматина в выделенных ядрах использовали электронную микроскопию. Выделенные и отмытые от глицерина ТЭА-буфером с 5 мМ $MgCl_2$ ядра переводили в буфера с более низким содержанием ионов Mg^{2+} (< 5 мМ) и после 15 мин выдерживания подвергали электронно-микроскопическому исследованию, показавшему, что если в диапазоне концентраций 5–2 мМ Mg^{2+} ядерный хроматин выглядит как скопление плотных гетерогенных глобулярно-фибриллярных структур диаметром 100–200 нм без заметных морфологических отличий, то при ~1 мМ Mg^{2+} он становится гомогенным с диаметром фибрилл и глобул около 30 нм. Далее при уменьшении концентрации магния до 0.1 мМ хроматин деконденсируется, демонстрируя фибриллы, диаметр которых около 10 нм, и мало отличается от диаметра фибрилл в буфере с ЭДТА (рис. 1).

Изменение конденсации хроматина было подтверждено данными оптических измерений при $\lambda = 630$ нм (рис. 2). Известно, что мутность ядер-

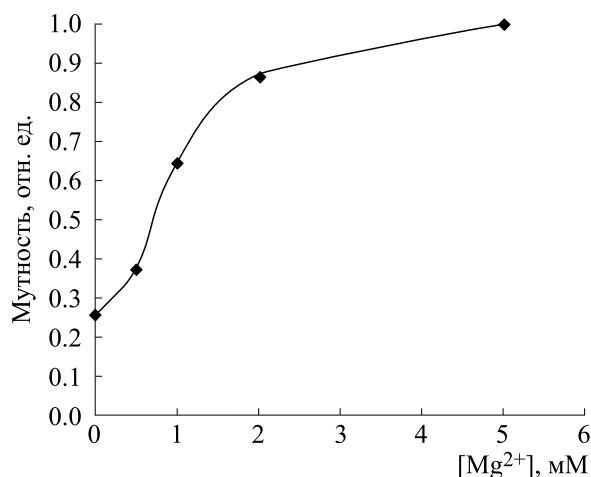


Рис. 2. Нормированная зависимость поглощения при $\lambda = 600$ нм ядерной суспензии от концентрации ионов магния. Поглощение при 5 мМ MgCl_2 принято за единицу. Концентрация ДНК в суспензии составляла ~ 50 мкг/мл.

ных суспензий коррелирует с их морфологией. Поглощение, фиксируемое в длинноволновой области (при длинах волн выше 300 нм), обусловлено рядом эффектов [33], среди которых основной вклад вносит рассеяние внутриядерного хроматина. Как следует из рис. 2, наблюдаемое нормированное поглощение суспензии ядер при 600 нм снижалось почти в четыре раза при уменьшении концентрации ионов Mg^{2+} от 5 мМ до перевода их в буфер с ЭДТА.

Электрофорез белков подтвердил неизменный состав и соотношение фракций гистонов во всем диапазоне используемых концентраций ионов магния во всех изолированных ядрах.

Таким образом, исследуемые образцы ядер содержат разный по компактизации хроматин и могут быть использованы для решения поставленной задачи — термодинамического сравнения плавления компактного и деконденсированного хроматина внутри самого ядра в зависимости от концентрации ионов магния.

Из литературы известно, что профили термического плавления изолированных ядер животных и человека являются многокомпонентными (три-пять пиков), что соответствует плавлению разных доменов ядерного хроматина [34, 35]. Показано также, что интенсивности пиков и их соотношение зависят от стадии клеточного цикла, возраста, природы катионов в буфере и ионной силы [36–39].

На рис. 3 представлены полученные нами экспериментальные зависимости избыточной молярной теплоемкости ΔC_p ядер от t при разных концентрациях ионов Mg^{2+} . При 5 мМ на экспериментальной термограмме видны только два пи-

ка — основной при $T_{пл} \approx 83^\circ\text{C}$ и небольшой пик, который выглядит как плечо основного пика при температуре около 94°C . При снижении концентрации магния уже можно выделить первый пик, сначала как плечо слева от основного пика, и в отсутствие магния в растворе (в присутствии 1 мМ ЭДТА) — как отдельный пик с $T_{пл}$ около 74°C . На рис. 3б приведены эти же термограммы с деконволюцией на три пика.

По интерпретации, предложенной авторами работы [38], в порядке возрастания $T_{пл}$ в хроматине ядра последовательно плавятся белки кора нуклеосом (пик I), релаксированная ДНК (пик II) и топологически напряженная ДНК (пик III). Следует заметить, что продолжают существовать и другие интерпретации пиков [40–42], хотя для идентификации этих пиков авторы подчас использовали одни и те же биохимические подходы. На основании того, что пик I исчезает под действием протеазы [43] и, в отличие от пиков II и III, не реагирует как ДНК при изменении ионной силы [38], он определяется как пик плавления мажорного белка, коим в ядрах являются гистоны. Поскольку пик III разрушается при небольшом действии нуклеазы [34, 41], а известно, что конденсация хроматина в ядре не меняется из-за расщепления ДНК, пик III не может быть связан с конденсацией хроматина. В то же время величина пика III связана с активностью клетки [37], и при его уменьшении материал пика III переходит в пик II, что может свидетельствовать о плавлении в его составе ДНК в состоянии топологической напряженности, которое чувствительно к действию нуклеазы [34, 38]. Учитывая эти данные, а также собственные результаты по взаимодействию ядер с антибиотиком дистамицином [44], интерпретация, предложенная в работе [38], представляется нам более предпочтительной.

Из рис. 3 отчетливо видно, что в низкой ионной силе при 5 мМ MgCl_2 имеет место практическое совмещение пиков I и II. Небольшой размер пика III, по-видимому, связан с недостаточным ингибированием нуклеаз в среде с ионами магния (несмотря на использование NEM) в процессе более длительного в нашем случае выделения ядер по сравнению с более коротким выделением с меньшей очисткой ядер или в присутствии ЭДТА [34, 35, 40]. Вследствие этого часть топологически напряженной ДНК обычно большого пика III переходит в пик II.

То же самое следует из анализа термограмм ядер, полученных без NEM — ингибитора сериновых протеаз, активирующих эндонуклеазы. По данным электрофореза выделенная в присутствии NEM ядерная ДНК имела длину около 20–50 т.п.н., а средняя длина ДНК в препаратах без NEM составляла примерно 1–3 т.п.н. (рис. 4).

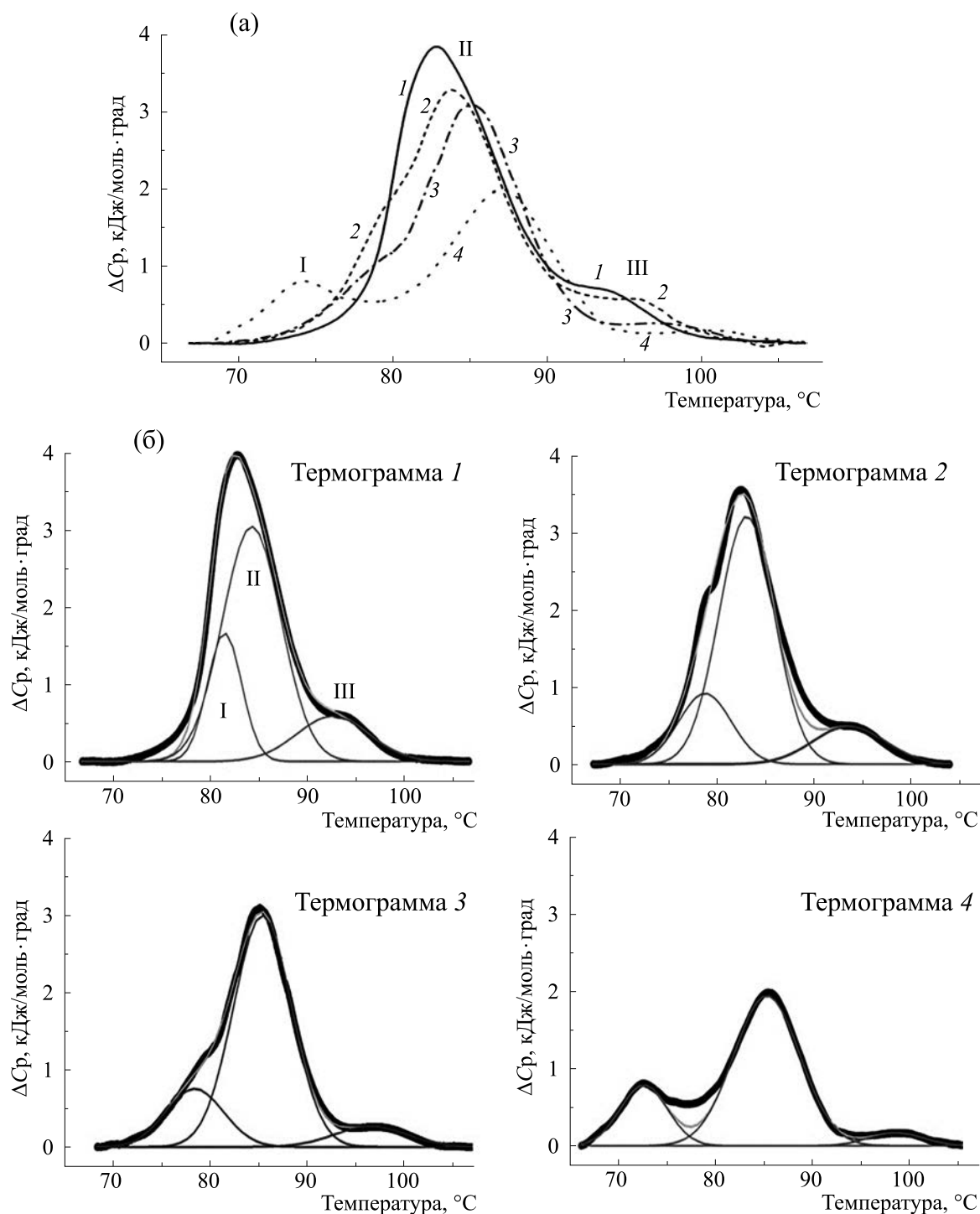


Рис. 3. Термограммы плавления ядер клеток печени крысы: (а) — в растворе 20 мМ ТЭА, рН 7.6, содержащем 5 мМ $MgCl_2$ (кривая 1); 1 мМ $MgCl_2$ (кривая 2); 0.1 мМ $MgCl_2$ (кривая 3) или 1 мМ ЭДТА (кривая 4); (б) — деконволюция тех же термограмм. Кривая, суммирующая компонентные кривые, накладывается на наблюдаемую кривую и почти не видна.

На термограммах этих ядер полностью отсутствовал пик III (рис. 5), пик II уменьшался и немного сдвигался в низкотемпературную область, по-видимому, из-за существенного снижения

молекулярной массы ДНК. Снижение полимерности ДНК сильно сказалось на пике I — он сместился на 7°C в низкотемпературную область в сравнении с контролем и проявился как отдель-

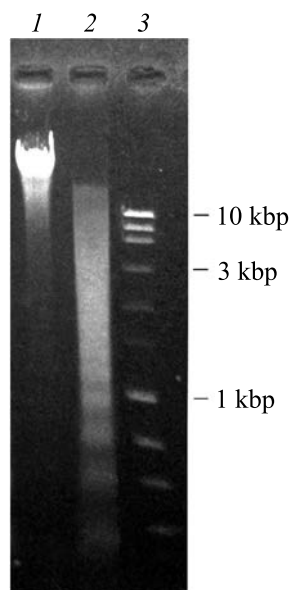


Рис. 4. Электрофорез в 1%-м агарозном геле ДНК из ядер клеток печени крысы в присутствии (дорожка 1) и в отсутствие (дорожка 2) NEM в буфере выделения; дорожка 3 — ДНК-маркеры.

ный пик. Отметим, что его $T_{пл}$ практически совпала с $T_{пл}$ пика I в ядрах с деконденсированным с помощью ЭДТА хроматином (см. рис. 3). Таким образом, можно заключить, что снижение молекулярной массы внутриядерной ДНК нивелирует стабилизирующее кор-гистоны действие ионов Mg^{2+} . Отсюда следует также, что стабилизация кор-гистонов связана с ДНК-гистоновыми взаимодействиями.

Термодинамические параметры кривых плавления на рис. 3 рассчитывали из термограмм по модель-независящей системе $\Delta H = \int C_p \cdot dT$, $\Delta S = \int (C_p/T) \cdot dT$, а изменение свободной энергии

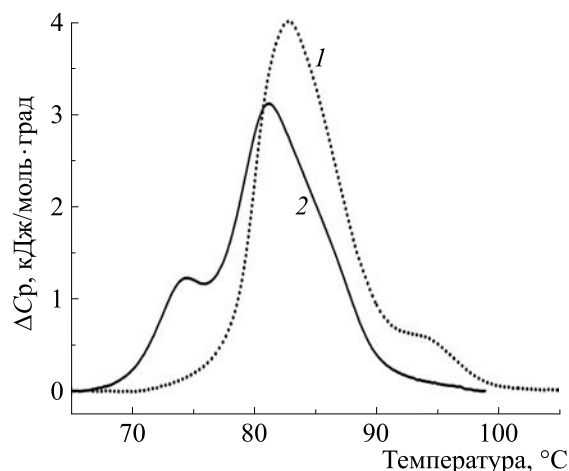


Рис. 5. Термограммы плавления ядер клеток печени крысы: кривая 1 — в 20 мМ ТЭА, pH 7.6 и 5 мМ $MgCl_2$, ядра выделены с NEM; кривая 2 — ядра в том же растворе, но выделены без NEM.

рассчитывали по формуле $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Суммарные величины этих параметров и значения ΔH и $T_{пл}$ для каждого пика в отдельности для разных концентраций ионов Mg^{2+} в буфере приведены в табл. 1. Из рис. 3 и табл. 1 видно, что $T_{пл}$ ДНК как релаксированной, так и напряженной, увеличиваются с уменьшением концентрации ионов Mg^{2+} в буфере, тогда как $T_{пл}$ белкового пика уменьшается. Максимальные изменения $T_{пл}$ составили для ДНК в пиках II и III — 2.6 и 7.6°C соответственно, тогда как $T_{пл}$ белка в диапазоне 5–0 мМ $MgCl_2$ снизилась на 7.3°C по сравнению с $T_{пл}$ пика 1 в ядрах при 5 мМ $MgCl_2$. Обращает на себя внимание разница во влиянии магния на плавление релаксированной и топологически напряженной ДНК. Для последней оно существен-

Таблица 1. Термодинамические параметры плавления ядер в растворе 20 мМ ТЭА, pH 7.6 с разным содержанием ионов магния и пиков плавления, полученные в результате деконволюции термограмм

	Суммарные параметры			ΔH			T_m		
	ΔH	ΔS	ΔG	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 1	Пик 2	Пик 3
5 мМ $MgCl_2$	36.6	99.8	6.9	7.4	23.1	5.5	81.5	84.3	92.6
1 мМ $MgCl_2$	35.0	95.4	6.6	6.2	22.9	4.5	80.3	84.6	95.1
0.1 мМ $MgCl_2$	30.3	82.6	5.7	5.5	22.3	2.5	78.4	85.4	96.5
1 мМ ЭДТА	24.2	66.0	4.5	4.8	16.5	1.2	74.2	86.9	100.2

Примечание. Показаны средние значения из двух-трех измерений с ошибкой, не превышающей 0.5°C для $T_{пл}$ и 5% для ΔH (кДж/моль нуклеотидов), ΔS (Дж/моль нуклеотидов·град) и ΔG (кДж/моль нуклеотидов).

но выше. Получается, что в связанных магнием хроматиновых фибриллах напряженная ДНК сильнее дестабилизируется. Повышенная $T_{пл}$ напряженной ДНК по сравнению с релаксированной может служить указанием на то, что напряженность ДНК в ядре определяется положительным торсиональным стрессом, связанным с вращением оси спирали ДНК влево, сжимающим комплементарные цепочки ДНК. В этом случае эффект магния, растягивающий комплементарные цепи ДНК (см. ниже), может сильнее влиять на нестабильное напряженное состояние ДНК, действуя аддитивно с силами, которые стремятся вернуть ДНК в стабильное состояние.

Из данных табл. 1 можно заключить, что индуцируемая понижением концентрации ионов Mg^{2+} декомпактизация ядерного хроматина сопровождается уменьшением суммарной энтальпии на ~ 12 кДж/моль нуклеотидов (сравни ядра в 5мМ $MgCl_2$ и ядра в ЭДТА). Этот вывод не совпадает со сделанным ранее заключением [40], что индуцируемый понижением ионной силы процесс декомпактизации хроматина атермичен и не изменяет ΔH плавления ядерного хроматина. Анализируя данные по плавлению отдельных пиков можно видеть, что наибольшие изменения энтальпии деконденсация вызывает в пике III. Его интенсивность падает почти в пять раз, тогда как наиболее представленный в термограмме пик релаксированной ДНК уменьшается всего лишь в полтора раза. Возможно, эти различия между пиками II и III при разворачивании хроматина и разбухании ядер вызваны потерей важных для стабилизации напряженного состояния ДНК контактов с матриксными структурами ядра. В результате ДНК релаксирует и плавится уже в пике II. При этом соотношения ΔH пика белка и двух пиков ДНК остаются практически неизменными.

Можно представить, что ионы Mg^{2+} взаимодействуют независимо с белком и ДНК хроматина, вызывая такие изменения в структуре каждого из них, из-за которых меняется их стабильность. Однако наблюдаемая отрицательная корреляция в термическом поведении пиков I и II не исключает и возможность модуляции магнием воздействия одного компонента нуклеосомы на стабильность другого, подобно тому, как это, например, происходит при изменении ионной силы [43] и, в частности, за счет изменения под действием магния ДНК-гистоновых взаимодействий.

О понижении $T_{пл}$ основного пика ДНК в ядрах в присутствии ионов Mg^{2+} сообщалось в работе

[45], где авторы плавляли ядра в присутствии ионов Mg^{2+} и этанола. Снижение $T_{пл}$ ДНК ядер в буфере с ионами Mg^{2+} можно заметить на экспериментальных кривых в работе [40]. Оно отмечено на термограммах плавления хроматина в работе [46], хотя сами авторы не обсуждают причины этого эффекта.

Известно, что щелочноземельный металл Mg относится к категории бивалентных металлов, взаимодействующих, главным образом, с фосфатами ДНК и нейтрализующих их [47]. Поэтому ионы Mg^{2+} в низких концентрациях обычно повышают $T_{пл}$ ДНК в растворе, хотя известны и другие противоположные эффекты, зависящие от концентрации как ДНК, так и Mg^{2+} [48, 49]. С другой стороны, известно, что двухвалентные катионы Mg^{2+} и Ca^{2+} в физиологической концентрации не конденсируют чистую ДНК в растворе [13], но могут конденсировать при достаточно больших концентрациях катионов в пленках [50] или в параллельных слоях в 2D-размерном пространстве [51].

Стабильность двухцепочечной ДНК определяется стэкинг-взаимодействиями оснований, их спариванием, свойствами гидратационной оболочки, а дестабилизирует ДНК отталкивание отрицательно заряженных фосфатов. Понижение $T_{пл}$ ДНК означает ослабление некоторых стабилизирующих ее внутрицепочечных взаимодействий и (или) возрастание сил дестабилизирующих.

Мы полагаем, что в ядре именно катион-индуцируемые межфибриллярные взаимодействия вносят основной вклад в дестабилизацию внутриядерной ДНК. Авторы работы [52] предложили электростатическую zipper-модель конденсации-агрегации одноименно заряженных полимеров. Суть ее для ДНК заключается в zipper-подобном выстраивании отрицательно заряженных фосфатов сахарно-фосфатного остова одной молекулы ДНК напротив положительно заряженных катионов, связанных в бороздках ДНК другой молекулы. С помощью предложенной спекулятивной модели авторы объяснили повышение температуры плавления в агрегатах гомологичной и пластичной ДНК в экспериментах по их термической денатурации [53] «идеализацией» структуры ДНК, хотя не исключили возможности, что в присутствии двухвалентных катионов электростатические силы и силы гидратации макромолекул способны индуцировать и пока необъясненный противоположный эффект. По мнению авторов, модель является универсальной и может быть

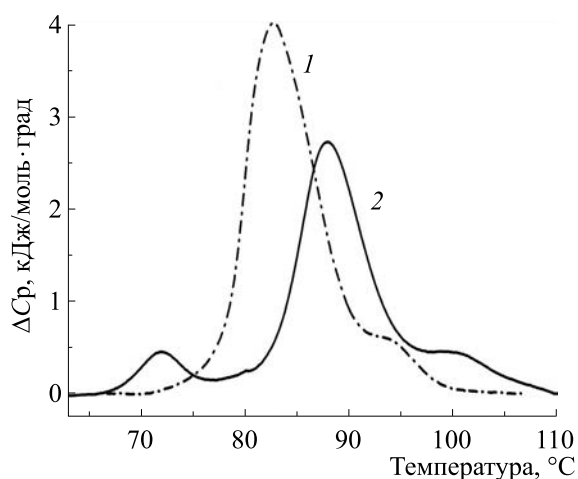


Рис. 6. Термограммы плавления ядер клеток печени крысы: кривая 1 — в 20 мМ ТЭА, pH 7.6 и 5 мМ $MgCl_2$; кривая 2 — перевод ядер из буфера с 5 мМ $MgCl_2$ (1) в буфер с 125 мМ NaCl.

применима как к ДНК, так и к компактизации фибрилл хроматина. Для хроматина по этой модели основной стабильности катион-индуцируемой ассоциации на определенных расстояниях может служить так называемая «структурная гомология» или «структурная комплементарность» фибрилл хроматина [54]. В рамках этой теории, учитывая современные данные о структуре фибрилл хроматина, объяснить снижение $T_{пл}$ в присутствии ионов Mg^{2+} не представляется возможным.

Поэтому наше объяснение сводится к следующему. Уже в нуклеосомах ДНК образует два параллельно расположенных супервитка ДНК, тесно сближенных за счет октамера гистонов, подобно расположению ДНК в пленках [50] или в параллельных слоях между положительно заряженными мембранами [51]. В ограниченном пространстве ядра при конденсации хроматина для достижения высокой плотности упаковки ДНК нуклеосомы вступают во взаимодействия «лицом к лицу» с поверхностями ДНК, увеличивая количество параллельных тесно сближенных супервитков ДНК [30]. В присутствии ионов магния электростатические силы притяжения между фибриллами формируют перпендикулярную оси ДНК силу растяжения между двумя комплементарными цепочками ДНК, ослабляя их взаимодействие. В работе [56] приводится оценка силы притяжения между молекулами ДНК в растворе на расстоянии 29 Å при концентрации магния ~100 мМ. Она составила примерно $-0.02 kT$ на пару оснований, что существенно меньше мини-

мальной энергии денатурации ДНК (примерно $-2 kT$). Видно, что сила притяжения очень слабая, однако в случае хроматина в условиях ядра она может возрасти за счет специфических особенностей катионов магния: их малый размер, жесткая координация и направленность связей, способность создавать прямые связи между фосфатами соседних фибрилл способствуют возникновению жесткой связи каждой из комплементарных цепочек ДНК с соседней молекулой ДНК. Малая растворимость солей фосфатов, образующихся при прямом взаимодействии с магнием по сравнению с гидратированным магнием и их энергетическая выгодность [56] увеличивают силу притяжения между фибриллами, способствуя дополнительному растяжению комплементарных цепей. Эффект растяжения может усиливаться также взаимодействием гистонов и других белков с одной из комплементарных цепочек ДНК. Тем не менее, общий вклад силы притяжения между молекулами в стабильность ДНК, по-видимому, остается небольшим, о чем свидетельствует незначительное снижение $T_{пл}$.

Особая роль магния подтверждается термическим поведением ядерного хроматина при физиологической ионной силе в отсутствии ионов Mg^{2+} (рис. 6). Известно, что ионы натрия конкурируют с ионами магния, вытесняя последние, и в физиологической концентрации сохраняют определенную степень компактизации хроматина (до уровня 30 нм фибрилл). Если ядра, выделенные в присутствии магния, перевести в раствор 20 мМ ТЭА и 125 мМ NaCl, то $T_{пл}$ ядерной ДНК становится выше, чем в растворе с магнием. Опять же, больше возрастает $T_{пл}$ топологически напряженной ДНК. При этом физиологическая ионная сила подавляет взаимодействие гистонов с ДНК, и пик гистонов резко теряет свою стабильность, что выражается в значительном снижении $T_{пл}$ и энтальпии плавления.

Следует заметить, что в литературе рассматриваются и другие механизмы понижения $T_{пл}$ ДНК в присутствии ионов Mg^{2+} . Это, прежде всего, возможное взаимодействие Mg^{2+} с остатками гуанина [48, 49], а также его пи-взаимодействия с основаниями [57]. Понижение $T_{пл}$ в присутствии лиганда также обычно наблюдают, когда константа взаимодействия с денатурированной формой макромолекулы превышает ее значение для нативной. Однако установлено, что в случае ионов магния константа связывания с ДНК в нативном состоянии выше, чем с ДНК в денатурированном состоянии [58].

Интересная информация была получена нами при повышенных концентрациях магния (>5 мМ)

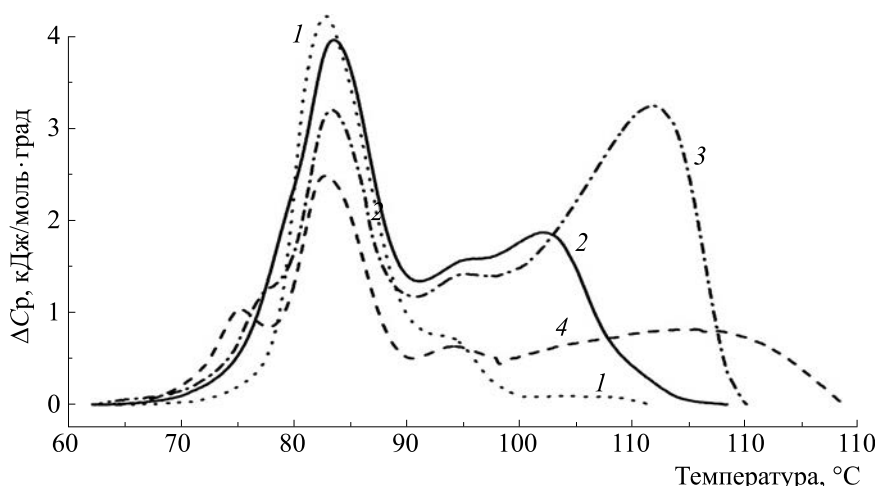


Рис. 7. Изменение термограмм плавления ядер клеток печени крысы в буфере 20 мМ ТЭА, рН 7.6 при увеличении концентрации $MgCl_2$: кривая 1 – 5 мМ, кривая 2 – 10 мМ, кривая 3 – 20 мМ, кривая 4 – 40 мМ.

и нагревании компактных ядер до температуры $130^{\circ}C$.

На термограмме (рис. 7) обнаруживался новый высокотемпературный пик с $T_{пл}$ больше $100^{\circ}C$. Ранее было показано образование агрегатов денатурированной ДНК в присутствии магния в процессе денатурации, но разваливающихся при достижении $T_{пл}$ или насыщающей концентрации магния [59, 60]. Возможно и в нашем случае, что это стабилизированная магнием денатурированная ДНК в составе хроматина, образующая специфические агрегаты с более высокой $T_{пл}$, подобно описанным ранее при плавлении ДНК в присутствии физиологической концентрации натрия и высокой концентрации магния [49]. Однако плавление этих агрегатов происходило до $100^{\circ}C$. В то же время появление этого пика коррелировало с уменьшением интенсивности пика II, что может служить указанием на их взаимосвязь. Таким образом, не исключено, что это – преобразовавшаяся при комнатной температуре некая компактная конденсированная форма хроматина, возможно, ассоциированная и с денатурированной ДНК, которая кооперативно и с большей энтальпией плавится при значительно более высоких температурах. Ее разрушение при дальнейшем увеличении концентрации магния и, соответственно, ионной силы свидетельствует об участии белка в формировании этой структуры путем электростатического взаимодействия между белком и ДНК. Работы в этом направлении продолжаются.

Таким образом, в данной работе с помощью метода ДСК, позволяющего работать с мутными суспензиями ядер, получены термодинамические данные по плавлению внутриядерного хроматина

в присутствии ионов магния. Их анализ позволил предположить, что ионы магния в относительно малых концентрациях в условиях ограниченного пространства и высокой плотности внутриядерного хроматина способны вызывать такие изменения в балансе сил взаимодействия между соседними молекулами ДНК и межцепочечными силами внутри ДНК, которые вызывают ее дестабилизацию и снижение $T_{пл}$. При этом стабилизация октамера гистонов в присутствии магния связана с полимерным состоянием ДНК. Повышенные концентрации магния в условиях кроудинга в ядре, возможно, приводят к формированию особо стабильных конденсатов нуклеопротеидов, плавящихся с увеличенной энтальпией и $T_{пл}$. Из наших результатов можно также заключить, что магний, понижая $T_{пл}$ и ослабляя взаимодействие двух цепочек ДНК, способствует действию ферментов типа полимераз. Известно, что полимеразы создают впереди себя положительное напряжение (торсиональный стресс) в ДНК, препятствующее их движению. Магний, оказывая свое действие на напряженную ДНК сильнее, чем на релаксированную, тем более способствует продвижению полимеразы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Н. Орлову и В.Н. Мичуриной за помощь в экспериментах с применением ДСК.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов отсутствует конфликт интересов в финансовой и в какой-либо иной сфере.

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. E. I. Prieto and K. Maeshima, *Essays Biochem.*, **63** (1), 133 (2019).
2. J. R. Daban, *Biochemistry*, **39**, 3861 (2000).
3. G. Li and D. Reinberg, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 175 (2011).
4. J. C. Hansen, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **31**, 361 (2002).
5. В. Ю. Поляков, О. В. Зацепина, И. И. Киреев и др., *Биохимия*, **71**, 6 (2006).
6. Z. Zhou, R. Yan, W. Jiang, and J. M. K. Irudayaraj, *Nanoscale Adv.*, **3** (4), 1019 (2021).
7. M. Tark-Dame, R. van Driel, and D. W. Heermann, *J. Cell Sci.*, **124** (6), 839 (2011).
8. K. Maeshima, S. Tamura, J. C. Hansen, and Y. Itoh, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **64**, 77 (2020).
9. M. Egli, *Chem. Biol.*, **9**, 277 (2002).
10. A. A. Kornyshev, D. J. Lee, S. Leikin, and A. Wynveen, *Rev. Mod. Phys.*, **79**, 943 (2007).
11. A. G. Cherstvy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 9942 (2011).
12. Z. J. Tan and S. J. Chen, *Biophys. J.*, **91** (2), 518 (2006).
13. V. A. Bloomfield, *Biopolymers*, **44** (3), 269 (1997).
14. P. M. Schwarz, A. Felthaus, T. M. Fletcher, and J. C. Hansen, *Biochemistry*, **35** (13), 4009-1996).
15. M. de Frutos, E. Raspaud, A. Leforestier, and F. Livolant, *Biophys. J.*, **81** (2), 1127 (2001).
16. C. A. Davey, and T. J. Richmond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (17), 11169 (2002).
17. A. Bertin, S. Mangenot, M. Renouard, et al., *Biophys. J.*, **93**, 3652 (2007).
18. N. Korolev, A. Allahverdi, Ye. Yang, et al., *Biophys. J.*, **99**, 1896 (2010).
19. A. Zinchenko, N. V. Berezhnoy, S. Wang, et al., *Nucl. Acids Res.*, **46**, 635 (2018).
20. M. Krafcikova, S. Dzatko, C. Caron, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **141** (34), 13281 (2019).
21. J. Ellenberg, A. Walter, C. Chapuis, and S. Huetol, *J. Struct. Biol.*, **184** (3), 445 (2013).
22. P. J. Giannasca, R. A. Horowitz, and C. L. Woodcock, *J. Cell Sci.*, **105** (2), 551 (1993).
23. T. Ohyama, *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (17), 4232 (2019).
24. M. A. Billett and T. J. Hall, *Nucl. Acids Res.*, **6** (8), 2929 (1979).
25. Y. Shimamoto, S. Tamura, H. Masumoto, and K. Maeshima, *Mol. Biol. Cell*, **28** (11), 1580 (2017).
26. S. Schnell and R. Hancock, *Methods Mol. Biol.*, **463**, 3 (2008).
27. R. Hancock, *Biochemistry (Mosc.)*, **83** (4), 326 (2018).
28. R. Strick, P. L. Strissel, K. Gavrilov, and R. Levi-Setti, *J. Cell Biol.*, **155** (6), 899 (2001).
29. N. Korolev, O. V. Vorontsova, and L. Nordenskiöld, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **95**, 23 (2007).
30. S. E. Farr, E. J. Woods, J. A. Joseph, et al., *Nat. Commun.*, **12** (1), 2883 (2021).
31. А. Н. Прусов, Т. А. Смирнова и Г. Я. Коломийцева, *Биохимия*, **80** (3), 427 (2015).
32. А. С. Спирин, *Биохимия*, **23**, 656 (1976).
33. A. Prado, C. Puyo, J. Arlucea, et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **177** (1), 9 (1996).
34. N. A. Touchette and R. D. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2642 (1985).
35. C. Balbi, M. L. Abelson, L. Gogioso, S. Parodi, et al., *Biochemistry*, **28**, 3220 (1989).
36. C. Nicolini, A. Diaspro, L. Vergani, and G. Cittadini, *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 137 (1988).
37. M. Almagor and R. D. Cole, *Biochemistry*, **28**, 5688 (1989).
38. N. A. Touchette and R. D. Cole, *Biochemistry*, **31**, 1842 (1992).
39. A. N. Prusov, G. Ya. Kolomijtseva, and T. A. Smirnova, *Pharmaceut. Biol.*, **55**, 687 (2017).
40. B. Cavazza, G. Brizzolara, G. Lazzarini, et al., *Biochemistry*, **30** (37), 9060 (1991).
41. C. Balbi, P. Sanna, P. Barboro, et al., *Biophys. J.*, **77** (5), 2725, (1999).
42. S. Noriega, G. Budhiraja, and A. Subramanian, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44** (8), 1331 (2012).
43. M. Almagor and R. D. Cole, *J. Biol. Chem.*, **264**, 6515 (1989).
44. А. Н. Прусов, Т. А. Смирнова и Г. Я. Коломийцева, *Биохимия*, **83** (10), 1534 (2018).
45. Z. Darzynkiewicz, F. Traganos, T. Sharpless, and M. R. Melamed, *J. Cell Biol.*, **68** (1), 1 (1976).
46. X. Ni and R. D. Cole, *Biochemistry*, **33** (31), 9276 (1994).
47. I. Sissoëff, J. Grisvard, and E. Guillé, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **31** (2), 165 (1976).
48. Y. P. Blagoi, V. A. Sorokin, V. A. Valeev, et al., *Biopolymers*, **17** (5), 1103 (1978).
49. А. П. Власов, Л. И. Яхонтова и В. Т. Андрианов, *Биофизика*, **36** (3), 437 (1991).
50. K. Serec, S. D. Babic, R. Podgornik and S. Tomic, *Nucl. Acids Res.*, **44**, 178456 (2016).
51. I. Koltover, K. Wagner, and C. R. Safinya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (26), 14046 (2000).
52. A. A. Kornyshev and S. Leikin, *J. Chem. Phys.*, **107**, 3656 (1997).
53. A. G. Cherstvy and A. A. Kornyshev, *J. Phys. Chem.*, **109** (26), 13024 (2005).
54. A. G. Cherstvy and V. B. Teif, *J. Biol. Phys.*, **39** (3), 363 (2013).
55. Zh.-L. Zhang, Y. Y. Wu, K. Xi, et al., *Biophys. J.*, **113**, 517 (2017).
56. G. R. Clark, C. J. Squire, L. J. Baker, et al., *Nucl. Acids Res.*, **28** (5), 1259 (2000).
57. L. McFail-Isom, X. Shui, and L. Williams, *Biochemistry*, **37** (49), 17105 (1998).
58. J. E. Morgan, J. W. Blankenship, and H. R. Matthews, *Arch. Biochem. Biophys.*, **246** (1), 225 (1986).
59. G. S. Ott, R. Ziegler, and W. R. Bauer, *Biochemistry*, **14** (15), 3431 (1975).
60. J. G. Duguid, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, and G. J. Thomas, Jr., *Biophys. J.*, **69** (6), 2623 (1995).

Melting Calorimetry of Rat Liver Nuclei in the Presence of Magnesium Ions**G.Ya. Kolomijtseva*, A.N. Prusov*, E.A. Kolomijtseva**, and T.A. Smirnova*, *****

**Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory, 1/40, Moscow, 119992 Russia*

***MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia*

****All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya ul. 42, Moscow, 127550, Russia*

Differential scanning calorimetry was used to determine thermodynamic parameters of decondensation of intranuclear rat liver chromatin was induced by a decrease in the concentration of magnesium ions from 5 mM to 0 mM. The process of chromatin melting in the temperature range of 70–100°C occurs in the following order: melting of core-histones, melting of relaxed DNA, and melting of topologically constrained DNA. It was found that T_m and ΔH of individual peaks also depend on the concentration of Mg^{2+} ions in the buffer. In nuclei with condensed chromatin, Mg^{2+} ions at a concentration of 5 mM increased significantly the T_m of core histones (by $\sim 7^\circ\text{C}$), as compared to that in unfolded chromatin but at the same time lowered the T_m of nuclear DNA both in the relaxed and constrained state (by $\sim 2.5^\circ\text{C}$ and $\sim 7.5^\circ\text{C}$, respectively). In the presence of Mg^{2+} ions, melting enthalpy for peaks increased significantly. At the same time, a decrease in molecular weights of intranuclear DNA levels out a stabilizing effect of Mg^{2+} ions on core histones. A rise in the concentration of Mg^{2+} ions above 5 mM leads to the appearance of a new peak with T_m above 100°C, which probably reflects the thermal behavior of some Mg-induced aggregates. Possible mechanisms underlying thermal behavior of chromatin inside the nucleus are discussed.

Keywords: nucleus, chromatin, Mg^{2+} cations, differential scanning calorimetry, thermodynamics, DNA torsional stress

ЗАМОРАЖИВАЮЩИЙ РАСТВОР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АГАРА ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО КРИОСОХРАНЕНИЯ СРЕЗОВ МОЗГА НЕГИБЕРНИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ

© 2023 г. А.А. Мокрушин*,#

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

#E-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 13.12.2021 г.

После доработки 13.12.2021 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Ранее нами было обнаружено, что функционирование глутаматергических ионотропных механизмов АМПА (α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты) и НМДА (N-метил-D-аспартата) нарушались после длительного криосохранения срезов головного мозга крыс при –10°С в течение 30–50 сут. Для выяснения причин криоповреждения АМПА- и НМДА-зависимых механизмов мы исследовали криосохранение срезов обонятельной коры мозга крыс в растворах, состоящих из искусственной цереброспинальной жидкости и агара в различных концентрациях (33, 44 и 50%). После криосохранения срезы отогревались до 37°С и в них были проанализированы изменения амплитуд АМПА- и НМДА-потенциалов, которые отражают активности АМПА- и НМДА-механизмов, по сравнению с значениями до криосохранения. Обнаружено, что АМПА- и НМДА-потенциалы изменялись различно в зависимости от концентрации агара в искусственной цереброспинальной жидкости. В растворах, содержащих 33% агара, амплитуда АМПА-потенциалов увеличивалась на 60%, напротив, амплитуда НМДА-потенциалов была равна значениям до криосохранения. При концентрации агара 44% в растворе наблюдалось увеличение амплитуд АМПА и НМДА на 70 и 80% соответственно. Полное восстановление активностей АМПА- и НМДА-механизмов удалось получить после криосохранения в замораживающем растворе с концентрацией агара 50%. При этих условиях амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов соответствовали их значениям до криосохранения. Таким образом, полученные результаты показывают, что агар, добавленный в раствор искусственной цереброспинальной жидкости, является криопротектором, защищающий АМПА- и НМДА-зависимые механизмы от криоповреждений. Разработанный нами замораживающий раствор (искусственная цереброспинальная жидкость и агар) для криосохранения эксплантатов мозга негиббернирующих животных будет использован для создания криобанка нервной ткани.

Ключевые слова: срезы мозга крыс, криосохранение, агар, АМПА-зависимые механизмы, НМДА-зависимые механизмы, замораживание/отогревание.

DOI: 10.31857/S0006302923020151, EDN: CCKFGL

Известны протективные эффекты влияния низкой температуры на биологические объекты, и их криосохранение широко используется в биомедицине, в том числе в регенеративной медицине, трансплантации органов и разработке лекарств [1, 2]. В настоящее время доминирующим направлением криосохранения нервной ткани является низкотемпературное хранение первичной культуры нейронов [3, 4]. Однако в таких структурах отсутствуют синапсы, то есть нейронная сеть не сформирована. Очевидно, такие ней-

роны будут иметь ограниченное клиническое использование только для восстановления небольших структур мозга при трансплантации. В клинике для восстановления больших участков ткани головного мозга реципиента необходимо задействовать нервную ткань соответствующих структур мозга. Именно эти эксплантаты головного мозга необходимы для трансплантации при таких невропатологиях, как инсульт, эпилепсия и травма. Результаты исследований показали, что криосохраняемые эксплантаты мозга как целостная структура демонстрируют свойства, сравнимые с теми же тканями, полученными от донора [5–8]. Очевидно, что срезы головного мозга являются оптимальными экспериментальными объектами для разработки протоколов криосохране-

Сокращения: АМПА – α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота; НМДА – N-метил-D-аспартат; ИЦЖ – искусственная цереброспинальная жидкость.

ния нервной ткани и последующего их применения в клинике. Их использование позволяет исследовать восстановление активности не только нейронов, но и ключевых синаптических механизмов.

В наших исследованиях была выявлена различная устойчивость глутаматергических ионотропных α -амино-3-гидроксиз-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (АМПА) и *N*-метил-D-аспартата (НМДА) рецептор-зависимых механизмов к замораживанию/повторному отогреванию срезов головного мозга при криосохранении (-10°C , 52 сут). Активности АМПА-механизмов не только сохранялись, но и увеличивались. Напротив, процессы НМДА-механизмов необратимо ингибировались, что указывает о нарушении их функции [9, 10]. Эти результаты важны, потому что НМДА-механизмы являются ключевыми в системе глутаматергической медиаторной системы мозга. Они являются адаптивными механизмами в головном мозге, участвуют в обучении, формировании следов памяти, а также в развитии различных нейропатологий [11, 12].

Таким образом, изучение особенностей криоповреждения АМПА- и НМДА-механизмов имеет исключительное значение для поддержания активности этих механизмов при криосохранении и создании криобанка трансплантатов. Возникает вопрос, каким образом сохранить активность АМПА и НМДА механизмов в ткани мозга в процессе длительного криосохранения?

Можно предположить, что криопротекторы могут быть использованы для устранения криоповреждений АМПА- и НМДА-механизмов. Однако, как показали результаты исследований, они оказывают выраженное негативное воздействие на нейроны и блокируют синаптические механизмы, поэтому их применение нецелесообразно [13].

Перспективный подход к устранению криоповреждений АМПА- и НМДА-механизмов – использование специальных замораживающих сред (Neurofreezing, CryoStor10 (CS10), Hibernat-A, Hibernat-E, HypoThermosol и др.). Действительно, недавние исследования показали улучшение криосохранения первичных нейронов за счет использования разработанных замораживающих сред. Однако жизнеспособность криосохраненных нейронных культур уменьшалась по сравнению с интактными нейронами, что указывает на снижение эффективности этих растворов [3, 4, 14].

Другим возможным способом сохранения активности АМПА- и НМДА-механизмов может быть использование альгинатных гидрогелей. Они успешно используются в качестве основы для создания криозащитной среды [15]. Для криосохранения клеток при использовании раз-

личных гелей продемонстрировано улучшение выживаемости и сохранение нормальных функций клеток [16, 17]. Однако существенным недостатком таких растворов является присутствие в их составе двухвалентных катионов Ba^{2+} и Sr^{2+} . Эти компоненты блокируют синаптическую активность в донорской ткани и не подходят для криосохранения эксплантатов мозга. Кроме того, использование таких растворов связано с добавлением криопротекторов, которые необратимо нарушают функции нейронов и синапсов, и, как следствие, такие эксплантаты мозга не подходят в качестве донорского материала.

Для успешного криосохранения активностей АМПА- и НМДА-механизмов в настоящем исследовании были изучены протективные эффекты криосохранения срезов обонятельной коры крыс с использованием замораживающих растворов с добавлением агара в различных концентрациях. Известно, что агар как природный полимер используется в биологии и медицине благодаря его биосовместимости и биоразлагаемости. Использование растворов на основе агара для криосохранения нервной ткани срезов представляется весьма перспективным, поскольку он обладает рядом уникальных свойств, связанных с гелеобразованием. Мы полагаем, что такие свойства агара будут способствовать сохранению активности АМПА- и НМДА-механизмов при длительном криосохранении.

Таким образом, цель нашего исследования – разработать способ получения замораживающего раствора с агаром и исследовать его протективные свойства для сохранения активности глутаматергических ионотропных АМПА- и НМДА-зависимых механизмов при длительном криосохранении срезов мозга негипернотизирующих животных – крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г (всего 29 животных). Все эксперименты были проведены на крысах из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России.

Из мозга крыс с помощью специальных инструментов изготавливали тангенциальные срезы обонятельной коры толщиной 400–500 мкм [18]. Приготовление срезов, их инкубация, состав искусственной цереброспинальной жидкости (ИЦЖ), внеклеточная регистрация АМПА- и НМДА-потенциалов в электрофизиологической установке [9] подробно описаны в предыдущей работе [19].

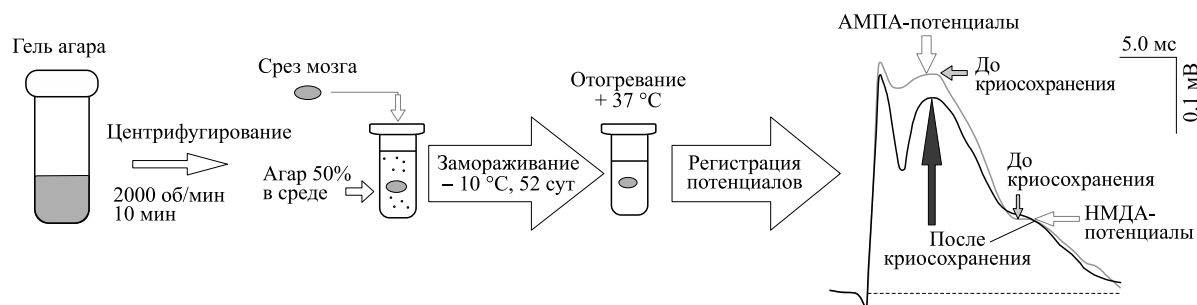


Рис. 1. Схема протокола приготовления замораживающей среды с легкой фракцией агара и регистрация АМПА- и НМДА-потенциалов после криосохранения.

В настоящей работе были исследованы протективные эффекты криосохранения срезов обонятельной коры в замораживающем растворе, состоящем из ИЦЖ и агара в различных концентрациях. Замораживающий раствор для криосохранения срезов готовили в следующей последовательности (рис. 1). Агар Difco Bactor (Difco, США) в количестве 3 г заливали 100 мл 1 М раствора NaCl и выдерживали 10 сут в термостате при 32–35°C. Полученный гелевый раствор центрифугировали на лабораторной центрифуге ЦЛМН-Р10-01 («Электрон», Россия) при скорости 2000 об/мин в течение 10 мин. Легкую фракцию отсасывали из раствора и использовали для приготовления среды для криосохранения срезов. Тяжелую фракцию агара не использовали.

Далее были приготовлены замораживающие растворы для криосохранения срезов следующего состава: 1) 0.5 мл легкой фракции агара и 1.0 мл ИЦЖ (конечная концентрация агара 33%); 2) 0.8 мл легкой фракции агара и 1.0 мл ИЦЖ (конечная концентрация агара 44%); 3) 1.0 мл легкой фракции агара и 1.0 мл ИЦЖ (конечная концентрация агара 50%). Срезы головного мозга помещали в стеклянные флаконы с этими средами. Затем флаконы со срезами постепенно медленно (со скоростью 0.1°C/мин) замораживали до –10°C при в морозильной камере с термостатом ThermoStat plus (Eppendorf, Германия). Через 52 сут флаконы со срезами отогревали до 37°C со скоростью 0.1°C/мин.

Для тестирования жизнеспособности срезов использовали метод оценки электрической активности АМПА- и НМДА-механизмов по значениям амплитуд АМПА- и НМДА-потенциалов. Для этого срезы по одному извлекали из флаконов и помещали в регистрационную камеру электрофизиологической установки для регистрации АМПА- и НМДА-потенциалов [9]. В течение 15 мин срезы перфузировали ИЦЖ без агара. В срезах регистрировали АМПА- и НМДА-потенциалы, значения их амплитуды считали контрольными и принимались за 100%. За это время срезы полностью отмывались от агара. Каждый

срез сначала оценивали визуально с помощью бинокулярного микроскопа МБС–9 («ЛОМО», Россия). Отсутствие разрушения в структурах срезов оценивали как их хорошее состояние. Основным критерием оптимального криосохранения срезов было наличие АМПА- и НМДА-потенциалов, равных по амплитуде потенциалам до криосохранения.

В данном исследовании криопротекторы не использовали, так как они необратимо блокируют активность нейронов и синапсов [13], в том числе активности АМПА- и НМДА-механизмов.

Химические реактивы, использованные для получения замораживающих растворов, были приобретены в фирмах «Химреактив» (Россия) и Difco (США).

Для статистической обработки данных применяли непараметрический *U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Числовые данные были выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Уровень статистической значимости был выбран на уровне $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные по криосохранению активности АМПА- и НМДА-механизмов в замораживающем растворе с различной концентрацией агара приведены на рис. 2–4. Представлены протективные эффекты в диапазонах концентраций агара на криосохранение срезов: 33% (10–35%), 44% (37–46%) и 50% (48–55%). Было обнаружено, что активности АМПА- и НМДА-механизмов сохранялись на 100% после криосохранения срезов в течение 52 сут при –10°C в замораживающем растворе, состоящем из агара и ИЦЖ. Во-вторых, было обнаружено, что степень восстановления активности АМПА- и НМДА-механизмов после криосохранения зависела от концентрации агара в замораживающем растворе. Эти данные показали, что добавление агара в замораживающий раствор вызывает протективный эффект при криосохранении срезов мозга.

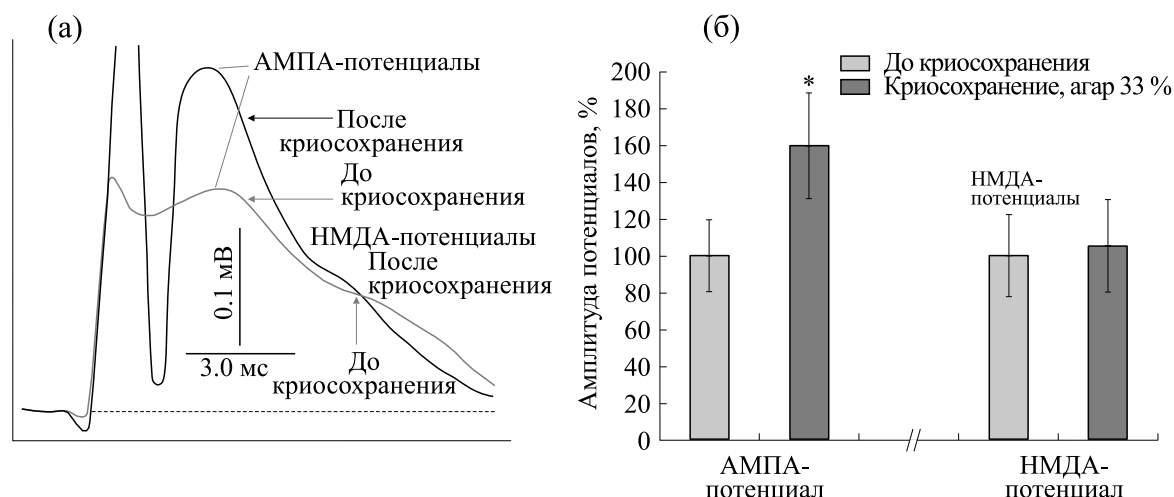


Рис. 2. Изменения АМПА- и НМДА-потенциалов, регистрируемых в срезах мозга до и после криосохранения (-10°C , 52 сут) в замораживающем растворе с агаром в концентрации 33%. Горизонтальная пунктирная линия на рис. 2а — уровень потенциалов, записанный в срезах без стимуляции. Регистрацию проводили при отогревании срезов до 37°C . Калибровка на рис. (а): 3.0 мс, 0.1 мВ. По оси ординат на рис. (б) — амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов при отогревании в % к значениям до криосохранения (контроль — 100%, $n = 7$). * — Различия данных с $p \leq 0.05$ по U -критерию Вилкоксона—Манна—Уитни по отношению к значениям до криосохранения (контроль).

Далее были проанализированы протективные эффекты агара при криосохранении срезов в замораживающем растворе с различными концентрациями агара. При концентрации агара 33% обнаружено, что при повторном нагревании амплитуда АМПА-потенциалов увеличивалась (рис. 2а). Амплитуда суммарного потенциала действующих волокон латерального обонятельного тракта также возрастала. В отличие от амплитуд АМПА-потенциалов амплитуда НМДА-потенциалов полностью восстанавливалась после криосохранения при концентрации агара 33% в замораживающем растворе (рис. 2а).

Из рис. 2 видно, что после криосохранения в замораживающем растворе с концентрацией агара 33% амплитуда АМПА-потенциалов увеличилась в среднем на $59 \pm 7\%$ ($n = 7$; $p \leq 0.05$, $U = 5$) по сравнению с амплитудой АМПА-потенциалов в контроле (до криосохранения). Это указывает на гиперактивацию АМПА-механизмов после криосохранения (рис. 2б).

Амплитуда НМДА-потенциалов при концентрации агара 33% в замораживающей среде после криосохранения статистически не отличалась от значений до криосохранения и составляла по отношению к контролю (до криосохранения, 37°C) $105 \pm 7\%$ ($n = 7$, $p \leq 0.05$, $U = 4$) (рис. 2б). Однако снижение НМДА-потенциала происходило быстрее, чем до криосохранения (рис. 2а). Это указывает на то, что продолжительность восстановления НМДА-механизмов снижалась. Таким образом, криосохранение срезов в замораживающем растворе с 33%-м агаром разнонаправлено воздействует на АМПА- и НМДА-зависимые ме-

ханизмы: АМПА-механизмы гиперактивируются, тогда как НМДА-механизмы восстанавливаются. На основании полученных данных можно утверждать, что агар в концентрации 33% не является оптимальным для сохранения активности АМПА и НМДА механизмов в процессе длительного криосохранения.

При увеличении концентрации агара в замораживающем растворе до 44% амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов значительно возрастали (рис. 3а). Отметим, что и амплитуда пресинаптического компонента потенциала действия проводящих волокон латерального обонятельного тракта также увеличивалась (рис. 3а).

Анализ изменений АМПА- и НМДА-потенциалов выявил их статистически значимое увеличение на $74 \pm 8\%$ и $87 \pm 9\%$ соответственно ($n = 7$, $p \leq 0.05$, $U = 5$) (рис. 3б). Эти данные указывают на гиперактивацию АМПА- и НМДА-механизмов.

Следовательно, замораживающий раствор с концентрацией агара 44% также не является оптимальным для длительного криосохранения срезов мозга.

Далее концентрация агара в замораживающем растворе была увеличена до 50%. При криосохранении срезов в этих условиях амплитуда АМПА-потенциалов восстанавливалась, но степень восстановления была меньше, чем до криосохранения (рис. 4а). Следует отметить, что амплитуда НМДА-потенциалов после криосохранения при концентрации агара 50% была равна значениям до криосохранения. Амплитуда потенциала действия проводящих волокон латерального обоня-

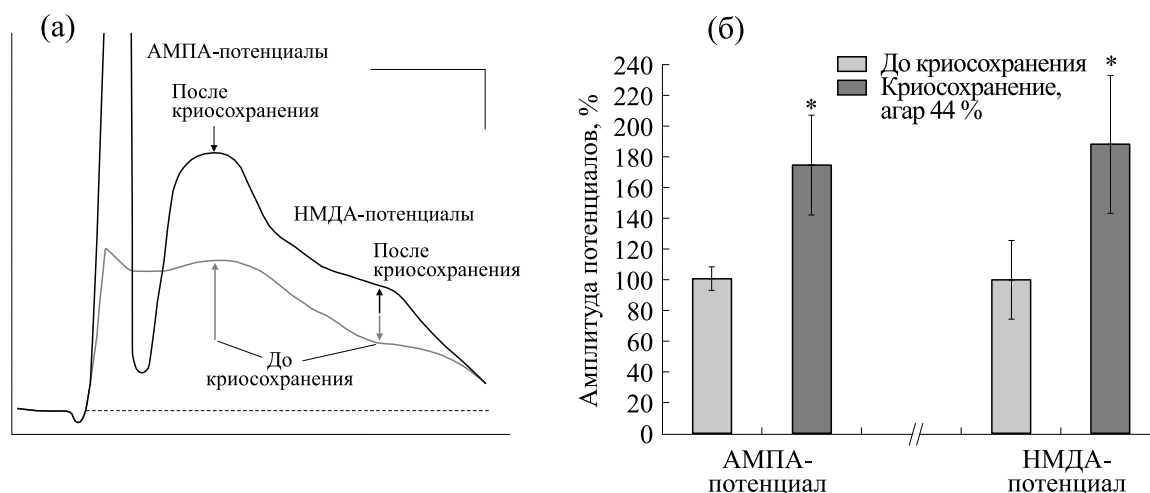


Рис. 3. Изменения АМПА- и НМДА-потенциалов, регистрируемых в срезах мозга до и после криосохранения (-10°C , 52 сут) в замораживающем растворе с агаром в концентрации 44% (а, б). Обозначения те же, что на рис. 2.

тельного тракта также восстанавливалась до исходных значений (рис. 4а).

Анализ суммарных изменений АМПА- и НМДА-потенциалов выявил восстановление активностей этих механизмов: АМПА в контроле (до криосохранения, 37°C) — 100%, после криосохранения — $88 \pm 6\%$ ($p \geq 0.05$, $U = 10$, $n = 7$), т.е. различия статистически недостоверны (рис. 4б). Важно отметить, что амплитуда НМДА-потенциалов после отогревания при концентрации агара 50% была равна значениям до криосохранения: контроль (до криосохранения, 37°C) — 100%, после криосохранения — $97 \pm 9\%$ ($p \geq 0.05$, $U = 12$, $n = 7$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что криосохранение срезов в замораживающем растворе с концентрацией ага-

ра 50% способствует полному сохранению активности как АМПА-, так и НМДА-механизмов. Следовательно, концентрация агара в замораживающем растворе, равная 50%, не вызывает повреждений обоих глутаматергических ионотропных механизмов, выявляемых электрофизиологическим тестированием, и является оптимальной для их длительного криосохранения.

На основании полученных данных были вычислены концентрационные зависимости протективных эффектов агара в замораживающем растворе на изменения амплитуд АМПА и НМДА потенциалов после длительного криосохранения (-10°C , 52 сут) (рис. 5). При сопоставлении данных при разных концентрациях агара с данными при отсутствии агара отчетливо видно многократное усиление протективного эффекта агара в за-

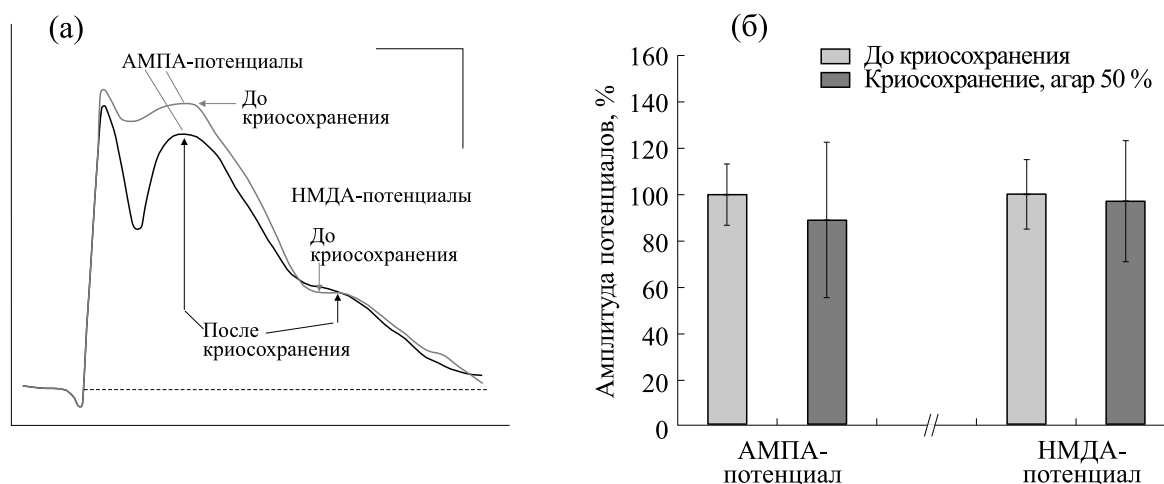


Рис. 4. Изменения АМПА- и НМДА-потенциалов, регистрируемых в срезах мозга до и после криосохранения (-10°C , 52 сут) в замораживающем растворе с агаром в концентрации 50% (а, б). Обозначения те же, что на рис. 2.

мораживающем растворе (рис. 5, стрелки). При этом для АМПА-потенциалов наблюдается снижение гиперактивации. Так, при 0% агара в растворе амплитуда АМПА-потенциалов составляет $480 \pm 22\%$ ($n = 12$), а при 33% агара — $160 \pm 15\%$ ($p \leq 0.05$, U -критерий, $n = 7$). В отличие от АМПА-механизмов, криосохранение с агаром для НМДА-механизмов индуцировало восстановление активности: при 0% агара в растворе амплитуда НМДА-потенциалов составляет $10 \pm 3\%$ ($n = 12$), тогда как при 33% агара — $98 \pm 16\%$ ($p \geq 0.05$, U -критерий, $n = 7$).

Протективные эффекты агара для АМПА- и НМДА-механизмов в диапазоне концентраций 33–50% носят немонокотный куполообразный вид с максимальными значениями при содержании агара 44%. Для АМПА-кривой это возрастание достоверно не отличалось: при концентрации агара 33% — $160 \pm 15\%$, при 44% агара — $170 \pm 18\%$ ($p \geq 0.05$, U -критерий, $n = 7$). При увеличении концентрации агара до 50% амплитуды АМПА-потенциалов снижались до $95 \pm 15\%$ и были близки к значениям до криосохранения — $100 \pm 12\%$ ($p \geq 0.05$, U -критерий, $n = 7$) (рис. 5).

Для НМДА-кривой возрастание амплитуд при концентрации агара 44% составляло $180 \pm 19\%$ и достоверно отличалось как от значений при 33% агара ($95 \pm 18\%$), так при 50% агара ($105 \pm 16\%$, $p \leq 0.05$, U -критерий, $n = 7$). Двукратное увеличение значений амплитуд НМДА-потенциалов при 44% агара в замораживающем растворе свидетельствует об активации НМДА-механизмов в процессе криосохранения с агаром (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе представлен протокол длительного криосохранения срезов головного мозга негипернотных животных. Целью исследования было достижение сохранения активности АМПА- и НМДА-механизмов после длительного низкотемпературного криосохранения. Для успешного сохранения активности этих механизмов мы использовали замораживающий раствор, приготовленный из искусственной цереброспинальной жидкости и агара в различных концентрациях. Агар используется в биологических и медицинских исследованиях из-за его свойств биосовместимости и биоразлагаемости и считается подходящим биоматериалом для имитации каркасов внеклеточного матрикса с пористой структурой. В качестве индикаторов активностей АМПА- и НМДА-механизмов мы регистрировали АМПА- и НМДА-потенциалы, вызванных электростимуляцией латерального обонятельного тракта, и анализировали изменения их амплитуд.

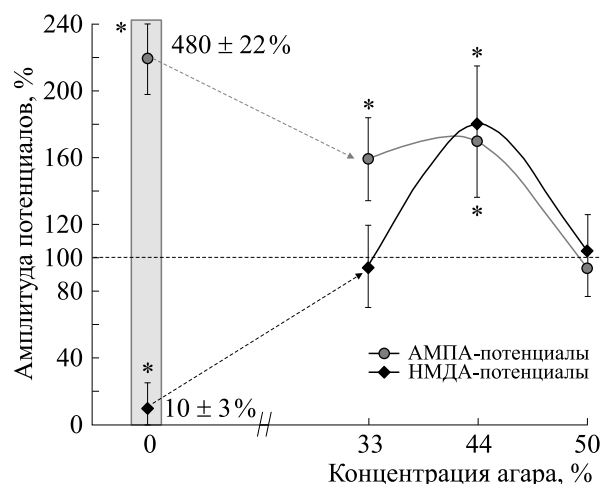


Рис. 5. Протективные эффекты агара в разных концентрациях на амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов после длительного криосохранения (-10°C , 52 сут). По оси абсцисс — концентрация агара в замораживающей среде в %. По оси ординат — амплитуда АМПА- и НМДА-потенциалов в % по отношению к значениям до криосохранения (100%, пунктирная линия). При концентрации агара 0% в замораживающем растворе (серый прямоугольник) точка амплитуд АМПА-потенциалов расположена условно, поскольку ее значения не соответствуют шкале ординат. Серые пунктирные стрелки демонстрируют усиление протективного эффекта при добавлении агара в замораживающий раствор. * — Данные отличаются с $p \leq 0.05$ по отношению к значениям до криосохранения (контроль) для АМПА- и НМДА-потенциалов, U -критерий Вилкоксона–Манна–Уитни; $n = 12$ для 0%, $n = 7$ для 33, 44 и 50%.

Полученные данные доказывают, что криосохранение срезов в замораживающем растворе с агаром способствовало 100%-му сохранению активности АМПА- и НМДА-механизмов в процессе длительного криосохранения (-10°C , 52 сут). Отметим, что при криосохранении срезов в ИЦЖ (без агара) сохранялись только активности АМПА-механизмов, напротив, активности НМДА-механизмов необратимо блокировались.

Мы использовали различные концентрации агара в замораживающем растворе, чтобы получить полное восстановление этих механизмов после криосохранения. В результате проведенных исследований было выявлено, что степень восстановления АМПА- и НМДА-механизмов после криосохранения срезов в замораживающем растворе была наиболее оптимальной при концентрации агара 50%. При этой концентрации агара активности АМПА и НМДА механизмов полностью сохранялись.

Представленные данные свидетельствуют о протективном свойстве агара при криосохранении срезов мозга. Известно, что криопротекторы бывают двух основных типов — проникающие и непроникающие [20, 21].

К первым относят криопротекторы, проникающие внутрь клетки. Их молекулярная масса не превышает 100 Да. Проникающие криопротекторы препятствуют формированию кристаллов льда в процесс замораживания [22]. Наиболее распространенные проникающие криопротекторы — это диметилсульфоксид, глицерин, пропиленгликоль, этиленгликоль и др. Все они являются токсичными при воздействии на нервные клетки и синапсы [13] и в наших исследованиях по этой причине не использовались.

Ко второму типу относят криопротекторы с молекулярными весами в десятки-сотни кДа, не проникающие внутрь клеток. Они менее токсичны, чем проникающие криопротекторы при равных концентрациях [21]. Предполагают, что они притягивают и абсорбируют воду извне мембраны, тем самым снижая ее вязкость, способствуют возрастанию скорости обезвоживания и препятствуют образованию внутриклеточных кристаллов льда и осмотических изменений [23, 24]. К не-проникающим криопротекторам относят две группы веществ — олигосахариды (наиболее часто используют сахарозу и трегалозу) и высокомолекулярные соединения (фиколл, альбумин, поливинилпирролидон).

В соответствии с представленными выше данными агар по величине молекулярного веса (32–200 кДа) агар следует отнести к непроникающему типу криопротекторов, подобно олигосахаридам, например трегалозе (342 кДа). По химической природе агар является биополимером, макромолекулы которого образованы двумя полисахаридами — агарозой и агаропектином. Агароза, входящая в состав агара (50–80%), представляет собой линейный полисахарид и рассматривается как менее высокомолекулярная фракция полимера, тогда как агаропектин имеет сетчатую структуру с большей молекулярной массой [25–31].

Обнаружено, что агар в водных растворах образует сложную многоуровневую структуру. При ее формировании полимер проявляет высокую гидратационную способность, позволяющую создавать устойчивые структуры с молекулами воды даже при низких концентрациях полимера [25, 32, 33]. Благодаря большой поверхности агара при его контакте с водным раствором происходит быстрая диффузия в полимерную структуру как молекул воды, так и растворенных в ней веществ [34]. Очевидно, что такие свойства индуцируют абсорбцию полимером молекул воды из внеклеточного пространства срезов. Полагаем, что благодаря этому свойству агара проявляется защита мембран нервных клеток от осмотических напряжений, уменьшение образования кристаллов льда и их разрушительного воздействия на мембраны в процессе криосохранения.

Другой защитный механизм агара проявляется в образовании межмолекулярных связей между сульфатными группами полимерных цепей агара и ионами кальция [35]. Это важное свойство, поскольку в процессе замораживания нервных клеток может многократно усиливаться вход кальция внутрь клеток, что вызывает нарушение их функционирования и даже гибель. Кроме ионов кальция агар взаимодействует с другими ионами [31], что способствует защите нейронов от осмотических изменений, вызываемых перераспределением катионов между внутриклеточным содержанием клеток и внеклеточным пространством.

В наших опытах был выявлен нелинейный характер зависимостей протективных эффектов АМПА- и НМДА-активностей от концентраций агара в замораживающем растворе. Такая зависимость, по-видимому, отражает различные взаимодействия молекул полимера с рецепторными структурами. Полагают, что такие (протективные) свойства агара, как абсорбция воды и связывание ионов агаром, существенно зависят от его концентрации в водном растворе. При малых концентрациях агара наибольшее число межмолекулярных связей приводит к взаимодействию агара с водой, что усиливает абсорбцию молекул воды из срезов. Повышение концентрации агара создает условия для усиления образования цепочек «агар–агар». Это способствует переходу раствора полимера в более однородную структуру, усилению диффузии воды и отрицательных и положительно заряженных ионов в полые структуры агара [32]. Следует принять во внимание, что процессы формирования структуры агара и его взаимодействия с АМПА- и НМДА-рецепторами будут меняться в различных фазах процесса криосохранения (замораживание–хранение–отогревание). Эти физические воздействия на АМПА- и НМДА-рецепторы, очевидно, будут отражаться на их функционировании в зависимости от используемых концентраций агара.

В практическом плане использования агара для криосохранения срезов следует обратить внимание на удаление полимера от срезов. Этот процесс имеет существенное значение для защиты структур срезов от механических воздействий. При этом следует учитывать, что в агаре присутствуют низко и высокомолекулярные фракции, которые могут по-разному влиять на функционирование нейронов и синапсов. В результате проведенных исследований было обнаружено, что при плавном медленном отогревании (0.1°C/мин) и отмывании срезов со скоростью 1 мл/мин с ламинарным характером течения протекающего солевого раствора (ИЦЖ) гелевый раствор агара удаляется без негативных (механических) влияний на функционирование срезов. При достижении 37°C АМПА- и НМДА-потенциалы стабильно регистрировались в срезах. Оп-

тимальность использования нашего приема была подтверждена результатами других исследований. Было установлено, что гелевая структура агара при отмывании разрушается поэтапно: сначала удаляются низкомолекулярные, а затем высокомолекулярные фракции. При этом повышение температуры раствора ускоряет данный процесс [31].

Представленные выше данные свидетельствуют о выраженных протективных свойствах агара, разумеется, необходимы дальнейшие исследования механизмов его действия, повышению их эффективности для использования в процессах криосохранения эксплантатов мозга эндодермов.

ВЫВОДЫ

Представленные данные доказывают, что агар в замораживающем растворе можно рассматривать как криопротектор, который защищает АМ-ПА- и НМДА-механизмы от криоповреждений. Мы полагаем, что наш протокол криосохранения эксплантатов головного мозга (срезов) негиберирующих теплокровных животных в замораживающем растворе с агаром будет способствовать созданию биобанка, который станет постоянным и надежным источником нервной ткани для клинического использования в терапии нейропатологий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность Г.П. Смирновой за помощь при проведении экспериментов, а также С.Е. Боровикову за техническую помощь в наладке и обслуживании электрофизиологической установки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенных European Communities Council Directive (86/609 EEC). Опыты с животными были одобрены в строгом соответствии с Руководством Совета Федерации по уходу и использованию лабораторных животных (1996 г.) и с руководящими принципами этического кодекса Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (1996 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. J. Paynter, Brain Res. Bull., **75**, 1 (2008).
2. S. Bojic, A. Murray, and B. L. Bentley, BMC Biol., **19** (1), 56 (2021).
3. S. S. Parker, A. Moutal, and S. Cai, eNeuro, **5**, 0135 (2018).
4. F. Pischedda, C. Montani, and J. Obergasteiger, Front. Cell Neurosci., **12**, 81 (2018).
5. J. Fang and Z. X. Zhang, Cryobiology, **29**, 267 (1992).
6. D. Petite and M. C. Calvet, Brain Res., **747**, 279 (1997).
7. T. J. Collier, M. J. Gallagher, and C. D. Sladek, Brain Res., **623**, 249 (1993).
8. S. Jensen, T. Sorensen, and J. Zimmer, Cryobiology, **24**, 120 (1987).
9. А. А. Мокрушин и С. Е. Боровиков, Междунар. журн. прикл. фунд. исслед. **2** (2), 214 (2017).
10. А. А. Mokrushin, Biol. Bull., **47**, 71 (2020).
11. T. P. Obrenovitch and J. Urenjak, Progr. Neurobiol., **51**, 39 (1997).
12. S. F. Traynelis and S. D. Cull-Candy, Nature, **345**, 347 (1990).
13. Ю. И. Пичугин, *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии* (Москва, 2013).
14. A. G. E. Day, K. S. Bhangra, and C. Murray-Dunning, Tissue Engineering: Part C Methods, **23**, 575 (2017).
15. C. Zhang, Y. Zhou, and L. Zhang, Int. J. Mol. Sci., **19**, 3330 (2018).
16. E. E. Benson, K. Harding, and M. Ryan, Cryoletters, **39**, 14 (2018).
17. S. Schneider and H. H. Klein, Eur. J. Med. Res., **16**, 396 (2011).
18. М. И. Митюшов, Н. А. Емельянов, А. А. Мокрушин и др., *Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования* (Наука, Л., 1986).
19. А. А. Мокрушин, Биофизика, **66** (5), 954 (2021).
20. B. Wowk, <https://www.alcor.org> (2007).
21. K. Matsumura, F. Hayashi, and T. Nagashima, Commun. Mater., **2**, 15 (2021).
22. D. Pegg, *Cryopreservation in Essentials of Tissue Banking*, Ed. by G. Galea (Springer Netherlands, 2010).
23. P. J. Stiff, A. J. Murgo, and C. G. Zaroulis, Cryobiology, **20**, 17 (1983).
24. A. Stolzinger, Y. Naaldijk, and V. Fedorova, Transfus. Apher. Sci., **46**, 137 (2012).
25. Б. П. Шипунов и В. И. Маркин, Химия растительного сырья, № 1, 73 (2020).
26. А. И. Усов, Химия растительного сырья, № 2, 7 (2021).
27. A. I. Usov, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem., **65**, 115 (2011).
28. C. Delattre, T. A. Fenoradosoa, and P. Michaud, Brazil. Arch. Biol. Technol., **54** (6), 1075 (2011).
29. A. M. Sousa, J. Borges, and A. F. Silva, Carbohydrate Polymers, **96** (1), 163 (2013).

30. T. Matsuhashi, *Agar/Food Gels*, Ed. by Harris (Dordrecht, 1990).
31. В. А. Евтушенко и Г. В. Варфаломеева, Высокомолекуляр. соединения, **5**, 1867 (1963).
32. Б. П. Шипунов, В. Е. Коптев, и В. И. Маркин, Химия растительного сырья, № 1, 53 (2018).
33. А. И. Усов, Food Hydrocolloids, **12** (3), 301 (1998).
34. Е. А. Анциферов, Е. В. Кудрявцева и А. А. Соболева, Вестн. Иркутского гос. техн. ун-та, **6** (46), 171 (2010).
35. О. А. Максимова и В. В. Митин, Пищевая промышленность, **7**, 45 (2013).

Agar Freezing Solution for Long-Term Cryopreservation of Brain Slices from Non-Hibernating Animals

A.A. Mokrushin*

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

Our previous studies have shown that function of ionotropic glutamate receptors such as AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid) and NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) was impaired after long-term cryopreservation of brain slices at -10°C within 30–50 days. To elucidate the reasons for cryo-damage to AMPA- and NMDA-dependent mechanisms, artificial cerebrospinal fluid (aCSF) solutions that contain agar at different concentrations (33, 44, and 50%) were used for cryopreservation of the rat olfactory cortex slices. After cryopreservation, the slices were warmed to 37°C and the amplitudes changes of AMPA and NMDA potentials, which reflected the activities of the AMPA and NMDA mechanisms, were evaluated; the results were compared with those obtained before cryopreservation. It was found that AMPA and NMDA potentials changed differently depending on the concentration of agar in artificial cerebrospinal fluid. In solutions with 33% agar, the amplitude of AMPA potentials increased by 60%, whereas, in contrast, the amplitude of NMDA potentials was equal to the values before cryopreservation. At agar concentration of 44% in the solution, the AMPA and NMDA amplitudes were increased by 70% and 80%, respectively. A complete recovery of the activities of AMPA and NMDA mechanisms was obtained after cryopreservation in a freezing solution with an agar concentration of 50%. Under these conditions, the amplitudes of the AMPA and NMDA potentials corresponded to those seen before cryopreservation. Thus, the results obtained indicate that agar added to the artificial cerebrospinal fluid solution is a cryoprotectant that protects AMPA- and NMDA-dependent mechanisms from cryoinjury. The freezing solution (artificial cerebrospinal fluid and agar) developed by us for cryopreservation of brain explants of non-hibernating animals will be used to create a cryobank of nervous tissue.

Keywords: rat brain slices, cryopreservation, agar, AMPA-dependent mechanisms, NMDA-dependent mechanisms, freezing/warming

СМЕЩЕНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПЯТИКРАТНОМ ПОВЫШЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЕЙТЕРИЯ В ПИТЬЕВОМ РАЦИОНЕ

© 2023 г. С.В. Козин*, **, О.М. Лясота*, **, А.А. Кравцов*, **, Е.В. Чихиржина***, В. А. Ивлев****, К. А. Попов*, ****, А.А. Дорохова*, **, В.В. Малышко*, ****, А.В. Моисеев*****, А.В. Дроздов*****, С.С. Джимаков*, **

ФИЦ «Южный научный центр РАН, пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону, 344006, Россия

** Кубанский государственный университет, ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040, Россия

*** Институт цитологии РАН, пр. Тихорецкий, 4, Санкт-Петербург, 194064, Россия

**** Российский университет дружбы народов, ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198, Россия

***** Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ,

ул. им. Митрофана Седина, 4, Краснодар, 350063, Россия

***** Кубанский государственный аграрный университет, ул. Калинина, 13, Краснодар, 350004, Россия

***** Институт аналитического приборостроения РАН, ул. Ивана Черных, 31-33а,

Санкт-Петербург, 198095

*E-mail: 013194@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2022 г.

После доработки 31.10.2022 г.

Принята к публикации 01.11.2022 г.

Представлены результаты исследования влияния воды с содержанием дейтерия 750 ppm, моделирующей изотопный состав воды в ледяных шапках на полюсах Марса, на окислительные процессы в тканях печени и крови лабораторных животных. Установлено, что длительное потребление утяжеленной дейтерием воды способствовало увеличению содержания дейтерия в плазме крови до 487 ppm. В результате выявлено усиление антиоксидантного потенциала в тканях печени и в плазме крови. Также исследовано влияние среды с содержанием дейтерия 487 ppm на вторичную структуру бычьего сывороточного альбумина в модельном эксперименте. Обнаружено снижение интенсивности спектров кругового дихроизма и спектров собственной триптофановой флуоресценции, что указывает на конформационные изменения в структуре данного белка на фоне повышения содержания дейтерия в среде инкубации. Проведенное исследование создает предпосылки для дальнейшего изучения влияния питьевого рациона с повышенным содержанием дейтерия (от 700 до 1000 ppm) на живые системы для понимания возможности осуществления жизни на Марсе.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, дейтерий, Марс, лабораторные животные, бычий сывороточный альбумин.

DOI: 10.31857/S0006302923020163, EDN: CCNNGX

Известно, что изотопный состав атмосферы Марса значительно отличается от земного — в ней присутствует в 6 раз больше дейтерия (700–1000 ppm), на 70% больше азота-15 и на 5% — углерода-13 и кислорода-18 [1, 2]. Прежде чем отправлять экспедицию на Марс с целью основания колонии, необходимо выяснить, как отличный от

земного марсианский изотопный состав повлияет на жизнедеятельность млекопитающих. Известно, что снижение содержания дейтерия в питьевом рационе может оказывать стимулирующее влияние на функциональную активность живых систем [3–5], тогда как значительное увеличение концентрации дейтерия способно ингибировать жизненно важные процессы [6–10], а в ряде случаев отмечено, что умеренные колебания концентрации дейтерия (как при повышении, так и при уменьшении его содержания в воде) способны повышать функциональную активность живых систем [11–14].

Сокращения: ВМИС — вода с модифицированным изотопным составом, АВТС — 2,2'-азино-бис-3-этилбензтиозолин-6-сульфокислота, КД — круговой дихроизм, БСА — бычий сывороточный альбумин, АОС — антиоксидантная система, GSH — концентрация восстановленного глутатиона.

К настоящему времени опубликовано значительное количество работ, в которых описано как активирующее, так и ингибирующее влияние воды с пониженным относительно природного уровня содержанием дейтерия практически на все уровни организации живой материи (молекулярный [15–18], клеточный [19, 20], тканевый [21–25], организменный [26–31]). При этом особый интерес представляет исследование влияния воды, в которой содержание дейтерия сопоставимо с таковым в ледниковых шапках Марса, на функциональные системы неспецифической защиты организма, прежде всего, на ее прооксидантно-антиоксидантное звено, нарушения в котором играют существенную роль в развитии многих заболеваний [32–34].

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния воды с модифицированным изотопным составом (750 ppm) на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы печени и крови лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали воду с модифицированным изотопным составом с содержанием дейтерия 750 ppm (ВМИС-750 ppm), которая была получена разведением оксида дейтерия (99,92%) («Leimacs», Россия) водой с естественным содержанием дейтерия 150 ppm. Питьевая вода с природной концентрацией дейтерия была получена на бидистилляторе УПВА 5 (ООО ПФ «Ливам», Россия). Физиологически полноценную воду с содержанием дейтерия 750 и 150 ppm получали путем добавления в нее минеральных солей (общая минерализация составила от 314 до 382 мг/л). Животных содержали в виварии при естественном освещении, свободном доступе к пище и воде. Суточное потребление воды животными всех групп в течение эксперимента составляло в среднем от 18 до 27 мл на одну голову и не зависело от физиологического состояния животных. Эксперимент выполнен на 14 крысах-самцах линии *Wistar* в возрасте 1,5 месяца (массой от 240 до 270 г). Условия содержания животных были стандартизированы: температура $20 \pm 3^\circ\text{C}$, влажность $48 \pm 2\%$, освещение — режим день/ночь (с 6.00 до 18.00 и с 18.00 до 6.00). В качестве подстилки использовали березовую стружку. На протяжении всего эксперимента животные потребляли стандартный концентрированный комбикорм по ГОСТ Р 50258. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Приказа МЗ РФ № 267 от 19 июня 2003 года «Об утверждении правил лабораторной практики», Правил лабораторной практики (GLP), Хельсинской декларации (2000) и Директив Европейского сообщества 86/609ЕЕС [35].

Животные были разделены на две группы по семь особей в каждой:

- в группу 1 (контрольную) были включены интактные крысы, получавшие в рационе воду с содержанием дейтерия, равной естественной (150 ppm), в течение двух месяцев;

- в группу 2 («ВМИС-750 ppm») — крысы, получавшие в рационе воду с содержанием дейтерия 750 ppm в течение двух месяцев.

На 61-е сутки эксперимента крысам проводили декапитацию под общей анестезией, выполняемой препаратом Золетил 100 (Virbac, Франция), после чего печень животных извлекали и помещали в жидкий азот. Из полученной смешанной крови готовили плазму путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 15 мин. Супернатант получали из навески ткани печени, растертой в ступке, охлажденной жидким азотом и помещенной в холодный фосфатный буфер с pH 7.4 (из расчета 100 мг ткани на 1 мл буфера) [36]. Гомогенизировали ткань встряхиванием в течение 15 мин с последующим центрифугированием 10 мин при 6000 об/мин.

Концентрацию дейтерия в плазме крови определяли в ЦКП НОРЦ «Фармация» (РУДН, Москва) с помощью ЯМР-спектрометра Bruker Avance NEO 700 МГц по методике, подробно описанной в работе [37].

Интенсивность свободнорадикальных процессов в плазме крови определяли методом хемилюминесцентного анализа на приборе Lum-100 по следующим показателям: светосумме — интегральному показателю свечения в усл. ед., амплитуде быстрой вспышки в мВ и тангенсу угла наклона ветви графика [38]. В тканях печени лабораторных животных определяли содержание низкомолекулярного неферментативного показателя антиоксидантной системы — восстановленного глутатиона. Общую антиоксидантную активность оценивали по светосумме свечения хемилюминесценции в усл. ед. [39] и методом оценки радикальной сорбции 2,2'-азино-бис-3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты (ABTS) [40]. Согласно данному методу предварительно готовили раствор относительно стабильного радикала ABTS, имеющего зеленую окраску, который перед исследованием разводили до оптимального значения оптической плотности (примерно 0.7 единиц оптической плотности). Затем в кювету с разведенным раствором ABTS вносили супернатант и регистрировали скорость снижения оптической плотности при 734 нм против холостой пробы, содержащей реакционную смесь и буферный раствор вместо исследуемого образца. Результаты представляли в перерасчете на mM аскорбиновой кислоты, которую использовали в качестве стандарта, для этого предварительно строили калибровочный график с известными

Таблица 1. Показатели развития хемилюминесценции в крови

Группа	Светосумма, у.е.	Амплитуда быстрой вспышки, мВ	tg α
Контроль-150 ppm	462 $\pm$ 8	13.5 $\pm$ 0.1	0.145 $\pm$ 0.004
«ВМИС-750 ppm»	306 $\pm$ 7*	9.2 $\pm$ 0.6*	0.117 $\pm$ 0.007*

Примечание: Данные представлены в виде $M \pm m$; * — $p < 0.05$ относительно контрольной группы.

концентрациями витамина С и на его основании проводили последующий расчет соответствующей активности опытного образца. Кроме того, определяли известный маркер окислительных процессов — число продуктов, образующихся в результате взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой [41], основным из которых является малоновый диальдегид. Данный показатель выражали в единицах оптической плотности на 1 г белка. Содержание восстановленного глутатиона определяли с помощью реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты)), данные представляли в мкмольях на 1 г белка [42].

Структура бычьего сывороточного альбумина в средах с различным содержанием дейтерия (150 и 487 ppm) была изучена с помощью спектров собственной триптофановой флуоресценции и спектров кругового дихроизма (КД). Для этого был приготовлен основной раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm) в 0.01 М калий-фосфатном буфере при pH 7.5. Исходную воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм·см с содержанием дейтерия 150 ppm для приготовления растворов получали на установке LaboStar TWF 7 (Evoqua, Германия). За сутки до измерений готовились два рабочих раствора БСА. Первый рабочий раствор готовили разведением основного раствора фосфатным буфером (pH 7.5, 150 ppm) до нужной концентрации белка. Второй рабочий раствор получали добавлением D₂O в основной раствор. Концентрация БСА составила 5 мкМ, ее определяли, используя коэффициент оптического поглощения $\varepsilon_{279} = 43824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, на спектрофотометре U-2000 (Hitachi, Япония) [43]. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре F-2700 (Hitachi, Япония). Собственную триптофановую флуоресценцию возбуждали светом длиной волны 297 нм [44]. Спектры КД регистрировали на дихрографе Mark V (Jobin Ivo, Франция) при комнатной температуре в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0.1 см. Спектры снимали в диапазоне от 197 до 260 нм с шагом в 1 нм. На каждой длине волны проводили усреднение сигнала КД по 1000 измерений. Для устранения влияния низкочастотных случайных процессов спектры образца

записывали три раза с последующим усреднением. Спектры КД представлены в пересчете на молярную эллиптичность (θ), выраженную в град·см²·дмоль⁻¹. Процент α -спиралей в белковой молекуле рассчитывали при 220 нм по эмпирической формуле $\alpha(\%) = (-\theta_{220} + 3000)/3900$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание дейтерия в крови лабораторных животных, в питьевом рационе которых была ВМИС-750 ppm, повысилось со 149.7 ± 0.5 ppm до 486.2 ± 4.6 ppm.

На фоне продолжительного использования в питьевом рационе ВМИС с содержанием дейтерия 750 ppm происходило смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови и тканях печени крыс. При этом на фоне увеличения концентрации дейтерия наблюдалось усиление антиоксидантного потенциала крови экспериментальных животных, что сопровождалось снижением показателей нарастания вспышки хемилюминесценции (табл. 1). Светосумма свечения хемилюминесценции и тангенс угла наклона графика, пропорциональные количеству свободных радикалов, генерируемых в модельной системе, уменьшились соответственно на 34 и 28% для животных группы «ВМИС-750 ppm» по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). Амплитуда быстрой вспышки также снизилась на 31% относительно контрольной группы ($p < 0.05$), что свидетельствует о более низком содержании гидроперекисей в крови животных в группе «ВМИС-750 ppm».

Из табл. 2 видно, что показатели антиоксидантной системы ткани печени выше у животных, в рационе которых была ВМИС-750 ppm, по сравнению с группой животных, которые потребляли воду с естественным содержанием дейтерия.

Общая активность антиоксидантной системы была выше в группе «ВМИС-750 ppm», что выразилось статистически значимым снижением светосуммы свечения хемилюминесценции на 13 % и увеличением радикальной сорбции на 21% по сравнению с контрольной группой. Основной вклад в общую защиту от свободных радикалов и перекисных соединений вносят ферментативные

Таблица 2. Показатели системы антиоксидантной защиты в тканях печени

Группа	Светосумма хемилюминесценции, усл. ед.	ABTS, мМ/мг белка	Восстановленный глутатион, мкМ/г белка	Продукты взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой, е.о.п./г белка
Контроль – 150 ppm	48.7 ± 0.9	1.22 ± 0.05	56.6 ± 3.4	8.8 ± 0.5
«ВМИС-750 ppm»	$42.4 \pm 2.0^*$	$1.48 \pm 0.06^*$	$77.5 \pm 5.8^*$	7.6 ± 0.9

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$; * – $p < 0.05$ относительно контрольной группы; е.о.п. – единица оптической плотности.

и неферментативные звенья антиоксидантной защиты. Ряд ферментов последнего звена (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатион-трансфераза) функционируют прежде всего в тесном контакте с тиолсодержащими субстратами, в первую очередь регулируя концентрацию восстановленного глутатиона, являющегося ключевым внутриклеточным низкомолекулярным компонентом антиоксидантной системы. Животные, группы «ВМИС-750 ppm», имели достоверно более высокое содержание восстановленного глутатиона в тканях печени (на 37%) по сравнению с животными, в рационе которых была вода с естественным содержанием дейтерия 150 ppm. Вещества, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, являются продуктами перекисного окисления липидов и служат маркерами окислительного стресса. Для группы «ВМИС-750 ppm» данный показатель окислительного стресса был несколько ниже, чем для контрольной группы, хотя и не имел статистически значимого различия.

Таким образом, потребление лабораторными животными воды с повышенным содержанием дейтерия (750 ppm) относительно природного уровня способствовало увеличению антиокси-

дантного потенциала в тканях печени и в плазме крови.

Мы предполагаем, что повышение антиоксидантного потенциала в организме может быть связано со структурными и функциональными изменениями в белковых молекулах на фоне вынужденного изотопного D/H-обмена во внутренних жидкостях организма. Для подтверждения данного предположения была изучена структура модельного белка бычьего сывороточного альбумина в среде с содержанием дейтерия 487 ppm, соответствующая его содержанию в крови экспериментальных животных.

При оценке собственной триптофановой флуоресценции БСА установлено, что интенсивность флуоресценции альбумина была на 5% меньше в среде с повышенной концентрацией дейтерия, чем в среде с природной концентрацией тяжелого водорода (рис. 1).

В КД-спектрах также происходит снижение интенсивности разности поглощения лево и правостороннего поляризованного света (рис. 2).

Процент α спиральных структур в молекуле белка определяется интенсивностью КД-спек-

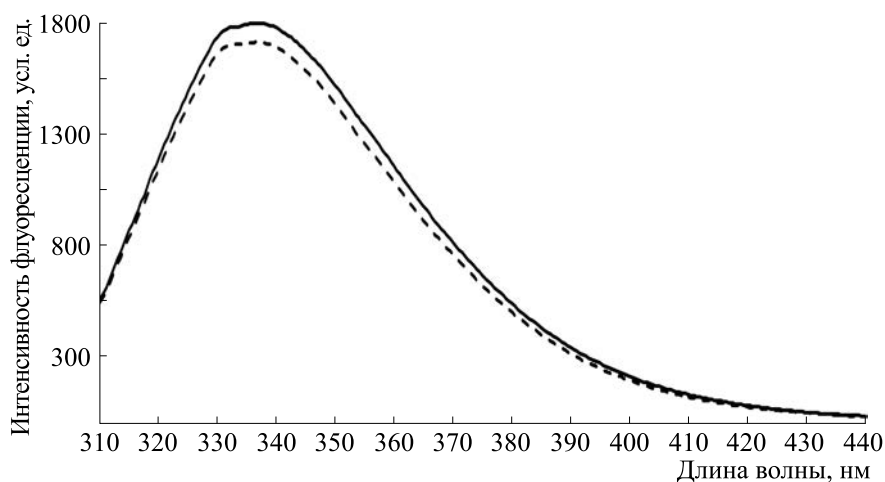


Рис. 1. Собственная триптофановая флуоресценция бычьего сывороточного альбумина в средах с различным содержанием дейтерия: сплошная линия – 150 ppm, пунктирная линия – 487 ppm.

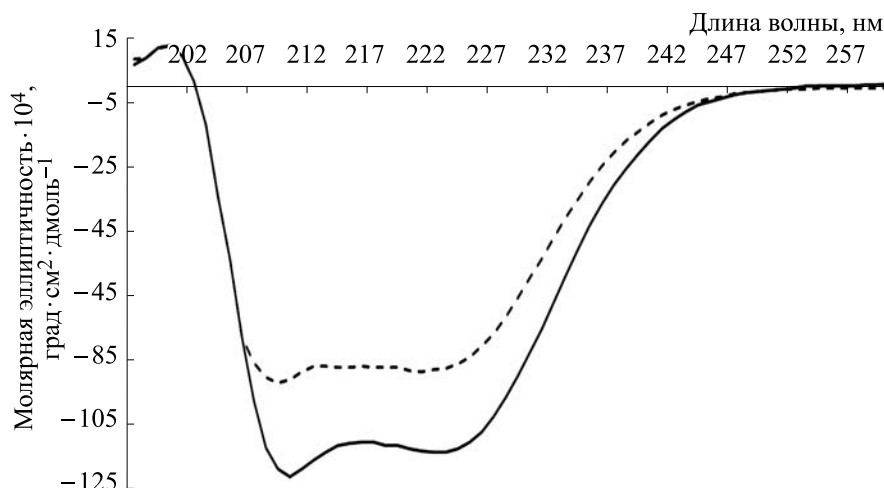


Рис. 2. КД-спектры бычьего сывороточного альбумина в средах с различным содержанием дейтерия: сплошная линия — 150 ppm, пунктирная линия — 487 ppm.

тров при 208 и 220 нм. Снижение молярной эллиптичности при данных длинах волн является следствием изменения вторичной структуры белков, а именно уменьшения количества α -спиралей. КД-спектры БСА в среде с содержанием дейтерия 487 ppm имели более низкую молярную эллиптичность, по сравнению со средой с содержанием дейтерия 150 ppm. Данный факт указывает на снижение процента α -спиралей во вторичной структуре БСА в среде с содержанием дейтерия 487 ppm.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Повышение концентрации дейтерия в экстрацеллюлярной жидкости и тканях организма происходит вследствие изотопного D/H-обмена в белках, липидах и нуклеиновых кислотах, образующих клетки. Известно, что наиболее активно такое замещение происходит в функциональных группах, имеющих неподеленную электронную пару и способных образовывать водородные связи. К таким атомным группировкам относятся гидроксильные ($-\text{OH}$), карбоксильные ($-\text{COOH}$) и аминогруппы ($-\text{NH}_2$) [45]. Энергия дейтериевой связи на 5% выше водородной [46]. Поэтому изотопный обмен протона на дейтрон в гидратационной воде или в функциональных группах аминокислотных остатков, находящихся на поверхности белковой структуры, способствует укреплению межмолекулярных связей между гидратационным слоем и макромолекулой, что в конечном счете может привести к изменению функциональной активности белка.

Ранее нами было установлено, что среда с содержанием дейтерия 50 ppm приводит к снижению скорости окисления о-дианизидина пероксидом водорода, катализируемое пероксидазой

хрена [47]. В литературе имеются данные о снижении ферментативной активности ацетилхолинэстеразы в среде с высоким содержанием дейтерия [48].

Учитывая полученные результаты флуоресцентной и КД-спектроскопии, вероятнее всего, можно допустить, что усиление водородных связей приводит к конформационным перестройкам в молекуле БСА. Потеря доли альфа-спиральности говорит об изменениях во вторичной структуре БСА. Известно, что у БСА имеется два триптофановых остатка, один из них находится на поверхности молекулы, а другой внутри нее. Основными тушителями триптофановой флуоресценции являются молекулы растворителя (воды), а также тирозиновые остатки за счет переноса энергии по диполь-дипольному механизму. Можно предположить, что снижение интенсивности триптофановой флуоресценции может быть следствием увеличения доступности растворителю остатков триптофана и возрастанию вероятности переноса энергии с триптофана на тирозиновые остатки. Таким образом, проведенные оптические исследования указывают на модификацию структуры БСА в среде с содержанием дейтерия 487 ppm.

Потеря нативной структуры у белковых молекул приводит к снижению их функциональных свойств. Так, нарушение вторичной структуры ферментов способствует снижению скорости ферментативных реакций, в которых они участвуют. С другой стороны, модификация белков на фоне действия повреждающих факторов вызывает стрессовую реакцию, в ответ на которую запускается ряд защитных механизмов. Один из таких механизмов реализуется благодаря слаженной работе системы протеостаза [49], направленной на поддержание нативной структуры белка [50]. При

развитии некоторых стрессовых реакций в организме для устранения конформационных ошибок, увеличивается экспрессия белков теплового шока [51, 52]. Поэтому частичная модификация белковых компонентов клетки, вызванная повышением содержания дейтерия в них, может привести к развитию адаптационного потенциала за счет активации синтеза белков теплового шока.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что у крыс при потреблении воды с повышенным содержанием дейтерия (750 ppm) наблюдается одновременно как снижение интенсивности свободнорадикальных процессов в крови и гепатоцитах, так и нарастание антиоксидантного потенциала в тканях печени, в том числе за счет увеличения содержания низкомолекулярных тиоловых антиоксидантов. Полученные в работе данные указывают на возрастание функциональной активности прооксидантно-антиоксидантного звена системы неспецифической защиты организма на фоне питьевого рациона с пятикратным увеличением дейтерия.

Таким образом, повышение в питьевом рационе млекопитающих содержания дейтерия до 750 ppm, т. е. уровня, аналогичного марсианским ледникам, оказывает биологическое действие на тканевом и молекулярном уровне, активируя антиоксидантную систему млекопитающих. Данное исследование открывает предпосылки для дальнейшего изучения биологических эффектов относительно высоких содержаний дейтерия, соответствующих его содержанию в ледниковых шапках на полюсах Марса (от 700 до 1000 ppm), и понимания особенностей внешней среды при его потенциальной колонизации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда (проект Н-21.1/11) и Государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

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. G. L. Villanueva, M. J. Mumma, R. E. Novak, et al., *Science*, **348** (6231), 218 (2015).
2. J. J. Barnes, F. M. McCubbin, A. R. Santos, et al., *Nat. Geosci.*, **13**, 260 (2020).
3. A. Basov, L. Fedulova, E. Vasilevskaya, and S. Dzhimak, *Molecules*, **24** (22), 4101 (2019).
4. I. Zlatskiy, T. Pleteneva, A. Skripnikov, et al., *Molecules*, **25** (18), 4173 (2020).
5. М. И. Быков, С. С. Джимак, А. А. Басов и др., *Вопросы питания*, **84** (4), 89 (2015).
6. В. И. Лобышев и Л. П. Калиниченко, *Изотопные эффекты D₂O в биологических системах* (Наука, М., 1978).
7. В. И. Лобышев, В. А. Твердислов Л. В. Яковенко и др., *Биофизика*, **2**, 390 (1978).
8. В. И. Лобышев, Ю. Фогель, Л. В. Яковенко и др., *Биофизика*, **4**, 595 (1982).
9. В. И. Лобышев, *Биофизика*, **4**, 666 (1983).
10. V. I. Lobyshev, *Int. J. High Dilution Res.*, **17** (2), 12 (2018).
11. X. Zhang, J. Wang, and R. A. Zubarev, *Mol. Cell. Proteomics*, **19** (11), 1790 (2020).
12. A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, and S. Dzhimak, *Nutrients*, **11** (8), 1903 (2019).
13. S. V. Kozin, E. I. Zlischeva, L. V. Shurygina, et al., *Biophysics*, **65** (6), 1017 (2020).
14. S. Hou, P. Chen, J. He, et al., *Redox Biol.*, **57** (11), 102472 (2022).
15. A. Basov, M. Drobotenko, A. Svidlov, et al., *Molecules*, **25** (16), 3753 (2020).
16. A. Syroeshkin, T. Pleteneva, E. Uspenskaya, et al., *Chem. Engineer. J.*, **377**, 1 (2019).
17. R. Rehakova, J. Klimentova, M. Cebova, et al., *Physiol. Res.*, **65** (3), 401 (2016).
18. A. A. Svidlov, M. I. Drobotenko, A. A. Basov, et al., *Physics of Wave Phenomena*, **29** (2), 180 (2021).
19. A. V. Syroeshkin, N. V. Antipova, A. V. Zlatska, et al., *J. Trace Elements Med. Biol.*, **50**, 629 (2018).
20. N. V. Lobysheva, S. V. Nesterov, Y. A. Skorobogatova, et al., *Biophysics*, **65** (2), 272 (2020).
21. A. B. Lisicin, M. G. Barishev, A. A. Basov, et al., *Biophysics*, **59** (4), 620 (2014).
22. K. Yavari and L. Kooshesh, *Nutrition and Cancer*, **71** (6), 1019 (2019).
23. A. Kravtsov, S. Kozin, A. Basov, et al., *Molecules*, **27** (1), 243 (2022).
24. S. Kozin, A. Kravtsov, M. Baryshev, et al., *Molecules*, **26** (7), 2036 (2021).
25. M. G. Baryshev, A. A. Basov, S. N. Bolotin, et al., *Bull. Russ. Acad. Sci.: Physics*, **76** (12), 1349 (2012).
26. N. V. Yaglova, S. S. Obernikhin, E. P. Timokhina, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **171** (2), 262 (2021).
27. X. Xie and R. A. Zubarev, *Sci. Rep.*, **5** (9215), 1 (2015).
28. S. S. Dzhimak, M. G. Barishev, A. A. Basov, et al., *Biophysics*, **59** (4), 614 (2014).
29. T. Halenova, I. Zlatskiy, A. Syroeshkin, et al., *Molecules*, **25** (1), 23 (2020).
30. N. V. Yaglova, S. S. Obernikhin, E. P. Timokhina, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **171** (5), 572 (2021).
31. А. А. Басов, М. И. Быков, М. Г. Барышев и др., *Вопросы питания*, **83** (5), 43 (2014).

32. G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, et al., *Oxid Med. Cell. Longev.*, **2017**, (2017).
33. M. S. Shchepinov, *Rejuvenation Res.*, **10** (1), 47 (2007).
34. I. M. Vykov, A. A. Basov, V. V. Malysheko, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **163** (2), 268 (2017).
35. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition* (The National Academies Press, Washington, DC, 2011).
36. С. В. Козин, А. А. Кравцов, С. В. Кравченко и др., *Вопросы питания*, **90** (2), 63 (2021).
37. S. S. Dzhimak, A. A. Basov, G. F. Kopytov, et al., *Rus. Phys. J.*, **58** (7), 923 (2015).
38. М. М. Туйгунов, Р. Р. Фархутдинов и Ю. А. Медведев, *Мед. иммунология*, **8** (2–3), 427 (2006).
39. S. V. Kozin, A. A. Kravtsov, A. A. Elkina, et al., *Biophysics*, **64** (2), 272 (2019).
40. I. R. Ilyasov, V. L. Beloborodov, I. A. Selivanova, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (3), 1131 (2020).
41. A. A. Basov, A. A. Elkina, S. S. Dzhimak, et al., *Biol. Bull.*, **46** (6), 531 (2019).
42. L. V. Shurygina, A. A. Kravtsov, E. I. Zlishcheva, et al., *Neurochem. J.*, **11** (3), 250 (2017).
43. А. М. Поляничко, Н. В. Михайлов, Н. М. Романов и др., *Цитология*, **58** (9), 707 (2016).
44. О. В. Степаненко, И. М. Кузнецова, К. К. Туровцев и др., *Цитология*, **47** (11), 988 (2005).
45. M. L. F. Estep and T. C. Hoering, *Carnegie Institution of Washington*, **78**, 652 (1979).
46. S. S. Dzhimak, M. I. Drobotenko, A. A. Basov, et al., *Dokl. Biochem. Biophys.*, **483**, 359 (2018).
47. S. V. Kozin, A. A. Kravtsov, A. V. Churkina et al., *Biophysics*, **65** (2), 195 (2020).
48. T. L. Rosenberry, *Molecules*, **25** (19), 4412 (2020).
49. N. Frankowska, K. Lisowska, J. M. Witkowski, *Front Aging*, 927630 (2022).
50. E. Amzallag, E. Hornstein, *Cells*, **11** (15), 2415 (2022).
51. C. Hu, J. Yang, Z. Qi, et al., *MedComm.*, **2** (3), 381 (2020).
52. H. Saibil, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **14** (10), 630 (2013).

A Shift of the Prooxidant-Antioxidant Balance in the Bodies of Laboratory Animals at Five-Fold Increased Deuterium Content in Drinking Diet

S.V. Kozin*, **, O.M. Lyasota*, **, A.A. Kravtsov*, **, E.V. Chikhirzhina***, V.A. Ivlev****, K.A. Popov*, ****, A.A. Dorohova*, **, V.V. Malysheko*, *****, A.V. Moiseev*****, A.V. Drozdov*****, and S.S. Dzhimak*, **

*Federal Research Centre "Southern Scientific Centre", Russian Academy of Sciences, prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia

**Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

***Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

****Peoples' Friendship University of Russia, ul. Miklouho-Maclay 6, Moscow, 117198 Russia

*****Kuban State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. imeni Mitrofana Sedina 4, Krasnodar, 350063 Russia

*****Kuban State Agrarian University, ul. Kalinina 13, Krasnodar, 350004 Russia

*****Institute of Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences, ul. Ivana Chernykh 31-33a, St. Petersburg, 198095 Russia

This paper presents the results of the study of the effect of water with deuterium content of 750 ppm, used for simulation of the isotopic composition of water in ice caps at the poles of Mars, on oxidative processes in the liver tissue and blood of laboratory animals. It was found that prolonged consumption of deuterium-enriched water contributed to an increase in the deuterium content in blood plasma up to 487 ppm. As a result, increased antioxidant activity in the liver tissues and blood plasma was observed. In addition, the effect of a medium that contains 487 ppm of deuterium on the secondary structure of bovine serum albumin was also investigated in a model experiment. A decrease in intensity of circular dichroism and intrinsic tryptophan fluorescence spectra was found. This indicates that there are conformational changes in the structure of this protein at a time when the content of deuterium increases in the incubation medium. The results of our research point to the need to explore further the effect of drinking diet with the increased deuterium to (from 700 to 1000 ppm) on living systems, to explain the possibility for life on Mars.

Keywords: antioxidant activity, deuterium, Mars, laboratory animals, bovine serum albumin

ВЛИЯНИЕ АЛЬГИНАТНО-ТКАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА НА ТЕЧЕНИЕ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2023 г. В.В. Малышко*, **, Л.В. Федулова***, М.Е. Соколов****, А.В. Моисеев*****,
А.А. Басов*, ****, А.А. Дорохова**, ****, #, Д.И. Шашков****, С.С. Джимаков**, ****

*Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ,
ул. им. Митрофана Седина, 4, Краснодар, 350063, Россия

**ФИЦ «Южный научный центр РАН», пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону, 344006, Россия

***ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, ул. Талалихина, 26, Москва, 109316, Россия

****Кубанский государственный университет, ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040, Россия

*****Кубанский государственный аграрный университет, ул. Калинина, 13, Краснодар, 350004, Россия

#E-mail: 013194@mail.ru

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.

После доработки 03.12.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Альгинаты с различными модифицирующими добавками (прежде всего хитозаном) и разными способами физической обработки используют для создания инновационных прототипов раневого покрытия. Целью настоящего исследования было создание и исследование свойств прототипа альгинатно-тканевого раневого покрытия, содержащего наночастицы серебра с десятикратной циклической заморозкой, с оценкой его влияния на течение гнойного раневого процесса у крыс. Проведенное исследование показало, что разработанная технология десятикратной циклической заморозки позволяет достоверно увеличить количество наночастиц серебра в составе альгинатно-тканевого раневого покрытия, прежде всего за счет наночастиц диаметром не более 15 нм, которые характеризуются наибольшей антибактериальной активностью. Применение разработанного раневого покрытия с наночастицами серебра уменьшает метаболические нарушения в работе системы неспецифической защиты на местном уровне, что характеризуется на третьей и пятые сутки раневого процесса менее выраженными показателями свободнорадикального окисления, меньшей напряженностью в сопряженной работе ферментов локальной антиокислительной защиты (каталазы и супероксиддисмутазы) по сравнению с применением препарата с наночастицами серебра, но не содержащего альгината, или использованием метода ежедневных санаций раны, не включающих применения ни альгината, ни наночастиц.

Ключевые слова: наночастицы серебра, альгинаты, электронная микроскопия, хемилюминесценция, каталаза, супероксиддисмутаза.

DOI: 10.31857/S0006302923020175, EDN: CCUJRN

Известно, что в настоящее время альгинатные раневые покрытия достаточно часто применяются на практике и активно исследуются в различных областях ветеринарии и экспериментальной медицины. Так, альгинаты с различными модифицирующими добавками (прежде всего хитозаном) и разными способами физической обработки используют для создания инновационных прототипов раневого покрытия. Подобная модификация позволяет добиться увеличения способ-

ности к набуханию, снижает эрозию покрытия, а также обеспечивает гладкую текстуру поверхности и оптимальную скорость высвобождения иммобилизованного на нем лекарственного средства [1]. Гидрогели на основе альгината и хитозана с факторами роста обладают большим потенциалом в качестве многофункциональных гидрогелевых повязок для полнослойной регенерации кожи, которые характеризуются ярко выраженными кровоостанавливающими и антибактериальными свойствами, проявляя при этом устойчивую цитосовместимость [2]. Также возможно изменение свойств альгинатных покрытий за счет целлюлозы, поливинилового спирта и

Сокращения: AgNPs — наночастицы серебра, СОД — супероксиддисмутаза, ПВХЛ — площадь вспышки хемилюминесценции, АОА — антиокислительная емкость.

хлорида кальция с образованием стабильного минерализованного гидрогеля. Характерно, что его структура обладает низкой цитотоксичностью, что очень перспективно для заживления ран, особенно у лиц с иммунной гиперреактивностью кожных покровов [3].

Еще одним из направлений создания альгинатных раневых покрытий является применение различных полимерных волокон. К ним относятся, например, волокна из альгината натрия и ε-полилизина, полученные путем непрерывного вытягивания электростатическим способом собранных композитов, что позволяет добиться хорошей антибактериальной активности, низкой цитотоксичности и биоадгезии [4].

Другим вариантом модификаций альгинатных повязок является применение композитного каркаса из фиброина шелка и альгината натрия в качестве нижнего регенеративного слоя и пленки. Подобная структура позволяет получить более быструю эпителизацию ран, существенно снижая местный воспалительный процесс и увеличивая синтез белка во внеклеточном матриксе в процессе регенерации тканей [5]. Также продемонстрирована потенциальная возможность использования гидрогеля на основе альгинатно-хрящевого внеклеточного матрикса и фиброина шелка для регенерации хрящевой ткани [6]. Внесение в альгинатную гелевую композицию фиброина совместно с желатином позволяет значительно повысить биосовместимость получаемого материала [7].

Перспективным направлением модификации альгинатных композиций является применение наночастиц серебра (AgNPs). Согласно литературным данным, модификация альгинатной основы наночастицами серебра позволяет повысить их биосовместимость и антибактериальную активность, в том числе в отношении *M. tuberculosis*, *S. aureus* и *P. aeruginosa* [8–11], причем использование альгинатного матрикса позволяет пролонгировать и оптимизировать высвобождение наночастиц из подобного раневого покрытия.

В наших исследованиях ранее была проведена серия экспериментов, направленных на изучение сорбции AgNPs на поверхности шовных материалов различного химического состава [12–14], а также изменения их антибактериальных свойств при дополнительном температурном воздействии [15]. В результате этого было доказано, что кавитационно-диффузионное фотохимическое восстановление ионов серебра с последующей циклической заморозкой полученных AgNPs существенно повышает количество наночастиц на поверхности шовного материала, особенно на кетгутовых и шелковых нитях. При этом используемая десятикратная заморозка/разморозка поз-

воляла увеличить прежде всего количество наночастиц серебра диаметром от 1 до 15 нм, которые обладают наибольшей удельной поверхностью и, как следствие, наиболее выраженной антибактериальной активностью. Так, бактерицидные свойства модифицированных шовных материалов были подтверждены в отношении *Escherichia coli* (*E. coli* 25922) методом Кирби–Бауэра. Была обнаружена достоверно большая антибактериальная активность шелковых волокон, которые превосходили по данному показателю аналогично обработанные волокна кетгута и перлона [15].

С учетом вышеизложенного целью настоящего исследования было создание и исследование свойств прототипа альгинатно-тканевого раневого покрытия, содержащего AgNPs, с оценкой его влияния на течение гнойного раневого процесса у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение наночастиц серебра осуществляли в соответствии с разработанной ранее методикой, включающей одновременное воздействие на компоненты реакционной системы, содержащей ионы серебра и поливинилпирролидон, как ультрафиолетового излучения с длиной волны 280–400 нм, так и ультразвука с частотой излучения 1.7 МГц с равномерным бесконтактным диффузионным перемешиванием ее компонентов [16, 17]. Получение альгинатно-тканевого раневого покрытия было основано на инкубации шовного материала из шелка в гелевой композиции с наночастицами серебра в присутствии поливинилпирролидона и дальнейшей десятикратной циклической заморозке, каждый цикл которой заключается в последовательном чередовании температуры -37.0°C в течение 24 ч и температуры 0.0°C в течение такого же по длительности периода времени [18].

Оценку активности сорбции/десорбции AgNPs проводили на основе анализа электронных микрофотографий, выполненных на растровом электронном микроскопе JEOL-7500F (JEOL, Япония) с полевым эмиссионным катодом при ускоряющем напряжении 10 кВ, в режиме детектирования отраженных электронов с увеличением до 30000 при температуре 25°C (Центр коллективного пользования диагностики структур и свойств наноматериалов Кубанского государственного университета, г. Краснодар) [19, 20]. Оценивали количество AgNPs в размерных диапазонах от 1 до 5 нм, от 6 до 10 нм, от 11 до 15 нм, от 16 до 25 нм и свыше 25 нм. Диаметры окружностей, эквивалентных частицам, сравнивали с длиной маркера на фотографии. Погрешность измерения составила ± 0.15 нм.

Моделирование раневого процесса у крыс массой от 150 до 170 г ($n = 16$, группа I) выполняли на основании разработанного ранее способа хирургического моделирования окислительного стресса у лабораторных животных [21]. Создание модели включало обработку операционного поля спиртовым антисептическим раствором, после чего под комбинированной анестезией, предполагающей местное применение 2.0 мл 0.5%-го раствора новокаина и кетопрофена в дозе 2.5 мг/кг подкожно [22], формировали абсцесс мягких тканей. Для этого производили разрез кожи, рассечение подкожной клетчатки, поверхностной и пояснично-спинной фасции, собственной фасции мышцы выпрямителя спины. В рану вводили марлевый шарик, пропитанный суточной культурой патогенного штамма бактерий (*S. aureus*) с концентрацией 10^3 /мл. Затем рану закрывали путем сшивания краев кожи кисетным швом. Через 120 ч с момента проведения имплантации инфицированного инородного тела формировали гнойную рану. Для этого снимали кожные швы, удаляли инородное тело и выполняли санацию полости абсцесса с последующим лечением этих животных с помощью альгинатно-тканевого покрытия [21]. Формирование ран у крыс в группе сравнения ($n = 16$, группа II) проводили по аналогичной методике с последующим лечением содержащим коллоидное серебро препаратом «Аргогель» (Россия), которым пропитывали марлевую салфетку. Группу контроля (группа III) составили 16 крыс с моделированными гнойными ранами, получавшие перевязки с мазью «Левомеколь» (Россия), которая не содержала ионы или наночастицы серебра.

Далее на первые, третьи, пятые и седьмые сутки проводили динамическое наблюдение изменений биохимических показателей в раневом отделяемом, в том числе определяли показатели функционирования ферментного и низкомолекулярного звена антиоксидантной системы неспецифической защиты: активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД), суммарную антиокислительную емкость раневого отделяемого, содержание восстановленных тиоловых групп (SH-групп), а также прооксидантные факторы по интенсивности свободнорадикального окисления с измерением площади вспышки хемилюминесценции (ПВХЛ). Определение суммарной антиокислительной емкости (АОА) раневого отделяемого выполняли на анализаторе антиоксидантной активности «ЦветЯуза-ААА-01» (ОАО НПО «Химавтоматика», Россия) амперометрическим способом, основанным на измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого субстрата при определенном напряжении (1.3 В) на поверхности рабочего сероуглеродного электрода и последующем сравнении [23] полученного сигнала, регистрируемого в

наноамперах в секунду (нА·с), с принятым стандартом (раствором аскорбиновой кислоты в рамках ГЗ № 121022600268-0). Содержание SH-групп оценивали по их взаимодействию с 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной) кислотой, образующей при наличии восстановленных тиолов тио-2-нитробензойную кислоту, которая имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм [24]. Полученные результаты выражали в единицах оптической плотности.

Исследование активности каталазы выполняли на основании методики [25], базирующейся на определении скорости утилизации перекиси водорода в реакционной смеси, в которую вносится биологический материал, содержащий фермент [26]. Расчет активности каталазы в единицах активности проводили по разнице экстинкций в опыте и контроле согласно закону Бугера—Ламберта—Бэра с учетом молярного коэффициента светопоглощения перекиси водорода при длине волны 260 нм ($\epsilon = 22 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Для определения активности СОД использовали методику, основанную на способности этого фермента ингибировать автоокисление кверцетина [27]. Окисление 1.4 мкМ кверцетина проводили при комнатной температуре в фосфатном буфере (рН 8.0) с диметилсульфоксидом, после добавления тетраметилэтилендиамина до конечной концентрации 0.8 мМ в конечном объеме реакционной смеси, равном 2.0 мл. Полученные результаты выражали в единицах активности.

Определение интенсивности свободнорадикального окисления раневого отделяемого проводили, анализируя площадь вспышки хемилюминесценции [28]. Исследование выполняли, регистрируя люминол-зависимую H_2O_2 -индуцированную хемилюминесценцию на люминотестере ЛТ-01 (НПО «Люмин», Россия) с помощью разработанного аппаратно-программного комплекса [29–31]. Полученные результаты сравнивали с показателями площади вспышки стандартного раствора люминола и выражали в процентах [32].

Обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью методов вариационной статистики. Оценку достоверности найденных отличий между показателями AgNPs и биохимических показателей раневого экссудата проводили с помощью непараметрического *U*-критерия Манна—Уитни. Достоверными полагали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На поверхности шелковых нитей в составе альгинатно-тканевого покрытия после циклической заморозки по сравнению с аналогичными показателями на шелке до десятикратного воз-

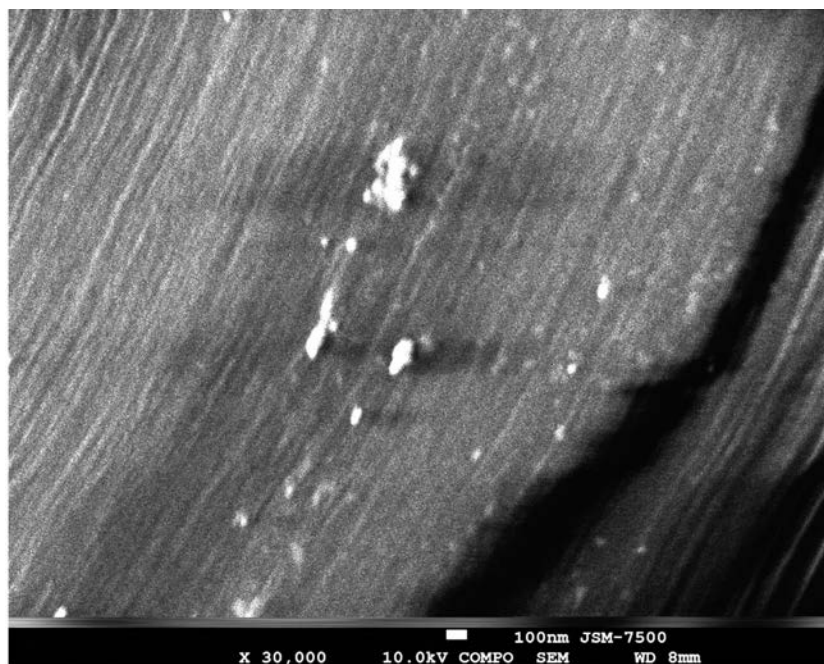


Рис. 1. Электронная микрофотография наночастиц серебра на поверхности волокон шелка в режиме детектирования отраженных электронов до выполнения циклической заморозки.

действия температуры -37.0°C наблюдалось значительное увеличение количества наночастиц серебра диаметром от 1 до 5 нм: их оказалось в 174.0 раза выше, чем без температурной обработ-

ки ($p < 0.004$, рис. 1 и 2). Также достоверно более высокие значения количества AgNPs (в 23.2 раза выше, $p < 0.05$) были обнаружены после разработанной процедуры заморозки/разморозки в срав-



Рис. 2. Электронная микрофотография наночастиц серебра на поверхности волокон шелка в составе альгинатно-тканевого покрытия в режиме детектирования отраженных электронов после выполнения десятикратной циклической заморозки.

Таблица 1. Показатели прооксидантно-антиоксидантной системы в раневом отделяемом у крыс в различные сроки лечения

Показатель	Первые сутки	Третьи сутки	Пятые сутки	Седьмые сутки
Группа I				
Каталаза, ед. акт. $\cdot 10^{-2}$	7.5 ± 1.3	$8.9 \pm 1.1^*$	$8.5 \pm 1.6^{* \#}$	-
СОД, ед. акт. $\cdot 10^{-2}$	7.9 ± 1.0	$9.1 \pm 1.2^{* \#}$	$6.0 \pm 0.8^{* \#}$	-
АОА, нА·с	0.26 ± 0.04	$0.59 \pm 0.05^{* \#}$	$0.74 \pm 0.03^{* \#}$	-
ПВХЛ, %	8.5 ± 1.0	$23.6 \pm 1.3^{* \#}$	$15.9 \pm 1.2^{* \#}$	-
SH-группы, ед. опт. пл.	0.20 ± 0.02	0.27 ± 0.01	$0.42 \pm 0.02^{* \#}$	-
Группа II				
Каталаза, ед. акт. $\cdot 10^{-2}$	7.2 ± 1.1	12.0 ± 0.8	$11.5 \pm 1.4^*$	$9.9 \pm 1.0^*$
СОД, ед. акт. $\cdot 10^{-2}$	7.4 ± 1.6	$12.3 \pm 1.0^*$	15.7 ± 1.2	$10.4 \pm 1.1^*$
АОА, нА·с	0.24 ± 0.02	$0.34 \pm 0.01^*$	0.35 ± 0.03	$0.20 \pm 0.01^*$
ПВХЛ, %	8.7 ± 0.9	$32.1 \pm 1.2^*$	$22.3 \pm 1.4^*$	10.2 ± 1.6
SH-группы, ед. опт. пл.	0.16 ± 0.01	0.28 ± 0.03	$0.21 \pm 0.03^*$	$0.16 \pm 0.02^*$
Группа III				
Каталаза, ед. акт. $\cdot 10^{-2}$	7.3 ± 0.9	13.2 ± 0.9	15.1 ± 1.7	8.5 ± 0.8
СОД, ед. акт. $\cdot 10^{-2}$	8.1 ± 1.1	14.9 ± 1.0	15.6 ± 1.4	7.8 ± 1.1
АОА, нА·с	0.24 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.14 ± 0.02
ПВХЛ, %	8.3 ± 1.2	46.2 ± 1.5	39.3 ± 1.1	9.6 ± 1.2
SH-группы, ед. опт. пл.	0.19 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.09 ± 0.01

Примечание. $^{\#} - p < 0.05$ в сравнении с группой II, $^* - p < 0.05$ в сравнении с группой III.

нении с показателями до температурной обработки шелка для частиц диаметром от 6 до 10 нм. При этом после циклического воздействия температуры -37.0°C на шелковых волокнах с AgNPs в составе альгинатно-тканевого покрытия происходило снижение на 81.4% количества наночастиц диаметром от 11 до 15 нм ($p < 0.03$) и на 96.9% AgNPs размером от 16 до 25 нм ($p < 0.004$). Следует отметить, что количество наночастиц более 25 нм на волокнах шелка после циклического воздействия минусовой температуры достоверно не изменялось.

Описанные изменения, сопровождающиеся многократным увеличением количества наночастиц диаметром не более 15 нм на поверхности шелка в составе альгинатно-тканевого покрытия могут свидетельствовать о дополнительном формировании AgNPs на поверхности исследуемого материала при циклической заморозке. В целом такая картина может быть связана с взаимодействием Ag^+ с функциональными группами в составе данного волокна. Преимуществом шелковых нитей среди других шовных материалов является наличие в их составе органического компонента, присутствие которого необходимо для ускорения восстановительных процессов при замораживании, а также высокое сродство наночастиц серебра к входящему в состав шелка серицину, способному удерживать AgNPs и эффективно высвобождать их непосредственно в ране, что сочетается с его превосходной цитосовместимостью с клетками млекопитающих [33]. Взаимо-

действие ионов серебра и серицина может происходить, например, за счет гидроксильной группы тирозина [34], что характеризуется специфическим сигналом на ИК-Фурье-спектрах при 1640 см^{-1} [35], а также путем ван-дер-ваальсового взаимодействия со стабилизацией структуры комплекса «AgNP–белок» за счет гидрофобных участков [36]. Образование комплекса «AgNP–белок» также обеспечивает дополнительную передачу энергии между аминокислотами (тирозином, триптофаном, фенилаланином) и AgNPs, что может играть дополнительную роль в регенерации ионов серебра в процессе циклической заморозки волокон с ранее адсорбированными наночастицами (рис. 2).

Данные об изменении количества и диаметров AgNPs, полученные в этом исследовании, подтверждаются результатами другой работы, где было показано, что в гидротермальных условиях (в процессе заморозки/разморозки) может происходить межмолекулярное взаимодействие AgNPs за счет реакции восстановления ионов Ag^+ [37, 38]. Такая реакция происходит как следствие выделения Ag^+ из AgNPs в геле за счет ускорения процесса окисления наночастиц стимулированного циклами замораживания и оттаивания. Подобный процесс может характеризоваться динамическим преобразованием в системе «AgNPs– Ag^+ –волокно», в ходе которого на фоне восстановительной регенерации может происходить моди-

фикация отдельных групп наночастиц с разной интенсивностью в зависимости от их диаметра.

Использование стабильного изотопа серебра (^{107}Ag) позволило отследить окислительно-восстановительную реакцию с участием AgNPs [39], что продемонстрировало ускорение данного процесса при чередовании замораживания и оттаивания по сравнению со скоростью аналогичной реакции этих же наночастиц при инкубации их при различной плюсовой температуре (4°C и 25°C).

Следует отметить, что в первые сутки после моделирования раневого процесса достоверные отличия в биохимических показателях, характеризующих состояние прооксидантно-антиоксидантной системы на местном уровне у крыс, во всех трех группах выявлены не были ($p > 0.05$). В дальнейшем согласно полученным данным, активность СОД в группе I оказалась достоверно ниже, чем в группах II и III на третьи сутки эксперимента (табл. 1). При этом в группе II данный показатель оказался всего на 17.4% меньше, чем в группе III, тогда как в группе I активность СОД была на 38.9% ниже, чем в группе III ($p < 0.05$). В то же время на пятые сутки активность СОД в группах II и III была практически сопоставима ($p > 0.05$), а в группе I она по-прежнему оставалась меньше в 2.6 раза ($p < 0.05$), чем в группах II и III. На седьмые сутки исследования у всех животных из экспериментальной группы раны полностью перешли из фазы экссудации в фазу грануляций, что исключало возможность взятия раневого отделяемого на анализ. При этом активность СОД в группе II характеризовалась даже более высокими (на 33.4%) значениями, чем в группе III (табл. 1).

Активность каталазы уже на третьи сутки исследования была практически сопоставима в группах II и III ($p > 0.05$), тогда как в группе I значения этого фермента оказались достоверно меньше как на третьи, так и на пятые сутки исследования (на 32.6 и 43.7% соответственно, $p < 0.05$), чем в группе III. Активность данного энзима была также снижена в экспериментальной группе по сравнению с группой II: на 25.8% на третьи сутки и на 26.1% — на пятые сутки.

Динамика антиоксидантной активности раневого отделяемого характеризовалась на третьи и пятые сутки достоверно большими значениями в группе, животных которой лечили с помощью альгинатно-тканевого покрытия, содержащего AgNPs, по сравнению с обеими другими исследуемыми группами ($p < 0.05$). При этом АОА экспериментальной группы на третьи сутки была на 43.9% выше, чем в группе III ($p < 0.05$), и практически в два раза больше на пятые сутки при сравнении с той же группой ($p < 0.05$, табл. 1). В то же время показатель ПВХЛ на третьи сутки в группе

I оказался на 48.9% меньше, чем в группе III ($p < 0.05$), и на 26.5% ниже, чем в группе II ($p < 0.05$). При этом на пятые сутки аналогичные различия в интенсивности свободнорадикального окисления составили уже 59.5% и 28.7% соответственно ($p < 0.05$). Наиболее высокие показатели ПВХЛ в группе III на третьи и пятые сутки эксперимента могут быть связаны с бактерицидным воздействием мази, что проявляется путем локального усиления генерации свободных радикалов и реактивных молекул [40, 41], в том числе продуктов неполного одно- и двухэлектронного восстановления кислорода в организме — супероксидного анион-радикала ($\text{OO}^{\cdot-}$) и пероксида водорода (H_2O_2).

Концентрация SH-групп характеризовалась динамикой, схожей с АОА, и в целом свидетельствовала о меньшей интенсивности процессов отмирания и последующего лизиса клеток раневой поверхности при использовании разработанного раневого покрытия [42]. При этом на первые и третьи сутки исследования содержание восстановленных тиолов существенно не отличалось от показателей групп II и III ($p > 0.05$), тогда как на пятые сутки оно было выше в экспериментальной группе на 44.8% относительно группы III ($p < 0.05$). При этом в группе II аналогичный показатель был снижен на 27.6% по отношению к данным в группе III ($p < 0.05$), что отражает больший дефицит тиоловых соединений в экссудате у этих лабораторных животных. Последнее, возможно, обусловлено проявлением некоторой локальной цитотоксичности AgNPs в период выраженного воспалительного процесса в ране.

Подтверждением этого является и наблюдавшееся уже на седьмые сутки у крыс в группе I более быстрое завершение фазы экссудации, в отличие от животных получавших лечение без альгинатно-тканевого покрытия, включающего AgNPs, что сопровождалось в этих группах (II и III) более медленным уменьшением проявлений воспалительного процесса в ране. Вместе с тем известно, что наночастицы серебра, помимо высокой антибактериальной, противовирусной и противогрибковой активности [43], оказывают значительное влияние и на метаболические процессы в организме животных, а также обладают иммуномодулирующим эффектом, в том числе повышают количество иммуноглобулинов и увеличивают процентное содержание лимфоцитов. Кроме того, следует отметить, что, благодаря отсутствию устойчивости к препаратам серебра у большинства патогенных микроорганизмов и низкой их токсичности, использование AgNPs представляется достаточно перспективным в ветеринарии и медицине [44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что разработанная технология десятикратной циклической заморозки позволяет достоверно увеличить количество AgNPs в составе альгинатно-тканевого раневого покрытия, прежде всего за счет наночастиц диаметром не более 15 нм, которые характеризуются наибольшей антибактериальной активностью. Описанный подход позволяет существенно повысить антимикробный потенциал такой повязки, без увеличения суммарного содержания ионов серебра в ее структуре, что потенциально уменьшает возможность возникновения цитотоксического эффекта в процессе лечебных мероприятий.

Кроме того, применение разработанного раневого покрытия с AgNPs уменьшает метаболические нарушения в работе системы неспецифической защиты на местном уровне, что характеризуется на третьи и пятые сутки раневого процесса менее выраженными показателями свободнорадикального окисления, меньшей напряженностью в сопряженной работе ферментов локальной антиокислительной защиты (каталазы и СОД) по сравнению с применением препарата с AgNPs, но не содержащего альгината, или использованием метода ежедневных санаций раны, не включающих ни альгината, ни и AgNPs. Также при использовании разработанной повязки динамика изученных биохимических показателей отражает большую регенерацию низкомолекулярного звена антиоксидантной системы на местном уровне, в значительной мере за счет пула восстановленных тиоловых соединений, что свидетельствует о более благоприятном течении раневого процесса и выраженной биосовместимости альгинатно-тканевого раневого покрытия. Подтверждением этого является и наблюдавшееся после пяти суток у крыс в группе I более быстрое завершение фазы экссудации, в отличие от животных получавших лечение без альгинатно-тканевого покрытия, включающего AgNPs, что сопровождалось в данных группах (II и III) более медленным уменьшением проявлений воспалительного процесса в ране и сохраняющейся экссудацией даже на седьмые сутки эксперимента.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке госзадания Минобрнауки РФ, проект № FZEN-2023-0006..

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на животных проводили (включая их содержание и все осуществляемые манипуляции) в соответствии с соблюдением Директив Европейского сообщества 86/609ЕЕС, рекомендаций РД-АПК 3.10.07.02-09 «Методические рекомендации содержания лабораторных животных в вивариях, научно-исследовательских институтов и учебных заведениях» Министерства сельского хозяйства РФ (Москва, 2007 г.), Санитарных правил 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально биологических клиник (вивариев)», требований ГОСТ 33215-2014 от 07.01.2016 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами». Исследование одобрено биоэтической комиссией ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбачева РАН (протокол №05/2021 от 13.09.2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. A. Albarqi, A. A. Alqahtani, I. Ullah, et al., *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **23** (2), 72 (2022).
2. L. Wei, J. Tan, L. Li, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (3), 1249 (2022).
3. R. E. Abouzeid, A. Salama, and E. M. El-Fakharany, *Molecules*, **27**, 697 (2022).
4. X. Huang, H. Jing, X. Du, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **200**, 1 (2022).
5. Y. Wang, L. Su, Y. Hou, et al., *Macromol. Biosci.*, **22** (4), e2100352 (2022).
6. N. Shojarazavi, S. Mashayekhan, H. Pazooki, et al., *J. Biomater. Appl.*, **36** (5), 803 (2021).
7. E. Kim, J. M. Seok, S. B. Bae, et al., *Biomacromolecules*, **22** (5), 1921 (2021).
8. C. C. Chen, Y. Y. Chen, C. C. Yeh, et al., *Front. Pharmacol.*, **12**, 746496 (2021).
9. A. Basov, L. Fedulova, E. Vasilevskaya, et al., *Saudi J. Biol. Sci.*, **28** (3), 1826 (2021).
10. S. Tian, Y. Hu, X. Chen, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **195**, 515 (2022).
11. H. Murugaiah, C. L. Teh, K. C. Loh, et al., *Molecules*, **26** (21), 6414 (2021).
12. S. S. Dzhimak, V. V. Malysenko, A. I. Goryachko, et al., *Rus. Phys. J.*, **62** (2), 314 (2019).
13. S. S. Dzhimak, V. V. Malysenko, A. I. Goryachko, et al., *Nanotech. Rus.*, **14**, 48 (2019).
14. G. F. Kopytov, V. V. Malysenko, A. A. Elkina, et al., *Rus. Phys. J.*, **63** (6), 989 (2020).
15. A. Basov, S. Dzhimak, M. Sokolov, et al., *Nanomaterials*, **12**, 1164 (2022).
16. S. S. Dzhimak, M. E. Sokolov, A. A. Basov, et al., *Nanotech. Rus.*, **11**, 835 (2016).
17. A. A. Басов, В. В. Малышко, С. Р. Федосов и др., Патент РФ № 150504, № 5 (2015).
18. В. В. Малышко, С. С. Джимаков, Л. В. Ломакина и др., Патент РФ № 2770277, № 11 (2022).

19. I. Petriev, P. Pushankina, M. Baryshev, and N. Shostak, *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (1), 228 (2022).
20. I. S. Petriev, P. D. Pushankina, I. S. Lutsenko, and M. G. Baryshev, *Tech. Phys. Lett.*, **47**, 803 (2021).
21. А. А. Басов, И. М. Быков, С. Р. Федосов, В. В. Малышко, Патент РФ № 2455703, № 19 (2012).
22. М. О. Гомзикова, А. Г. Маланьева и З. Ю. Сираева, *Основы проведения биомедицинских исследований на лабораторных животных: учеб. пособие* (МедДок, Казань, 2021).
23. А. Я. Яшин, *Рос. хим. журн.*, № 2, 130 (2008).
24. J. F. Robyt, R. J. Ackerman, and C. G. Chittenden, *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 262 (1971).
25. R. Beers and I. Sizer, *J. Biol. Chem.*, **195**, 133 (1952).
26. А. А. Басов, S. V. Kozin, I. M. Bikov, et al. *Biol. Bull.*, **46** (6), 531 (2019).
27. В. А. Костюк, А. И. Потапович и Ж. И. Ковалева, *Вопр. мед. хим.* **2**, 88 (1990).
28. A. Kravtsov, S. Kozin, A. Basov, et al. *Molecules* **27** (1), 243 (2022).
29. А. А. Басов, И. И. Павлюченко, А. М. Плаксин и С. Р. Федосов, *Вестн. новых мед. технол.* **4**, 67 (2003).
30. И. И. Павлюченко, А. А. Басов и С. Р. Федосов, Патент РФ № 54787, № 21 (2007).
31. И. И. Павлюченко, С. Р. Федосов и А. А. Басов, Патент РФ № 2006611562 (2006).
32. I. M. Bykov, A. A. Basov, V. V. Malyshko, et al., *Bull. Exp. Biol. and Med.*, **163** (2), 268 (2017).
33. G. Tao, Y. Wang, R. Cai, et al., *Mater. Sci. Eng. C*, **101**, 341 (2019).
34. H. He, G. Tao, Y. Wang, et al., *Mater. Sci. Eng. C*, **80**, 509 (2017).
35. H. Muhammad Tahir, F. Saleem, S. Ali, et al., *J. Basic. Microbiol.*, **60** (5), 458 (2020).
36. S. Roy and T. K. Das, *J. Appl. Spectrosc.*, **82**, 598 (2015).
37. Z. Tan, X. Guo, Y. Yin, et al. *Environ. Sci. Technol.*, **53** (23), 13802 (2019).
38. S. J. Yu, Y. G. Yin, J. B. Chao, et al., *Environ. Sci. Technol.*, **48** (1), 403 (2014).
39. G. Xiaoru, Y. Yongguang, T. Zhiqiang, et al., *Environ. Sci. Technol.*, **52** (12), 6928 (2018).
40. С. Р. Туйсин и И. В. Богданов, *Фундаментал. исслед.* **4**, 81 (2010).
41. А. А. Басов, S. R. Fedosov, V. V. Malyshko, et al., *J. Wound Care*, **30** (4), 312 (2021).
42. I. Y. Tsymbalyuk, A. M. Manuilov, K. A. Popov, and A. A. Basov, *Novosti Khirurgii*, **25** (5), 447 (2017).
43. R. Vazquez-Munoz, B. Borrego, K. Juarez-Moreno, et al., *Toxicol. Lett.*, **276**, 11 (2017).
44. Т. И. Лебедева, И. А. Красочко и П. А. Красочко, *Вестник АПК Верхневолжья*, **2** (54), 73 (2021).

Influence of Alginate-Fabric Coating with Silver Nanoparticles on the Course of Wound Process in Laboratory Animals

V.V. Malyshko*, **, L.V. Fedulova*, M.E. Sokolov****, A.V. Moiseev*****, A.A. Basov*, ****, A.A. Dorohova**, ****, D.I. Shashkov*****, and S.S. Dzhimak**, ******

*Kuban State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation,
ul. Mitrofana Sedina 4, Krasnodar, 350063 Russia

**Federal Research Center "Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences",
prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia

***V.M. Gorbatov Federal Scientific Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences,
ul. Talalikhina 26, Moscow, 109316 Russia

****Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

*****Kuban State Agrarian University, ul. Kalinina 13, Krasnodar, 350004 Russia

Alginates with various modifying additives (for example, chitosan) and various methods of physical treatment are used in the design of prototypes of innovative wound dressing. The aim of this study was to create and explore the properties of a prototype of textile-based sodium alginate wound dressing containing silver nanoparticles subjected to 10 freeze cycles, and to evaluate its efficacy on the course of the purulent wound process in rats. The study showed that the developed technology of 10-fold cyclic freezing makes it possible to significantly increase the amount of silver nanoparticles in the composition of textile-based sodium alginate wound dressing, primarily due to silver nanoparticles that have a diameter not larger than 15 nm, and are characterized by the highest antibacterial activity. The use of the developed wound dressing with silver nanoparticles reduces metabolic disturbances when the nonspecific defense system response occurs in the wound tissue; on the 3rd and 5th day after wounding less pronounced changes in free radical oxidation indices were found, the levels of antioxidant defence enzymes (catalase and superoxide dismutase) in wound tissue were lower than those observed after the use of wound dressing with silver nanoparticles, but not containing alginate, or after wound debridement without alginate or nanoparticles done every day.

Keywords: silver nanoparticles, alginates, electron microscopy, chemiluminescence, catalase, superoxide dismutase

ТЕРАНОСТИКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: РЕЗУЛЬТАТЫ МИРОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПУТИ РАЗВИТИЯ

© 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 16.09.2022 г.

После доработки 03.10.2022 г.

Принята к публикации 25.10.2022 г.

Тераностика — область медицины, занимающаяся разработкой средств, которые являются одновременно и терапевтическими агентами, и инструментами ранней диагностики заболеваний. Данный эффект обусловлен, в первую очередь, адресной доставкой агента в клетки-мишени. Разработка клинически эффективного тераностического препарата станет крупнейшим прорывом в медицине. В настоящем аналитическом мини-обзоре описаны современные подходы к решению задач тераностики онкологических заболеваний. Описываются последние исследования по применению радиофармпрепаратов и систем, которые обуславливают МРТ-визуализацию раковых опухолей, являясь одновременно и терапевтическим агентом; приводятся сведения об использовании различных систем с применением флуоресцирующих агентов, в частности — антистоксовых флуорофоров, сигнал от которых хорошо различим на фоне свечения тканей, окружающих раковые клетки, по сравнению с другими флуоресцирующими веществами. Также приводятся сведения о сравнительном применении классических химиотерапевтических агентов и перспективных препаратов на основе природных веществ, обладающих меньшей токсичностью, например, сульфорафана и цитохрома с.

Ключевые слова: онкология, тераностика, диагностика, терапия, антистоксовые флуорофоры, радиоонкология, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0006302923020187, EDN: CCUOTY

Классическим направлением тераностики онкологических заболеваний является применение радиоактивных изотопов, многие из которых тропны к определенным тканям. Это направление появилось одним из первых, и в настоящее время работы в данной области активно продолжаются. Так, авторы работы [1] сообщают об успешном применении в исследовании на людях методики, в сравнении с другими методами эффективно выявляющей метастазы рака простаты, — позитронно-эмиссионной томографии с использованием в качестве радиофармпрепарата ^{68}Ga (претерпевает β^+ -распад), связанного с лигандом к мембранной форме простатспецифического антигена. Во множестве сходных работ используется ^{177}Lu , претерпевающий β^- -распад; русскоязычный обзор [2] дает исчерпывающую информацию по данному поводу.

В настоящее время ведется разработка средств против нейроblastомы, альтернативных дину-

туксимабу — моноклональному антителу к гликофинголипиду GD2 — применение которого вызывает сильные побочные эффекты. Многие коллективы обратили внимание на метайодобензилгуанидин (содержащий ^{131}I) для лечения и диагностики нейроblastомы; сведения по этому вопросу обобщены в обзоре [3].

Однако применение радиоактивных источников сопряжено с рядом опасностей. Помимо того, что ионизирующее излучение само по себе является онкогенным фактором, следует обратить внимание на то, что в некоторых случаях оно может привести к развитию большей устойчивости раковых клеток за счет изменения функций белка p53 [4].

Главным поражающим фактором при действии ионизирующего излучения является развитие каскада свободнорадикальных реакций. Таким образом, индукция данного процесса в раковой клетке способна привести к ее гибели и без действия данного фактора. Авторы работы [5] приводят исчерпывающую информацию о раз-

Сокращение: МРТ — магнитно-резонансная томография.

личных подходах к использованию свободнорадикальных процессов в тераностике онкологии. Одна группа подходов подразумевает индукцию образования активных (а значит — короткоживущих) радикалов в раковых клетках посредством доставки в них определенных агентов и действия фактора-индуктора. Сюда можно отнести фотодинамическую, хемодинамическую, сонодинамическую и газовую (для запуска NO-обусловленного стресса) терапию, а также лечение гипоксического рака. Последнее предполагается за счет индукции радикалами $Cl^{\bullet}$ хлорного стресса за счет облучения раковых клеток, предварительно обогащенных $AgCl$, светом, приводящим к гомолитическому распаду данного соединения. Другая группа подходов предполагает использование стабилизированных радикалов, применение которых возможно в фототермической терапии, а также — для магнитно-резонансной и фотоакустической визуализации. Интерес вызывают работы [6, 7], посвященные противораковому действию сульфорафана, вызывающего индукцию образования активных форм кислорода в раковых клетках (при этом имеются данные о его возможном антиоксидантном действии на соматические клетки). Данный интерес обусловлен природным растительным происхождением данного вещества.

Уже далеко не первый год сразу несколькими научными группами ведется исследование применения комбинированных препаратов, основанных на одновременном цитотоксическом действии. Например, авторы работы [8] показали бóльшую эффективность совместного действия сульфорафана и фотодинамической терапии в сравнении с их применением по отдельности против раковых клеток головы и шеи человека.

Авторы работы [9] сообщают о разработке новой супрамолекулярной структуры для индукции окислительного стресса в раковых клетках, представляющей собой золотые наночастицы на подложке из черного фосфора, с которой связаны оксид марганца (MnO_2) и фосфолипид, выделенный из сои. MnO_2 обеспечивает истощение антиоксидантной системы раковой клетки и индукцию окислительного стресса. При действии ультразвука на данную структуру происходит активное образование Mn^{2+} , являющегося хорошим T1-агентом для улучшения визуализации опухоли при магнитно-резонансной томографии (МРТ). Состав системы в целом, также обеспечивает хорошее обнаружение ее при помощи МРТ. Система была апробирована на культуре клеток и мышцах.

Если вернуться к средствам против нейроblastомы, то новые разработки в этой области не сводятся только к использованию радиофармпрепаратов. Так, авторы работы [10] испытали на

мышцах «многофункциональную наномедицинскую» систему, основанную на доставке в клетки нейроblastомы доксорубина (классического химиотерапевтического препарата) и малых интерферирующих РНК, специфичных к транскрипту проонкогена MYCN. Адресность доставки обеспечивалась аптамером к GD2. В качестве достоинств своего метода авторы работы [10] назвали низкую токсичность и иммуногенность системы, а также более низкую, в сравнении с моноклональными антителами, стоимость средства доставки. Авторы работы [11] на культуре клеток нейроblastомы продемонстрировали возможности аптамерных рецепторов эпидермального фактора роста РНК для доставки агентов в экспрессирующие его раковые клетки. Далее планируется исследование на лабораторных животных.

В работе [12] сообщается об успешном применении в клинической практике системы для визуализации глиомы; доставка агента — за счет антитела к рецептору эпидермального фактора роста; флуоресцирующим агентом выступил Panitumumab-IRDye800 — конъюгат белка с эфиром IRDye800CW-N-гидроксисукцинимидом. Данный агент оказался гораздо более чувствителен по сравнению с 5-аминолевулиновой кислотой, официально одобренной ранее для применения в клинической практике [13]. С помощью препарата удалось визуализировать клетки глиомы, оставшиеся в организме после проведения хирургической операции по удалению опухоли.

Использование цитотоксических агентов химической природы — бурно развивающееся направление тераностики. Поскольку, в отличие от радионуклидов, данные химические токсины невозможно отслеживать по испускаемому ими излучению, то средство доставки необходимо также снабжать отдельными диагностическими агентами. В абсолютном большинстве работ — это флуорофоры, общие сведения о которых приведены в обзоре [14] и среди которых можно выделить:

- квантовые точки, обладающие выраженным побочным эффектом, а потому их перспективность для медицины сомнительна (отметим, что при этом имеются в последнее время данные об исследованиях $CdSe$ в целях тераностики интракраниальной глиобластомы [15]);

- золотые наночастицы (2–100 атомов), с которыми возможно связать множество агентов, но которые обладают слишком широким пиком эмиссии и, возможно, токсическим эффектом;

- кластеры атомов углерода различной структуры, от аморфной и графеноподобной до нанодIAMAZOV, не имеющие токсического эффекта, а потому потенциально вполне применимые в условиях организма;

- полупроводниковые частицы пористого кремния, хорошо подходящие для доставки и рН-

зависимого высвобождения цитотоксического агента, однако имеющие относительно небольшую в сравнении с квантовыми точками интенсивность свечения в окне прозрачности биологической ткани (в коротковолновой инфракрасной области);

— антистоксовые флуорофоры — наиболее перспективные, по мнению авторов работы [14] (отметим, что данные структуры — изобретение коллектива авторов [14, 16, 17], использующих наночастицы состава NaYF_4 , легированные Yb^{3+} и Er^{3+} или Tm^{3+}), имиджинговые агенты, главным свойством которых является более короткая длина волны испускаемого света по сравнению с возбуждающим, что в сочетании с продолжительным (до миллисекунд) временем жизни позволяет применять системы отложенной регистрации для более выраженного сигнала на фоне фотос шума от окружающих целевые клетки тканей.

Работы с антистоксовыми флуорофорами во многом посвящены разработке наиболее эффективного средства связывания белков с наночастицей. В Институте биоорганической химии РАН несколько лет назад были разработаны конструкции на основе связывания флуорофора с барстаром и антитела (или специфического к рецептору HER2 белка неиммуноглобулиновой природы DARPIn) с барназой. Взаимодействие барстара и барназы обеспечивает целостность конструкции, но поскольку в данном способе не контролируется сайт присоединения барстара к наночастице, он оказывается ориентированным в раствор случайным образом.

Куда более частый способ сборки подобных наночастиц для тераностики — это применение химического линкирования. Данные по подобной конструкции с антистоксовым флуорофором, соединенным с белковой конструкцией DARPIn-LoPE, осуществляющей доставку агента к клеткам аденокарциномы молочной железы с последующей их гибелью, приведены в работе [17]. Однако в этом случае лиганд к специфическому рецептору клетки-мишени также оказывается ориентирован в растворе случайно. Сюда же следует добавить, что идеального способа создания данных конструкций подобным путем не разработано.

Достаточное число работ посвящено модификациям белков для создания тераностических агентов. Авторы работы [18] использовали высокоэффективные пептидные лигазы (бутилазу-1 и VyPAL2) для модификации аффитела, нацеленного на рецептор эпидермального фактора роста, флуоресцентной меткой и митохондрионолитическим пептидом по его N- и C-концам. Также была получена циклическая форма аффитела, конъюгированного с доксорубицином. Оба модифицированных аффитела показали повышенную

цитотоксичность по отношению к клеткам линии A431 — в 10 и 100 раз по сравнению с неконъюгированным доксорубицином и свободным митохондрионолитическим пептидом соответственно. Об успешном применении лигазы VyPAL2 в сходном, в целом, исследовании сообщают и авторы работы [19]. В работе [20] была изучена протеаза McPAL1, действующая на связь после остатка Asp или Asn, но при этом обладающая лигазной активностью, что позволяет использовать ее для получения циклических полипептидов.

В патенте [16] представлен способ получения супрамолекулярной конструкции для тераностики на основе антистоксовых флуорофоров, при получении которой присоединение рекомбинантных белков KillerRed или mCherry к ним было более контролируемым в сравнение с аналогами, описанными выше. Это было достигнуто за счет аффинного взаимодействия остатков гистидина на C-конце белков с Ni^{2+} , содержащимся на поверхности флуорофора за счет связывания с нитрилоуксусной кислотой, присоединенной к полиакриловой кислоте, покрывающей частицу конфигурации ядро/оболочка состава $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}/\text{NaYF}_4$.

Еще одной работой в области тераностики, наряду с работой [9], предлагающей МРТ-визуализацию опухоли, является публикация [21], в которой представлен магнитный липидный наноконструктивный носитель, содержащий доксорубин для тераностики меланомы. Данная система обеспечивает хорошую визуализацию опухоли на МРТ и при этом под действием магнитного поля вызывает локальную гипертермию, приводящую к гибели клеток. Таким образом, авторы работы [21] разработали систему двухфакторного уничтожения раковых клеток.

В качестве еще одного магнитного средства доставки стоит упомянуть гибридные наночастицы на основе золота и оксида железа. В работах [22, 23] сообщается об их использовании для доставки экзогенного цитохрома c в клетки гепатоцеллюлярной карциномы (Huh-7D12) и эндотелиального рака печени человека (SK-hep1) совместно с применением различных химиотерапевтических агентов. Была показана гораздо большая эффективность такого подхода по сравнению с использованием только химиотерапевтических препаратов. Необходимо упомянуть, что имеются данные об использовании в качестве средства доставки цитохрома c и иных конструкций — его конъюгата с поликатионным пептидом [24], пористых частиц оксида кремния (IV) [25] и полипептидных мицелл [26].

В целом, применение экзогенного цитохрома c для терапии рака вполне можно считать перспективным направлением. Однако необходимо указать, что для действенного его применения в кли-

нической практике необходимо разработать эффективные формы препарата. Подробно эти проблемы освещены в аналитическом мини-обзоре [27].

Также ведется разработка оборудования для синтеза препаратов для нужд тераностики. В настоящее время наметилась тенденция к работе в малых объемах жидкостей и к созданию приборов с отличными от макроаналогов техническими характеристиками. Сюда можно отнести микрофлюидные устройства из полидиметилсилоксана для создания эмульсий [28]. В них возможно управление течением жидкостного и газожидкостного потоков нано- и пиколитровых объемов.

Основополагающей задачей в медицине можно считать адресную доставку лекарственных препаратов. В идеале следует разработать такой тераностический агент, который бы мог попадать в клетки различных опухолей. Описанные же выше работы предлагают препараты для пациентов, у которых уже либо известен, либо подозревается конкретный диагноз. Такой подход делает практически невозможной раннюю диагностику онкологических заболеваний в реальных условиях, — скажем, при проведении общих диспансеризаций. Перспективной можно считать разработку средств доставки, нацеленных на источники выработки ангиогенинов: раковые клетки таковыми и являются. В недавних же работах ангиогенины рассматривались лишь как маркеры классической диагностики онкологии [29, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышеизложенного можно сказать, что тераностика онкологических заболеваний — одно из наиболее перспективных и бурно развивающихся направлений медицины, в котором к началу третьего десятилетия XXI века разработано множество подходов и методов, главная цель которых — создание средств, одновременно направленных и на раннее выявление злокачественных новообразований, и на их терапию. Исследуется применение с этой целью различных радионуклидов и прочих агентов, направленных на индукцию окислительного стресса в раковых клетках, супрамолекулярных конструкций, содержащих цитотоксический агент и средство визуализации: разнообразные МРТ-контрастные вещества, флуорофоры, среди исследований возможности применения которых особо хочется отметить работы с использованием антистоксовых флуорофоров, наиболее эффективно визуализирующих клетки-мишени. При этом производство препаратов для нужд тераностики зачастую требует разработки нового промышленного оборудования, а потому данная сфера, помимо всего

прочего, актуализирует разработки в области инновационного приборостроения.

Однако для достижения основной цели тераностики необходимо разработать эффективное и, крайне желательно, универсальное средство доставки лекарственного агента в клетки-мишени. На настоящий момент же все описанные в мировой литературе средства доставки подходят лишь для конкретных опухолей. Поэтому для нужд массовой медицины, где требуется универсальное средство для действительно раннего выявления онкологических заболеваний различной этиологии, строго говоря, пока предложить нечего.

Таким образом, на настоящий момент задачу разработки более-менее универсального средства массовой ранней диагностики онкологических заболеваний, ориентированного на опухоли различной природы, считать решенной не представляется возможным.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Л. Долбов, А. А. Станжевский, Д. Н. Майстренко и др., Онкологич. журн.: лучевая диагностика, лучевая терапия, № 4 (4), 20 (2021).
2. А. А. Медведева, В. И. Чернов, Е. А. Усынин и др., Сибирский онкологич. журн., **20** (3), 115 (2021).
3. M. S. Rafael, S. Cohen-Gogo, M. S. Irwin, et al., PET clinics, **16** (3), 419 (2021).
4. О. А. Кучур, Д. О. Кузьмина, М. С. Духинова и А. А. Штиль, ActaNaturae, **13** (3), 65 (2021).
5. X. Q. Wang, W. Wang, M. Peng, and X. Z. Zhang, Biomaterials, № 266, 120474 (2021).
6. Z. Miao, F. Yu, Y. Ren, and J. Yang, Int. J. Mol. Sci., **18** (1), 72 (2017).
7. P. M. P. Ferreira, L. Rodrigues, L. P. de Alencar Carnib, et al., Curr. Pharmaceut. Design, **24** (40), 4779 (2018).
8. S. J. Lee, H. J. Hwang, J. I. Shin, et al., Gen. Physiol. Biophys., **34** (1), 13 (2015).
9. T. Chen, W. Zeng, C. Tie, et al., Bioactive Mater., **10**, 515 (2022).
10. L. Zhang, M. Wang, Z. Zhu, et al., Mol. Therapy. Nucl. Acids, **26**, 732 (2021).
11. А. М. Копылов, Л. В. Фаб, О. Антипова и др., Биохимия, **86** (8), 1217 (2021).
12. Q. Zhou, N. S. van den Berg, E. L. Rosenthal, et al., Theranostics, **11** (15), 7130 (2021).

13. C. G. Hadjipanayis and W. Stummer, *J. Neuro-oncol.*, **141** (3), 479 (2019).
14. Е. Л. Гурьев, С. Шанвар, А. В. Звягин и др., *Acta Naturae*, **13** (2), 16 (2021).
15. Р. Б. Тагаева, Б. П. Николаев, Л. Ю. Яковлева и др., *Рос. нейрохирургич. журн. им. проф. А. Л. Поленова*, № 13 (1), 89 (2021).
16. Е. Л. Гурьев, Е. А. Соколова и А. В. Звягин, Патент РФ № 2745187. Заявл. 11.02.2020, зарег. 22.03.2021 (Патентообладатель: Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского).
17. Е. Л. Гурьев, А. С. Смышляева, Н. Ю. Шилягина и др., *Докл. РАН*, **491** (1), 137 (2020).
18. Z. Wang, D. Zhang, X. Hemu, et al., *Theranostics*, **11** (12), 5863 (2021).
19. D. Zhang, Z. Wang, S. Hu, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **143** (23), 8704 (2021).
20. H.T. Liew, J. To, X. Zhang, et al., *J. Biol. Chem.*, 297 (6), 101325 (2021).
21. L. Garcia-Hevia, I. Casafont, J. Oliveira, et al., *Bioactive Mater.*, **8**, 153 (2022).
22. W. Al-Shakarchi, A. Alsuraifi, A. Curtis, and C. Hoskins, *Pharmaceutics*, **10** (2), 63 (2018).
23. W. Al-Shakarchi, A. Alsuraifi, M. Abed, et al., *Pharmaceutics*, **10** (2), 48 (2018).
24. P. Imesch, D. Scheiner, E. Szabo, et al., *Exp. Therap. Med.*, **6** (3), 786 (2013).
25. E. Choi, D. K. Lim, and S. Kim, *J. Colloid Interface Sci.*, **560**, 416 (2020).
26. X. S. Sun, M. S. Jang, Y. Fu, et al., *Mater. Sci. Engineer. C — Materials for biological applications*, **114**, 111069 (2020).
27. Л. А. Ромодин, *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*, № 5, 6 (2021).
28. Н. С. Заурин, Е. О. Лазарева и Д. В. Королев, *Наука настоящего и будущего*, № 1, 62 (2021).
29. D. Yu, J. Sun, Y. Weng, et al., *Anti-Cancer Drugs*, **32** (7), 703 (2021).
30. A. H. Aalami, H. Abdeahad, M. Mesgari, et al., *BioMed. Res. Int.*, № 2021, 5557309 (2021).

Theranostics for Oncological Therapy: Results from Worldwide Research and the Paths of Development

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, Volokolamskoe shosse 11, Moscow, 125080 Russia

Theranostics is a field of medicine with the aim to establish tools for a specific targeted therapy based on early diagnosis of diseases. This effect is primarily due to targeted delivery of the therapeutic agent to the target cells. The development of a clinically effective theranostic drug will be the greatest medical breakthrough. This paper presents an analytical mini-review of some modern approaches to find a solution to the core of the problems of theranostics for oncological therapy and discusses recent studies on the use of radiopharmaceuticals, that can be diagnostic and therapeutic, and systems for visualization of radiopharmaceuticals by means of magnetic resonance imaging for therapy of cancerous tumors. Information is given on application of various systems using fluorescent agents such as anti-Stokes fluorophores, the signal from which is well observed, compared to other fluorescent substances, on a background of the reflected irradiance from tissues surrounding cancer cells. This paper also presents details on the comparative use of classical chemotherapeutic agents and promising drugs developed on the basis of natural substances, for example, sulforaphane and cytochrome c, that have lower toxicity.

Keywords: *oncology, theranostics, diagnostics, therapy, anti-Stokes fluorophores, radiation oncology, oxidative stress*

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО КОНТРОЛЯ УРОВНЯ ОКСИГЕНАЦИИ КРОВИ

© 2023 г. М.М. Гузенко*, #, М.С. Мазинг*, А.Ю. Зайцева*

*Институт аналитического приборостроения РАН, ул. Ивана Черных, 31-33, Санкт-Петербург, 198095, Россия

#E-mail: maria51m@mail.ru

Поступила в редакцию 26.04.2022 г.

После доработки 22.10.2022 г.

Принята к публикации 24.10.2022 г.

Разработана и испытана интеллектуальная оптическая система медицинской экспресс-диагностики. Продемонстрирован способ визуализации кислородного статуса биологических тканей в виде «цифровых образов», описывающих общее функциональное состояние организма человека. Показана возможность применения метода главных компонент и иерархической кластеризации в купе с оптическими методами детектирования форм гемоглобина в биологических тканях для неинвазивного контроля и экспресс-диагностики кислородного статуса организма человека. Результаты исследования говорят о возможности дифференциации испытуемых на группы риска по показаниям оптических измерений. В отличие от пульсоксиметрии, применение которой распространено для определения уровня оксигенации крови, представленный метод способен оценить периферический кислородный статус, благодаря этому можно вовремя заметить тромбозы и ишемии конечностей.

Ключевые слова: сенсорная система, оптические сенсоры, машинное обучение, метод главных компонент, кислородный статус тканей.

DOI: 10.31857/S0006302923020199, EDN: CDEUXP

В последнее время особенно остро стоит проблема оценки функционального состояния человека в ходе реабилитации после перенесенного заболевания. Для наблюдения за восстановлением в динамике критически важно обращать внимание на качество доставки кислорода к биологическим тканям [1, 2].

Транспорт кислорода в тканях регулируется изменением сродства гемоглобина к кислороду, при гипоксии происходит образование метаболитов гемопротеидов (цитохромов), при патологических процессах в тканях повышается уровень порфиринов, с возрастом накапливаются липофусцин и протопорфирин IX [3]. Кислородный статус тканей человека определяется по содержанию основных фракций гемоглобина, его степени насыщения кислородом.

Отслеживание качества доставки, потребления и снабжения тканей кислородом давно стало одним из основополагающих методов оценки состояния организма человека в клинической практике. В наше время для измерения содержания кислорода и качества его переноса к тканям ис-

пользуются инвазивные методы (их золотым стандартом можно считать метод BGA — анализ газового состава крови), такие методы достаточно точные, однако не отслеживают процессы в динамике [4–6].

Также возможно использование неинвазивных методов, самым популярным из них считается пульсоксиметрия. В основе метода лежит спектрофотометрический способ определения насыщения крови кислородом. Данный метод, хоть и удобен, но слишком чувствителен к внешним факторам, таким как движение и яркий свет, красители (даже лак на ногтях), неправильное расположение датчика. Кроме того, было замечено, что сердечные аритмии могут нарушать восприятие пульсоксиметром сигнала [7, 8]. Также пульсоксиметр может дать характеристику только локальной оксигенации, тогда как необходимо следить за всем периферическим кислородным статусом, ведь частыми осложнениями после заболеваний являются тромбозы и ишемии конечностей [9–12].

Для решения проблемы доступной диагностики и мониторинга кислородного статуса тканей была разработана и испытана неинвазивная оп-

Сокращение: ЧСС — частота сердечных сокращений.

тическая система видимого и ближнего ИК-диапазонов длин волн. Такая система проста в использовании и подходит для эксплуатации вне медицинского учреждения.

Для качественной обработки данных и удобства их восприятия были использованы методы машинного обучения, визуализации и распознавания «цифровых образов» состояния биологических тканей. Информационно-вычислительный модуль системы использовал статистические алгоритмы и методы математического моделирования для анализа и визуализации массива данных в виде «цифровых образов», представленных радиальными диаграммами. Обработка данных происходила с использованием метода главных компонент и иерархической кластеризации [13–16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработанная оптическая система для неинвазивного контроля и экспресс-диагностики кислородного статуса организма человека состоит из двух модулей — оптико-электронного и вычислительно-информационного. Принцип работы системы основан на процессах поглощения и рассеяния света, направленного на ткани, а также на зависимости количества обратно рассеянного излучения от глубины проникновения квантов света и максимального поглощения их составляющими тканей (спектрофотометрия в обратно рассеянном свете). В основе метода лежит способность фотоприемника регистрировать спектральные интенсивности части света, измененных после прохождения через биологические ткани: в зависимости от присутствия определенных веществ в исследуемых тканях оптические свойства изменяются по-разному [17, 18].

Оптико-электронный модуль системы представляет собой 18-канальный сенсорный интегральный оптический анализатор спектров видимого и ближнего инфракрасного диапазонов, который основан на отладочной плате AS7256x производства компании AMS AG (Австрия). Плата AS7256x объединяет в себе 18 фоточувствительных элементов, работающих в оптическом диапазоне на длинах волн от 410 до 940 нм, а также 16-битные встроенные АЦП, предназначенные для преобразования детектируемых оптических аналоговых сигналов в цифровые. Для обеспечения устройства источниками оптического излучения авторами были осуществлены подбор и ручная поверхностная установка трех SMD светодиодов типоразмера 3216: белого (Kingbright, KP-3216QWF-D), красного (Kingbright, KP-3216SRC-PRV) и инфракрасного света (Kingbright, KP-3216F3C). Таким образом, в качестве

источника излучения белого света был выбран белый люминофорный SMD светодиод на основе гетероструктур нитрида галия GaN. Несмотря на то, что спектр излучения белого SMD светодиода не является широкополосным излучением (например, как спектр у солнца или галогеновых ламп), все же спектр переизлучения светодиодов в такой конфигурации захватывает достаточно широкую область видимого диапазона от красного до синего цвета с определенным провалом в области сине-зеленого цвета.

Информационно-вычислительный модуль осуществляет управление и отображение полученных значений, он представлен математической моделью статистических алгоритмов обработки и анализа многомерных данных. Математическая модель статистических алгоритмов представлена целым набором математических методов машинного обучения, классически используемых для разведывательного интеллектуального анализа данных, а также для распознавания и визуализации образов. В работе было предложено использовать такие методы как метод главных компонент, наиболее популярные иерархические (методы одиночной, средней и полной связи) и неиерархические методы кластеризации (методы k -means и PAM). Обучение системы заключается в создании «образа эталона» исследуемой биологической ткани [11]. Далее исследуемый «образ объекта» распознается и визуализируется. Для реализации всех предложенных методов машинного обучения с целью комплексного анализа данных в ходе работы авторами был разработан программный модуль, который осуществляет загрузку подлежащих анализу двумерных числовых таблиц в программу и применяет к ним различные алгоритмы машинного обучения с последующей визуализацией полученных результатов анализа в удобной форме. Программный модуль был написан на языке R в графическом интерфейсе R Studio.

Помимо этого, разработанная оптическая система представлена не одним сенсором, а целым набором (массивом) оптических датчиков, регистрирующих обратно-рассеянный в тканях свет на разных длинах волн (мультисенсорная система). Стандартно в исследованиях с использованием мультисенсорных систем «цифровые отпечатки» могут быть представлены в виде многогранников (радиальных диаграмм) с числом вершин, совпадающим с числом используемых сенсоров. Таким образом, в работе после первичной обработки полученных данных (стандартизации данных) отклики 18 оптических сенсоров представлялись в виде лепестковых диаграмм с 18 вершинами.

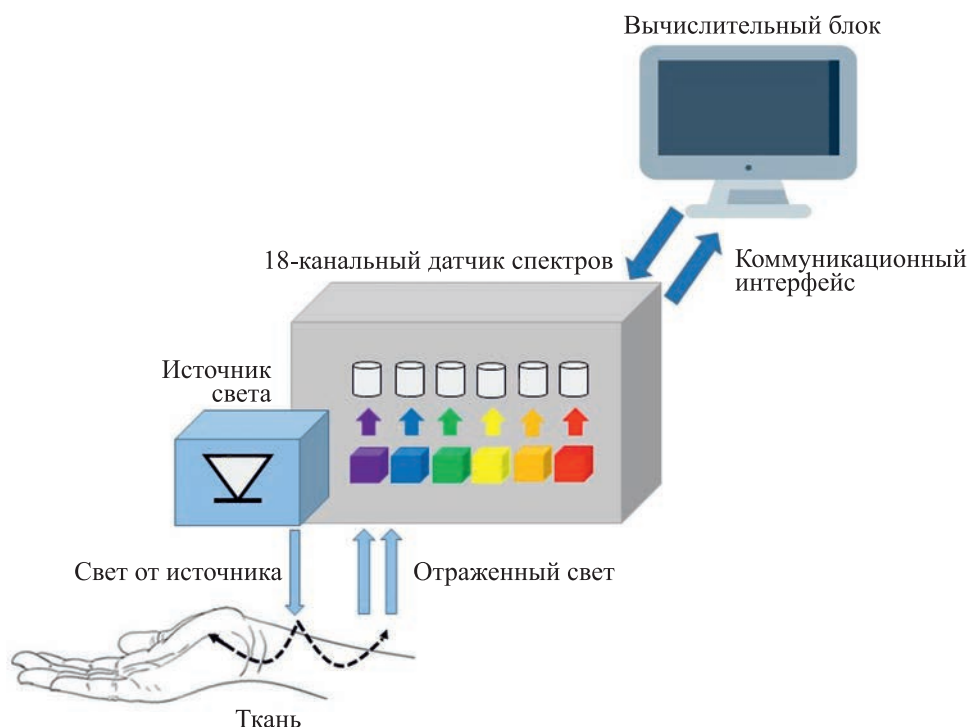


Рис. 1. Блок-схема диагностической сенсорной системы анализа кислородного статуса тканей человека.

В процессе обучения системы предъявляется матрица известных «образов эталонов», для которых вычисляются и запоминаются средние значения осей многогранника и их средние квадратичные отклонения. Статистические параметры матрицы «образов эталонов» заносятся в базу данных.

Распознавание образов включает в себя формирование «образа объекта» за несколько циклов предъявления исследуемого образца, вычисление и запоминание его статистических параметров, а также их сравнение с значениями матрицы «образа эталона» того же типа.

В процессе исследования был разработан макет корпуса прибора, ограничивающий поступление дневного света к датчикам при проведении измерений. Схема неинвазивной оптической системы для диагностики кислородного статуса тканей человека изображена на рис. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель экспериментальных исследований заключалась в получении результатов измерений с помощью оптической диагностической системы в виде матрицы значений восемнадцати оптических сенсоров. В экспериментальных исследованиях приняли участие семь испытуемых мужского пола в возрасте от 18 до 23 лет. В результате

комплексного медицинского осмотра наличие серьезных медицинских отклонений или патологий у испытуемых выявлено не было.

Физическая нагрузка организма человека, которой подвергались испытуемые, представляла собой выполнение пробы Штанге, существенно влияющей на физиологические изменения в функционировании организма, а также отражающей устойчивость организма к состоянию гипоксии — пониженному содержанию кислорода в крови, тканях и органах [19].

При проведении экспериментальной оценки физической нагрузки организма оптическую экспресс-систему помещали на предплечье левой руки. Также был использован секундомер для фиксирования времени от момента начала физических упражнений (приседаний) до их окончания. Оптическая система проводила измерения в непрерывном режиме каждые 3 с до физической нагрузки организма испытуемого, в течение и после нее. Данные измерения позволили получить массив данных, отражающих изменение уровня оксигенации крови испытуемых в условных единицах. Состояние измерительной системы в режиме сбора данных до физической нагрузки длилось 60 с, после нагрузки — 240 с. Параллельно с экспериментальным исследованием было проведено независимое медико-биологическое исследование под наблюдением медицинского персонала.

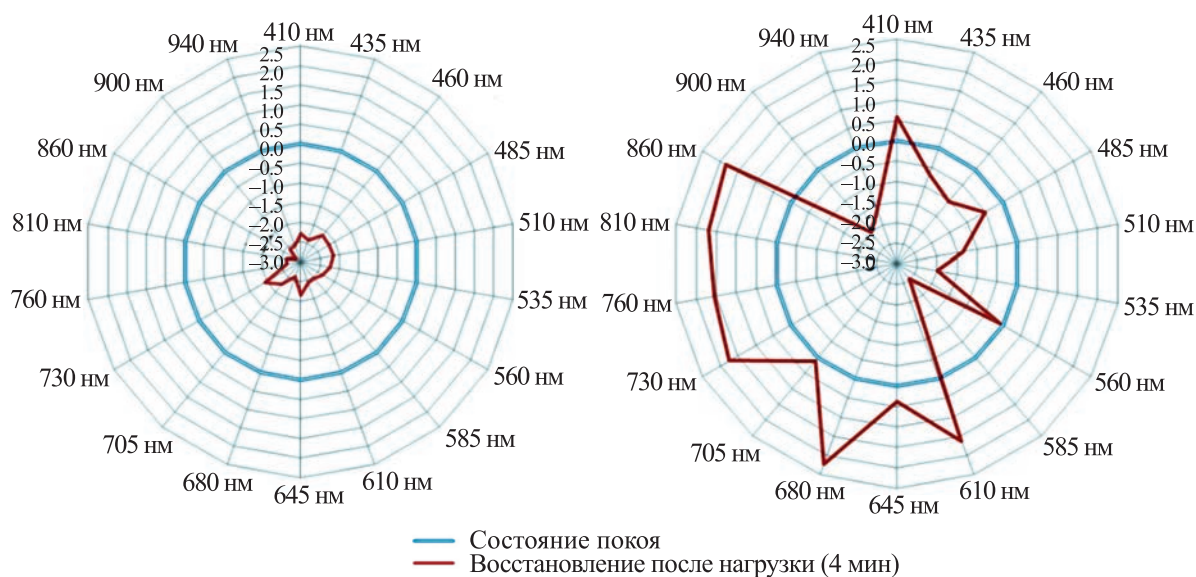


Рис. 2. «Цифровые образы» испытуемых с различными уровнями адаптированности к изменению уровня оксигенации. Красный график отражает показания датчиков спустя 4 мин после физической нагрузки, нормированные по показаниям датчиков в состоянии покоя.

Исследование также представляло собой проведение классической пробы Штанге, только при этом оценивались продолжительность задержки дыхания на вдохе (проба Штанге) и показатель реакции частоты сердечных сокращений (ЧСС) [20, 21]. Последний параметр отражает изменение ЧСС при проведении эксперимента и равен отношению ЧСС через 30 с после окончания физической нагрузки к ЧСС за 30 с до физической нагрузки. При отклонении показателя реакции от значения 1.2 в большую сторону можно говорить о недостаточной компенсаторно-адаптационной реакции сердечно-сосудистой системы организма испытуемого при недостатке кислорода.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе обработки и визуализации экспериментальных данных были построены индивидуальные радиальные диаграммы для каждого испытуемого. Они представляли собой восемнадцатигранные, на осях которых отложены стандартизированные показания, считанные с 18 датчиков. Стандартизация данных осуществлялась для приведения всех показаний датчиков к одному диапазону. В ходе работы авторами было предложено применение оптимальной методики стандартизации данных, которая представляла собой использование базового метода Z-оценки при котором расчет стандартизированной величины z производится по формуле (1):

$$Z = \frac{x - \bar{X}}{S_x}, \quad (1)$$

где x – исходная величина, $\bar{X}$ – среднее значение всей выборки, S_x – стандартное отклонение всей выборки.

Однако при расчетах вместо среднего значения всей выборки в формулу подставляли среднее значение показаний датчиков до начала нагрузки. Таким образом, все показания оптических датчиков были стандартизированы относительно состояния покоя, что впоследствии повысило информативность анализа. Полученные диаграммы отражают индивидуальный кислородный статус, уникальный для каждого испытуемого, они представляют собой «цифровые образы», описывающие общее функциональное состояние организма. Примеры полученных «цифровых образов» до и после физической нагрузки приведены на рис. 2.

Как видно из графиков, у испытуемых наблюдаются разные уровни адаптированности к изменению уровня оксигенации. При этом, согласно независимому медико-биологическому исследованию, испытуемые с уровнем адаптированности как на рис. 2 (слева) имеют наилучшие результаты в пробе Штанге (показатель реакции меньше 1, большая длительность задержки), тогда как испытуемые с тенденцией как на рис. 2 (справа), наоборот, показали неудовлетворительные результаты в дыхательной пробе (показатель реакции больше или равен 1.2), что говорит о неблагопри-

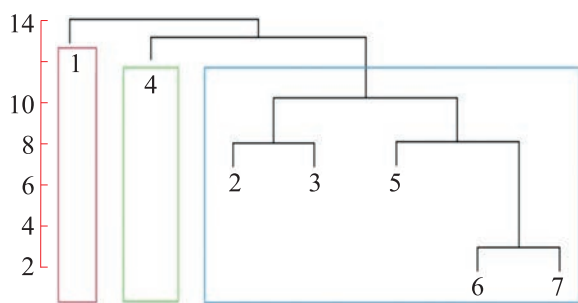


Рис. 3. Результат кластеризации методом одиночной связи. Семь пациентов распределяются по трем кластерам, расстояние между кластерами определяется расстоянием между ближайшими объектами в различных кластерах.

ятной реакции сердечно-сосудистой системы на недостаток кислорода. Таким образом, с точки зрения здоровья испытуемого хорошим результатом является представленный на рис. 2 (слева), когда через 4 мин после задержки дыхания показатели или восстанавливаются до показателей, зарегистрированных в состоянии покоя, или наблюдается снижение уровня показателей относительно показателей, зарегистрированных в состоянии до проведения функциональной нагрузки, как отображено на рис. 2 (слева).

Возможность наблюдения таких динамических изменений уровня интенсивности обратного рассеяния света в тканях с помощью оптических методов связано с изменением количественных соотношений оксигемоглобина и дезоксигемоглобина в крови и в тканях при гипоксическом воздействии. Помимо этого, под нагрузкой может происходить расширение капиллярных сосудов (реакция сосудов на функциональную нагрузку), что приводит к изменению величин рассеивающих и поглощающих площадей.

После построения образов показания каждого из 18 сенсоров после физической нагрузки испытуемых в виде многомерных данных были использованы для кластерного анализа с применением метода иерархической кластеризации и метода главных компонент.

Визуализация кластеризации многомерных данных методом одиночной связи представлена на рис. 3, на нем изображена дендрограмма, листья которой представляют собой номера испытуемых. В этом методе расстояние между двумя кластерами определяется расстоянием между двумя наиболее близкими объектами (ближайшими соседями) в различных кластерах.

В ходе кластеризации данным методом испытуемые разделились на три группы. Оптимальное количество кластеров (равное трем) было оцене-

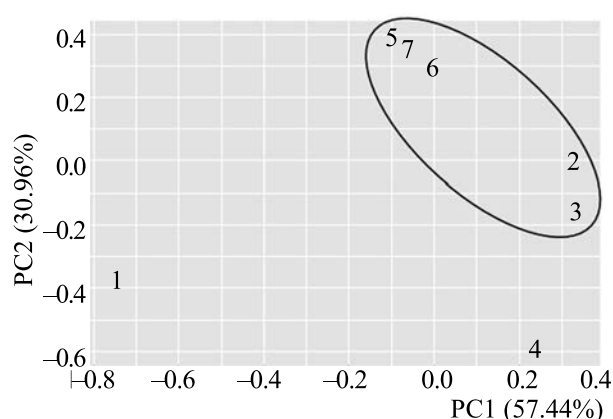


Рис. 4. Результат кластеризации с помощью метода главных компонент в пространстве первых двух главных компонент по 18 переменным для семи испытуемых.

но с помощью известного эмпирического статистического алгоритма машинного обучения — методом локтя (Elbow method). При этом в группу 1 согласно независимому медико-биологическому исследованию попал испытуемый с неудовлетворительной реакцией на нагрузку, в группу 2 — испытуемый с нормальной реакцией, а в группе 3 были объединены испытуемые с хорошей реакцией на дыхательную пробу.

Кроме того, была проведена оценка экспериментальных данных методом главных компонент для уменьшения размерности многомерных данных и поиска статистических взаимосвязей между ними. Метод главных компонент представляет собой ортогональное линейное преобразование, которое отображает данные из исходного пространства признаков в новое пространство меньшей размерности [22, 23]. Испытуемые были разделены на три группы, они изображены на рис. 4.

Таким образом, полученные распределения успешно соотносятся с реальными медицинскими показаниями о компенсаторно-адаптационных реакциях испытуемых, снятых независимо от проведения эксперимента. Полученные результаты независимого медико-биологического исследования подтвердило сходство и различия испытуемых по реакции на гипоксическую пробу и подтвердило возможность разбиения испытуемых на три условных группы с разным уровнем адаптированности и устойчивости к гипоксии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментальных исследований и последующей математической обработки был получен набор «цифровых обра-

зов», которые отражают компенсаторно-адаптационную реакцию испытуемого на нагрузку, по которым можно судить об уровне и динамике отклонений кислородного статуса испытуемых от эталонных значений. Проведена кластеризация групп испытуемых с различными уровнями оксигенации крови. Показана возможность выявления различимости испытуемых между собой по оптическим измерениям.

Таким образом, данное исследование демонстрирует эффективность применения математических методов обработки больших массивов информации вкупе с оптическими методами неинвазивного контроля для экспресс-диагностики кислородного статуса биологических тканей при оценке функционального статуса организма человека, а также для микроциркуляторного мониторинга тканей. Было показано, что использование предложенного метода позволяет выявлять скрытые закономерности в оптических данных, а полученные результаты отражают реальную компенсаторно-адаптационную реакцию человека на функциональную нагрузку. В дальнейшем требуется проведение исследований для оценки тенденции изменения показаний системы у различных групп испытуемых и увеличение общего набора статистических данных для проведения более глубокого факторного анализа. Полученные результаты позволяют рекомендовать разработанную неинвазивную оптическую сенсорную систему в качестве аппаратно-программного комплекса поддержки принятия врачебных решений, а также как автоматизированную систему экспресс-диагностики кислородного обеспечения тканей человека и оценки нарушений тканевой микрогемодинамики.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания № 075-00280-21-00 по теме «Новые подходы к разработке аналитических систем на основе генетических, физико-химических и иммунных методов исследования» СУ НИР 0074-2019-0013.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья людей с соблюдением всех принципов гуманности и этических норм (Хельсинкская декларация WMA, 2013 г.). От всех участников экс-

периментов было получено информированное согласие на проведение исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. П. Кислякова, А. Л. Буляница, Ю. Я. Кисляков и В. И. Гуляев, Научное приборостроение, **26** (2), 37 (2016).
2. Yu. Ya. Kislyakov, S. A. Avduchenko, L. P. Kislyakova, and A. Yu. Zaitceva, J. Comput. Theor. Nanosci., **16**, 4502 (2019).
3. А. В. Абрамцова и В. Ю. Куликов, Медицина и образование в Сибири, **2**, 8 (2011).
4. M. T. Ganter, U. Schneider, M. Heinzelmann, et al., J. Clin. Anesth., **19**, 569 (2007).
5. J. Kofstad, Scand. J. Clin. Lab. Inv., **41** (4), 409 (1981).
6. I. Hennessey and A. Japp, *Arterial blood gases made easy* (CBS, Churchill Livingstone, 2007).
7. R. Beasley, A. McNaughton, and G. Robinson, Lancet, **367**, 1124 (2006).
8. D. P. Davis, J. Q. Hwang, and J. V. Dunford, Prehosp. Emerg. Care, **12**, 46 (2008).
9. K. Warrior, P. A. Chung, N. Ahmed, et al., Crit. Care Explor., **2** (6), 140 (2020).
10. M. Javid, T. R. Magee, and R. B. Galland, Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., **35** (1), 84 (2008).
11. H. Obara, K. Matsubara, and Yu. Kitagawa, Ann. Vasc. Diseases, **11** (4), 443 (2018).
12. S. Nitecki, B. Brenner, A. Hoffman, et al., Eur. J. Vasc. Surg., **7** (4), 414 (1993).
13. J. Yang, D. Zhang, A. F. Frangi, and J. Yang, IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell., **26** (1), 131 (2004).
14. A. Daffertshofer, C. J. C. Lamoth, O. G. Meijer, and P. J. Beek, Clin. Biomech. **19** (4), 1 (2004).
15. F. Murtagh and P. Contreras, WIREs: Data Mining and Knowledge Discovery, **7** (3), 1219 (2017).
16. S. C. Johnson, Psychometrika, **32**, 241 (1967).
17. A. Yu. Zaitceva, L. P. Kislyakova, Yu. Ya. Kislyakov, and S. A. Avduchenko, J. Phys.: Conf. Ser. **1400** (3), 3022 (2019).
18. Yu. Ya. Kislyakov, S. A. Avduchenko, L. P. Kislyakova, and A. Yu. Zaitceva, J. Comput. Theor. Nanosci. **16**, 4502 (2019).
19. Д. О. Кирсанов, Дисс. ... д-ра хим. наук (СПбГУ, СПб., 2014).
20. G. E. P. Box and N. R. Draper, *Empirical Model-Building and Response Surface* (Wiley, N.-Y., 1987).
21. Р. М. Воронин, Актуальные проблемы медицины, **14** (10), 173 (2011).
22. K. H. Esbensen, *Multivariate Data Analysis — in practice. An introduction to multivariate data analysis and experimental design* (CAMO AS, Oslo, 2001).
23. I. T. Jolliffe, *Principal component analysis* (Springer Science & Business Media, N.-Y., 2002).

Application of Optical Analysis Methods for Non-Invasive Monitoring of Blood Oxygen Saturation Level

M.M. Guzenko*, M.S. Mazing*, and A.Yu. Zaitseva*

**Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences,
ul. Ivana Chernykh 31-33, St. Petersburg, 198095 Russia*

An intelligent optical system for medical express diagnostics has been developed and tested. A method for visualizing the oxygen status of biological tissues in the form of "digital images" describing the general functional state of the human body is demonstrated. It has been shown that the method of principal components and hierarchical clustering can be used in combination with optical methods for detecting hemoglobin forms in biological tissues to perform non-invasive monitoring and express diagnostics of the oxygen status of the human body. The results obtained show that it is possible to stratify the subjects into risk groups based on optical sensor readings. In comparison with pulse oximetry, the use of which is common for determining the oxygen saturation level of blood, the described method can be employed to estimate peripheral oxygen saturation, and thus thrombosis and ischemia of the extremities can be detected in time.

Keywords: sensory system, optical sensors, machine learning, principal component method, oxygenation status in tissues

УДК 340.624.41

ПРОГНОЗ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОРГАНИЗМА СПОРТСМЕНОВ ПО АКАДЕМИЧЕСКОЙ ГРЕБЛЕ НА ОСНОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ

© 2023 г. В.И. Пустовойт*,#, Т.А. Астрелина*, Е.И. Балакин*, И.В. Кобзева*, Ю.Б. Сучкова*, А.В. Хан*, А.А. Муртазин*, Н.Ф. Максютлов*, В.А. Брумберг*

ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России
ул. Маршала Новикова, 23, Москва, 123098, Россия

*E-mail: vpust@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.07.2022 г.

После доработки 19.07.2022 г.

Принята к публикации 01.11.2022 г.

Определение состояния метаболизма является актуальной проблемой в спортивной медицине. Биохимические и гематологические показатели крови отражают преобладание анаболических или катаболических процессов в метаболизме, которые зависят от интенсивности и продолжительности тренировок. Для определения преобладания метаболических процессов было проведено исследование, в которое вошел 21 спортсмен-гребец мужского пола (возраст: 22.55 ± 3.68 года, рост: 189.62 ± 6.34 см, вес: 88.65 ± 8.55 кг). Мониторинг параметров крови и уровня интенсивности тренировок позволил установить линейно-дискриминантную функцию, с помощью которой были определены восемь основных параметров крови, позволяющих прогнозировать метаболическое состояние: креатинин ($p < 0.001$), мочевиная кислота ($p < 0.001$), мочевиная ($p < 0.001$), тестостерон ($p < 0.001$), щелочная фосфатаза ($p < 0.001$), альбумин ($p < 0.05$), общий кальций ($p < 0.05$), общий белок ($p < 0.05$). Достоверность разработанного прогноза метаболической активности спортсменов с использованием линейно-дискриминантных функций подтверждена сильной положительной корреляцией ($r = 0.88$; $p < 0.001$) с результатами оценки активности нейроэндокринной системы. Точность определения метаболического состояния составила 91.8%.

Ключевые слова: гребля; регуляция метаболизма; биохимический анализ крови; дискриминационная модель.

DOI: 10.31857/S0006302923020205, EDN: CDMJII

Интенсивные физические нагрузки оказывают существенное воздействие на метаболические процессы в организме спортсменов и, соответственно, происходит изменение биохимических показателей, что можно выявить по лабораторным анализам сыворотки крови. Первостепенной задачей спортивного врача, является своевременное определение и предоставление информации тренеру и спортсмену о функциональном состоянии систем организма.

В настоящее время есть огромная потребность в определении предикторов, описывающих изменения в метаболических механизмах регуляции

организма в период годичного тренировочного макроцикла.

Длительные физические нагрузки сопровождаются высокой метаболической активностью в системах организма с повышением показателей креатинфосфокиназы (КФК) и ее миокардиальной изоформы (КФК-МВ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и миоглобина, которые обычно повышаются после тренировки. Увеличение данных показателей в периферическом кровеносном русле связано с нарушением метаболических процессов в мышечной ткани вследствие истощения функциональных резервов организма [1–8]. Повышение концентрации в периферической крови АСТ, аланинаминотрансферазы (АЛТ), ЛДГ и γ -глутамилтрансферазы (ГГТ) служит предвестником нарушения процессов метаболической активности в печени в ответ на длительные физические нагрузки [1, 8–14].

Сокращения: КФК — креатинфосфокиназа, КФК-МВ — миокардиальная изоформа креатинфосфокиназы, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, АСТ — аспартатаминотрансфераза, ЩФ — щелочная фосфатаза, АЛТ — аланинаминотрансфераза, ГГТ — γ -глутамилтрансфераза, ЛПВП — липопротеиды высокой плотности, ЛДФ — линейно-дискриминантная функция.

Увеличение значений ЩФ подтверждает преобладание процессов катаболизма белковых и аминокислотных соединений, а также гидролиза жиров с целью поддержания гомеостаза в период длительной физической нагрузки [15, 16].

Известно, что повышение концентрации мочевой кислоты, креатинина и мочевины в сыворотке крови характеризует увеличение интенсивности процессов катаболизма белковых и аминокислотных соединений, а также изменение функциональной активности почек [17–21]. Динамика этих показателей находится в сильной корреляционной связи с интенсивностью и длительностью физических нагрузок [18, 22, 23], что предполагает использование показателей концентрации мочевой кислоты, креатинина и мочевины в качестве предикторов активности метаболических процессов.

Предыдущие исследования показали, что биохимические и гематологические показатели крови характеризуются значительными изменениями в течении годового макроцикла, что, по-видимому, связано с интенсивностью физических нагрузок и воздействием экзогенных факторов [24].

Динамический мониторинг показателей сыворотки крови предоставляет возможность определить предикторы, которые станут ценным инструментом для своевременного изменения схемы нутритивно-метаболической поддержки и тренировочного процесса или оценки эффективности проводимых корректирующих процедур, что позволит предотвратить перетренированность спортсменов.

Цель исследования заключается в разработке диагностической модели прогноза преобладания метаболических процессов регуляции в организме спортсменов, опирающейся на значимые предикатные показатели биохимического анализа крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участники. В клинко-лабораторном исследовании добровольно принял участие 21 спортсмен мужского пола (возраст — 22.55 ± 3.68 года, рост — 189.62 ± 6.34 см, масса тела — 88.65 ± 8.55 кг, индекс массы тела — 24.58 ± 2.78 , жировая масса — 16.17 ± 2.79 кг, тощая масса — 72.47 ± 3.39 кг, активная клеточная масса — 44.12 ± 2.13 кг, скелетно-мышечная масса — 39.88 ± 1.8 кг, общая жидкость — 53.06 ± 2.46 кг, внеклеточная жидкость — 20.97 ± 1.12).

Все испытуемые спортсмены входят в сборную по академической гребле. Перед началом исследования они были проинформированы о возможных рисках и неудобствах, связанных с процедурами забора крови, после этого подписывалась

форма информированного согласия на участие. На момент исследования обследуемые лица были некурящими, по результатам прохождения углубленного медицинского обследования (в которое входили инструментальные обследования — флюорография, ультразвуковое обследование брюшной полости и органов малого таза, эхокардиография, электрокардиография; нагрузочное тестирование «до отказа», общий анализ мочи, биохимический и общий клинический анализ крови; также проводились осмотры врачами — офтальмологом, отоларингологом, хирургом, кардиологом, неврологом, стоматологом, эндокринологом и терапевтом) все участники были признаны здоровыми. В период клинко-лабораторных исследований спортсмены не принимали фармакологические препараты и биологически активные добавки, которые могли бы повлиять на метаболические процессы в организме обследуемых лиц. Физические нагрузки проходили по полтора часа, дважды в день в течение шести дней в неделю.

Для того чтобы подчеркнуть преобладание катаболических или анаболических процессов в метаболических механизмах регуляции организма во время годового макроцикла, основывались на общепринятых (в спорте высших достижений) биомаркерах сыворотки крови, клинической картине, концентрации гормонов гипоталамо-гипофизарной системы. Для выявления корреляций между текущим состоянием метаболической системы и биохимическими показателями спортсмены разделялись на две группы в зависимости от донозологической формы на оптимальное состояние и с наличием признаков утомления или переутомления организма спортсменов, связанные с изменениями биохимических процессов для поддержания гомеостаза. Выраженность катаболических или анаболических механизмов регуляции определяется интенсивностью и продолжительностью физических нагрузок. Данные изменения в организме спортсменов сочетаются с высокой активностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой осью и подтверждаются повышением концентраций в крови продуктов катаболизма белковых и аминокислотных соединений, перекисного окисления липидов и нуклеиновых кислот. Интенсивная и длительная физическая нагрузка сопровождается изменениями скорости метаболизма регуляции организма с образованием биохимических сдвигов в плазме крови, подтверждающих нарушение обменных процессов в мышечных тканях и внутренних органах.

Прогнозирование механизмов преобладания метаболического (анаболический или катаболический) процесса организма спортсмена, как на текущий момент времени, так и его изменение в динамике четырехлетнего макроцикла, является первостепенной задачей в спортивной медицине.

Новый подход к объективному контролю процессов катаболизма и анаболизма предоставит возможность эффективного управления мероприятиями подготовки спортсмена при достижении высшей цели.

Причиной такого разделения послужил тот факт, что функциональное состояние организма существенно различается по метаболическим потребностям из-за различий в энергетических процессах, протекающих до момента полноценного восстановления. Выраженность катаболических или анаболических механизмов регуляции определяется интенсивностью и продолжительностью физических нагрузок.

Разработка модели прогноза преобладания механизмов регуляции (анаболический или катаболический) организма спортсменов, по академической гребле, как на текущий момент времени, так и его изменение в динамике годового макроцикла, является первостепенной задачей в спортивной медицине.

Забор крови и биохимический анализ сыворотки. Забор капиллярной крови у испытуемых спортсменов проводили строго натощак из дистальной фаланги пальца после ночного голодания в соответствии со стандартными диагностическими процедурами. Применяли систему сбора капиллярной крови, по 3 капилляра объемом 200 мкл для биохимических и гематологических анализов с антикоагулянтом (гепарин лития) и этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) соответственно. Первая капля крови перед забором выбрасывали в специальный биоконтейнер, остальной полученный биоматериал не позднее чем через два часа после сбора центрифугировали при скорости 3500 об/мин, а затем анализировали с использованием модульной платформы Cobas 6000 (Roche Diagnostics, Германия).

В сыворотке крови определяли следующие метаболиты: кислую фосфатазу (Ед/л), лактат (ммоль/л), общий белок (г/л), альбумин (г/л), креатинин (мкмоль/л), мочевины (мкмоль/л), мочевую кислоту (ммоль/л), амилазу (Ед/л), триглицериды (ммоль/л), холестерин общий (ммоль/л), липопротеиды высокой плотности (ЛПВП, ммоль/л), билирубин общий (ммоль/л), билирубин прямой (ммоль/л), АЛАТ (Ме/л), АСАТ (Ме/л), КФК (Ме/л), КФК-МВ (Ме/л), ЛДГ (Ме/л), ГГТ (Ме/л), ЩФ (Ме/л), общий кальций (ммоль/л), фосфор (ммоль/л), магний (ммоль/л), железо (ммоль/л), соматотропный гормон (нг/мл), тиреотропный гормон (Ме/л), Т4 свободный (Ме/л), пролактин (Ме/л) и общий тестостерон (нмоль/л).

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали с использованием специального программного прикладного пакета STATISTICA v 13.1 (StatSoft, Inc., США) наряду с табличным ре-

дактором Excel for Windows 2016. При обработке биохимических данных статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0.05$.

Для разработки классификации проводили обработку и анализ собранных данных, а также для моделирования механизмов метаболической регуляции в организме спортсменов в зависимости от показателей биомаркеров проводили статистическую группировку результатов с описанием признаков и их корреляционный анализ с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена [25].

Использование дискриминантного анализа предоставило возможность построить классификацию с обобщением, обработкой и анализом собранных материалов. В результате чего была определена межгрупповая дисперсия признаков, сделан пошаговый отбор с включением значимых и исключением недостоверных переменных, оценкой гипотезы и степени влияния качественных показателей с градацией на два уровня [25]. Выведенная линейно-дискриминантная функция (ЛДФ) позволяет прогнозировать вероятность преобладания катаболических механизмов регуляции в организме спортсменов, занимающихся академической греблей.

Выводы сделаны с учетом исходного фона биомаркеров спортсменов, интенсивности и длительности физических нагрузок, а также влияния экзогенных факторов. Данная работа базируется на биохимических показателях крови и разносторонних, объективных методах математико-статистической обработки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биохимическое обследование в динамике годового цикла предоставило возможность увидеть значимые различия в показателях, характеризующих анаболические или катаболические процессы в организме спортсменов.

Для создания модели, позволяющей определить в режиме реального времени преобладание метаболических механизмов регуляции в организме спортсменов (включая определения анаболической или катаболической фазы) и выявить наиболее значимые предикторы, использовали многофакторный анализ, с помощью которого полученные показатели (содержание кислот фосфатазы, мочевины, лактата, креатинина, мочевой кислоты, общего белка, альбумина, АСАТ, АЛАТ, ГГТ, амилазы, общего и прямого билирубина, фосфора, железа, общего кальция, магния, холестерина, триглицеридов, холестерина ЛПВП, ЩФ, КФК, КФК-МВ, ЛДГ, соматотропного и тиреотропного гормонов, gross-laps-b, миоглобина, свободного тироксина, АТ-ТПО, пролактина, тестостерона и кортизола) были про-

Таблица 1. Оценка информативности признаков при диагностике метаболических процессов, включенных в линейную дискриминантную функцию

Показатели	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	<i>F</i> -исключения	<i>P</i> -level	Toler
Креатинин	0.57	0.77	602.1826	0.000	0.76
Мочевая кислота	0.60	0.74	718.3235	0.000	0.96
Мочевина	0.48	0.92	174.0340	0.000	0.95
Тестостерон	0.45	0.99	18.6873	0.000	0.89
ЩФ	0.44	0.99	10.8572	0.001	0.74
Альбумин	0.44	0.99	7.3520	0.006	0.99
Общий кальций	0.44	0.99	7.6543	0.005	0.89
Общий белок	0.44	0.997	4.3478	0.037	0.89

анализированы для выявления наиболее значимых предикторов с последующим включением в модель определения анаболической или катаболической фазы.

С целью осуществления поставленной задачи выбрали дискриминантный анализ как наиболее подходящий для выявления предикторов, значимо влияющих на отнесение конкретного обследуемого к одному из метаболических процессов.

Дискриминантный анализ биохимических результатов обследования показал, что для разработки достоверной математической модели с разделением метаболического процесса в организме спортсменов на две фазы анаболическую или катаболическую необходимо учитывать следующие восемь основных показателей: содержание креатинина ($p = 0.000$), мочевой кислоты ($p = 0.000$), мочевины ($p = 0.000$), тестостерона ($p = 0.000$), ЩФ ($p = 0.001$), альбумина ($p = 0.006$), общего кальция ($p = 0.005$) и общего белка ($p = 0.037$).

Данные результаты представлены в табл. 1, где значение лямбды Уилкса (λ) = 0.044 ($F(82.065) = 319.76$, $p < 0.001$) говорит о хорошей дискриминации, так как λ приняла значение близкое к 0.

По данным, представленным в табл. 1, видим, что чем меньше значение частной лямбды Уилкса, тем больше вклад соответствующего показателя в диагностическую модель. Переменные креатинин, мочевая кислота и мочевина делают значительный вклад, а тестостерон, щелочная фосфатаза, альбумин, общий белок и кальций вносят наименьшее значение в общую дискриминацию. Опираясь на результаты табл. 1, возможно сделать вывод, что показатели креатинин, мочевая кислота и мочевина являются главными переменными, которые вносят свой вклад в дискриминацию между фазами, характеризующими метаболический процесс.

Показатель Toler (толерантность) является мерой избыточности переменной в модели. Хорошая связь в таблице данных подтверждена высокими значениями толерантности для большинства критериев, в меньшей степени — для щелочной фосфатазы, но данный биохимический показатель обобщает текущую фазу метаболического процесса, что подтверждает необходимость его включения в диагностическую модель. Удаленность независимых переменных и разность дисперсий, влияющих на оценку метаболического процесса подтверждена значениями λ -критерия Уилкса ($p < 0.001$) и F -фактора ($p < 0.001$).

В результате пошагового отбора наиболее значимых ($p < 0.05$) признаков с уровнем надежности не менее 95% решена задача выработки окончательной дискриминантной функции, где коэффициенты для линейных классификационных функций с уровнями градации признаков представлены в табл. 2.

Для определения фазы метаболического процесса, а также прогноза развития адаптационных механизмов регуляции в организме используются разработанные формулы ЛДФ, в которые подставляются значения биохимических показателей (содержания креатинина, мочевой кислоты, мочевины, тестостерона, щелочной фосфатазы, альбумина, общего кальция и общего белка), полученные при обследовании конкретных спортсменов (табл. 3).

Для определения преобладания анаболических или катаболических процессов производили решение уравнений, по итогам которых определяли наибольшее значение ЛДФ (табл. 3), оно же соответствует фазе метаболических механизмов регуляции в организме спортсменов.

Таблица 2. Биохимические показатели, включенные в модель определения метаболических процессов и коэффициенты ЛДФ

Признаки	Условное обозначение	Коэффициенты	
		ЛДФ1	ЛДФ2
Креатинин	X1	0.936	0.801
Мочевая кислота	X2	0.072	0.047
Мочевина	X3	4.018	3.281
Тестостерон	X4	0.029	0.169
Щелочная фосфатаза	X5	0.081	0.077
Альбумин	X6	0.000	0.000
Кальций общий	X7	127.092	125.615
Общий белок	X8	1.794	1.823
Константа		-305.144	-278.649

Таблица 3. Решающие правила дифференциальной диагностики метаболических процессов у спортсменов в зависимости от максимального значения ЛДФ

Наибольшая вероятность преобладания катаболических процессов
$\text{ЛДФ1} = -305.1 + 0.9 \times X1 + 0.07 \times X2 + 4.02 \times X3 + 0.03 \times X4 + 0.08 \times X5 + 0.001 \times X6 + 127.1 \times X7 + 1.8 \times X8$
Наибольшая вероятность преобладания анаболических процессов
$\text{ЛДФ2} = -278.7 + 0.8 \times X1 + 0.05 \times X2 + 3.3 \times X3 + 0.17 \times X4 + 0.08 \times X5 + 0.001 \times X6 + 125.6 \times X7 + 1.8 \times X8$
Наибольшая вероятность преобладания катаболических процессов

Дискриминантная функция прогноза метаболических процессов в организме спортсменов, имеет достаточно высокую информационную способность (91.8%), что подтверждается клиническими данными (оценка заболеваемости в период тренировок) и биохимическими показателями активности нейроэндокринной системы, как отношение концентраций тестостерона к кортизолу (Т/К), характеризующее стадию адаптационных механизмов регуляции в организме спортсменов в ответ на стрессогенные факторы. Результаты корреляционного анализа отношения Т/К показали сильную положительную связь ($r = 0.88$, $p < 0.001$) с прогнозом ЛДФ метаболической активности организма (табл. 4).

Классификационная матрица прогноза метаболических процессов по итогам расчета дискриминантной функции демонстрирует статистическую значимость модели ($p < 0.01$), где чувствительность решающих правил для определения фазы преобладания анаболических или катаболических механизмов регуляции представлена в табл. 5. Фаза с преобладанием катаболических процессов в организме спортсменов обеспечивает совпадение предлагаемой модели прогнозируемого состояния с реальным результатом в 87.5% случаев. Предполагаемая модель прогноза анаболической фазы обеспечивает прогнозируемое совпадение с реальным результатом в 94.3% слу-

чаев. Классификационная чувствительность модели определения метаболических процессов в организме спортсменов, обеспечивает прогнозируемое совпадение в 91.8% случаев с реальными результатами.

Математическая модель определения фаз метаболической регуляции в организме спортсменов, обеспечивает статистически значимый ($p < 0.01$) прогноз, основанный на восьми стандартных биохимических показателях (содержание креатинина, мочевой кислоты, мочевины, тестостерона, щелочной фосфатазы, альбумина, общего кальция и общего белка).

Модель диагностики фаз метаболической регуляции в дальнейшем использовали для быстрого прогноза возможных изменений адаптационных механизмов регуляции организма спортсменов в ответ на неблагоприятные факторы окружающей среды и их динамического контроля в период интенсивных тренировок и непосредственно на соревнованиях. Данный метод скрининга представляет собой процедуру диагностики, цель которой — выявление спортсменов с высокой вероятностью преобладания катаболических над анаболическими механизмами регуляции организма.

Разработанная модель является лишь первичным диагностическим инструментом, позволяющим в совокупности дать оценку метаболическим

Таблица 4. Определение взаимосвязи биохимических показателей крови с ЛДФ метаболической активности организма спортсменов, спорта высших достижений

Переменная	Взаимосвязь биохимических показателей с ЛДФ	<i>P</i> -level
Мочевина	0.640915	0.000
Лактат	0.070377*	0.600
Креатинин	0.630985	0.000
Мочевая кислота	0.628313	0.000
Общий белок	−0.35668	0.040
Альбумин	−0.30786	0.050
АСАТ	0.705858	0.000
АЛАТ	0.445125	0.004
ГГТ	−0.14559*	0.400
Амилаза	0.251452*	0.100
Билирубин общий	0.169161*	0.300
Фосфор	0.285244*	0.070
Кальций общий	−0.28712	0.050
Холестерин	0.091989*	0.500
Триглицериды	−0.06771*	0.600
Холестерин ЛПВП	0.021756*	0.800
Железо	0.048337*	0.700
Билирубин прямой	0.125701*	0.400
ЩФ	−0.43978	0.020
КФК	0.410799	0.009
КФК-МВ	0.524825	0.000
Магний	0.082256*	0.600
Миоглобин	0.546232	0.0003
ЛДГ	0.275505*	0.080
Соматотропный гормон	−0.0435*	0.700
Gross-Laps-B	−0.10877*	0.500
Тиреотропный гормон	−0.16916*	0.300
Тироксин свободный	−0.24649*	0.100
Антитела к тиреоидной пероксидазе	−0.2175*	0.100
Пролактин	0.372136	0.010
Тестостерон	−0.42381	0.030
Кортизол	0.351312	0.020
IgE	−0.65245	0.000
IgA	−0.54615	0.000
IgM	−0.69705	0.000
IgG	−0.66214	0.000
T/K	0.879769	0.000

Примечание. * — Отсутствует достоверная взаимосвязь ($p > 0.05$).

Таблица 5. Классификационная матрица прогноза метаболических процессов в организме спортсменов, спорта высших достижений ($n = 2100$)

Метаболические процессы	Чувствительность	Классификация состояния по значению ЛДФ		Всего случаев
		ЛДФ 1	ЛДФ 2	
Кataboлическая фаза	87.5%	685	98	783
Анаболическая фаза	94.3%	75	1242	1317
Всего	91.8%	760	1340	2100

процессам в организме спортсменов на самом раннем этапе и инициировать нутритивно-метаболическую поддержку в точке их максимальной эффективности.

ВЫВОДЫ

Динамическое биохимическое обследование спортсменов позволило определить значимые ($p < 0.05$) предикторы (креатинин, мочевиная кислота, мочевиная, тестостерон, щелочная фосфатаза, альбумин, общий кальций и общий белок) метаболических процессов в организме.

Продемонстрирована средняя положительная (для гемоглобина, АСАТ, АЛАТ, креатинина, мочевиная кислота, мочевины, КФК, КФК-МВ, миоглобина, кортизола) и отрицательная (для тестостерона, щелочной фосфатазы, альбумина, иммуноглобулинов, общего кальция и общего белка) связь ($0.30 > r > 0.69$, $-0.69 < r < -0.30$, $p < 0.05$) биохимических показателей с ЛДФ метаболической активности организма спортсменов.

Сформированы классификационные критерии определения анаболической или кataboлической фазы регуляции у спортсменов на основании математико-статистической обработки биохимических результатов методом ANOVA, в которой показаны значимые ($p < 0.05$) различия в процессах метаболической регуляции, обеспечивающей энергетический баланс в организме.

Достоверность разработанного прогноза ЛДФ метаболической активности организма спортсменов подтверждена сильной положительной корреляционной связью ($r = 0.88$, $p < 0.001$) с результатами оценки активности нейроэндокринной системы.

Разработана информативная (91.8%) математическая модель, дающая возможность достоверно ($p < 0.05$) и своевременно спрогнозировать преобладание метаболической активности в организме спортсменов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено этическим комитетом ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России от 18.10.2018 г. (№ 10/2) в соответствии с Хельсинкской декларацией. От всех участников было получено информированное согласие на участие в экспериментах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Banfi, A. Colombini, G. Lombardi, and A. Lubkowska, Adv. Clin. Chem., **56**, 1 (2012).
2. P. Brancaccio, N. Maffulli, and F. M. Limongelli, Br. Med. Bull., **81–82**, 209 (2007).
3. S. Honda, T. Kawasaki, T. Kamitani, and K. Kiyota, Intern. Med. Tokyo Jpn., **56**, 1175 (2017).
4. F. Hoppel, E. Calabria, D. Pesta, et al., Front. Physiol., **10**, 1300 (2019).
5. D. Magrini, M. Khodaei, I. San-Millán, et al., Phys. Sportsmed., **45**, 129 (2017).
6. J. Á. Rubio-Arias, V. Ávila-Gandía, F. J. López-Román, et al., Physiol. Behav., **205**, 51 (2019).
7. A. J. Siegel, L. M. Silverman, and R. E. Lopez, Yale J. Biol. Med., **53**, 275 (1980).
8. J. N. Tirabassi, L. Olewinski, and M. Khodaei, Sports Health, **10**, 361 (2018).
9. T. Chamera, M. Spieszny, T. Klocek, et al., J. Strength Cond. Res., **28**, 2180 (2014).
10. G. Lippi, F. Schena, M. Montagnana, et al., Eur. J. Intern. Med., **22**, e36 (2011).
11. J. Mieszkowski, B. E. Stankiewicz, A. Kochanowicz, et al., Front. Physiol., **12**, 731889 (2021).
12. A. Nowakowska, D. Kostrzewa-Nowak, R. Buryta, and R. Nowak, Int. J. Environ. Res. Public. Health, **16**, 3279 (2019).
13. K.-A. Shin, K. D. Park, J. Ahn, et al., Medicine (Baltimore), **95**, e3657 (2016).
14. H.-J. Wu, K.-T. Chen, B.-W. Shee, et al., World J. Gastroenterol., **10**, 2711 (2004).
15. G. Banfi, G. Lombardi, A. Colombini, and G. Lippi, Sports Med. Auckl. NZ, **40**, 697 (2010).
16. O. A. Ekun, A. F. Emiabata, O. C. Abiodun, et al., BMJ Open Sport Exerc. Med., **3**, e000223 (2017).

17. F. Hoppel, E. Calabria, D. H. Pesta, et al., *Front. Physiol.*, **12**, 632664 (2021).
18. L. A. Juett, K. L. Midwood, M. P. Funnell, et al., *Eur. J. Appl. Physiol.*, **121**, 3485 (2021).
19. M. Lecina, I. López, C. Castellar, and F. Pradas, *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, **18**, 11323 (2021).
20. M. P. G. Leers, R. Schepers, and R. Baumgarten, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **44**, 999 (2006).
21. A. Colombini, M. Machado, G. Lombardi, et al., *J. Sports Med. Phys. Fitness*, **54**, 658 (2014).
22. G. Banfi, M. Del Fabbro, and G. Lippi, *Br. J. Sports Med.*, **40**, 675 (2006).
23. R. Milić, G. Banfi, M. Del Fabbro, and M. Dopsaj, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **49**, 285 (2011).
24. В. И. Пустовойт, Р. В. Никонов, А. С. Самойлов и др., *Курортная медицина*, № 2, 85 (2021).
25. <http://statsoft.ru/home/textbook/default.htm>.

Prediction of Metabolic Activity of Rowing Athletes Based on Serum Biochemical Analysis

**V.I. Pustovoyt*, T.A. Astrelina*, E.I. Balakin*, I.V. Kobzeva*, Y.B. Suchkova*, A.V. Khan*,
A.A. Murtazin*, N.F. Maksjutov*, and V.A. Brumberg***

*State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency,
ul. Marshala Novikova 23, Moscow, 123098 Russia*

Determination of the metabolic state is an important topic in sports medicine. Biochemical and hematological blood parameters reflect the predominance of anabolic or catabolic processes in metabolism, these parameters depend on intensity and duration of workouts. The aim of the present study was to determine whether metabolic processes are dominant. 21 male rowing athletes (age: 22.55 ± 3.68 years, height: 189.62 ± 6.34 cm, weight: 88.65 ± 8.55 kg) participated in the experiment. Monitoring of blood concentrations in samples collected from participating athletes and measuring workout intensity led to the use of a linear-discriminant function. With this technique, the eight main blood count parameters: creatinine ($p < 0.001$), uric acid ($p < 0.001$), urea ($p < 0.001$), testosterone ($p < 0.001$), ALP ($p < 0.001$), albumin ($p < 0.05$), total calcium ($p < 0.05$), and total protein ($p < 0.05$) for the prediction of the metabolic state have been determined. The reliability of test results using a linear-discriminant function for the prediction of the metabolic state in athletes was supported by a strong positive correlation ($r = 0.88$, $p < 0.001$) with the results of the neuroendocrine system activity assessments. The accuracy of the metabolic state prediction was 91.8%.

Keywords: rowing, metabolic regulation, biochemical blood test, discriminative model

ЧАСТЬ АНТИКОВИДНОЙ ТЕРАПИИ, ОСНОВАННОЙ НА ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ МЕХАНИКИ КОНТАКТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОРОНАВИРУСА С ОБОЛОЧКОЙ КЛЕТКИ

© 2023 г. Н.А. Кольцова

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: nattan21@rambler.ru

Поступила в редакцию 29.01.2022 г.

После доработки 28.02.2022 г.

Принята к публикации 29.12.2022 г.

Рассматривается теоретическая модель механических закономерностей образования деформации мембраны при проникновении коронавируса в клетку. Упругие и гибкие шипы коронавируса, имеющие белковую структуру, прикрепляются к рецепторам оболочки клетки – мишени ACE2. С помощью фермента TMPRSS2 запускается механизм слияния вирусной и клеточной мембран с образованием поры слияния, через которую происходит раскрытие капсида оболочки коронавируса и проникновение вирусной РНК внутрь клетки. На основе закономерностей механики контактного взаимодействия и теории упругости определяется критическая величина радиуса клетки, при которой произойдет образование поры слияния и локальное повреждение оболочки клетки. Проведенные расчеты показывают, что чем меньше размер клетки, тем меньше вероятность механического повреждения клетки при воздействии коронавируса. Одним из способов уменьшения размеров клеток является уменьшение количества внутриклеточной жидкости за счет применения лекарственных средств – диуретиков. Величина критического радиуса клетки обратно пропорциональна величине силы прижима в момент прикрепления коронавируса к клеточной мембране. Необходимы дальнейшие исследования зависимости силы прижима от геометрической формы и размеров шиповидного отростка для различных штаммов коронавируса. Если возникший новый штамм будет действовать на клеточную мембрану с меньшей силой прижима, тяжесть заболевания снизится. Требуется проверка выводов теоретического исследования экспериментальными методами.

Ключевые слова: коронавирус, липидная оболочка клетки, механика контактного взаимодействия, жидкий кристалл, теория упругости.

DOI: 10.31857/S0006302923020217, EDN: CDMZDC

С начала пандемии в средствах массовой информации были представлены многочисленные фотографии коронавируса, полученные с помощью электронного микроскопа. На этих фотографиях можно видеть, что на округлой поверхности коронавируса плотно располагаются шиповидные отростки. Шиповидный отросток имеет ножку, которая крепится к круглой части коронавируса. На конце шиповидного отростка находится тело с бугристой поверхностью. Размер коронавируса составляет 100–120 нм. Вирион коронавируса состоит из нуклеокапсида, мембраны, оболочки и шипа (S), которые являются структурными белками. Белок S зрелого вириона состоит из двух нековалентно связанных субъединиц: субъединица S1 связывает коронавирус с клеткой-мишенью, а субъединица S2 закрепляет белок S на мембране. Итоги исследований взаимодействия

коронавируса с клеткой были отражены во многих работах (см., например, обзоры [1, 2]).

Белковые шипы коронавируса SARS-CoV-2 чрезвычайно гибки и упруги в отличие от более жестких и ригидных шипов других коронавируса, например, гриппа. В верхней части белка имеется петля, являющаяся рецептор-связывающим доменом (RBP), не покрытая молекулами гликанов (полисахаридов). Его функция – прикрепиться к рецептору ACE2, который находится на поверхности большинства клеток слизистой горла и легких человека. После того, как коронавирусные шипы прикрепятся к рецептору ACE2, прочие белки, имеющиеся на поверхности человеческой клетки, запускают процесс, который приводит к слиянию вирусной и клеточной мембран. Коронавирус SARS-CoV-2 эффективно использует фермент TMPRSS2, обнаруженный в больших

количествах на внешней оболочке респираторных клеток. На начальном этапе TMPRSS2 разрезает сайт, участок молекулы белка, на субъединице S2 шиповидного отростка коронавируса. Через этот разрез ряд гидрофобных аминокислот проникает в ближайшую мембрану клетки-хозяина. Затем удлинённый шип складывается словно застежка-молния, заставляя мембраны вируса и клетки сливаться.

Слияние между вирусной и клеточной мембранами образует пору слияния, через которую вирусная РНК высвобождается в цитоплазму клетки-хозяина для снятия оболочки и репликации. Другие коронавирусы, например, гриппа или атипичной пневмонии, вторгаются в клетку с помощью эндосомы, при этом никакие поры не образуются. Очевидно, что способность коронавируса проникнуть внутрь клетки зависит от свойств мембраны, а именно, от ее упругости. Чем сложнее вирусным белкам будет деформировать клеточную мембрану и дать возможность образованию поры слияния, тем меньше вероятность того, что вирус сможет проникнуть в клетку.

Согласно жидкостно-мозаичной модели структуры мембраны, предложенной в работе [3], биологическая мембрана представляет собой два параллельных слоя липидов. В мембрану вкраплены различные мембранные белки. Некоторые из них находятся на внешней или на внутренней поверхности липидной части мембраны; другие пронизывают всю толщу мембраны насквозь. При физиологических температурах мембраны находятся в жидкокристаллическом состоянии и проявляют свойства упругости только вдоль оси z , перпендикулярной двум слоям липидных молекул, образующих поверхность оболочки. Если сила действует вдоль слоев, то в этом направлении закон упругости не работает, и тело ведет себя как вязкая жидкость. Тела с вышеописанными свойствами называются смектическими. В смектиках все длинные оси молекул перпендикулярны поверхности слоя. Толщина каждого слоя равна длине одной липидной молекулы. Если воздействовать силой вдоль оси z , то расстояние между плоскостями изменится и произойдет искривление слоев. При этом, как и в твердом теле, возникнут упругие силы, стремящиеся вернуть тело в прежнее состояние. Толщина клеточной мембраны составляет 7–12 нм.

Авторы работ [4, 5], применявшие методы нанотрибологии для определения нормальных сил при внедрении кантилевера (механического зонда) в образец, получили результат, что для полимеров и биологических тканей жесткость такой системы можно заменить эквивалентной работой пружины, для которой применим закон Гука.

В работе рассматривается теоретическая модель механических закономерностей образования поры слияния при проникновении коронавируса в клетку.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИЛЫ ПРИЖИМА В МОМЕНТ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ШИПОВИДНОГО ОТРОСТКА К ОБОЛОЧКЕ КЛЕТКИ

Авторы работы [6] разработали теоретическую модель, которая предсказывает энергетические затраты, требующиеся для проникновения вирусных белков внутрь клетки-мишени. Оказалось, что на процесс слияния мембран влияют несколько ключевых факторов. Во-первых, это геометрические параметры белков слияния. Очевидно, что от их пространственной укладки зависит то, как они будут работать с мембраной. Кислотность среды — это второй фактор. Наконец, третий главный фактор — это так называемые «рафты» (от англ. raft — плот). Как известно, липидная мембрана в норме пребывает в полужидком состоянии, в ней, как в липидном море, плавают крупные молекулы и молекулярные комплексы. Рафты представляют собой как раз такие жесткие молекулярные плоты или островки, относительно свободно перемещающиеся по полужидкой клеточной мембране. Они взаимодействуют с вирусными белками и играют решающую роль в том, как пойдет процесс слияния. Если в том месте, где вирусные белки слияния атакуют клеточную мембрану, оказывается рафт, то вирусу проникнуть в клетку будет значительно легче.

Сравним размеры клетки и коронавируса. Размер клетки — это единицы микрометров, размер оконечности шиповидного отростка коронавируса — в 1000 раз меньше, единицы нанометров. При этом в области контакта имеется высокая концентрация силовых напряжений, которые слабо зависят от конфигурации тел вдали от области контакта [7]. Данное механическое взаимодействие по форме можно схематически заменить взаимодействием оконечности коронавируса с жестким рафтом. Задачи контактного взаимодействия различных по форме тел по определению нормальной силы прижима были решены автором работы [8].

Рассмотрим случай воздействия коронавируса, имеющего оконечность шиповидного отростка круглой формы. Схема нормального контакта системы «коронавирус — оболочка клетки» во время присоединения к рецепторам мембраны представлена на рис. 1. Определим силу прижима, возникающую при сжатии структурного белка шиповидного отростка коронавируса во время присоединения к мембране клетки. Из теории упругости известно, что результирующая сила может быть представлена в виде суммы сил, дей-

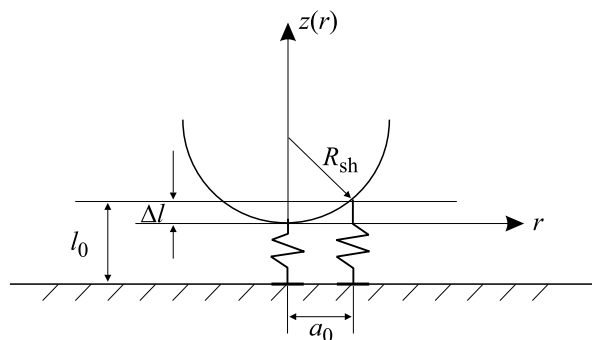


Рис. 1. Схема взаимодействия коронавируса, имеющего округлую оконечность шиповидного отростка, с поверхностью оболочки клетки

ствующих на каждый элемент поверхности контакта, т.е. в виде некоторого интеграла по этой поверхности. Поэтому необходимо определить силу прижима на каждом элементе области контакта, а затем просуммировать по площади контакта.

Заменим упругое взаимодействие каждой точки контакта пружиной. Длина пружин, находящихся в контакте с поверхностью, определяется из геометрических соотношений, как

$$l(r) = l_0 - \Delta l + r^2/2 \cdot R_{sh}, \quad (1)$$

где l_0 — длина недеформируемой пружины, м; Δl — величина максимальной деформации пружи-

ны, м; R_{sh} — радиус округлой оконечности шиповидного отростка, м.

Определим радиус области контакта a_0 из граничного условия на краю области контакта:

$$l_0 - \Delta l + a_0^2/2 \cdot R_{sh} = l_0. \quad (2)$$

Отсюда для радиуса области контакта находим:

$$a_0 = \sqrt{2 \cdot \Delta l \cdot R_{sh}}. \quad (3)$$

В соответствии с законом Гука для полной силы прижима $|\vec{P}|$ (в ньютонах) находим

$$|\vec{P}| = \frac{k}{A_0} \cdot \int_0^{a_0} \left(\frac{r^2}{2R_{sh}} - \Delta l \right) \cdot 2\pi r dr = \frac{\pi k R_{sh} \Delta l^2}{A_0} = \frac{\pi E R_{sh} \Delta l^2}{l_0}, \quad (4)$$

где A_0 — круговая площадь области контакта, м²; k — коэффициент жесткости структурного белка шиповидного отростка, Н/м, E — модуль Юнга структурного белка шиповидного отростка, Па, Н/м².

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОКАЛЬНОГО МЕХАНИЧЕСКОГО КРИТЕРИЯ ПРОЧНОСТИ МЕМБРАНЫ КЛЕТКИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КОРОНАВИРУСА

С учетом масштабных отношений сила прижима $\vec{P}$ для клетки является точечной сосредоточенной силой. Эта сила направлена перпендикулярно к поверхности оболочки. В этом направлении жидкокристаллическая мембрана клетки ведет себя как твердое тело. Задача определения энергии деформации при взаимодействии точечной сосредоточенной силы с мембраной была ре-

шена Л. Ландау и Е. Лифшицем [9], а также Л.В. Погореловым [10].

При воздействии сосредоточенной силы на оболочку могут реализоваться два варианта. В первом варианте сосредоточенная сила производит небольшой изгиб в области вокруг точки приложения силы (схема такого воздействия изображена на рис. 2); во втором — при воздействии поперечной силы в оболочке могут возникнуть выпучивания, меняющие ее форму (схема области выпучивания изображена на рис. 3).

1. Рассмотрим вариант образования изгиба в области вокруг точки приложения поперечной сосредоточенной силы (рис. 2). Даже при слабом изгибе имеет место сила растяжения. Приближаясь к точке приложения сосредоточенной силы, энергия изгиба растет, а энергия растяжения падает. При определении деформации вблизи точки приложения сосредоточенной силы необходимо учитывать обе эти энергии. Примем порядок величины области деформации за d_1 (м), тогда пло-

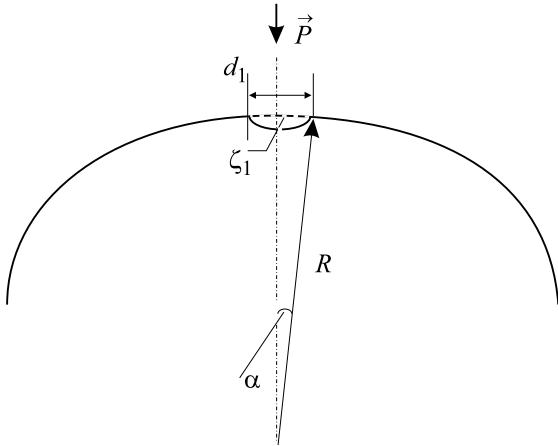


Рис. 2. Схема влияния точечной сосредоточенной силы $\vec{P}$ на оболочку (1-й вариант).

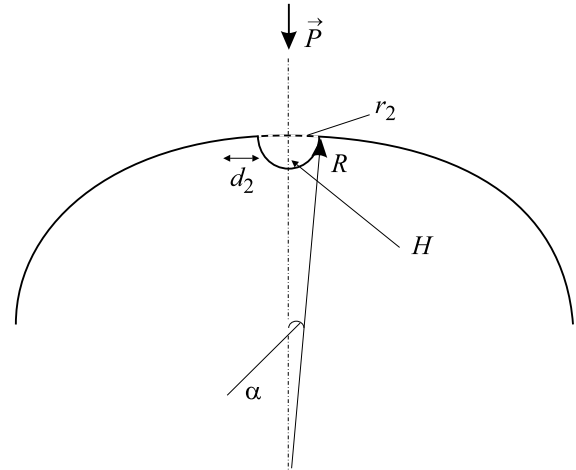


Рис. 3. Схема влияния точечной сосредоточенной силы $\vec{P}$ на оболочку (2-й вариант).

щадь этой области имеет порядок $\sim d_1^2$. Тензор деформации будет порядка ζ_1/R , где ζ_1 — величина деформации в м, R — радиус оболочки клетки в м. Проведя расчеты, основанные на теории упругости, авторы работ [8, 9] получили следующие зависимости:

— для полной энергии силы растяжения

$$En_{1st} \sim E_1 h (\zeta_1/R)^2 d_1^2 \text{ (Дж)}, \quad (5)$$

— для полной энергии изгиба

$$En_{1bend} \sim E_1 h^3 \zeta_1^2 / R^4 \text{ (Дж)}, \quad (6)$$

где E_1 — модуль упругости Юнга смектической оболочки клетки (Па, Н/м²), h — толщина оболочки клетки (м);

— для полной энергии деформации

$$En_{1tot} \sim E_1 h^2 \zeta_1^2 / R \text{ (Дж)}. \quad (7)$$

Величина области деформации определяется из условия минимума En_{1tot} и равна d_1 (м):

$$d_1 \sim \sqrt{hR}. \quad (8)$$

Варьируя En_{1tot} по ζ_1 и приравняв величине работы силы прижима $\vec{P}$, найдем величину прогиба ζ_1 :

$$\zeta_1 \sim |\vec{P}| \cdot R / E_1 \cdot h^2. \quad (9)$$

2. При образовании области выпучивания, являющейся шаровым сегментом (рис. 3) основная часть упругой энергии сконцентрирована вблизи края области выпучивания. В этой области изгиб оболочки сравнительно велик. Предполагаем, что размер области выпучивания r_2 (м), причем $r_2 \ll R$. Обозначим ширину полосы области изгиба d_2 (м), площадь полосы изгиба $\sim r_2 d_2$ (м²). В

этой области основные энергии — это энергия изгиба вдоль меридиана и энергия растяжения вдоль параллели. Обозначим через ζ_2 (м) смещение точек оболочки в полосе изгиба.

В результате проведенных расчетов [9, 10] были получены следующие зависимости для области полосы изгиба:

— для полной энергии силы растяжения

$$En_{2st} \sim E_1 h d_2^3 \cdot r_2^3 / R^4 \text{ (Дж)}; \quad (10)$$

— для полной энергии изгиба

$$En_{2bend} \sim E_1 h^3 \cdot r_2^3 / R^2 \cdot d_2, \text{ (Дж)}; \quad (11)$$

— для полной энергии деформации

$$En_{2tot} \sim E_1 r_2^3 (h/R)^{5/2} / R = \text{const} \cdot E_1 h^{5/2} \cdot H^{3/2} / R \text{ (Дж)}, \quad (12)$$

где H — глубина прогиба (м);

— постоянная const равна

$$\text{const} = 1.2 \cdot (1 - \sigma^2)^{-3/4}, \quad (13)$$

где σ — коэффициент Пуассона.

Величина области деформации определяется из условия минимума En_{2tot} и равна d_2 (м):

$$d_2^2 \sim \sqrt{hR}. \quad (14)$$

Зависимость между глубиной прогиба H и величиной приложенной сосредоточенной силы $|\vec{P}|$ получится приравнянием $|\vec{P}|$ к производной от полной энергии En_{2tot} по H и равна

$$H \sim |\vec{P}|^2 \cdot R^2 / E_1 \cdot h^5. \quad (15)$$

Зависимость между глубиной прогиба H и радиусом оболочки R имеет нелинейный характер. Для оболочки клетки, являющейся жидким кристаллом, ситуация с образованием области выпучивания невозможна. В этом случае смектик должен претерпевать двойной изгиб — внутри области выпучивания в виде прогиба и в полосе области вторичного изгиба. При изгибе жидкого кристалла внутренние слои скашиваются, и этот перекокс должен компенсироваться иным перекоком в другом месте. При возникновении двойного перекокса и отсутствия свободных краевых условий для компенсации, так как граница оболочки замкнута, произойдет расхождение слоев, позволяющее образовать пору слияния. Определить величину радиуса клетки R_{break} , при которой произойдет образование поры слияния, можно приравняв величин прогиба первого ζ_1 (формула (9)) и второго H (формула (15)) вариантов. В результате получим

$$R_{\text{break}} \sim E_1 h^3 / |\bar{P}|. \quad (16)$$

Полученная зависимость определяет локальный критерий прочности клетки, заключающийся в том, что, если радиус клетки будет больше, чем величина R_{break} , то произойдет образование поры слияния, позволяющей полное открытие капсида оболочки коронавируса и проникновение генетического материала внутрь клетки.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основе вышеизложенных формул рассчитаем приблизительную величину R_{break} (формула (16)), при которой возникает образование поры слияния. Данные расчеты необходимы для определения качественной картины механического взаимодействия коронавируса с оболочкой клетки.

Необходимо отметить, что в формуле (16) присутствует отношение E_1/E при подстановке величины силы прижима. В литературе имеются противоречивые данные о величине модуля Юнга для мембран эритроцитов: от 1.4–1.7 кПа до 11.7 кПа [11, 12]. Вероятно, имеет место нелинейный характер зависимости модуля Юнга от параметров системы. Для структурного белка шиповидного отростка данных по величине модуля Юнга нет. Известно, что белок допускает максимальную деформацию в размере одного ангстрема. Для жидкокристаллической оболочки мембраны клетки максимальная величина деформации Δl не может превышать величины $0.01h/2$, где $h/2$ — это величина шага решетки жидкого кристалла, равная длине одной молекулы или половине величины толщины оболочки. Получается, что порядок максимальной величины деформации структурного белка шиповидного отростка

коронавируса и мембраны клетки примерно один и тот же. Допустим, что отношение E_1/E равно единице. Будем считать, что данное допущение правомерно для качественной картины механического взаимодействия коронавируса с оболочкой клетки.

Определим величину силы прижима $|\bar{P}|$ по формуле (4) и подставим в формулу (16), приняв отношение R_{sh}/l_0 равным единице. Получим, что порядок величины $R_{\text{break}} \approx 100 \cdot 10^{-6}$ м. Соответственно порядок величины диаметра клетки, при которой возникает пора слияния, будет приблизительно равен 200 мкм.

При заболевании коронавирусом основное поражение возникает в легочной ткани. Известно, что диаметр альвеол увеличивается в зависимости от возраста: у новорожденных он составляет 150 мкм, у взрослых — 280 мкм, у пожилых людей — 300–350 мкм. Факт тяжелого течения заболевания у пожилых людей, вероятно, связан с большим размером их клеток легочной ткани по сравнению с размером клеток других возрастных групп. Произведенные расчеты показывают, что чем меньше будет размер клетки, тем меньше вероятность образования поры слияния и соответственно повреждения клетки при воздействии коронавируса. Одним из путей уменьшения величины размера клетки является уменьшение количества внутриклеточной жидкости. На начальном этапе заболевания применение препаратов-диуретиков может быть эффективной терапией, предотвращающей патологическое повреждение легочной ткани.

В дальнейшем необходимо провести исследования влияния формы оконечности шиповидного отростка на величину силы прижима $|\bar{P}|$. Различные мутации коронавируса имеют характерные формы шиповидного отростка. Например, определим величину R_{break} в случае, если форма шиповидного отростка коронавируса представляет собой цилиндрический стержень. Силу прижима в этом случае можно определить методом, который применяли для определения силы прижима в случае округлой формы оконечности отростка (формула 4). В случае действия цилиндрического стержня на оболочку клетки сила прижима может быть вычислена по формуле $|\bar{P}| = E \cdot A_0 \cdot \frac{\Delta l}{l_0}$, где A_0 — площадь области контакта в форме круга (м^2); l_0 — высота цилиндра, длина недеформируемой пружины (м); Δl — величина максимальной деформации пружины (м); E — модуль Юнга структурного белка шиповидного отростка (Па , н/м^2). Допустим, что $l_0/h = 1$. Радиус основания положим равным 0.2 нм. Тогда порядок величины R_{break} будет приблизительно равен

1000 мкм. В этом случае штамм коронавируса механически не сможет образовать пору слияния и локально повредить оболочку клетки. При возникновении новых штаммов, у которых шиповидный отросток будет воздействовать на оболочку клетки с меньшей величиной силы прижима, тяжесть течения заболевания будет снижаться.

Локальные повреждения оболочки клетки активизируют свертывающую систему крови, при этом повышается количество тромбоцитов для «ликвидации» такого повреждения. Одновременно с этим повышается риск тромбозов. Если повреждение имеет малые размеры, то возможно самовосстановление мембраны клетки. Представим, что в мембране возникло отверстие радиусом r_{hole} . Образование в мембране отверстия приводит к увеличению площади поверхности по периметру отверстия на величину $2\pi r_{\text{hole}} h$, где h — толщина оболочки. Соответственно пропорционально увеличивается энергия поверхностного натяжения. С другой стороны, появление отверстия влечет потерю площади внутренней и внешней сторон поверхности оболочки на величину $2\pi r_{\text{hole}}^2$, что приводит к потере энергии поверхностного натяжения. Если разница в энергиях складывается в пользу последней, то образовавшееся отверстие самовосстанавливается за счет перехода молекул липидов из нижнего, более плотно «упакованного» слоя мембраны в верхний слой с использованием кромки отверстия. С ростом радиуса r_{hole} отверстие достигает критического размера, равного толщине мембраны h , при превышении которого произойдет локальное повреждение мембраны. Такое повреждение мембраны коронавирусом наиболее вероятно при больших размерах клетки. Данное упругое свойство коронавируса может быть использовано при антираковой терапии, так как при аноксии раковой клетки происходит ее набухание [13] и, соответственно, значительное увеличение размеров.

ВЫВОДЫ

1. Упругие и гибкие шипы коронавируса, имеющие белковую структуру, прикрепляются к рецепторам оболочки клетки-мишени ACE2. С помощью фермента TMPRSS2 запускается механизм слияния вирусной и клеточной мембран с образованием поры слияния, через которую происходит раскрытие капсида оболочки коронавируса и проникновение вирусной РНК внутрь клетки. В работе рассматривается теоретическая модель механических закономерностей образования поры слияния при проникновении коронавируса в клетку.

2. На основе закономерностей механики контактного взаимодействия и теории упругости определяется критическая величина радиуса клетки, при которой произойдет образование поры слияния и локальное повреждение оболочки клетки.

3. Произведенные расчеты показывают, что, чем меньше будет размер клетки, тем меньше вероятность локального повреждения клетки при воздействии коронавируса. Уменьшить величину размера клетки можно уменьшением количества внутриклеточной жидкости. На начальном этапе заболевания применение препаратов-диуретиков может быть эффективной терапией, предотвращающей патологическое повреждение клеток.

4. Так как критическая величина радиуса клетки обратно пропорционально зависит от силы прижима в момент прикрепления коронавируса к оболочке, необходимы дальнейшие исследования зависимости геометрической формы и размеров оконечности шиповидного отростка различных видов штаммов коронавируса на силу прижима. При возникновении штамма, у которого шиповидный отросток будет воздействовать на оболочку клетки с меньшей величиной силы прижима, тяжесть течения заболевания будет снижаться.

5. Необходима проверка выводов теоретического исследования экспериментальными методами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Scudellari, Nature, **595**, 640 (2021).
2. C. B. Jackson, M. Farzan, B. Chen, and H. Choe, Nature Rev. Mol. Cell Biol., **23**, 3 (2022).
3. G. L. Nicolson, Biochim. Biophys. Acta, **1838**, 1451 (2014).
4. K. Yamanaka, H. Ogiso, and O. Kolosov, Appl. Phys. Lett., **64**, 178 (1994).
5. R. W. Carpick and M. Saloner, Chem. Rev., **97** (4), 1163 (1997).
6. R. J. Molotkovsky, V. V. Alexandrova, N. R. Galimzyanov, et al., Int. J. Mol. Sci., **9** (5), 1483 (2018).
7. К. Джонсон, *Механика контактного взаимодействия* (Мир, М., 1989).

8. В. Л. Попов, *Механика контактного взаимодействия и физика трения. От нанотрибологии до динамики землетрясений* (Физматлит, М., 2013).
9. Л. Д. Ландау и Е. М. Лифшиц, *Теория упругости* (Наука, М., 1987).
10. Л. В. Погорелов. *Теория оболочек при закритических деформациях* (Наука, М., 1965).
11. Т. В. Абакумова, Д. Р. Арсланова, Т. С. Барышева и др., *Лазерная медицина*, **15** (2), 107 (2011).
12. B. Vilen, *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 5149 (2007).

Part of Anti-COVID Therapy Based on a Theoretical Model Describing Mechanics of Contact Interaction between Coronavirus and Cell Membrane

N.A. Koltcova

Saint-Petersburg, Russia

This article proposes a theoretical model of mechanical feedback in pattern formation on deforming a membrane when coronavirus enters a cell. Coronavirus stiff and flexible spike proteins attach to ACE2 receptors on the cell membrane of the target cell. TMPRSS2 triggers the fusion of the viral and cell membranes with the formation of a fusion pore leading to opening of a capsid surrounded by the coronavirus envelope and viral RNA release into the cell. Based on mechanical feedback analysis of contact interaction and elastic shell theory, a critical value of cell radius, at which a fusion pore is formed and membrane damage occurs locally, is determined. The results revealed that the smaller the cell size, the less likely that the cell will be damaged mechanically when exposed to the virus. One of the ways to reduce the cell size is to decrease intracellular fluid volume through the use of medicines - diuretics. The critical value of cell radius is inversely proportional to the value of binding energy at the time of attachment of the coronavirus to the cell membrane. Further research is required to improve our knowledge of the dependency of binding energy on the shape and sizes of spikelike bumps for various types of coronavirus strains. It may be predicted that when a new coronavirus strain will emerge, it may produce lower binding energy to cell surface and the severity of the disease may decrease. It is necessary to verify the conclusions of the theoretical study by experimental methods.

Keywords: coronavirus, lipid shell of the cell, mechanics of contact interaction, liquid crystal, elastic shell theory

НАПРАВЛЕННАЯ ПЕРЕСТРОЙКА ПОПУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ SARS КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА ПРЕОБЛАДАНИЯ БЕССИМПТОМНЫХ ФОРМ ИНФЕКЦИИ В COVID-19

© 2023 г. И.Д. Колесин*,#, Е.М. Житкова*

*Факультет прикладной математики — процессов управления Санкт-Петербургского государственного университета, Университетский просп., 35, Петергоф, Санкт-Петербург, 198504, Россия

#E-mail: kolesin_id@mail.ru

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 22.04.2022 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Для объяснения факта преобладания бессимптомных форм инфекции SARS-CoV-2 вводится гипотеза о направленной перестройке популяции возбудителя, сводящейся к изменению двух важнейших его параметров — контагиозности и патогенности. Согласно гипотезе, восприимчивые и бессимптомные формы инфекции оказывают влияние на скорости изменения контагиозности и патогенности, а последние — на скорости инфицирования и заболевания, что в итоге меняет соотношение бессимптомных и манифестных форм. С помощью математической модели, построенной в этой гипотезе и идентифицированной по данным для первой волны COVID-19 в Санкт-Петербурге, проверяется наличие соответствия между направленным изменением микробиологических параметров модели и изменением соотношения бессимптомных и манифестных форм. Делается вывод о возможном влиянии направленной мутации возбудителя на это соотношение.

Ключевые слова: гипотеза, мутация, бессимптомные инфекции.

DOI: 10.31857/S0006302923020229, EDN: CDUWTW

Бессимптомные формы острых респираторных инфекций до сих пор привлекают интерес своей нетипичностью. Их роль ныне ставится в ряд актуальных проблем эпидемиологии, особенно в связи с тем, что новый возбудитель SARS-CoV-2 показал себя прародителем подавляющей доли бессимптомно инфицированных среди всех инфицированных — свыше 80% [1]. В связи с этим возник вопрос о причине столь поразительного соотношения. Высказанное в работе [2] смелое суждение о стратегии вируса SARS-CoV-2 на обеспечение длительности своего существования в популяции человека в какой-то степени отвечает на этот вопрос, так как в основу суждения взято сравнение нового возбудителя с его предшественником SARS-CoV, быстро вышедшем из циркуляции вследствие низкой контагиозности, но имевшем высокую патогенность. Переход к обратному сочетанию, дающему популяции вируса большую вероятность сохраниться, требует наличия определенных генетических свойств [3]. В частности, это возможно при наличии в популяции возбудителя механизма направленной перестройки своих параметров, что в итоге может сказываться на со-

отношении бессимптомных и манифестных форм. В связи с этим можно предположить, что меньшая патогенность, но большая контагиозность (в сравнении с первоначальным вариантом) есть результат такой перестройки.

Предположение о перестройке взаимоотношений популяций возбудителя и хозяина в ходе их взаимодействия отводит к фундаментальной идее В.Д. Белякова о саморегуляции эпидемического процесса [4], которая используется для построения математической модели. Обращение к математическому моделированию как средству проверки гипотез позволяет изучать на модели влияние микробиологических процессов на их эпидемические проявления и делать определенные выводы относительно положения, высказанного в гипотезе.

Ниже описывается методика проверки, построенная на введении опорного варианта параметров и задании направленного отклонения от него, имитирующего ту или иную стратегию вируса. Подобная методика применена в работе [5].

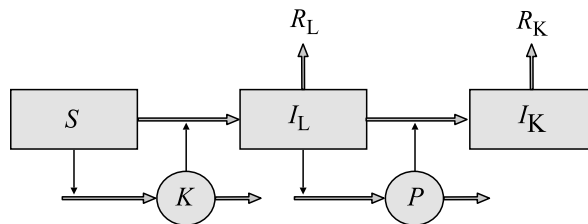


Рис. 1. Внутренняя регуляция взаимодействия популяций возбудителя и хозяина. Популяция хозяина представлена фазовыми показателями S , I_L , I_K , R_L , R_K ; популяция возбудителя — показателями K и P ; двойные стрелки — потоки, одинарные стрелки — регуляторные связи).

МОДЕЛЬ

Для отображения эффекта внутренней регуляции предлагается модель, берущая начало от модели Кермака—Мак Кендрика, но с дополнением ее микробиологическими показателями. Такими выбраны контагиозность и патогенность. Контагиозность отвечает за распространение возбудителя, а патогенность — за симптоматику заболевания. При этом с целью упрощения модели учитывается лишь изменчивость популяции возбудителя; изменчивость популяции хозяина не рассматривается. Введем обозначения: S — количество восприимчивых, I_L — количество лиц с бессимптомным течением инфекции, I_K — с манифестным, R_L — количество лиц, приобретших иммунитет в результате бессимптомного течения инфекции, а R_K — в результате клинически выраженного течения, K — контагиозность возбудителя, P — патогенность. Полагаем, что начальный охват населения инфекцией протекает в скрытой форме и состоит в инфицировании восприимчивых со стороны I_L и I_K . Переход инфекции из вирусной стадии в бактериальную интерпретируется как переход из бессимптомной формы в манифестную. Его эпидемическим проявлением становится переход $I_L \rightarrow I_K$ и начало появления клинически выраженных форм инфекции (рис. 1).

Внутренняя регуляция задается следующим образом: переход $S \rightarrow I_L$ регулируется показателем контагиозности, а переход $I_L \rightarrow I_K$ — показателем патогенности. При этом возбудитель вирусной природы постепенно замещается возбудителем бактериальной природы. Обратная связь эпидемических проявлений с микробиологическими процессами задается параметрами активизации и подавления.

Предполагается, что наличие восприимчивых инициирует активизацию роста контагиозности, а наличие бессимптомно инфицированных — активизацию роста патогенности. В соответствии с этим примем: c — параметр активизации конта-

гиозности со стороны восприимчивых (S), а c' — параметр активизации патогенности со стороны латентно инфицированных (I_L), g и g' — параметры подавления активности.

Обозначим через v_L скорость инфицирования со стороны латентно- и манифестно-переносящих инфекцию:

$$v_L = (k_A I_L + k_{A1} I_K) K S,$$

а через v_K — скорость перехода инфицированных из вирусной стадии инфекции в бактериальную:

$$v_K = k_B I_L P,$$

где k_B , k_A и k_{A1} — коэффициенты перехода. Коэффициенты, обратные длительностям течения инфекции в бессимптомной и клинической формах, обозначены через β_L и β_K . Рост переменных R_L и R_K отражает увеличение защиты популяции хозяина, но уравнения для $\dot{R}_L$ и $\dot{R}_K$ могут быть исключены из описания модели в силу уравнения сохранения $S + I_L + I_K + R_L + R_K = H = \text{const}$. Тогда математическая модель эпидемических проявлений микробиологических процессов получает следующий вид:

$$\begin{aligned} \dot{S} &= -v_L, \\ \dot{I}_L &= v_L - v_K - \beta_L I_L, \\ \dot{I}_K &= v_K - \beta_K I_K, \\ \dot{K} &= (cS - g) K, \\ \dot{P} &= (c' I_L - g') P. \end{aligned}$$

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОДЕЛИ

Для идентификации модели воспользуемся данными по динамике I_K , приведенными в работе [6] для первой волны COVID-19 в Санкт-Петербурге, а также результатом измерения доли лиц с бессимптомным течением инфекции в общем числе серопозитивных (имеющих специфиче-

Таблица 1. Реальная и модельная динамика числа выявленных больных (ИК)

Недели (от первого больного)	1	4	6	8	11	13	16
Реальная заболеваемость, чел/нед.	1	25	340	1220	2835	2420	1466
Модельная заболеваемость, чел/нед.	1	12	117	1141	2811	2183	1073

Примечание. Реальная динамика представлена с пересчетом данных работы [6] на 5 млн чел.

ские антитела к SARS-CoV-2) испытуемых, полагая $I_L/(I_L + I_K) \sim I_L/I_K$ при $I_L \gg I_K$ (табл. 1).

Численная идентификация параметров модели по этим данным при $S(0) = 5$ млн чел., $I_K(0) = 1$ (первый больной, выявленный 2 марта 2020 г.), а также $I_L/I_K = 82.32$ (на 16-й неделе от первого отмеченного случая заболевания) дала следующий результат:

$$\begin{aligned} k_A &= 0.00000005, k_B = 0.007214, \\ k_{A1} &= 0.0045, \beta_L = 0.067, \beta_K = 0.05, \\ c &= 0.000001, g = 0.7, c' = 0.000003, g' = 0.9, \\ I_L(0) &= 1000, K(0) = 0.02, P(0) = 0.01. \end{aligned}$$

Этим определен опорный вариант параметров и начальных данных. Динамика показателя I_K , соответствующая этому варианту, показана на рис. 2, а динамика показателей K и P — на рис. 3. Сопоставление реальных данных с модельными приведено в табл. 1. Модельное соотношение I_L/I_K на 16-й неделе от первого больного составило 82.32 (при реальном соотношении 84.5).

МЕТОДИКА МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Так как направленное отклонение параметров c и c' от их опорных значений имитирует направленную мутацию возбудителя, то можно воспроизводить ту или иную стратегию возбудителя: на смягчение активности либо усиление, наблюдая изменения микробиологических показателей K и P и эпидемических показателей I_K и I_L . В соответствии с этим методика модельных экспериментов состоит в следующем. Имитация стратегии возбудителя на длительное существование выполняется путем увеличения коэффициента c , но при одновременном уменьшении коэффициента c' (что соответствует увеличению контагиозности, но уменьшению патогенности). Наблюдение за изменением соотношения бессимптомных и манифестных форм (I_L/I_K) в ходе реализации этой стратегии позволяет соотнести направление, в котором протекает изменение этого соотношения, с направлением изменения показателей K и P (и то и другое прослеживается за движениями в плоскостях (I_L, I_K) , (K, P)). При совпадении этих направлений делается вывод о наличии зависи-

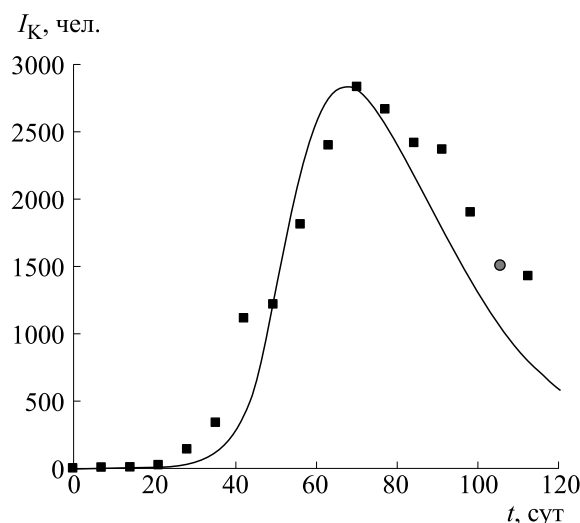


Рис. 2. Результат верификации модели по данным об изменении числа выявленных больных I_K (сплошная линия — модельные значения, квадраты — реальные недельные значения в пересчете на 5 млн человек [6], кружок — период обследований на 16-й неделе, $t = 0$ соответствует обнаружению первого больного).

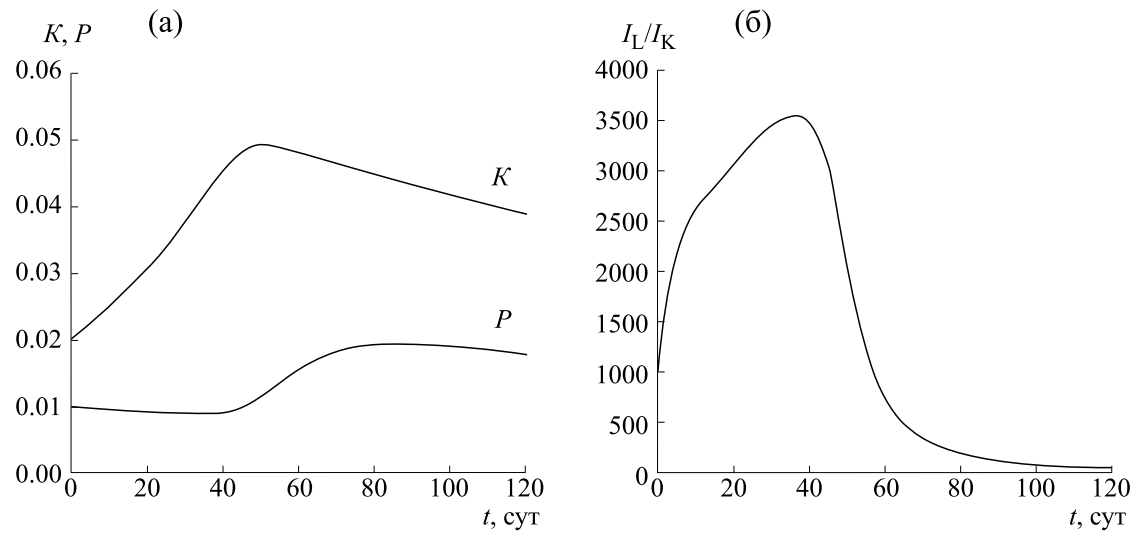


Рис. 3. Динамика микробиологических и эпидемических показателей: *а* – изменения контагиозности (K) и патогенности (P), *б* – изменение соотношения бессимптомных и манифестных форм инфекции I_L/I_K .

мости между ними. Можно предположить, что возможна и обратная стратегия вируса. В этом случае показатели c и c' изменяются в обратном порядке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты выполнения описанной методики для той и другой стратегий вируса отражены в табл. 2, где смягчение патогенной активности соответствует нынешней стратегии вируса SARS, а

усиление – предположенной обратной стратегии. Соотнесем эти результаты с гипотезой о направленной перестройке популяции возбудителя.

Исходная посылка о направленной перестройке популяции возбудителя объясняет факт преобладания латентных форм инфекции как результат снижения агрессивности вируса SARS-CoV-2 в сравнении с его предшественником SARS-CoV, но увеличении распространяемости. При наличии внутренней регуляции направленное изменение параметров c и c' имитирует направленную

Таблица 2. Результаты сравнения двух стратегий вируса SARS (усиления активности и смягчения)

	Усиление активности			Смягчение активности	
	Позиция 2	Позиция 1	Опорная позиция	Позиция 1	Позиция 2
c	0.0000001	0.0000005	0.0000001	0.0000012	0.0000015
c'	0.000001	0.0000008	0.0000003	0.0000002	0.0000001
t	98	83.8	67.4	63	58
I_K	13301	8367	2836	2395	2067
I_L	513448	621842	1107003	1252712	1406702
K	0.017	0.028	0.047	0.055	0.068
P	0.179	0.093	0.018	0.013	0.010

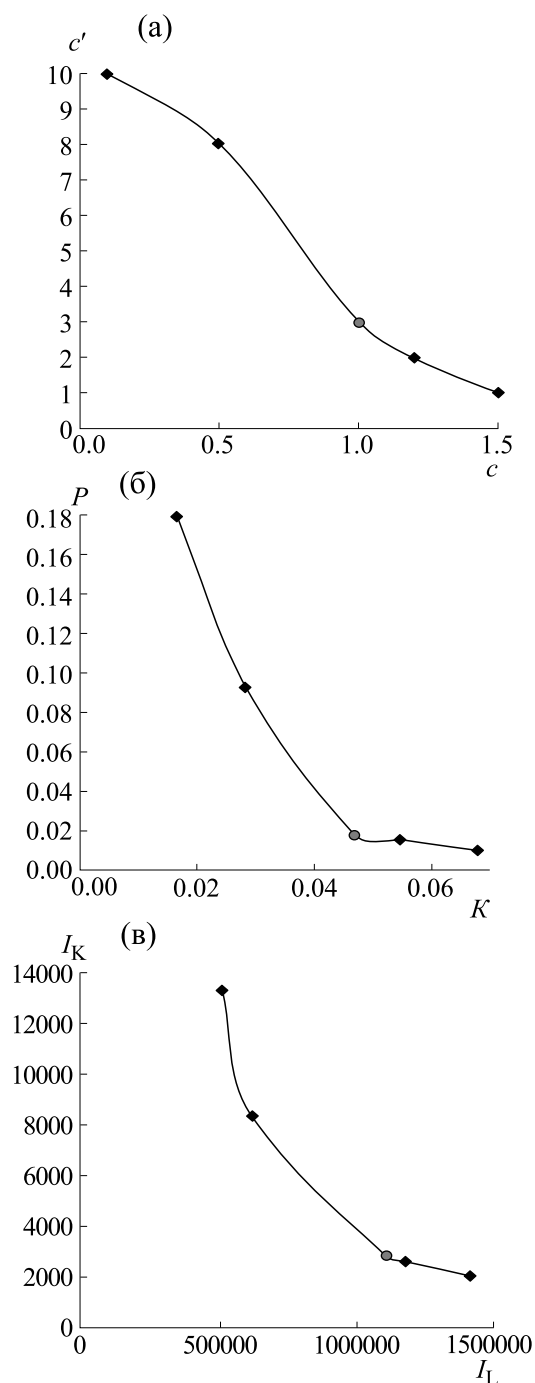


Рис. 4. Направленное изменение параметров c и c' , имитирующее смягчение и усиление активности вируса (а), и вызванное ими изменение микробиологических показателей P и K (б) и эпидемиологических показателей I_K и I_L (в).

перестройку: увеличение c соответствует росту contagiозности (K), а уменьшение c' — спаду патогенности (P), то и другое вместе — стратегии возбудителя на более длительное выживание в человеческой популяции. Подтверждением этому является ускорение роста числа бессимптомно

инфицированных (I_L), но замедление роста числа манифестных случаев (I_K), т. е. смещение отношения I_L/I_K в сторону увеличения, что и наблюдается в случае с COVID-19. Тем самым гипотеза о направленной перестройке популяции возбудителя как причине смещения I_L/I_K в сторону увеличения приобретает себе опору в результатах математического моделирования: стратегия возбудителя на выживание отражается направленной перестройкой (рис. 4а,б), результат которой наблюдаем по росту отношения I_L/I_K (рис. 4в).

ВЫВОДЫ

Предложена математическая модель, сочетающая эпидемические показатели с микробиологическими.

Предложена методика математического экспериментирования, основанная на введении опорного варианта параметров и начальных данных.

Предложено объяснение эффекта преобладания бессимптомных форм, основанное на учете направленной перестройки популяции возбудителя.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Felsenstein, J. A. Herbert, P. S. McNamara, and Ch. M. Hedrich, Clin. Immunol., **215**, 108448 (2020). DOI: 10.1016/j.clim.2020.108448
2. Н. А. Беляков, В. В. Рассохин и Е. Б. Ястребова, *Коронавирусная инфекция COVID-19. Часть 1. Природа вируса, патогенез, клинические проявления*, https://www.lspbgmu.ru/images/home/covid19/обучение_врачей/Часть_1_Лекция_по_COVID-19_на_сайт-09.04.2020.pdf.
3. Д. К. Львов и С. В. Альховский, *Вопр. вирусологии*, **65** (2), 62 (2020). DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70
4. В. Д. Беляков, *Вестн. АМН СССР*, № 5, 3 (1983).
5. М. Н. Асатрян, Э. Р. Герасимук, Д. Ю. Логунов и др., *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, № 4, 289 (2020).
6. А. Ю. Попова, Е. Б. Ежлова, А. А. Мельникова и др., *Проблемы особо опасных инфекций*, № 3, 124 (2020). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-124-130

Single SARS Virus Mutation as a Possible Cause of the Prevalence of Asymptomatic COVID-19 Infection Forms

I.D. Kolesin* and E.M. Zhitkova*

**Faculty of Applied Mathematics and Control Processes, St. Petersburg University,
Universitetskii prosp. 35, Petergof, St. Petersburg, 198904 Russia*

To explain the prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection forms, a hypothesis on a single virus mutation that causes changes in two important factors such as virus infectiousness and pathogenicity is proposed. According to this hypothesis, susceptible and asymptomatic forms affect the rate of change in infectiousness and pathogenicity, thereby influencing the rate of infectivity and the onset of a disease and as a result, altering the ratio of asymptomatic forms to symptomatic cases. With a mathematical model, constructed based on this hypothesis and identified using data from the first wave of COVID-19 in Saint-Petersburg, a correlation between changes in microbiological parameters of the model and changes in a ratio of asymptomatic forms to symptomatic cases is verified. It is concluded that single virus mutation may affect the ratio.

Keywords: hypothesis, mutation, asymptomatic infections