

ISSN 0006-3029

Том 69, Номер 2

Март - Апрель 2024



# БИОФИЗИКА



НАУКА

— 1727 —

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

# БИОФИЗИКА

Том 69 вып. 2 2024 Март—Апрель

Журнал основан в январе 1956 года

Выходит 6 раз в год

ISSN: 0006-3029

1956-1962 гг. — гл. ред. А.М. КУЗИН

1962-1976 гг. — гл. ред. Г.М. ФРАНК

1976-1977 гг. — гл. ред. Л.А. БЛЮМЕНФЕЛЬД

1977-1989 гг. — гл. ред. А.А. КРАСНОВСКИЙ

1989-2022 гг. — гл. ред. Е.Е. ФЕСЕНКО

Журнал издается под руководством  
Отделения биологических наук РАН

*Главный редактор*

П.Я. Грабарник

## Редакционная коллегия

В.С. Акатов, В.Г. Артюхов, А.Ф. Ванин, И.М. Вихлянцев,  
О.В. Галзитская, Н.Г. Есипова (*ответственный секретарь*), В.М. Комаров,  
М.С. Кондратьев, Н.И. Кукушкин, В.Ю. Макеев, Д.Ю. Нечипуренко,  
О.Н. Озолинь, Н.В. Пеньков, С. Петровский, И.Ю. Петрушанко,  
Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин, Е.И. Слобожанина, А.И. Сушков,  
В.А. Твердислов, В.Г. Туманян, С.Н. Удальцов,  
Е.Е. Фесенко мл. (*заместитель главного редактора*), Е.Я. Фрисман,  
К.В. Шайтан (*заместитель главного редактора*), М.Г. Шарапов

## Редакционный совет

Ф.И. Атауллаханов, Ю.А. Владимиров, И.Д. Волотовский,  
А.Ю. Гросберг, А.Г. Дегерменджи, Г.Р. Иваницкий, А.А. Красновский,  
А.А. Макаров, Д.И. Рощупкин, А.Б. Рубин, В.О. Самойлов,  
Е.Е. Фесенко, А.В. Финкельштейн, М.Д. Франк-Каменецкий

*Заведующая редакцией* М.А. Пуценкова

Адрес редакции: 142290, Пущино, Просп. Науки, 3, оф. 226

Телефон +7(963)698-77-22

E-mail: biophysical@mail.ru

Москва

ФГБУ «Издательство «Наука»

© Российская академия наук 2024

© Редколлегия журнала

«Биофизика» (составитель) 2024

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 69, номер 2, 2024

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

- Суперкомпьютерное моделирование внутримолекулярных колебаний глицина, дифенилаланина и триптофана в электрическом поле терагерцового и инфракрасного диапазонов  
*М.А. Баранов, Э.К. Карсеева, О.Ю. Цыбин* 213
- Восстановительное нитрозилирование гемоглобина и миоглобина и его антиоксидантное действие  
*К.Б. Шумаев, Д.И. Грачев, О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов, Э.К. Рууге* 230
- Теоретический анализ коротких фрагментов ДНК при действии плотноионизирующей радиации  
*Ю.А. Эйдельман, И.В. Сальников, С.Г. Андреев* 237
- Распределение значений GC-состава фрагментов в пространственной структуре геномов хлоропластов, бактерий и митохондрий  
*М.Ю. Сенашова, М.Г. Садовский* 246

## БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

- Ингибирующее действие оксибиола на процесс модификации белков водорастворимыми продуктами фотоокислительной деструкции бисретиноида A2E  
*А.Е. Донцов, Н.Л. Аронштам, М.А. Островский* 257
- Рентгенодифракционное исследование липидных пленок с ИХФАНОм  
*А.В. Кривандин, А.Н. Голощапов* 264
- Амбиол модулирует функциональные характеристики митохондрий проростков гороха  
*И.В. Жигачева, Н.И. Крикунова, Ю.В. Кузнецов, А.Н. Голощапов* 271
- Сероводород приводил к модификации структуры мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха *Pisum sativum* L. в условиях дефицита воды  
*Н.Ю. Герасимов, О.В. Неврова, И.В. Жигачева, И.П. Генерозова, А.Н. Голощапов* 277
- Изучение действия натрий- $\mu$ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрата на структуру мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха  
*Н.Ю. Герасимов, О.В. Неврова, И.В. Жигачева, Н.И. Крикунова, А.К. Воробьева, И.П. Генерозова, А.Н. Голощапов* 286
- Предотвращение дисфункции митохондрий карнитинатом 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина  
*И.В. Жигачева, И.Ф. Русина, Н.И. Крикунова, Ю.В. Кузнецов, М.М. Расулов, М.А. Яковлева, А.Н. Голощапов* 294
- Фармакологическая блокада высокопороговых кальциевых каналов L-типа кардиомиоцитов восстанавливает активность дыхательной цепи, нарушенную вибрацией  
*В.В. Воробьева, О.С. Левченкова, П.Д. Шабанов* 303
- Влияние вирусного лизиса на поглощение света культурой черноморской микроводоросли *Tetraselmis viridis*  
*С.А. Шоларь, О.А. Степанова* 311

Совместное действие электрохимической и ультразвуковой обработки для очистки воды от патогенных загрязнений на примере <i>Escherichia coli</i>	317
<i>С.Б. Бибиков, А.И. Сергеев, И.И. Барашкова, М.В. Мотякин</i>	
Антимикробная активность метаболитных комплексов лактобацилл в отношении <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	324
<i>С.А. Кишилова, А.Ю. Колоколова, И.В. Рожкова</i>	
Исследование выживаемости опухолевых клеток линии А549 при облучении и протонным пучком во флэш- и стандартном режимах	333
<i>А.В. Рзянина, Г.В. Мицын, А.В. Агапов, Е.А. Грицкова, С.С. Углова, В.Н. Гаевский, К.Н. Шипулин, И. Хасенова</i>	

## БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Взаимосвязь между составом природной воды и состоянием процессов перекисного окисления липидов в биологических объектах	341
<i>Л.Н. Шишкина, А.С. Дубовик, В.О. Швыдкий, М.В. Козлов, Е.В. Штамм, А.Г. Георгиади</i>	
Сохранение гипотензивной активности у лиофилизированных препаратов динитрозильного комплекса железа с глутатионом («Оксакома»), хранившихся в течение 15 лет при комнатной температуре	349
<i>А.Ф. Ванин, А.А. Абрамов, А.А. Тимошин, В.Л. Лакомкин, Н.А. Ткачев</i>	
Взаимосвязь температуры в глубоких слоях сомато-сенсорной коры и скорости кровотока в мозге наркотизированных мышей	356
<i>А.М. Ромшин, А.А. Осипов, В.К. Крохалева, С.Г. Журавлев, О.Н. Егорова, И.И. Власов, И.Ю. Попова</i>	
Биофизические методы исследования наноматериалов для биомедицинских и экотоксикологических целей с использованием <i>Daphnia magna</i> как модельного организма	364
<i>Н.Б. Савина, Д.В. Ускалова, Д.Т. Петросова, Е.И. Саранульцева</i>	
Исследование физиологической роли спектрального состава повседневного освещения в развитии детской близорукости	371
<i>Н.Н. Трофимова, Ю.С. Петронюк, Е.А. Храмова, В.В. Соколова, К.Г. Антипова, Т.С. Гурьева, Е.И. Медникова</i>	

## МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Связь геофизических ритмов с артериальным давлением и частотой сердечных сокращений человека. Исследование отдельного случая	377
<i>П.Д. Ковалев, Д.П. Ковалев</i>	
Соединения золота и серебра как потенциальные противоопухолевые препараты	386
<i>Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, А.К. Чигасова, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина, Ю.А. Хоченкова, К.А. Абзаева</i>	
О роли прайминга в развитии современных реабилитационных технологий	399
<i>А.И. Федотчев</i>	

## ХРОНИКА

К истории изучения биологической подвижности в институте эволюционной физиологии и биохимии Российской академии наук	404
<i>А.И. Бурдыгин, К.Б. Иванов, С.М. Коротков, К.В. Соболев, И.В. Шемарова</i>	
ИБХФ РАН 30 лет	414
<i>И.Н. Курочкин</i>	

# Contents

---

---

Vol. 69, No. 2, 2024

---

---

## Molecular Biophysics

- Supercomputer Simulation of Intramolecular Vibrations of Glycine, Diphenylalanine, and Tryptophan in Terahertz and Infrared Electric Fields  
*M.A. Baranov, E.K. Karseeva, and O.Yu. Tsybin* 213
- Reductive Nitrosylation of Hemoglobin and Myoglobin and Its Antioxidant Action  
*K.B. Shumaev, D.I. Grachev, O.V. Kosmachevskaya, A.F. Topunov, and E.K. Ruuge* 230
- Computer Simulation of Short DNA Fragments Induced by HIGH-LET Charged Particles  
*Y.A. Eidelman, I.V. Salnikov, and S.G. Andreev* 237
- Distribution of Values of GC-Content of the Fragments in the Spatial Structure of Mitochondrial, Chloroplast and Bacterial Genomes  
*M.Yu. Senashova and M.G. Sadovsky* 246
- 

## Cell Biophysics

- Inhibitory Effect of Oxibiol on the Process of Protein Modification by Water-Soluble Products of Photo-Oxidative Destruction of Bisretinoid A2E  
*A.E. Dontsov, N.L. Aronshtam, and M.A. Ostrovsky* 257
- X-Ray Diffraction Study of Lipid Films with ICHPHAN  
*A.V. Krivandin and A.N. Goloschapov* 264
- Ambiol Modulates the Functional Characteristics of Pea Seedlings Mitochondria  
*I.V. Zhigacheva, N.I. Krikunova, Yu.V. Kuznetsov, and A.N. Goloshchapov* 271
- Hydrogen Sulfide Led to a Modification in the Structure of Mitochondrial Membrane of Epicotyls of Pea Seedlings *Pisum sativum* L. under Water Deficit Conditions  
*N.Yu. Gerasimov, O.V. Nevrova, I.V. Zhigacheva, I.P. Generozova, and A.N. Goloshchapov* 277
- Study of the Effect of Sodium- $\mu$ 2-Dithiosulphate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate on the Structure of Mitochondrial Membranes Isolated from Epicotyls of Pea Seedlings  
*N.Yu. Gerasimov, O.V. Nevrova, I.V. Zhigacheva, N.I. Krikunova, A.K. Vorobyova, I.P. Generozova, and A.N. Goloshchapov* 286
- Prevention of Mitochondrial Dysfunction with 2-Ethyl-6-Methyl-3-Hydroxypyridine Carnitinate  
*I.V. Zhigacheva, I.F. Rusina, N.I. Krikunova, Yu.V. Kuznetsov, M.M. Rasulov, M.A. Yakovleva, and A.N. Goloshchapov* 294
- Pharmacological Blockade of High Threshold L-Type Calcium Channels in Cardiomyocytes Restores Respiratory Chain Activity Disturbed by Vibration  
*V.V. Vorobieva, O.S. Levchenkova, and P.D. Shabanov* 303
- Effects of Viral Lysis on Light Absorption Properties of Black Sea Microalgae *Tetraselmis viridis*  
*S.A. Sholar and O.A. Stepanova* 311
- Combination of Electrochemical and Ultrasonic Treatments for Purification of Water Contaminated with Pathogenic Bacteria: a Case Study of *Escherichia coli*  
*S.B. Bibikov, A.I. Sergeev, I.I. Barashkova, and M.V. Motyakin* 317
- Antimicrobial Activity of Metabolite Complexes of Lactobacillus against *Pseudomonas aeruginosa*  
*S.A. Kishilova, A.Y. Kolokolova, and I.V. Rozhkova* 324

### Complex Systems Biophysics

Interrelation between Composition of Natural Water and a State of Lipid Peroxidation Processes in Biological Objects

*L.N. Shishkina, A.S. Dubovik, V.O. Shvydkyi, M.V. Kozlov,  
E.V. Shtamm, and A.G. Georgiadi* 341

Stability of Hypotensive Activity in Freeze-Dried Preparations of Dinitrozy Iron Complexes with Glutathione (“Oxacom”) throughout the Period of Storage for 15 Years at Ambient Temperature

*A.F. Vanin, A.A. Abramov, A.A. Timoshin, V.L. Lakomkin, and N.A. Tkachev* 349

Relationship between Temperature in the Deep Layers of the Somatosensory Cortex and Blood Flow Velocity in the Brain of Anesthetized Mice

*A.M. Romshin, A.A. Osypov, V.K. Krohaleva, S.G. Zhuravlev, O.N. Egorova,  
I.I. Vlasov, and I.Yu. Popova* 356

Biophysical Methods for Testing Nanomaterials in Terms of Biomedical and Ecotoxicological Purposes Using *Daphnia magna* as a Model Organism

*N.B. Savina, D.V. Uskalova, D.T. Petrosova, and E.I. Sarapultseva* 364

Investigating the Physiological Role of Spectral Composition of Daily Light Exposure in the Development of Childhood Myopia

*N.N. Trofimova, Y.S. Petronyuk, E.A. Khramtsova, V.V. Sokolova, K.G. Antipova,  
T.S. Gurieva, and E.I. Mednikova* 371

---

### Medical Biophysics

Geophysical Rhythms and Interrelations between Geophysical Rhythms and Human Biorhythms Based on Time Series Data Collected over a Five-Year Period of Time

*P.D. Kovalev and D.P. Kovalev* 377

Gold and Silver Compounds as Potential Antitumor Drugs

*L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, E.I. Nekrasova, A.K. Chigasova, N.V. Bluhterova,  
V.A. Rikova, M.M. Fomina, Yu.A. Khochenkova, and K.A. Abzaeva* 386

On the Role of Priming in the Development of Modern Rehabilitation Technologies

*A.I. Fedotchev* 399

---

### Cronicle

On the History of Studying of Biological Motility at the Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences

*A.I. Burdygin, K.B. Ivanov, S.M. Korotkov, K.V. Sobol, and I.V. Shemarova* 404

30 Year to Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS

*I.N. Kurochkin* 414

---

---

## СУПЕРКОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОЛЕБАНИЙ ГЛИЦИНА, ДИФЕНИЛАЛАНИНА И ТРИПТОФАНА В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ ТЕРАГЕРЦОВОГО И ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНОВ

© 2024 г. М.А. Баранов\*., Э.К. Карсеева\*, О.Ю. Цыбин\*

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

#E-mail: baranovma1993@gmail.com

Поступила в редакцию 19.05.2023 г.

После доработки 13.07.2023 г.

Принята к публикации 19.07.2023 г.

Реализован метод неравновесного анализа внутримолекулярных колебаний аминокислот глицина, дифенилаланина и триптофана в электрическом поле терагерцового и инфракрасного диапазонов, основанный на вычислении амплитудно-временных реализаций дипольного момента и их Фурье-спектра частот. Реализации продолжительностью до 2 нс были получены суперкомпьютерным моделированием с шагом дискретизации 1 фс. Результаты показали новые возможности применения данного метода, в котором впервые использовано электрическое поле, модулированное симметричным меандром. Дополнены фундаментальные представления о динамических свойствах биомолекул во внешних полях. Полученные данные могут быть использованы при разработке нанобиотехнологий, биоэлектронных и гетерогенных гибридных микроэлектронных приборов со встроенными биомолекулярными компонентами.

*Ключевые слова:* аминокислота, молекулярная динамика, компьютерное моделирование, биомолекулярная электроника, гетерогибридная микроэлектроника.

DOI: 10.31857/S0006302924020016, EDN: OVYPQX

Закономерности внутримолекулярных колебаний имеют важнейшее значение для выявления структуры и функций биомолекул. Локальные внутримолекулярные колебания, или нормальные моды, самосогласованные с собственным полем при отсутствии внешнего облучения, реализуются преимущественно в среднем и ближнем инфракрасном (ИК), а также в видимом диапазонах частот. Коллективные колебания атомных групп в аминокислотах и белках реализуются в диапазоне частот  $10^9$ – $10^{12}$  Гц, то есть в ГГц–ТГц и дальнем ИК-диапазонах, за счет чего возможно управление конформациями, биохимическими реакциями и переносом энергии [1]. Г. Фрелих в работе [1] обосновал модель с учетом облучения внешним высокочастотным электромагнитным полем (ЭМП), в которой биомолекула рассматривается как открытая система, а сценарий активации нормальных колебательных мод подобен

квантовой конденсации Бозе–Эйнштейна. Экспериментальная спектроскопия включает воздействие на молекулярную систему внешним ЭМП определенной частоты, поглощение его энергии коллективными и локальными осцилляторами вызывает активацию внутренних степеней свободы, что способно изменять конформацию и функциональные свойства молекул и молекулярных систем [2–4].

Полученные при нулевом внешнем ЭМП теоретические спектры колебаний биомолекул в растворах, а также в кристаллической фазе находятся во многих случаях в хорошем соответствии с экспериментальными результатами спектроскопических исследований.

В литературе содержится информация об использовании нескольких методов для получения подробной информации о структурных, химических и динамических свойствах белков. Методы колебательной (рамановской и FTIR) спектроскопии используются для поиска спектральных особенностей, чувствительных к изменениям третичной структуры белковых молекул. Часто-

*Сокращения:* ИК – инфракрасный, ЭМП – электромагнитное поле, МД – молекулярная динамика, АВР – амплитудно-временная реализация, ДМ – дипольный момент, ЭДМ – электрический дипольный момент.

ты, интенсивности и поляризации спектральных полос можно использовать для характеристики структуры молекул [5, 6]. Выявлены и обсуждены спектральные изменения, связанные с естественной деградацией, вызванной длительным хранением спирально-спирального белка (фибриногена) с точки зрения изменений вторичной и третичной структур. Выбор спектральных полос, чувствительных к изменениям третичной структуры, основан на сравнительном анализе колебательных спектров белков с различной третичной структурой. Колебательные спектры могут быть получены с помощью спектроскопии ИК-поглощения или комбинационного рассеяния. Методы ИК-Фурье- и рамановской спектроскопии можно использовать для характеристики первичной и вторичной структур белков [8].

В частности, показано, что нормальные колебательные моды полипептидной цепи вносят вклад в спектр белка. Амидные полосы (A, B, I–VII) являются характерными спектральными особенностями колебательных спектров белков и отчетливо проявляются как в ИК-, так и в КР-спектрах. Известно, что амидные полосы чувствительны к изменению конформации белка [9].

В диапазоне  $500\text{--}1800\text{ см}^{-1}$  амиды I–III дополняются спектральными полосами функциональных групп и одиночных аминокислот. Известно несколько полос, чувствительных к структурным изменениям белковой молекулы, например, спектральные полосы дисульфидных мостиков ( $500\text{--}550\text{ см}^{-1}$ ), которые стабилизируют структуру белковой молекулы. Разрыв дисульфидных связей может привести к разворачиванию молекулы и, как следствие, к изменению и/или подавлению функциональных свойств белка [10].

Спектральные полосы триптофана с пиками при  $880$  и  $1360\text{ см}^{-1}$  чувствительны к конформации. Сигнал комбинационного рассеяния при  $1360\text{ см}^{-1}$  указывает на присутствие скрытых остатков триптофана. Отсутствие такого сигнала означает, что боковые цепи триптофана расположены на поверхности белковой глобулы.

Однако в литературе практически отсутствуют сведения о спектральных полосах, которые можно отнести к третичной или четвертичной структуре белков [7]. Одна из причин этого заключается в том, что, в отличие от хорошо изученной вторичной структуры (с общепринятыми структурными элементами), третичная структура количественно не охарактеризована. Предполагается, что третичная структура представляет собой взаимное расположение элементов вторичной структуры. Четвертичная структура, которая может отсутствовать в конкретной белковой молекуле, является следующей ступенью в иерархии структурной организации [10].

Сопоставление большой базы экспериментальных данных ИК- и ТГц-спектроскопии [4, 11–21] с данными метода DFT, полуэмпирическими методами (PM6 и RM1), методами *ab initio* (B3LYP/6-31+G(d) и другими) [22–24] демонстрируют непротиворечивое описание коллективных и локальных колебаний аминокислот (хотя точные границы между этими двумя видами динамики осцилляторов не установлены).

Компьютерное моделирование биомолекул методом молекулярной динамики (МД) в нулевом внешнем ЭМП позволяет производить исследования на атомном уровне, вычислять дипольные характеристики, спектры частот и амплитуды колебаний [25–27]. В работе [26] с использованием суперкомпьютерной МД выявлена и исследована субпикосекундная динамика суммарного дипольного момента единичных молекулярных полиаланинов на реализациях продолжительностью до 2 нс. В работе [27] применена методика суперкомпьютерной МД для записи амплитудно-временной реализации (АВР) суммарного дипольного момента (ДМ) единичной молекулы, что позволило с помощью преобразования Фурье вычислить спектры собственных локальных осцилляторов. Новые методы и результаты работ [26, 27] были верифицированы сопоставлением с известными представительными базами данных, их продолжение актуально для изучения вынужденных колебаний биомолекул в ЭМП.

Сценарии колебательных процессов, обусловленных воздействием внешнего ЭМП, в том числе облучающего поля в спектроскопии, представленные в широкой области биомолекулярных исследований, имеют важное значение для медицины и других наук о жизни [28–40]. Однако многие вопросы динамики биомолекул в ЭМП, особенно характеристики резонансных и переходных процессов с разрешением во времени, амплитудные, температурные и некоторые иные существенные зависимости обоснованы недостаточно. Связь внутримолекулярных колебаний и облучающего поля требует дальнейшего углубленного изучения.

Компьютерное моделирование МД в постоянном и/или переменном ЭМП или электрическом поле позволяет получать значительные научные и прикладные результаты в современной био- и нанопизике [2, 41–44]. Прямое моделирование в различных полях существенно дополняет новыми данными результаты равновесного рассмотрения, обосновывает методику и результаты спектроскопических исследований. Например, в содержательном обзоре [41] рассмотрены способы включения эффектов статических и переменных полей. Для пептидов выявлены существенные конформационные эффекты [44].



Актуальные проблемы и задачи суперкомпьютерных МД исследований обусловлены недостатком сведений о характеристиках распределенных и локальных колебаний аминокислот в различных по форме ЭМП, а также соответствующих методов. Методом неравновесного МД-моделирования в заданном электрическом поле в виде симметричного меандра на частотах ИК-диапазона впервые вычислены спектры и переходные характеристики вынужденных локальных колебаний аминокислот глицина, триптофана и дифенилаланина (из-за краткости публикации в работе [45] приведены графические данные только для глицина).

Целью данной работы является развитие суперкомпьютерных неравновесных методов МД, получение более полных характеристик вынужденных колебаний биомолекул в широкой полосе ТГц- и ИК-частот. Предполагается, что такие исследования имеют значение для единичных аминокислот благодаря их особым функциям как базовых модулей сборки биомолекул, в том числе при нормальной постоянной температуре в широкой полосе ТГц- и ИК-частот ЭМП, включая атомно-слабые поля, где возможны резонансные и нерезонансные вынужденные колебания молекул в условиях, далеких от диссоциации. Аминокислоты выбраны также благодаря, возможности сопоставления с известными результатами исследований, использования получаемых новых данных при разработке и поиске прототипов биоэлектронных и гетерогенных гибридных микрорезонаторных приборов с встроенными биомолекулярными компонентами.

#### МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АМИНОКИСЛОТ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ ТЕРАГЕРЦОВОГО И ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНОВ

Методика [46] реализована в расширенном виде для сравнительного анализа с единых позиций динамики аминокислот глицина, триптофана и дифенилаланина в переменном электрическом поле с частотой, перестраиваемой в диапазоне 20–5000 см<sup>-1</sup>.

Метод основан на суперкомпьютерном вычислении амплитудно-временных реализаций суммарного векторного ДМ  $\vec{D}(t)$ , предполагаемого в виде линейной суперпозиции локальных осцилляторов  $\vec{d}_n(t)$  молекулы, на первом этапе:

$$\vec{D}(t) = \sum_{n=1}^N \vec{d}_n(t) = \sum_{n=1}^N q(\vec{r}_n - \vec{r}_0), \quad (1)$$

и на втором этапе – вычисление и анализ частотных Фурье-спектров функций  $\vec{D}(t)$ . В основе по-

лучения Фурье-спектров частот, как и в спектроскопии, лежит предположение о взаимной независимости гармонических парциальных локальных осцилляторов  $\vec{d}_n(t)$ , определяемых смещением  $\vec{r}_n(t)$  атомов и удаленных друг от друга в конфигурационном и фазовом пространствах биомолекулы. Предположение о взаимной независимости удаленных гармонических парциальных локальных осцилляторов  $\vec{d}_n(t)$  (хотя бы при малых значениях энергии колебаний и поляризации атомов) будет допустимо в том случае, когда Фурье-спектр частот АВР суммарного ДМ состоит из дискретных пиков. Квазинепрерывный вид спектра будет указывать на коллективную динамику осцилляторов. Предварительно подтверждения и обоснования этого были получены ранее для ТГц- и ИК-диапазонов частот в работах [26, 27]. Для облучающего электрического поля  $\vec{E} = [E(t), 0, 0]$ , имеющего плоскую поляризацию в плоскости  $x = \text{const}$ , имеем:

$$\begin{aligned} \vec{D} \cdot \hat{x} &= p_x (\vec{E} + \vec{E}_s) \cdot \hat{x} \\ \vec{D} \cdot \hat{y} &= p_y \cdot \vec{E}_s \cdot \hat{y} \\ \vec{D} \cdot \hat{z} &= p_z \cdot \vec{E}_s \cdot \hat{z}, \end{aligned} \quad (2)$$

где  $\vec{D} \cdot \hat{x}, \vec{D} \cdot \hat{y}, \vec{D} \cdot \hat{z}$  – парциальные компоненты векторного дипольного момента молекулы, вычисляемые при динамическом моделировании согласно уравнению (1),  $\vec{E}_s(\vec{r}_n - \vec{r}_0, t)$  – индуцированное электрическое поле,  $[p_x, p_y, p_z]$  – вектор поляризуемости. Интерпретация вычисленного векторного динамического ДМ состоит в том, что спектр частот этой величины представляет собой спектр частот вынужденных колебаний молекулярных осцилляторов. В случае, когда поляризуемость задается скаляром, из уравнений (2) возможно определение вектора индуцированного поля.

Указанные процедуры вычислений на первом и втором этапах реализованы для широкого набора параметров и функциональных характеристик, что позволило провести верификацию результатов и выполнить соответствующие физические интерпретации. При этом учитывали следующие известные данные из научно-технической литературы. Локальные осцилляторы в молекулах аминокислот и в пептидных группах представлены с учетом собственных и вынужденных колебаний атомных валентных связей и вращений (с параболическими зависимостями энергии по длине и углам вращения), а также кулоновских и ван-дер-ваальсовых (в цепях водородных связей). Установление соответствия (отнесения полос) локальных осцилляторов с нормальными модами и частотами представлено во многих известных источниках, например, в работе [22]. Спектраль-

ный диапазон  $2600\text{--}900\text{ см}^{-1}$  представлен, например, в работе [47]. Девять характерных колебательных полос (амиды А, В, I, II, III, ..., VII, где амиды I и II, между  $1600$  и  $1700\text{ см}^{-1}$ , а также  $1500$  и  $1600\text{ см}^{-1}$  соответственно) являются интенсивными в ИК-спектре. Отнесения полос глицина предполагают иногда, что в области, меньшей  $1700\text{ см}^{-1}$ , колебания не являются локальными, затрагивают не одну функциональную группу, связь или угол, а несколько или все атомы аминокислоты [24]. Кручение  $\text{NH}_3^+$  доминирует в диапазоне  $380\text{--}480\text{ см}^{-1}$ . Между  $270$  и  $380\text{ см}^{-1}$  доминирует режим деформации  $\text{C}\text{C}\alpha\text{N}$ , за которым следует область от  $220$  до  $270\text{ см}^{-1}$ , характерная для  $\text{C}\text{O}\text{O}$ -вибраций. Ниже  $220\text{ см}^{-1}$  соответствие частот какому-то одному локальному колебанию не сформировано, предпочтительны интерпретации в виде коллективных колебаний [12, 15, 16, 46, 48, 49]. Показано, например, что низкоэнергетичные колебания в интервале волновых чисел ( $300\text{--}500$ )  $\text{см}^{-1}$  могут явиться диагностикой вторичных структур в линейных и циклических пептидах [43]. В некоторых известных литературных источниках показано также, что в интервале  $20\text{--}200\text{ см}^{-1}$  спектральные пики коллективных колебаний образуют континуум выделенных частот [41, 43]. Подобные результаты представлены, например, в работе [8] для кристаллического глицина.

Для выполнения вычислений был использован кластер «РСК-Торнадо» суперкомпьютерного центра «Политехнический» Санкт-Петербургского Политехнического университета Петра Великого (СПбПУ, Санкт-Петербург). Этот кластер с пиковой производительностью 1015 терафлопс содержит 668 двухпроцессорных узлов (Intel Xeon E5 2697 v3), из них 56 узлов имеют два ускорителя вычислений NVIDIA K40 [27]. Это позволило создавать за приемлемое время (порядка 100 машинных часов) эффективные базы данных амплитудно-временных реализаций интегрального электрического дипольного момента (ЭДМ) молекул с длительностью до 2 нс с наименьшим шагом дискретизации до 1 фс и обеспечить этим высокое разрешение Фурье-спектров. Исходя из свойств Фурье-преобразования и получения частотных спектров, сформулированы и выполнены требования к АВР по длине траектории, то есть длительности АВР относительно шага и шага относительно периода колебаний. При длительности шага дискретизации 1 фс длина АВР траектории составляла в среднем до  $2 \cdot 10^6$  шагов.

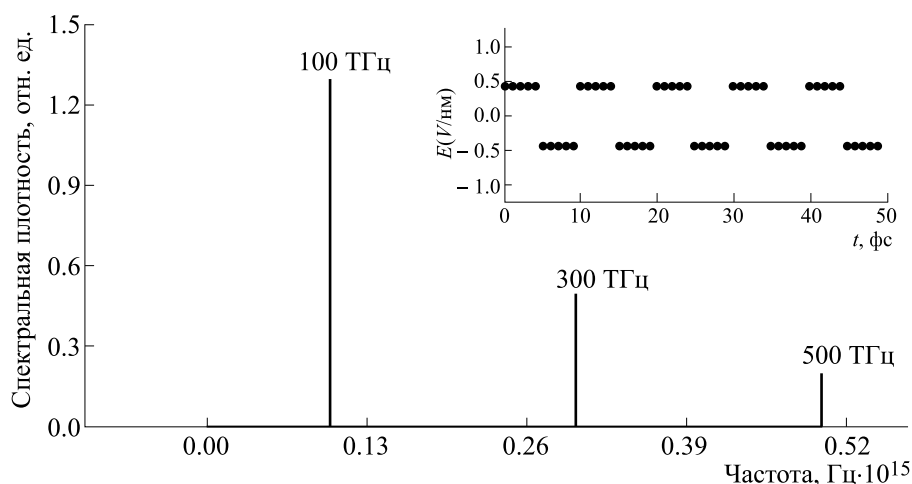
В состав программно-вычислительного комплекса СПбПУ входили пакеты прикладных программ Avogadro, Visual Molecular Dynamics и NAMD, а также дополнительные оригинальные

программы, написанные на языке Python. Дополнительно к методике моделирования, более подробно изложенной в работе [27], введено переменное электрическое поле ТГц–ИК-диапазона частот, подобное использованному в работе [45]. Как и в большинстве известных соответствующих работ, полагали, что сила, действующая на внутримолекулярные заряды со стороны переменного магнитного поля мала, значительно меньше электрической. Воздействие электромагнитного поля на молекулы задавали только электрической компонентой. Такое поле может быть создано, например, ТГц- или ИК-лазерами или другими генераторами с учетом усиления поля на атомно-размерных неоднородностях молекулярной структуры. Электрическое поле  $E(t)$  имело форму периодической волны в виде прямоугольного меандра, симметричного относительно нулевой линии, и плоскую пространственную поляризацию по координатным осям  $x$ ,  $y$ ,  $z$  с компонентами  $[E, 0, 0]$ . Меандр на частотах приблизительно  $1\text{--}125$  ТГц с амплитудой размаха  $0.01\text{--}1.0$  В/нм задавали с фронтами менее 1 фс, непрерывным или с импульсной огибающей длительностью  $100\text{--}1500$  пс.

На рис. 1 представлены эпюра внешнего поля и первые три наиболее значимые гармоники его Фурье-спектра. Частоту действующего поля можно было изменять в широких пределах, варьируя количество точек в периоде меандра и значения частоты дискретизации. Задание высокочастотного меандра с гармониками является в подобных исследованиях новым и оригинальным. Ранее такая форма волны была использована лишь при исследовании жидкой воды в диапазоне частот  $20\text{--}500$  ГГц с амплитудой размаха  $0.05\text{--}1.0$  В/нм [50].

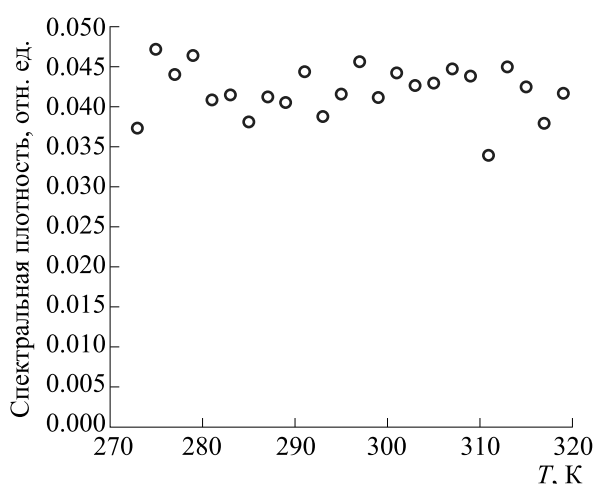
Фурье-анализ спектра частот АВР интегрального дипольного момента в электрическом поле выполняли при помощи пакета VMD IR Spectral Density Calculator.

С помощью пакета Avogadro были созданы первичные файлы с координатами атомов молекул глицина, триптофана и дифенил-L-аланина. Программа VMD позволяла создавать структурные файлы на основе топологии молекулярных связей, добавлять молекулы воды и ионы солей, визуализировать молекулярные системы, выполнять вычисления энергии и дипольных моментов конформационно-подвижных молекул. Для каждого атома системы решали уравнение динамики Ньютона, по временным шагам определяли координаты атомов, параметры силового поля, температуру системы, давление и т.п. В программе Avogadro были созданы координатные файлы аминокислот глицина, триптофана и дифенил-L-аланина. Молекулы аминокислот помещали в периодическую ячейку в виде водного куба. Длина



**Рис. 1.** Частичный Фурье-спектр с частотой основной гармоники 100 ТГц. На врезке — эюра применяемого переменного электрического поля  $E(t)$ .

стороны водного куба варьировалась от 30 до 70 Å (в зависимости от размеров молекул аминокислот). Во всех расчетных системах расстояние от крайней молекулы до границы куба составляло 15 Å. Была использована модель воды TIP3W. Моделирование производили в несколько этапов, включая этап минимизации энергии (100 пс), стабилизации кинетической и потенциальной энергии (200 пс). Для этапа молекулярной симуляции были определены периодические граничные условия, соответствующие системе NPT (постоянное значение количества частиц, давления и температуры). Давление и температура поддерживались на постоянном уровне ( $P = 101325$  Па,  $T = 298$  К) с помощью баростата и термостата Ланжевена.



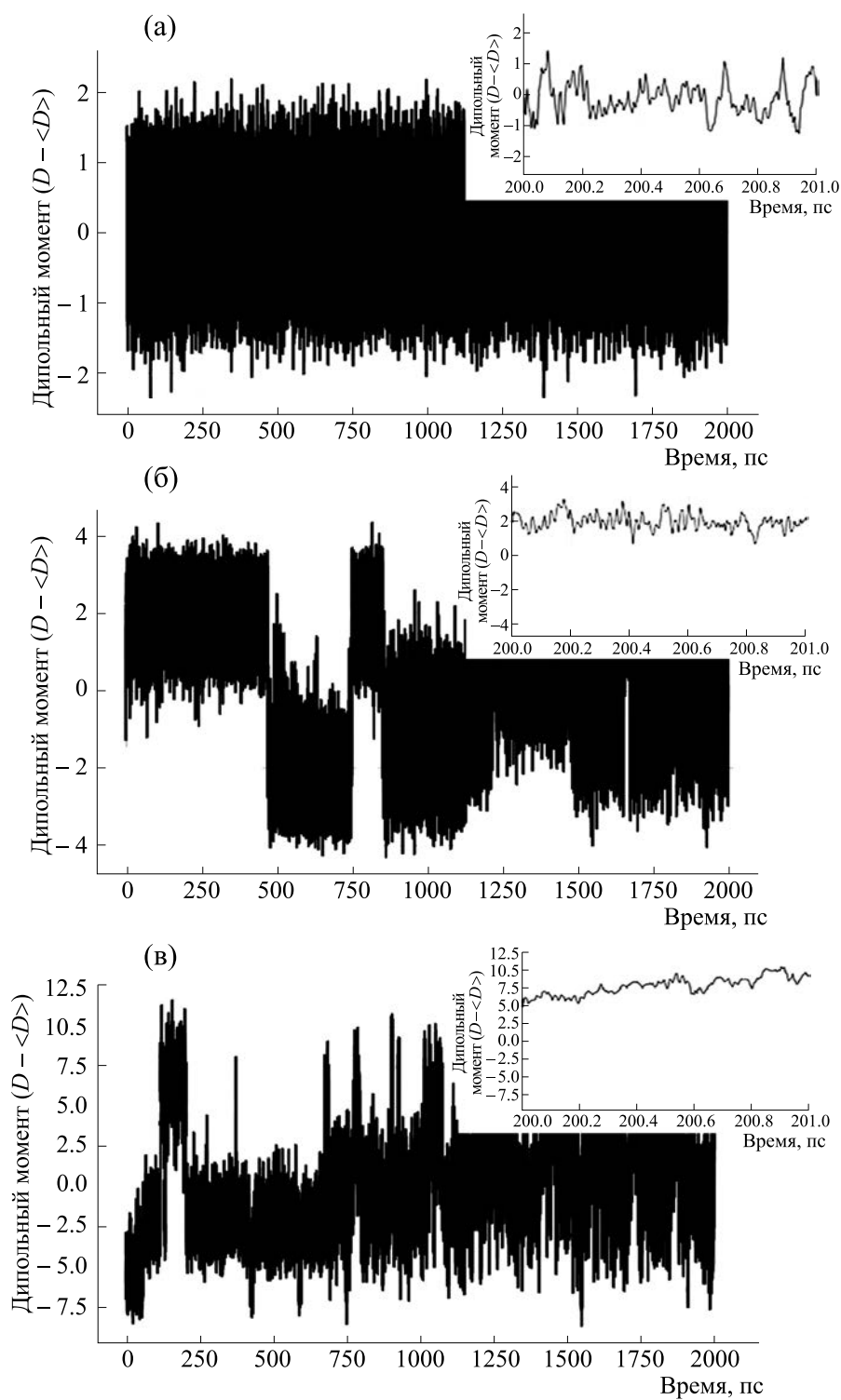
**Рис. 2.** Температурная зависимость спектральной плотности колебаний ДМ (в отн. ед.) молекулы глицина при резонансе в ЭМП на частоте  $f_E = 100$  ТГц ( $3333 \text{ см}^{-1}$ ).

Установлено, что прямое изменение температуры моделирования не оказывало существенного влияния на спектральную плотность колебаний. На рис. 2 представлена зависимость спектральной плотности колебаний ЭДМ молекулы глицина в области спектрального пика на частоте  $f_E = 100$  ТГц ( $3333 \text{ см}^{-1}$ ) от заданной температуры.

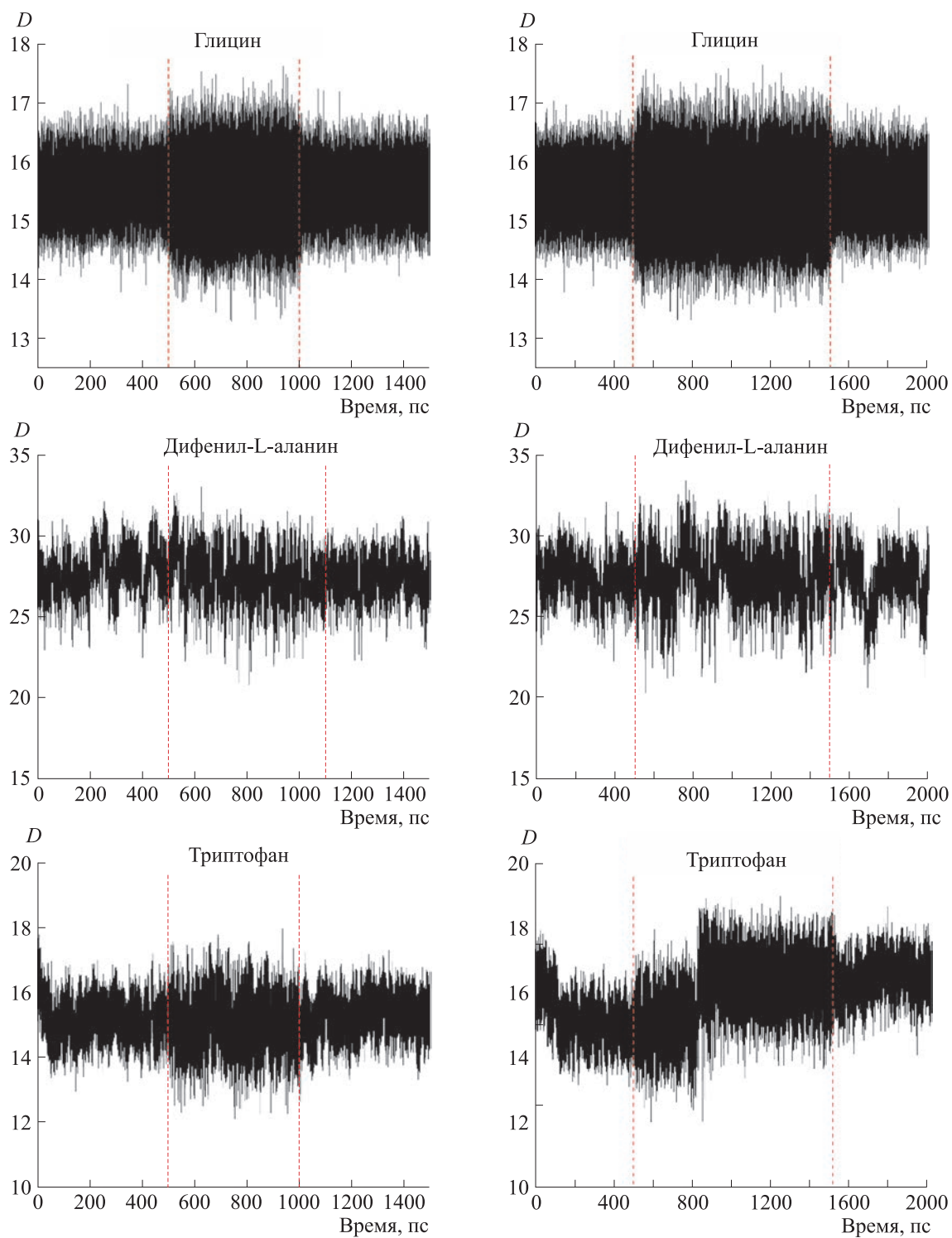
Типичные зависимости мгновенных значений полного интегрального ДМ, составляющие АВР на длине траектории моделирования 2 нс для трех видов молекул в нулевом внешнем электрическом поле, представлены на рис. 3.

Сценарии осцилляций АВР трех молекул (рис. 3) наблюдались в частях ТГц-диапазона, а также в дальнем ИК-диапазоне, подобно тому, как это было установлено для ряда аминокислот в работах [23, 24]. Наряду с высокочастотной модуляцией наблюдались нечастые скачкообразные изменения среднего значения интегрального ЭДМ, что можно связать со спонтанными конформационными переходами. Подобные синхронные переходы одновременно наблюдались также при VMD-визуализации молекулярной структуры.

На рис. 4 представлены типичные АВР интегральных ДМ молекул глицина, дифенил-L-аланина и триптофана под воздействием импульсов электрических полей  $f_E = 100$  ТГц ( $3333 \text{ см}^{-1}$ ). Видно возрастание амплитуды вынужденных локальных колебаний, происходящие во время действия импульса поля. Такое возрастание было особенно сильным на резонансных частотах поля, совпадающих с частотами нормальных мод. Наименьшая реакция амплитуд ДМ отмечена у молекулы дифенил-L-аланина, имеющей наи-



**Рис. 3.** Типичные зависимости мгновенных значений полного интегрального ДМ (с вычитанием среднего значения), составляющие АВР на длине траектории моделирования 2 нс для трех видов молекул при температуре 300 К: (а) — глицин, (б) — дифенилаланин, (в) — триптофан. На врезках показаны короткие участки с высокочастотными субпикосекундными осцилляциями.



**Рис. 4.** Типичные АВР интегральных ДМ молекул под воздействием резонансного электрического поля  $f_E = 100$  ТГц ( $3333 \text{ см}^{-1}$ ) представлены тремя наборами графиков: сверху вниз соответственно глицина, дифенил-L-аланина и триптофана. Вертикальной пунктирной линией обозначены временные отрезки действия внешнего электрического поля; слева – 500 пс, справа – 1000 пс.

большую боковую цепь. При отклонении значения частоты поля от резонанса существенного возрастания амплитуд осцилляций не наблюдалось. Эти данные подобны приведенным в работе [45], но существенно дополняют и расширяют их.

Типичные АВР  $x$ -компонент и интегрального ДМ молекул демонстрируют возбуждение колебаний под действием резонансного электрического поля. Методика обработки данных, приведенная впервые в работе [46], позволила по реализациям (рис. 4 и 5) определять такие параметры локального ИК-осциллятора, как полоса частот  $\Delta f$  и добротность  $Q$ . С этой целью эпюры на рис. 4 и 5 сначала преобразовывались в зависимости от времени энергии колебаний  $W$ , пропорциональной квадрату ДМ, а затем для импульсов  $W(t)$  определяли постоянные времена  $\tau$  нарастания и спада (см. рис. 6). Постоянные времена оказались существенно больше длительности фронтов. Поскольку фронты импульсов поля имели длительность не более шага дискретизации (1 фс, рис. 1), было возможно определить постоянные времена и переходные динамические характеристики локальных осцилляторов с большой точностью.

#### ДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АМИНОКИСЛОТ ГЛИЦИНА, ТРИПТОФАНА И ДИФЕНИЛАЛАНИНА В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ ТЕРАГЕРЦОВОГО И ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНОВ

Динамические характеристики аминокислот глицина, триптофана и дифенилаланина в электрическом поле ТГц- и ИК-диапазонов получены и представлены ниже в двух спектральных диапазонах:  $20\text{--}200\text{ см}^{-1}$  и  $200\text{--}5000\text{ см}^{-1}$ . Резонансные сценарии, наблюдаемые при облучении в ТГц- и ИК-диапазонах, характеризовались высокой спектральной плотностью энергии вблизи основного пика. При резонансах, когда частота основной гармоники облучающего поля была близка к частоте локального колебания, наблюдалось существенное, на порядок и более, возрастание амплитуды колебания. При промежуточных значениях частот сильно выраженные резонансные внутримолекулярные колебания не наблюдались, однако происходило некоторое возрастание амплитуд ближайших пиков.

В работе [27] впервые представлены в виде суперпозиции индивидуальных спектров обобщенные, или суммарные, спектры частот, полученные в ТГц-диапазоне и примыкающей части ИК-диапазона, где обнаружены как нерезонансные, так и резонансные сценарии молекулярных осцилляторов. Однако эти данные не были система-

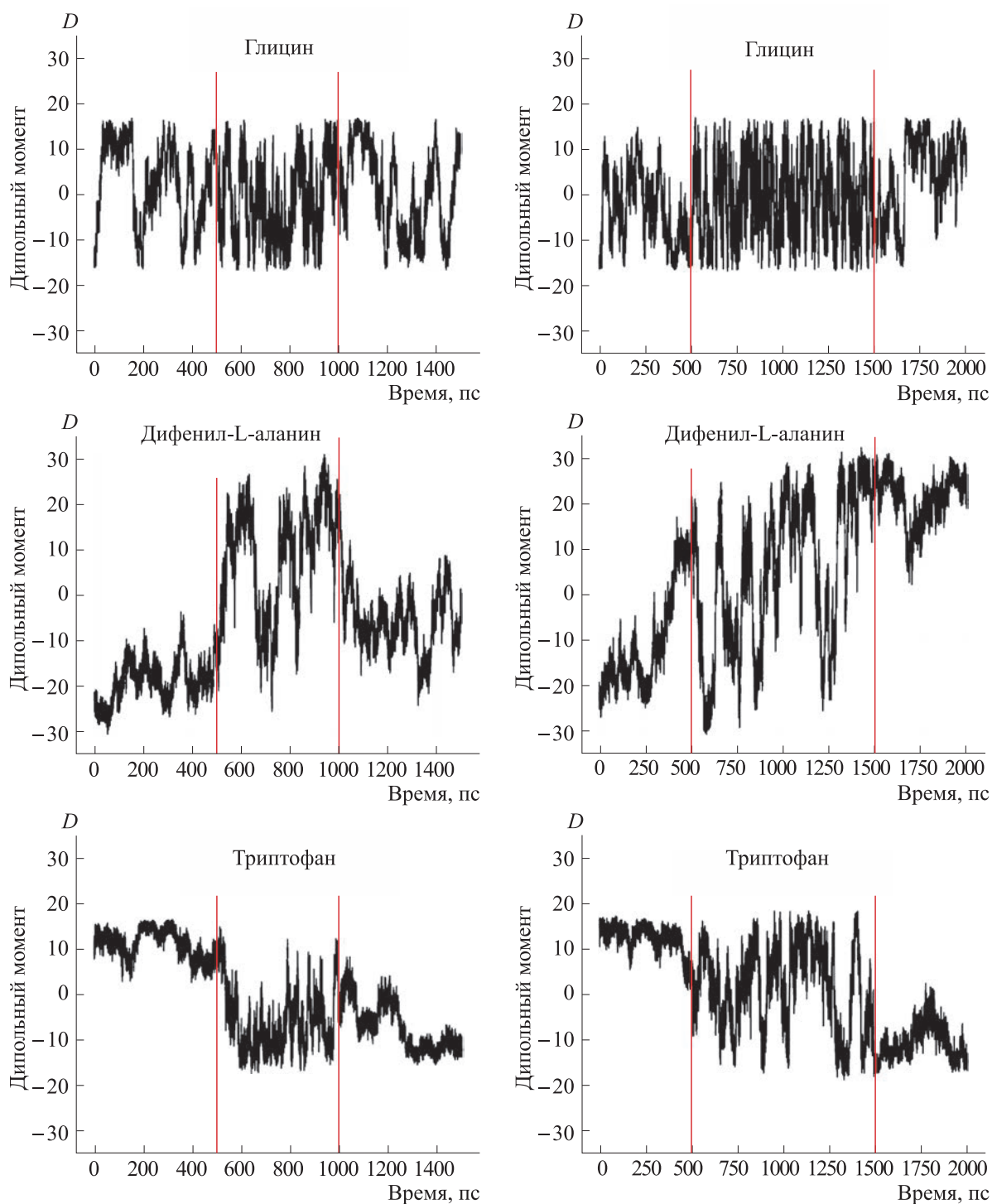
тизированы в достаточно широкой полосе частот, что не позволило обеспечить достоверную интерпретацию.

Некоторые численные значения вычисленных частот в диапазоне  $20\text{--}200\text{ см}^{-1}$  приведены в табл. 1 с указанием ссылок на сопоставляемые литературные источники.

Приведенные спектральные характеристики продемонстрировали хорошее совпадение с литературными данными. Например, наряду с результатами, приведенными в работах [10, 13–14, 17, 45, 46], в работах [51–55] в данном диапазоне исследованы различные аминокислоты, в том числе глицин, дифенил-L-аланин и триптофан. В работе [8] проведены сравнение и анализ низкочастотных спектров комбинационного рассеяния света и ИК-Фурье-спектров нескольких белков с различной вторичной структурой. Низкочастотный диапазон колебательных спектров в исследованных белках не содержал полос отдельных аминокислот. Обобщая полученные в работе результаты, а также литературные данные, авторы работы [8] приходят к выводу, что низкочастотные полосы могут быть отнесены к динамике групп NH, CN, C=O, CCC, CNC, CCN как колебания, которые принадлежат почти всем аминокислотам.

При увеличении объема вычислений в диапазоне частот  $0.5\text{--}5.0\text{ ТГц}$  ( $20\text{--}200\text{ см}^{-1}$ ) было установлено, что возбуждение колебаний происходит практически во всем диапазоне, за исключением редких участков. По-видимому, это свидетельствует о квазинепрерывном характере спектра. Примеры показаны на рис. 7, где представлены спектры некоторых частот при возбуждении электрическим полем в диапазоне  $0.5\text{--}5.0\text{ ТГц}$  ( $20\text{--}200\text{ см}^{-1}$ ) молекул глицина, триптофана и дифенилаланина. Спектры получены путем суперпозиции, или наложения индивидуальных, единичных спектров, соответствующих приведенным выше примерам (табл.).

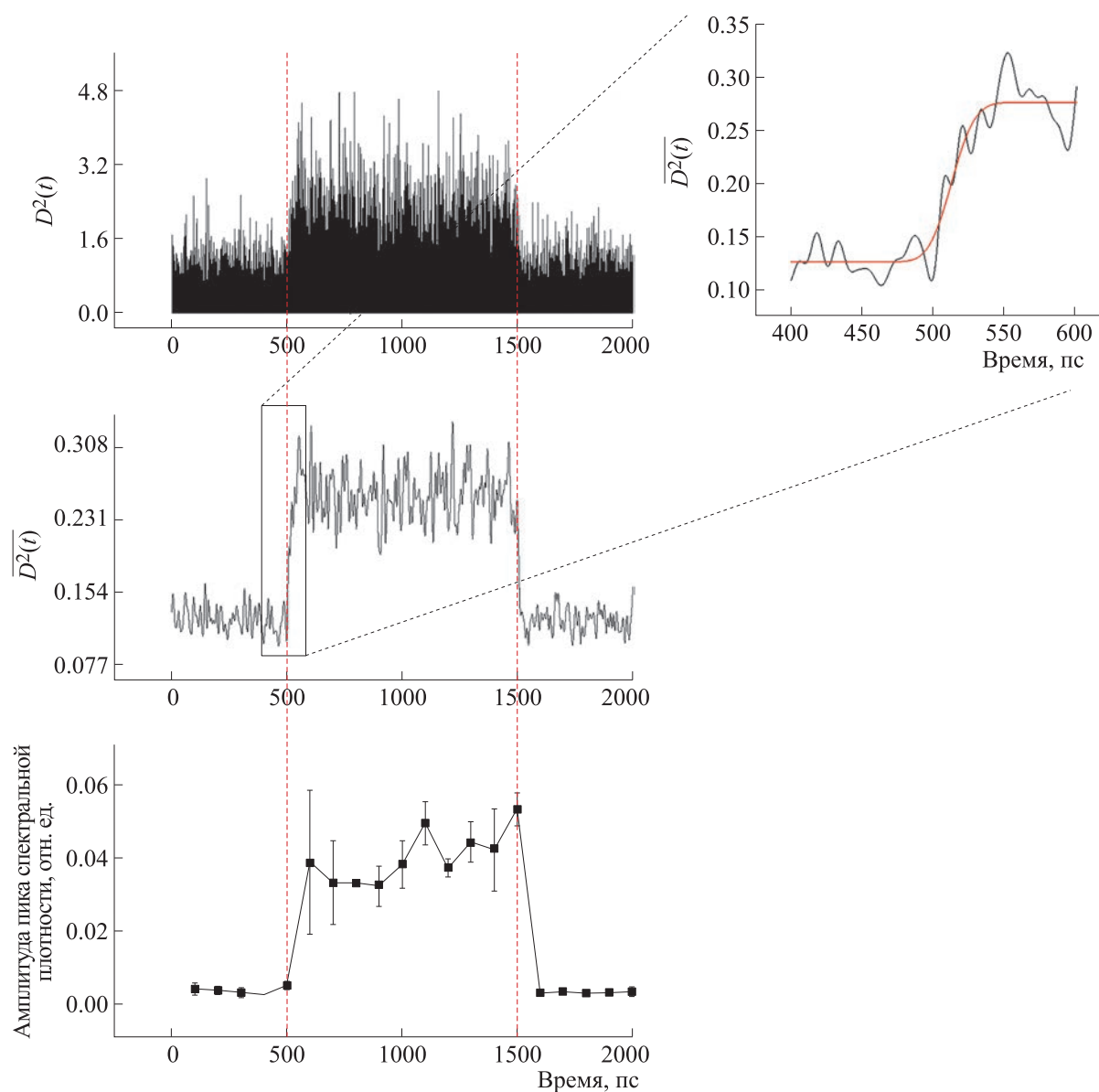
В результате расширения объема вычислений (рис. 7) установлено, что полученные спектральные зависимости являются преимущественно квазинепрерывными, предельно малые значения амплитуд в спектрах были редкими. Для локальных колебаний, лежащих выше по частоте, подобные особенности не являются типичными. Действительно, выше  $200\text{--}220\text{ см}^{-1}$  выявлены преимущественные соответствия каждого осциллятора нормальным модам колебаний атомных групп. Внутримолекулярные колебания на избранных частотах в диапазоне  $200\text{--}5000\text{ см}^{-1}$  обычно рассматриваются как нормальные моды,



**Рис. 5.** Типичные АВР  $x$ -компонент ДМ молекул под воздействием резонансного электрического поля  $f_E = 100$  ТГц ( $3333 \text{ см}^{-1}$ ) представлены тремя наборами графиков: сверху вниз соответственно глицина, дифенил- $L$ -аланина и триптофана. Вертикальной пунктирной линией обозначены временные отрезки действия внешнего электрического поля: слева – 500 пс, справа – 1000 пс.

соответствующие конкретным группам атомов и их динамике [3, 4, 15, 47, 51, 55, 56]. Наиболее существенными нерешенными вопросами для них при этом являются независимость и связанность

колебаний различных мод, допущения коллективных или индивидуальных процессов, наличие линейных и нелинейных режимов, пороговые параметры этих режимов. На рис. 8 представлены



**Рис. 6.** Зависимость квадрата амплитуды  $D(t)$  высокочастотной составляющей ЭДМ от времени (вверху), усреднение этой зависимости с периодом 5 пс (в центре), гистограмма резонансного пика (внизу). На врезке показана аппроксимация фронта импульса  $D^2(t)$ . Обозначены моменты времени включения (500 пс) и выключения (1500 пс) пакета меандра на частоте 100 ТГц ( $3333 \text{ см}^{-1}$ ) [46].

типичные частотные зависимости спектральной плотности вынужденных колебаний ДМ молекул аминокислот при возбуждении электрическим полем на частотах в диапазоне  $200\text{--}5000 \text{ см}^{-1}$ .

Представлены спектры частот вынужденных внутримолекулярных локальных колебаний, полученные спектральным Фурье-разложением АВР интегрального ЭДМ трех АК при наложении электрического поля с частотами 4167, 3333, 2381, 2778, 2083, 1111, 1042 и  $980 \text{ см}^{-1}$ . Они имели дискретный характер и стабильную структуру пиков,

что позволило произвести отнесение полос, то есть выявить преимущественные частоты и дать соответствующую интерпретацию их связи с локальными внутримолекулярными колебаниями в определенных группах атомной подсистемы. Типичные сценарии вынужденных локальных колебаний представляют:

– нерезонансное воздействие в области, удаленной от частот собственных колебаний, не оказывает заметного воздействия на спектральные характеристики ( $2381, 2778$  и  $2083 \text{ см}^{-1}$ );



**Таблица 1.** Комбинации структур хроматина в популяциях, соответствующих наилучшему описанию экспериментальных данных для различных ионов и порогов энерговыделения  $E_0$ 

Глицин	Триптофан	Дифенил-L-аланин
22.00 см <sup>-1</sup> /22.00 см <sup>-1</sup> [15] 37.06 см <sup>-1</sup> /37.00 см <sup>-1</sup> [15]	28.03 см <sup>-1</sup> /28.00 см <sup>-1</sup> [15] 39.71 см <sup>-1</sup> /39.67 см <sup>-1</sup> [16]	41.69 см <sup>-1</sup> /41.67 см <sup>-1</sup> [16]
52.45 см <sup>-1</sup> /52.33 см <sup>-1</sup> [15]	46.85 см <sup>-1</sup> /46.83 см <sup>-1</sup> [48]	
	47.65 см <sup>-1</sup> /47.67 см <sup>-1</sup> [12, 19]	
58.73 см <sup>-1</sup> /58.67 см <sup>-1</sup> [15] 61.09 см <sup>-1</sup> /61.00 см <sup>-1</sup> [16]	60.65 см <sup>-1</sup> /60.67 см <sup>-1</sup> [12, 49] 61.32 см <sup>-1</sup> /61.33 см <sup>-1</sup> [48]	
68.07 см <sup>-1</sup> /68.00 см <sup>-1</sup> [15] 76.86 см <sup>-1</sup> /76.67 см <sup>-1</sup> [12] 77.21 см <sup>-1</sup> /77.00 см <sup>-1</sup> [15]	75.47 см <sup>-1</sup> /75.33 см <sup>-1</sup> [12, 16]	66.45 см <sup>-1</sup> /66.33 см <sup>-1</sup> [12] 67.25 см <sup>-1</sup> /67.33 см <sup>-1</sup> [16]
	85.53 см <sup>-1</sup> /85.67 см <sup>-1</sup> [12]	84.23 см <sup>-1</sup> /84.33 см <sup>-1</sup> [12]
		90.64 см <sup>-1</sup> /90.67 см <sup>-1</sup> [12] 92.14 см <sup>-1</sup> /92.00 см <sup>-1</sup> [16]
135.59 см <sup>-1</sup> /135.83 см <sup>-1</sup> [16]		138.98 см <sup>-1</sup> /138.67 см <sup>-1</sup> [16]
166.78 см <sup>-1</sup> /166.67 см <sup>-1</sup> [15]		

– нерезонансное воздействие в области, близкой к какой-либо частоте собственных колебаний, приводит к некоторым изменениям амплитуд ближайших спектральных пиков (4167 см<sup>-1</sup>);

– резонансное воздействие на частоте собственного колебания оказывает сильное воздействие на спектральные характеристики, амплитуда резонансного пика на один и более порядков превышает амплитуды нерезонансных пиков (980 и 3333 см<sup>-1</sup>);

– резонансное воздействие как основной, так и третьей гармоникой поля (1111 и 1042 см<sup>-1</sup>).

На рис. 9 представлены типичные зависимости амплитуд резонансных пиков колебаний интегрального ЭДМ молекул глицина, дифенил-L-аланина и триптофана от амплитуды приложенного поля.

Линейная связь амплитуды резонансного пика и напряженности возбуждающего поля обнаружена в интервале 0.1–0.4 В/нм. При превышении пороговых значений поля (около 0.4 В/нм) происходил переход в нелинейный режим.

## ОБСУЖДЕНИЕ

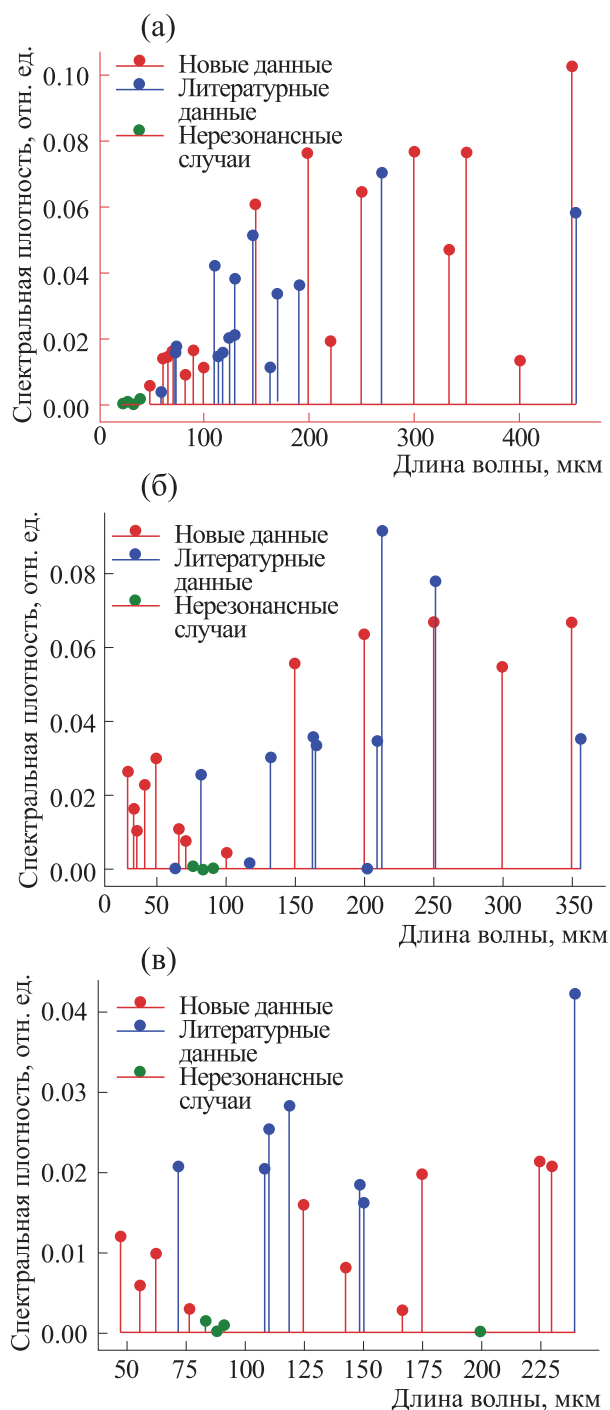
Разработанная методика суперкомпьютерного моделирования молекулярной динамики отличается конфигурацией алгоритмов, включающих наложение внешнего облучающего электрического поля с гармониками на частотах ТГц- и ИК-диапазонов; построение предельно длитель-

ной (приблизительно до 10<sup>6</sup> периодов колебаний) АВР компонентов ДМ молекул с минимальным шагом дискретизации; аподизация полученной АВР и преобразование Фурье; выявление резонансных режимов и представление обобщенной обзорной или панорамной интерпретации. Установлено, что резонансным режимам локального осциллятора нормальной моды асимметричных NH<sub>2</sub>-колебаний глицина и триптофана (например, Амид А, 3333 см<sup>-1</sup>) соответствовали значения постоянной времени  $\tau \approx 10^{-10}$  секунды, полосы частот  $\Delta f \approx 0.01$  ТГц и добротности  $Q \approx 10^4$  (рис. 6).

Благодаря таким параметрам достигалось высокое разрешение спектральных линий в широком диапазоне частот, начиная с наименьших значений порядка 0.5 ТГц (20 см<sup>-1</sup>).

Резонансные сценарии на избранных частотах в диапазоне 200–5000 см<sup>-1</sup> были соотнесены с локальными внутримолекулярными колебаниями в определенных группах атомной подсистемы и совпадали с известными литературными данными. Внешнее поле нерезонансной частоты изменяло распределение амплитуд лишь ближайших по частоте пиков в спектре (рис. 8).

При резонансах, когда частота основной гармоники облучающего поля совпадала с частотой локального колебания, наблюдалось существенное, на порядок и более, возрастание амплитуды выбранного типа колебания в ИК-диапазоне



**Рис. 7.** Суммарные, в виде суперпозиции единичных, спектры некоторых вычисленных частот при возбуждении электрическим полем в диапазоне 0.5–5.0 ТГц ( $20\text{--}200\text{ см}^{-1}$ ) молекул глицина (а), триптофана (б) и дифенилаланина (в). Синим показаны расчетные данные, для которых имеются совпадения с соответствующими данными в литературных источниках (указаны в табл. 1). Красным цветом обозначены расчетные резонансные спектры, полученные впервые, не имеющие совпадений в литературе. Зеленым цветом показаны расчетные промежуточные нерезонансные случаи, в которых возбуждение вынужденных колебаний не наблюдалось.

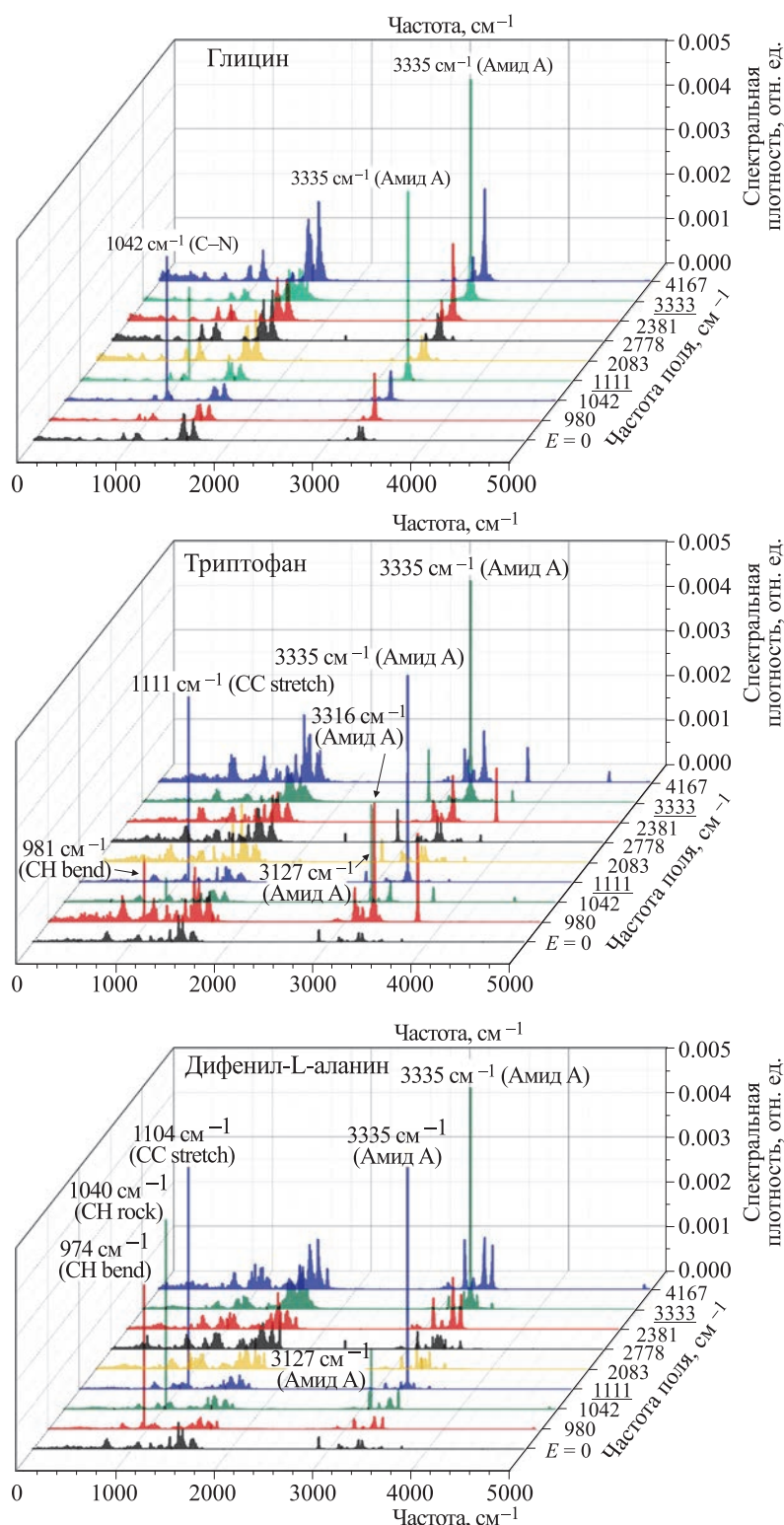
(см. примеры на рис. 8). При этом энергия всех регистрируемых колебаний в большей степени была сосредоточена в резонансном пике. Подобные возбуждения вынужденных колебаний наблюдались также при резонансах на гармониках внешнего поля.

Квазилинейный рост амплитуд резонансных пиков выявлен на начальных участках увеличения амплитуды поля. Определено пороговое значение перехода зависимости амплитуды резонансных колебаний от поля в нелинейный режим в поле, превышающем  $0.4\text{ В/нм}$ , при этом значении наблюдается точное совпадение с данными, представленными в публикациях [41, 50, 57].

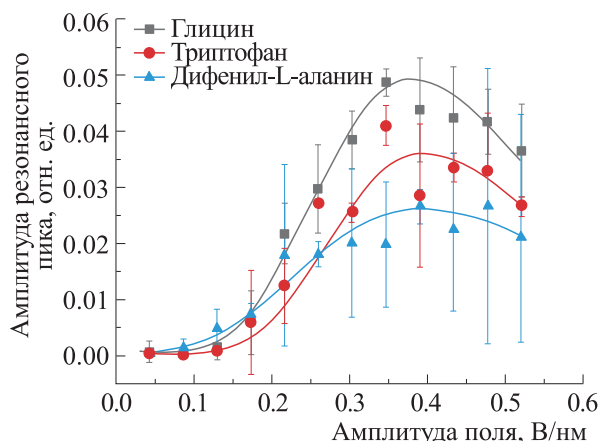
Проведенные систематизация и интерпретация сценариев суммарного спектра в диапазоне частот  $20\text{--}200\text{ см}^{-1}$  показали, что наблюдаемые (рис. 7) квазинепрерывные спектры частот соответствуют, вероятно, модели коллективных, связанных вращательно-колебательных возбужденных состояний, или фононов. Подобные интерпретации высказаны в работах [49–52].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развит метод суперкомпьютерного неравновесного анализа молекулярных колебаний аминокислот глицина, дифенилаланина и триптофана в электрическом поле ТГц- и ИК-диапазонов частот, впервые представленного в виде прямоугольного симметричного меандра. Метод основан на вычислении АВР модуля интегрального ДМ и их Фурье-спектра частот. Реализации продолжительностью до 2 нс были получены суперкомпьютерным моделированием с шагом дискретизации 1 фс. Построены АВР интегрального ЭДМ трех аминокислот при наложении электрического поля с гармониками на разных частотах ТГц- и ИК-диапазонов, что позволило проводить неравновесное моделирование с высокой селективностью частот в широком диапазоне. Фурье-преобразованием АВР вычислены частотные спектры вынужденных локальных колебаний глицина, дифенил-L-аланина и триптофана в вакууме и в водно-солевом окружении, а также параметры переходных динамических процессов во внешнем высокочастотном ЭМП. Выявлен линейный амплитудный режим вынужденных колебаний в ИК-диапазоне, близких к резонансным, установлены пороговые значения поля, в котором происходит переход в нелинейный режим. С применением теории вынужденных колебаний в линейном резонансном режиме вычислены значения добротности осцилляторов и полосы частот колебаний на различных нормальных модах. По сравнению с известными литературными данными и результатами сканирующей спектроскопии представленные спектры частот колебаний



**Рис. 8.** Распределение спектральной плотности колебаний ДМ молекул аминокислот глицина, триптофана и дифенилаланина по спектру частот при напряженности внешнего электрического поля  $E = 0$  и  $E = 0.5$  В/нм при нескольких значениях частоты – 4167, 3333, 2381, 2778, 2083, 1111, 1042 и 980  $\text{cm}^{-1}$ . Резонансные значения частот обозначены жирным шрифтом. Для наглядности изображения часть спектров при резонансных полях с частотами в интервале от 200 до 900  $\text{cm}^{-1}$  не показана.



**Рис. 9.** Зависимости амплитуд резонансных пиков колебаний на частоте 100 ТГц ( $3333\text{ см}^{-1}$ ) интегрального ЭДМ молекул глицина, дифенил-L-аланина и триптофана от амплитуды приложенного поля.

молекулы при облучении полем на фиксированной частоте позволяют получать более детальные динамические сценарии. Результаты могут быть использованы при разработке нанобиотехнологий, биоэлектронных и гетерогенных гибридных микроэлектронных приборов с встроенными биомолекулярными компонентами, представляются полезными для рассмотрения прототипов таких приборов. Разработанный суперкомпьютерный аппаратно-программный комплекс подготовлен для вычисления также более сложных и представительных молекулярных сценариев, например, внутренних и межмолекулярных колебаний в ансамблях и кластерах.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого ([www.scc.spbstu.ru](http://www.scc.spbstu.ru)).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках программы «Суперкомпьютерное моделирование и технология биомолекулярных пленочных структур» (грант № 21-72-20029).

### 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

- Fröhlich H. The Biological Effects of Microwaves and Related Questions. In *Advances in Electronics and Electron Physics*, Ed. by L. Marton and C. Marton (Academic Press, 1980), v. 53, pp. 85–152. DOI: 10.1016/S0065-2539(08)60259-0
- Zhang Q., Shao D., Xu P., and Jiang Z. Effects of an electric field on the conformational transition of the protein: Pulsed and oscillating electric fields with different frequencies. *Polymers (Basel)*, **14** (1), 123 (2022). DOI: 10.3390/polym14010123
- Pearson J. F. and Slifkin M. A. The infrared spectra of amino acids and dipeptides. *Spectrochim. Acta. Part A – Mol. Spectrosc.*, **28** (12), 2403–2417 (1972). DOI: 10.1016/0584-8539(72)80220-4
- Wolpert M. and Hellwig P. Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500  $\text{cm}^{-1}$ . *Spectrochim. Acta. Part A – Mol. Biomol. Spectrosc.*, **64** (4), 987–1001 (2006). DOI: 10.1016/j.saa.2005.08.025
- Mankova A. A., Borodin A. V., Kargovsky A. V., Brandt N. N., Luo Q., Sakodynskaya I. K., Wang K., Zhao H., Chikishev A. Yu., Shkurinov A. P., and Zhang X.-C. Terahertz time-domain and FTIR spectroscopic study of interaction of  $\alpha$ -chymotrypsin and protonated tris with 18-crown-6. *Chem. Phys. Lett.*, **560**, 55–59 (2013), DOI: 10.1016/j.cplett.2012.12.050
- Mankova A. A., Borodin A.V., Kargovsky A.V., Brandt N.N., Kuritsyn I.I., Luo Q., Sakodynskaya I.K., Wang K.J., Zhao H., Chikishev A. Yu., Shkurinov A.P., and Zhang X.-C. Terahertz time-domain and FTIR spectroscopy of tris-crown interaction. *Chem. Phys. Lett.*, **554**, 201–207 (2012). DOI: 10.1016/j.cplett.2012.10.039
- Balakhnina I. A., Brandt N. N., Mankova A. A., and Chikishev A. Y. The problem of manifestation of tertiary structure in the vibrational spectra of proteins. *Vib. Spectrosc.*, **114**, 103250, (2021). DOI: 10.1016/j.vibspec.2021.103250
- Balakhnina I. A., Brandt N. N., Chikishev A. Y., Mankova A. A., and Shpachenko I. G. Low-frequency vibrational spectroscopy of proteins with different secondary structures. *J. Biomed. Opt.*, **22** (9), 091509, (2017). DOI: 10.1117/1.jbo.22.9.091509
- Brandt N. N., Chikishev A. Yu., Kargovsky A. V., Nazarov M. M., Parashchuk O. D., Sapozhnikov D. A., Smirnova I. N., Shkurinov A. P., Sumbatyan N. V. Terahertz time-domain and Raman spectroscopy of the sulfur-containing peptide dimers: Low-frequency markers of disulfide bridges. *Vib. Spectrosc.*, **47** (1), 53–58 (2008). DOI: 10.1016/j.vibspec.2008.01.014

10. Mankova A. A., Nagaeva A. I., Brandt N. N., and Chikishev A. Y. Comparison of vibrational spectra of proteins with similar secondary and different tertiary structures. *Vib. Spectrosc.*, **120**, 103375 (2022). DOI: 10.1016/j.vibspec.2022.103375
11. Zhang F., Tominaga K., Hayashi M., and Wang H.-W. Low-frequency vibration study of amino acids using terahertz spectroscopy and solid-state density functional theory. In *Proc. SPIE/COS Photonics Asia Infrared, Millimeter-Wave, and Terahertz Technologies III* (Beijing, China, 2014), v. 9275, p. 92750D. DOI: 10.1117/12.2071528
12. Wang W. N., Li H. Q., Zhang Y., and Zhang C. L. Correlations between terahertz spectra and molecular structures of 20 standard  $\alpha$ -amino acids. *Wuli Huaxue Xuebao/Acta Phys. – Chim. Sin.*, **25** (10), 2074–2079 (2009), DOI: 10.3866/pku.whxb20090931
13. Tulip P. R. and Clark S. J. Dielectric and vibrational properties of amino acids. *J. Chem. Phys.*, **121** (11), 5201–5210 (2004). DOI: 10.1063/1.1781615
14. Iglesias-Groth S. and Cataldo F. Far-infrared spectroscopy of proteinogenic and other less common amino acids. *Monthly Notices Roy. Astronom. Soc.*, **478** (3), A 3430–3437 (2018). DOI: 10.1093/mnras/sty1226.
15. Matei A., Drichko N., Gompf B., and Dressel M. Far-infrared spectra of amino acids. *Chem. Phys.*, **316** (1–3), 61–71 (2005). DOI: 10.1016/j.chemphys.2005.04.033
16. Yi W., Yu J., Xu Yu., Wang F., Yu Q., Sun H., Xu L., Liu Yu., and Jiang L. Broadband terahertz spectroscopy of amino acids. *Instrum. Sci. Technol.*, **45** (4), 423–439 (2017). DOI: 10.1080/10739149.2016.1270961
17. Ding T., Middelberg A. P. J., Huber T., and Falconer R. J. Far-infrared spectroscopy analysis of linear and cyclic peptides, and lysozyme. *Vib. Spectrosc.*, **61**, 144–150 (2012). DOI: 10.1016/j.vibspec.2012.02.020
18. Oomens J., Steill J. D., and Redlich B. Gas-phase IR spectroscopy of deprotonated amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (12), 4310–4319 (2009). DOI: 10.1021/ja807615v
19. Miyamar F., Yamaguchi M., Tani M., Hangyo M., Yamamoto K., and Tominaga K. THz-time-domain spectroscopy of amino acids in solid phase. In *Mater. Conf. on Lasers and Electro-Optics/Quantum Electronics and Laser Science* (Baltimore, USA, 2003), paper CMG3. [Online]. Available: <https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=CLEO-2003-CMG3>.
20. Volpati D., Aoki P. H. B., Alessio P., Pavinatto F. J., Miranda P. B., Constantino C. J. L., Oliveira O. N. Jr, Vibrational spectroscopy for probing molecular-level interactions in organic films mimicking biointerfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **207** (1), 199–215 (2014). DOI: 10.1016/j.cis.2014.01.014
21. Gaigeot M. P. and Spezia R. Theoretical methods for vibrational spectroscopy and collision induced dissociation in the gas phase. *Top. Curr. Chem.*, **364**, 99–151 (2015). DOI: 10.1007/128\_2014\_620
22. Moon J. H., Oh J. Y., and Kim M. S. A systematic and efficient method to estimate the vibrational frequencies of linear peptide and protein ions with any amino acid sequence for the calculation of Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus rate constant.. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **17** (12), 1749–1757 (2006). DOI: 10.1016/j.jasms.2006.08.001
23. Millefiori S., Alparone A., Millefiori A., and Vanella A. Electronic and vibrational polarizabilities of the twenty naturally occurring amino acids. *Biophys. Chem.*, **132** (2–3), 139–147 (2008). DOI: 10.1016/j.bpc.2007.11.003
24. Бутырская Е. В., Нечаева Л. С., Шапошник В. А. и Дроздова Е. И. Отнесение полос в ИК спектрах водных растворов глицина на основе квантово-химического расчета. *Сорбционные и хроматографические процессы*, pp. 501–512, 2012.
25. Deniz E., et al. “Through bonds or contacts? Mapping protein vibrational energy transfer using non-canonical amino acids,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, p. 3284, Jun. 2021, DOI: 10.1038/s41467-021-23591-1
26. Зезина Т. И. и Цыбин О. Ю. Субпикосекундная динамика дипольного момента молекулярных полиаланинов. *Науч.-техн. ведомости СПбГПУ. Физ.-мат. науки.*, **10** (4), 100–110 (2017). DOI: 10.18721/JPM.10408
27. Баранов М. А., Непомнящая Э. К. и Цыбин О. Ю. Фурье-спектр интегрального дипольного момента суперкомпьютерных моделей ряда аминокислот. *Науч.-техн. ведомости СПбГПУ. Физ.-мат. науки.*, **15** (4), 55–68 (2022).
28. Ruan X., Ruan X., and Huang H. Application of terahertz spectroscopy in medical microbiological detection. *J. Phys.: Conf. Ser.*, **2425**, 012045 (2023). DOI: 10.1088/1742-6596/2425/1/012045
29. Turton D. A., Senn H. M., Harwood Th., Laphorn A. J., Ellis E. M., and Wynne K. Terahertz underdamped vibrational motion governs protein-ligand binding in solution. *Nat. Commun.*, **3** (5), 3999 (2014). DOI: 10.1038/ncomms4999.
30. Romanenko S., Begley R., Harvey A. R., Hool L., and Wallace V. P. The interaction between electromagnetic fields at megahertz, gigahertz and terahertz frequencies with cells, tissues and organisms: Risks and potential. *J. Roy. Soc. Interface*, **14** (137), 20170585 (2017). DOI: 10.1098/rsif.2017.0585
31. Wu H. L., Ghaani M. R., Futera Z., and English N. J. Effects of externally applied electric fields on the manipulation of solvated-chignolin folding: static versus alternating-field dichotomy at play. *J. Phys. Chem. B*, **126** (2), 376–386 (2022). DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c06857
32. Vaden T. D., De Boer T. S. J. A., Simons J. P., Snoek L. C., Suhai S., and Paizs B. Vibrational spectroscopy and conformational structure of protonated polyalanine peptides isolated in the gas phase. *J. Phys. Chem. A*, **112** (20), 4608–4616 (2008). DOI: 10.1021/jp800069n
33. Noble B. B., Todorova N., and Yarovsky I. Electromagnetic bioeffects: a multiscale molecular simulation per-

- spective. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **24** (11), 6327–6348 (2022). DOI: 10.1039/d1cp05510k
34. Woods K. N. Solvent-induced backbone fluctuations and the collective librational dynamics of lysozyme studied by terahertz spectroscopy. *Phys. Rev. E*, **81** (3), 031915 (2010). DOI: 10.1103/PhysRevE.81.031915
  35. Niehues G., Heyden M., Schmidt D. A., and Havenith M. Exploring hydrophobicity by THz absorption spectroscopy of solvated amino acids. *Faraday Discussions*, **150**, 193–207 (2011). DOI: 10.1039/c0fd00007h
  36. Jeong S.-Y., Cheon H., Lee D., and Son J.-H. Determining terahertz resonant peaks of biomolecules in aqueous environment. *Opt. Express*, **28** (3), 3854 (2020). DOI: 10.1364/oe.381529
  37. Grechko M., Hasegawa T., D'Angelo F., Turchinovich D., Nagata Yu., and Bonn M. Coupling between intra- and intermolecular motions in liquid water revealed by two-dimensional terahertz-infrared-visible spectroscopy. *Nat. Commun.*, **9** (1), 885 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-03303-y
  38. Xu J., Galan J., Ramian G., Savvidis P., Scopatz A., Birge R. R., Allen S. J., and Plaxco K. Terahertz circular dichroism spectroscopy of biomolecules. In *Proc. SPIE, Chemical and Biological Standoff Detection*, **5268**, 19 (2004). DOI: 10.1117/12.518533
  39. Beyer C., Christen P., Jelesarov I., and Fröhlich J. Real-time assessment of possible electromagnetic-field-induced changes in protein conformation and thermal stability. *Bioelectromagnetics*, **35** (7), 470–478 (2014). DOI: 10.1002/bem.21865
  40. Calabrò E. and Magazù S. Resonant interaction between electromagnetic fields and proteins: A possible starting point for the treatment of cancer. *Electromagn. Biol. Med.*, **37** (3), 155–168 (2018). DOI: 10.1080/15368378.2018.1499031
  41. English N. J. and Waldron C. J. Perspectives on external electric fields in molecular simulation: Progress, prospects and challenges. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17** (19), 12407–12440 (2015). DOI: 10.1039/c5cp00629e
  42. Floros S., Liakopoulou-Kyriakides M., Karatasos K., and Papadopoulos G. E. Frequency dependent non-thermal effects of oscillating electric fields in the microwave region on the properties of a solvated lysozyme system: A molecular dynamics study. *PLoS One*, **12** (1), e0169505 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0169505
  43. Wang H., Schütte Ch., Ciccotti G., and Site L. D. Exploring the conformational dynamics of alanine dipeptide in solution subjected to an external electric field: A nonequilibrium molecular dynamics simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, **10** (4), 1376–1386 (2014). DOI: 10.1021/ct400993e
  44. Solomentsev G. Y., English N. J., and Mooney D. A. Effects of external electromagnetic fields on the conformational sampling of a short alanine peptide. *J. Comput. Chem.*, **33** (9), 917–923 (2012). DOI: 10.1002/jcc.22912
  45. Непомнящая Э. К., Баранов М. А. и Цыбин О. Ю. Компьютерная резонансная динамика молекулы глицина в электрическом поле инфракрасного диапазона. *Письма в ЖТФ*, **49** (7), 8–11 (2023). DOI: 10.21883/PJTF.2023.07.54913.19435
  46. Mohamed M. E. and Abdelhafeez M. A. Experimental and computational vibration study of amino acids. *Int. Lett. Chem. Phys. Astron.*, **15** (1), 1–17 (2013). DOI: 10.56431/p-177d21
  47. Barth A. and Zscherp C. What vibrations tell us about proteins. *Quart. Rev. Biophys.*, **35** (4), 369–430 (2002). DOI: 10.1017/S0033583502003815
  48. Ma X. J., Zhao H. W., Dai B., and Ge M. Progress in application of THz-TDS to protein study. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi / Spectroscopy Spectr. Anal.*, **28** (10), 2237–2242 (2008). Accessed: Feb. 16, 2023. [Online]. Available: <https://europepmc.org/article/med/19123380>
  49. Özer Z., Gök S., Altan H., and Severcan F. Concentration-based measurement studies of L-tryptophan using terahertz time-domain spectroscopy (THz-TDS). *Appl. Spectrosc.*, **68** (1), 95–100 (2014). DOI: 10.1366/13-07165
  50. Reale R., English N. J., Marracino P., Liberti M., and Apollonio F. Dipolar response and hydrogen-bond kinetics in liquid water in square-wave time-varying electric fields. *Mol. Phys.*, **112** (14), 1870–1878 (2014). DOI: 10.1080/00268976.2013.867081
  51. Mancini T., Mosetti R., Marcelli A., Petrarca M., Lupi S., and D'Arco A. Terahertz Spectroscopic Analysis in Protein Dynamics: Current Status. *Radiation*, **2** (1), 100–123 (2022). DOI: 10.3390/radiation2010008
  52. Sanders T. J., Allen J. L., Plathe R., Horvat J., and Lewis R. A. The 3, 5, 6, and 7 THz resonances of  $\alpha$ -glycine. *Spectrochim. Acta. Part A – Mol. Biomol. Spectrosc.*, **253**, 119544 (2021). DOI: 10.1016/j.saa.2021.119544
  53. Panicker C. Y., Varghese H. T., Mary Y. S. A., Kumar G. K., Harikumar B., Raju K., Devi P. S. A. Vibrational spectroscopic study of glycine molecule. *Mater. Sci. Res. India*, **7** (1), 239–243 (2010). DOI: 10.13005/msri/070133
  54. Zhang F., Wang H. W., Tominaga K., and Hayashi M. Intramolecular vibrations in low-frequency normal modes of amino acids: L-alanine in the neat solid state. *J. Phys. Chem. A*, **119** (12), 3008–3022 (2015). DOI: 10.1021/jp512164y
  55. Iglesias-Groth S. and Cataldo F. Far-infrared spectroscopy of proteinogenic and other less common amino acids. *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, **478** (3), 3430–3437 (2018). DOI: 10.1093/MNRAS/STY1226
  56. Barth A. The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **74** (3–5), 141–173 (2000). DOI: 10.1016/S0079-6107(00)00021-3
  57. English N. J. Molecular simulation of external electric fields on the crystal state: a perspective. *Crystals*, **11** (11), 1405 (2021). DOI: 10.3390/cryst11111405

## **Supercomputer Simulation of Intramolecular Vibrations of Glycine, Diphenylalanine, and Tryptophan in Terahertz and Infrared Electric Fields**

**M.A. Baranov, E.K. Karseeva, and O.Yu. Tsybin**

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

A method for analyzing intramolecular vibrations of the amino acid like glycine, diphenylalanine and tryptophan in terahertz and infrared electric fields has been implemented with Fourier frequency spectrum calculation of the integral dipole moment amplitude-time realizations. Realizations lasting up to 2 ns were obtained by supercomputer modeling with a sampling step of 1 fs. The results obtained showed new possibilities of applying this method, in which the electric field simulated with a symmetrical meander was used for the first time. Our findings deepen the current understanding about dynamic properties of biomolecules in external electromagnetic radiation. These data can also be used in the development of nanobiotechnologies, bioelectronic and heterogenous hybrid microelectronic devices with embedded biomolecular components.

*Keywords: amino acid, molecular dynamics, computer modeling, biomolecular electronics, heterogenous hybrid microelectronics*



## ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЕ НИТРОЗИЛИРОВАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И МИОГЛОБИНА И ЕГО АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ

© 2024 г. К.Б. Шумаев\*, \*\*, #, Д.И. Грачев\*\*\*, О.В. Космачевская\*,  
А.Ф. Топунов\*, Э.К. Рууге\*\*

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
Ленинский просп., 33/2, Москва, 119071, Россия

\*\*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова  
Минздрава России, ул. Академика Чазова, 15а, Москва, 121552, Россия

\*\*\*Ереванский государственный университет, ул. Алека Манукяна, 1, Ереван, 0025, Республика Армения

#E-mail: tomorov@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Соль Анджели представляет собой донор нитроксила, благодаря чему может предотвращать негативные эффекты гемолиза, такие как суживающее действие свободного гемоглобина в плазме крови. Однако молекулярные механизмы взаимодействия нитроксила с различными гемопротейдами недостаточно выяснены. Известно, что возникающие при окислительном стрессе оксоферрильные формы гемопротейдов являются сильными прооксидантами. В данной работе было исследовано восстановительное нитрозилирование нитроксилом мет- и оксоферрильной форм гемоглобина и миоглобина. Эксперименты проводили *in vitro*, регистрируя нитрозильные формы гемопротейдов с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса. Полученные результаты указывают на антиоксидантный эффект соли Анджели в системах, моделирующих окисление гемоглобина или миоглобина пероксидом водорода. Кроме того, добавление пероксида водорода к метформам гемоглобина и миоглобина приводило к появлению ЭПР-сигнала свободных радикалов с  $g = 2.005$ , ассоциированного с белковой частью этих гемопротейдов. Таким образом, нитроксил действует одновременно как восстановительный и нитрозилирующий агент, тем самым предотвращая образование оксоферрильных форм гемопротейдов. Терапевтические свойства соли Анджели могут во многом быть связаны с антиоксидантным эффектом, оказываемым на компоненты крови.

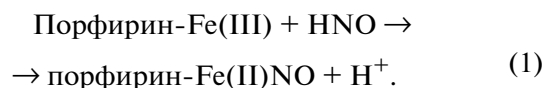
**Ключевые слова:** восстановительное нитрозилирование, гемоглобин, миоглобин, соль Анджели, спектроскопия ЭПР.

DOI: 10.31857/S0006302924020027, EDN: OVSSRT

Нитроксил (HNO) является продуктом одноэлектронного восстановления и протонирования такого важного биологически активного соединения как оксид азота (NO) [1–4]. Считается, что доноры нитроксила и его анионной формы (NO<sup>-</sup>) могут быть перспективными фармакологическими препаратами с достаточно широким спектром применения [1–3]. В частности, существуют данные о том, что при диабете в ткани миокарда возникает резистентность к NO, которую можно избежать в случае применения доноров HNO [2]. Уникальные химические свойства нитроксила

позволяют ему функционировать как в качестве классического антиоксиданта, так и ингибитора неферментативного гликирования биомолекул [1, 3].

Известно также, что нитроксил осуществляет восстановительное нитрозилирование метформ гемовых групп (порфиринов-Fe(II)) в следующей реакции [4]:



Константа скорости реакции (1), рассчитанная для различных гемопротейдов, колеблется в пределах от  $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  до  $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [4].

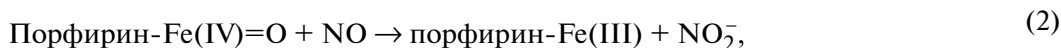
В ходе взаимодействия гемоглобина и миоглобина с различными гидропероксидами образуются оксоферрильные формы этих белков, которые

**Сокращения:** ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; Hb-Fe(IV)=O и Mb-Fe(IV)=O – оксоферрильные формы гемоглобина и миоглобина, соответственно; Hb-Fe(II)NO и Mb-Fe(II)NO – нитрозилированные по железу гема формы гемоглобина и миоглобина.



являются сильными прооксидантами и участвуют в развитии патологий, связанных с окислительным стрессом [5–8]. В частности, оксоферрилгемоглобин (Hb-Fe(IV)=O) играет важную роль в патогенезе атеросклероза [9]. Вместе с тем имеются данные о формировании пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и далее Hb-Fe(IV)=O в реакциях нит-

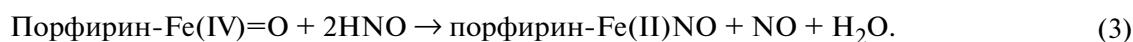
роксила с оксигемоглобином (Hb-Fe(II)=O) [10]. Антиоксидантные свойства доноров оксида азота обусловлены взаимодействием NO с оксоферрильными комплексами железа и свободными радикалами липидов [11–13]. Так, NO восстанавливает оксоферрильную форму гема (порфирин-Fe(IV)=O) до метформы (реакция (2)):



причем сам оксид азота окисляется до нитрита.

В этом случае константа скорости реакции восстановления оксоферрильных форм миоглобина и гемоглобина составляла  $(18\text{--}24) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [14, 15]. В свою очередь, нитрит окисляется оксоферрильными гемами до диоксида азота ( $\bullet\text{NO}_2$ ), хотя и с низкой скоростью. Константа скорости данной реакции находится в диапазоне  $(1.6\text{--}7.5) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [15].

Однако остается практически неизученным взаимодействие HNO с гемопротеидами в оксоферрильной форме и роль этих процессов при окислительном стрессе. Мы полагаем, что HNO восстанавливает порфирин-Fe(IV)=O с образованием нитрозильного комплекса гемового железа (порфирин-Fe(II)NO) в ходе следующей реакции:



В связи с этим в настоящей работе мы исследовали вызванное HNO/NO<sup>-</sup> восстановительное нитрозилирование оксоферрильных форм гемоглобина и миоглобина, а также провели сравнение качественных особенностей и кинетики реакций оксоферрил- и метмиоглобина с нитроксилом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы.** В работе использовали метгемоглобин быка и метмиоглобин из сердца лошади, каталазу из бычьей печени, пероксид водорода, KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> и Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>, полученные от фирмы Sigma-Aldrich (США), а также соль Анджели (оксигипонитрит натрия) от фирмы Sauman Еuroра (Эстония).

**Подготовка модельных реакционных систем.** С помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было изучено восстановительное нитрозилирование оксоферрильных или метформ гемоглобина и миоглобина в модельных реакционных системах — растворах в К,Na-фосфатном буфере (100 мМ, рН 7.4). Конечная концентрация гемоглобина и миоглобина составляла 0.4 мМ и 1.6 мМ соответственно. В качестве донора нитроксила (HNO/NO<sup>-</sup>) была использована соль Анджели (Na<sub>2</sub>(ONNO<sub>2</sub>)) в диапазоне концентраций от 2 до 15 мМ. Для получения оксоферрильных форм исследуемых гемопротеидов пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) добавляли к метгемоглобину или метмиоглобину в

концентрации 18 мМ. Через 2 мин инкубации смеси непрореагировавший H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> удаляли каталазой (600 ед./мл).

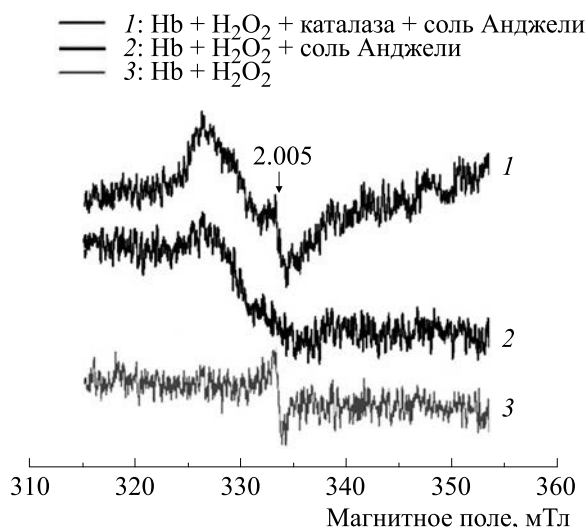
**Регистрация спектров ЭПР.** Для обеспечения постоянства газового состава реакционную смесь вводили в газопроницаемую PTFE Sub-Lite-Wall капиллярную трубку (внутренний диаметр 0.635 мм, толщина стенки 0.051 мм) фирмы Zeus Industrial Products Inc. (США). Заполненную капиллярную трубку складывали дважды и помещали в кварцевую трубку (диаметром ~4 мм), открытую с обоих концов. Это обеспечивало поток газа варьируемого состава вокруг образца в резонаторе спектрометра ЭПР во время регистрации спектров.

Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (25°C) на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 (УП «КБСТ» БГУ, Беларусь). Условия записи спектров ЭПР: частота 9.35 ГГц, ослабление СВЧ 5 дБ. Амплитуда модуляции внешнего магнитного поля составляла 0.4 мТл, развертка — 40 мТл.

**Статистический анализ.** Обработка и анализ экспериментальных результатов, в том числе статистические расчеты, были проведены в программе Origin Pro 8 (OriginLab Corp., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

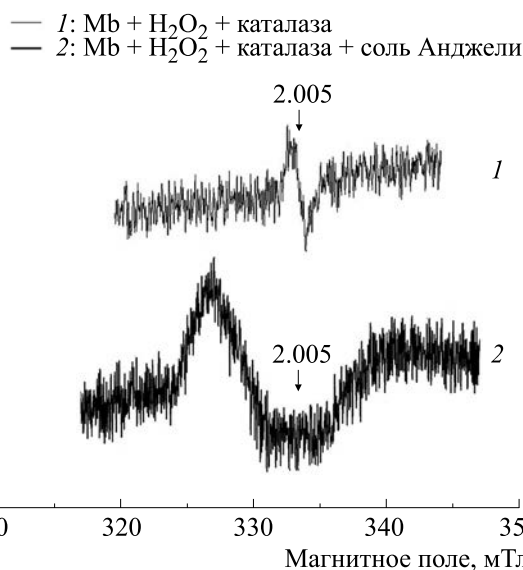
Показано, что после добавления соли Анджели в реакционной системе, содержащей оксоферрилгемоглобин, регистрируется сигнал ЭПР



**Рис. 1.** Спектр 1 – ЭПР-спектр нитрозильного комплекса гемоглобина (Hb-Fe(II)NO), зарегистрированный при последовательном добавлении пероксида водорода, каталазы и далее соли Анджели к раствору метгемоглобина в фосфатном буфере (100 мМ, рН 7.4); спектр 2 – спектр Hb-Fe(II)NO, полученный взаимодействием нитроксила с метгемоглобином без добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; спектр 3 – ЭПР-спектр свободнорадикального сигнала с *g*-фактором 2.005 в растворе метгемоглобина с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

(рис. 1, спектр 1), характерный для нитрозильного комплекса дезоксигемоглобина (Hb-Fe(II)NO). Этот факт свидетельствует о протекании реакции восстановительного нитрозилирования оксоферрильной гемовой группы (реакция (3)). С другой стороны, в этой реакционной системе наблюдался свободнорадикальный сигнал с *g*-фактором, равным 2.005. Сигнал аналогичного свободного радикала возникал также при добавлении пероксида водорода к метгемоглобину (рис. 1, спектр 3). Подобные сигналы ЭПР, описанные в работе [16], представляют собой стабильные белковые радикалы. В качестве контрольного представлен спектр ЭПР Hb-Fe(II)NO, полученный нитрозилированием метгемоглобина в присутствии соли Анджели (рис. 1, спектр 2).

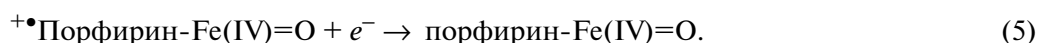
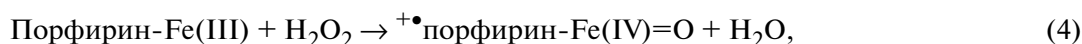
Сигнал с *g*-фактором, равным 2.005, наблюдался также при добавлении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к метмиогло-



**Рис. 2.** Спектр 1 – ЭПР-спектр свободнорадикального сигнала с *g*-фактором 2.005, образующегося при добавлении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к раствору метмиоглобина (окисление до Mb-Fe(IV)=O); спектр 2 – ЭПР-спектр нитрозильного комплекса миоглобина (Mb-Fe(II)NO), полученного в результате восстановительного нитрозилирования нитроксилом его оксоферрильной формы.

бину (рис. 2, спектр 1). По всей видимости, этот сигнал, как и в аналогичных экспериментах с гемоглобином, связан с образованием свободных радикалов в белковой цепи гемопротеида, что согласуется с литературными данными [6, 7, 17]. Вместе с тем после удаления непрореагировавшего H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> каталазой и введения в реакционную смесь донора нитроксила происходило нитрозилирование образовавшегося оксоферрилмиоглобина (Mb-Fe(IV)=O) (рис. 2, спектр 2). Однако сигнал свободного радикала, ассоциированного с белком, в таком случае не регистрировался.

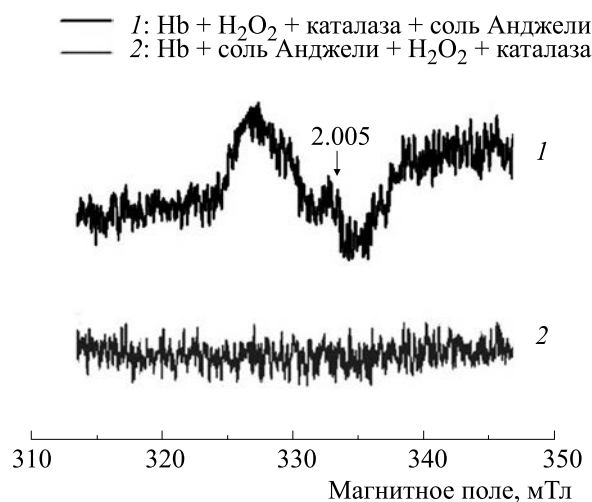
Считается, что при взаимодействии метформ гемопротеидов с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> образуется в начале перферрильная (<sup>+</sup>•порфирин-Fe(IV)=O), а затем оксоферрильная (порфирин-Fe(IV)=O) форма гема в следующих реакциях:



Донором электрона при восстановлении катион-радикала перферрильного гема в реакции (5) могут быть аминокислотные остатки белковой цепи гемопротеида. Следует отметить, что в результате такого автоокисления гемопротеидов образу-

ются в основном свободные радикалы тирозина и триптофана [5–7].

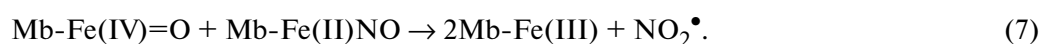
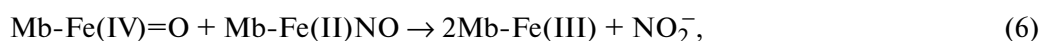
В случае добавления соли Анджели к метгемоглобину до пероксида водорода и каталазы (рис. 3, спектр 2) не регистрировались сигналы



**Рис. 3.** Спектр 1 – ЭПР-спектр нитрозильного комплекса гемоглобина при последовательном добавлении пероксида водорода, каталазы и соли Анджели к раствору метгемоглобина в фосфатном буфере (восстановительное нитрозилирование Hb-Fe(IV)=O); спектр 2 – ЭПР-спектр реакционной смеси при добавлении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> после введения соли Анджели.

ЭПР как Hb-Fe(II)NO, так и белкового радикала, что может быть следствием взаимодействия между нитрозилированной и оксоферрильной фор-

мами гемовых групп. Подобные реакции с участием нитрозильного комплекса миоглобина (Mb-Fe(II)NO) были описаны в работе [18]:



Таким образом, нейтрализация перферрильной и оксоферрильной форм гемопротеидов в реакциях (2), (3), (6) и (7) может лежать в основе антиоксидантного действия нитроксила. Также нитроксил, по-видимому, способен восстанавливать ассоциированные с белковой цепью миоглобина свободные радикалы (рис. 2). Однако в случае гемоглобина эта реакция не происходит. Этот факт может быть связан с большей доступностью свободных радикалов аминокислот для HNO/NO<sup>-</sup> в молекуле миоглобина по сравнению с гемоглобином. Важно отметить, что именно свободные радикалы белковых цепей гемоглобина ответственны за образование ковалентных сшивок между его субъединицами [9, 19].

По амплитуде сигналов ЭПР Mb-Fe(II)NO оценивали кинетику восстановительного нитрозилирования нитроксидом оксоферрильной и метформ миоглобина (рис. 4). Как видно из представленных на этом рисунке данных, самый высокий уровень и скорость образования Mb-Fe(II)NO наблюдаются при нитрозилировании Mb-Fe(IV)=O (рис. 4, кривая 3).

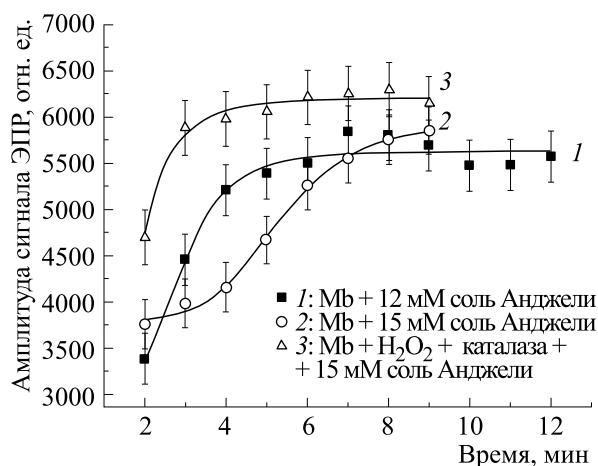
Кроме того, были получены концентрационные зависимости нитрозилирования оксоферрильной и метформ Mb под действием соли Ан-

джели (рис. 5). Нитрозилирование метMb происходило при меньших концентрациях донора нитроксила (рис. 5, кривая 1). Вместе с тем, в случае Mb-Fe(IV)=O эффективность нитрозилирования гема возрастала при высоких концентрациях донора HNO/NO<sup>-</sup> (рис. 5, кривая 2). Эти факты согласуются с тем, что в реакции (3) для получения нитрозильного комплекса гемового железа требуются две молекулы нитроксила.

Необходимо отметить, что в используемых нами экспериментальных модельных системах наряду с реакциями (1) и (3) происходит взаимодействие нитроксильного аниона с молекулярным кислородом и образование такого сильного окислителя как пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>) [4]:

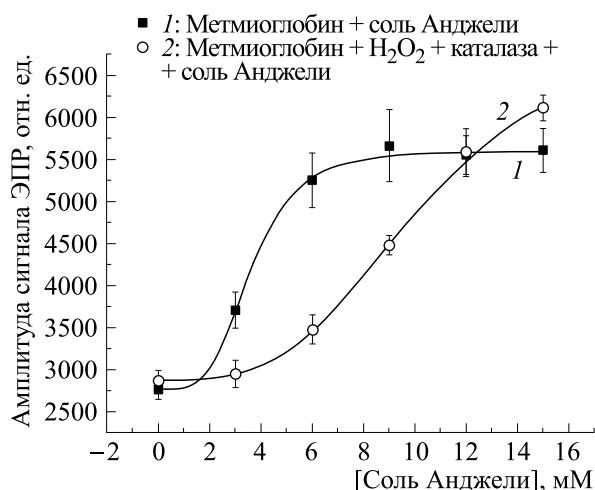


Можно предположить, что эта реакция снижает эффективность нитрозилирования гемовой группы, причем в большей степени в случае оксоферрильной формы Mb (реакция (3)). К тому же образующийся в реакции (8) пероксинитрит реагирует с оксоферрильной и метформами гемопротеидов с формированием различных интермедиатов и продуктов [19–21], которые также могут влиять на кинетику образования Mb-Fe(II)NO.



**Рис. 4.** Кинетика восстановительного нитрозилирования миоглобина при различных условиях (кривые 1 и 2 – восстановительное нитрозилирование метмиоглобина при разных концентрациях соли Анджели, 12 и 15 мМ соответственно, кривая 3 – восстановительное нитрозилирование оксоферрилмиоглобина). Аппроксимация логистическими кривыми выполнена в программе Origin Pro.

На основании полученных нами данных мы полагаем, что нитроксил действует как антиоксидант в системах, моделирующих перекисное окисление гемопротеидов. Ранее было показано, что антиоксидантными свойствами обладают такие физиологические производные NO, как динитрозильные комплексы железа [11, 12]. В частности, данные комплексы, связанные с гемогло-



**Рис. 5.** Зависимости амплитуды сигнала ЭПР нитрозильного комплекса миоглобина, образующегося при восстановительном нитрозилировании метмиоглобина (кривая 1) и оксоферрилмиоглобина (кривая 2) от концентрации донора нитроксила – соли Анджели. Для построения графика были использованы максимальные значения амплитуды спектров за время измерения каждого образца.

бином, предотвращают его окислительную модификацию под действием пероксида водорода и пероксинитрита [22, 23], а также органических радикалов [24]. Можно предположить, что HNO, восстанавливая оксоферрилгемоглобин, предотвращает его атерогенное и провоспалительное действие [9]. С другой стороны известно, что соль Анджели или другие доноры нитроксила могут снижать негативные последствия гемолиза, возникающие при переливании консервированной крови, гемолитических анемиях, и других заболеваний, которые связаны в первую очередь с выходом гемоглобина в кровеносное русло [10].

## ВЫВОДЫ

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что антиоксидантное действие соли Анджели в значительной степени связано с нейтрализацией оксоферрильных форм гемопротеидов, способных вызывать окисление различных важных биомолекул [5, 8, 9, 22]. Нами установлено, что основным механизмом такой нейтрализации является восстановительное нитрозилирование оксоферрильных гемовых групп.

Таким образом, соль Анджели может проявлять широкий спектр физиологических эффектов, которые могут иметь потенциальное терапевтическое значение. Вместе с тем в ходе клинических испытаний этой терапии или ее применения в исследовательских целях необходим тщательный мониторинг гемодинамических эффектов и токсичности из-за ряда особенностей соли Анджели [10].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доц. Е.Ш. Мамасалисову за ряд ценных замечаний и интерес к этой работе.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе не использовались биологические образцы животных и человека.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lopez B. E., Shinyashiki M., Han T. H., and Fukuto J. M. Antioxidant actions of nitroxyl (HNO). *Free Radic. Biol. Med.*, **42** (4), 482–491 (2007). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.015
2. Li J. C., Velagic A., Qin C. X., Li M., Leo C. H., Kemp-Harper B. K., Ritchie R. H., and Woodman O. L.

- Diabetes attenuates the contribution of endogenous nitric oxide but not nitroxyl to endothelium dependent relaxation of rat carotid. *Arteries Front. Pharmacol.*, **11**, 585740 (2021). DOI: 10.3389/fphar.2020.585740
3. Kosmachevskaya O. V., Nasybullina E. I., Pugachenko I. S., Novikova N. N., and Topunov A. F. Antiglycation and Antioxidant Effect of Nitroxyl towards Hemoglobin. *Antioxidants*, **11** (10), (2022). DOI: 10.3390/antiox11102007
  4. Michalski R., Smulik-Izydorczyk R., Pięta J., Rola M., Artelska A., Pierzchała K., Zielonka J., Kalyanaraman B., and Sikora A. B. The Chemistry of HNO: Mechanisms and Reaction Kinetics. *Front. Chem.*, **10**, Article 930657 (2022). DOI: 10.3389/fchem.2022.930657
  5. Baron C. P. and Andersen H. J. Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Agric. Food Chem.*, **50** (14), 3887 (2002). DOI: 10.1021/jf011394w
  6. Reeder B. J., Svistunenko D. A., Sharpe M. A., and Wilson M. T. Characteristics and mechanism of formation of peroxide-induced heme to protein cross-linking in myoglobin. *Biochemistry*, **41** (1), 367–375 (2002). DOI: 10.1021/bi011335b
  7. Reeder B. J., Svistunenko D. A., Cooper C. E., and Wilson M. T. The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology. *Antioxid. Redox Signal.*, **6** (6), 954–966 (2004). DOI: 10.1089/ars.2004.6.954
  8. Wilson M. T. and Reeder B. J. The peroxidatic activities of Myoglobin and Hemoglobin, their pathological consequences and possible medical interventions. *Mol. Aspects Med.*, **84**, 101045 (2022). DOI: 10.1016/j.mam.2021.101045
  9. Potor L., Bányai E., Becs G., Soares M. P., Balla G., Balla J., and Jeney V. Atherogenesis May Involve the Prooxidant and Proinflammatory Effects of Ferryl Hemoglobin. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2013**, Article ID 676425 (2013). DOI: 10.1155/2013/676\_25
  10. Solomon S. B., Bellavia L., Sweeney D., Piknova B., Perlegas A., Helms C. C., Ferreyra G. A., King S. B., Raat N. J. H., Kern S. J., Sun J., McPhail L. C., Schechter A. N., Natanson C., Gladwin M. T., and Kim-Shapiro D. B. Angeli's Salt Counteracts the Vasoactive Effects of Elevated Plasma Hemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.*, **53** (12), 2229–2239 (2012). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.548
  11. Gorbunov N. V., Yalowich J. C., Gaddam A., Thampatty P., Ritov V. B., Kisin E. R., Elsayed N. M., and Kagan V. E. Nitric oxide prevents oxidative damage produced by tert-butyl hydroperoxide in erythroleukemia cells via nitrosylation of heme and non-heme iron. Electron paramagnetic resonance evidence. *J. Biol. Chem.*, **272** (19), 12328–12341 (1997). DOI: 10.1074/jbc.272.19.12328
  12. Шумаев К. Б., Петрова Н. Э., Заббарова И. В., Ванин А. Ф., Топунов А. Ф., Ланкин В. З. и Рууге Э. К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа. *Биохимия*, **69** (5), 699–705 (2004). DOI: 10.1023/b:biry.0000029856.67884.c5
  13. Шумаев К. Б., Космачевская О. В., Грачев Д. И., Тимошин А. А., Топунов А. Ф., Ланкин В. З. и Рууге Э. К. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа. *Биомедицинская химия*, **67** (2), 162–168 (2021). DOI: 10.18097/PBMC20216702162
  14. Herold S. and K. Rehmman F.-J. Kinetic and mechanistic studies of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl myoglobin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6** (5), 543–555 (2001). DOI: 10.1007/s007750100231
  15. Herold S. and K. Rehmman F.-J. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.*, **34** (5), 531–545 (2003). DOI: 10.1016/S0891-5849(02)01355-2
  16. Ramirez D. C., Chen Y.-R., and Mason R. P. Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: involvement of a protein-tyrosyl radical. *Free Radic. Biol. Med.*, **34** (7), 830–839 (2003). DOI: 10.1016/S0891-5849(02)01437-5
  17. Østdal H., Skibsted L. H., and Andersen H. J. Formation of long-lived protein radicals in the reaction between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated metmyoglobin and other proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, **23** (5), 754–761 (1997). DOI: 10.1016/s0891-5849(97)00023-3
  18. Baron C. P., Møller J. K. S., Skibsted L. H., and Andersen H. J. Nitrosylmyoglobin as antioxidant – kinetics and proposed mechanism for reduction of hydroperoxides. *Free Radic. Res.*, **41** (8), 892–902 (2007). DOI: 10.1080/10715760701416475
  19. Romero N., Radi R., Linares E., Augusto O., Detweiler C. D., Mason R. P., and Denicola A. Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite: isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. *J. Biol. Chem.*, **278** (45), 44049–44057 (2003). DOI: 10.1074/jbc.M305895200
  20. Herold S. and Shivashankar K. Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxynitrite to nitrate. *Biochemistry*, **42** (47), 14036–14046 (2003). DOI: 10.1021/bi0350349
  21. Su J. and Groves J. T. Mechanisms of Peroxynitrite Interactions with Heme Proteins. *Inorg. Chem.*, **49** (14), 6317–6329 (2010). DOI: 10.1021/ic902157z
  22. Shumaev K. B., Gubkin A. A., Serezhenkov V. A., Lobysheva I. I., Kosmachevskaya O. V., Ruuge E. K., Lankin V. Z., Topunov A. F., and Vanin A. F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl iron complexes. *Nitric Oxide*, **18** (1), 37–46 (2008). DOI: 10.1023/b:biry.0000029856.67884.c5
  23. Kosmachevskaya O. V., Nasybullina E. I., Shumaev K. B., Novikova N. N., and Topunov A. F. Protective effect of dinitrosyl iron complexes bound with hemoglobin on oxidative modification by peroxynitrite. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (24), 13649 (2021). DOI: 10.3390/ijms222413649
  24. Грачев Д. И., Шумаев К. Б., Космачевская О. В., Топунов А. Ф. и Рууге Э. К. Нитрозильные комплексы гемоглобина в различных модельных системах. *Биофизика*, **66** (6), 1056–1064 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921060028

## Reductive Nitrosylation of Hemoglobin and Myoglobin and Its Antioxidant Action

K.B. Shumaev<sup>\*, \*\*</sup>, D.I. Grachev<sup>\*\*\*</sup>, O.V. Kosmachevskaya<sup>\*</sup>, A.F. Topunov<sup>\*</sup>, and E.K. Ruuge<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>*A.H. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

<sup>\*\*</sup>*National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akademika Chazova 15a, Moscow, 121552 Russia*

<sup>\*\*\*</sup>*Yerevan State University, ul. Aleka Manoogiana 1, Yerevan, 0025 Armenia*

Angeli's salt is regarded as a nitroxyl donor, so it can counteract hemolysis-driven adverse effects such as the vasoconstrictive effects of free hemoglobin in blood plasma. However, the molecular mechanisms of interaction of nitroxyl with various heme proteins are not fully understood. Oxoferryl forms of hemoproteins emerged under oxidative stress are known to be strong pro-oxidants. This study has been carried out to investigate reductive nitrosylation of met- and oxoferryl forms of hemoglobin and myoglobin upon interaction with nitroxyl. Experiments were performed *in vitro* using electron paramagnetic resonance spectroscopy for detection of nitrosyl forms. The results obtained indicate the antioxidant effect of Angeli's salt in model systems of hemoglobin or myoglobin oxidation with hydrogen peroxide. Moreover, the addition of hydrogen peroxide to methemoglobin and metmyoglobin led to the appearance of an EPR signal of free radicals with  $g = 2.005$ , associated with the protein part of hemoproteins. Thus, nitroxyl acts both as a reducing agent and a nitrosylating agent, thereby preventing the formation of oxoferryl forms of hemoproteins. The therapeutic properties of Angeli's salt may be largely related to the antioxidant effect it has on blood components.

*Keywords: reductive nitrosylation, hemoglobin, myoglobin, Angeli's salt, EPR spectroscopy*

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОРОТКИХ ФРАГМЕНТОВ ДНК ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЛОТНОИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

© 2024 г. Ю.А. Эйдельман<sup>\*, \*\*</sup>, И.В. Сальников<sup>\*</sup>, С.Г. Андреев<sup>\*, \*\*, #</sup>

<sup>\*</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

<sup>\*\*</sup>Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Каширское шоссе, 31, Москва, 115409, Россия

<sup>#</sup>E-mail: andreev\_sg@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Методами компьютерного моделирования исследовали образование коротких фрагментов ДНК длиной до 3 тысяч пар нуклеотидов при действии на хроматин ионов азота (линейная передача энергии, ЛПЭ 97 кэВ/мкм) и железа (190 кэВ/мкм). Облучение заряженными частицами фибрилл хроматина в виде соленоидов с различными параметрами (количество нуклеосом на виток соленоида, расстояние между витками, диаметр фибриллы) моделировалось методом Монте-Карло, исследовалось влияние структуры фибриллы и линейной передачи энергии на вид распределений длин фрагментов. Показано, что для всех изученных структур хроматина и линейной передачи энергии наибольшие частоты фрагментов наблюдаются в области ~100 п.н., соответствующей образованию разрывов ДНК в двух соседних витках спирали на нуклеосоме. От степени компактности структуры фибриллы зависит наличие и высота пика в области ~1000 п.н., соответствующего образованию разрывов ДНК в двух соседних витках соленоида. Положение этого пика не зависит от линейной передачи энергии. Предположение о популяции фибрилл хроматина с различной структурой в облучаемой клетке позволяет количественно описать экспериментальные распределения длин радиационно-индуцированных фрагментов ДНК.

*Компьютерное моделирование, метод Монте-Карло, заряженные частицы, Geant4-DNA, структура трека, повреждения ДНК, двунитевые разрывы ДНК, структура хроматина.*

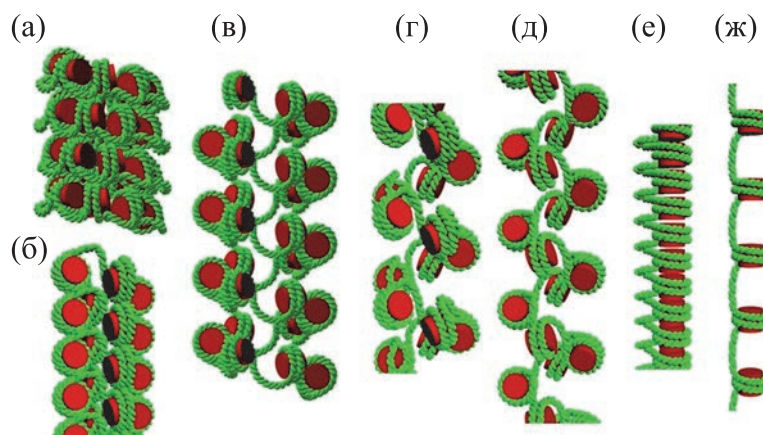
DOI: 10.31857/S0006302924020035, EDN: OVSJGD

Понимание количественных закономерностей и механизмов действия ионизирующего излучения на различных уровнях организации – субклеточном, клеточном, тканевом – является фундаментальной проблемой радиобиологии. Теоретические исследования, основанные на биофизических и компьютерных методах моделирования механизмов повреждений ДНК в клетке, интенсивно развиваются и приобретают роль количественного инструмента в фундаментальных и прикладных проектах [1–14]. Появление микродозиметрии как области знаний на стыке радиационной биофизики и радиобиологии привело к более глубокому изучению физико-химических процессов на молекулярном и субклеточном уровнях. На смену идеи чувствительного объема пришла концепция чувствительных мишеней сложной геометрии, отражающих реальные мишени действия радиации в клетке.

*Сокращения:* ЛПЭ – линейная передача энергии, RMSD – среднее квадратичное отклонение (Root Mean Square Displacement).

Первые работы по введению трехмерных моделей структуры хроматина в микродозиметрические исследования [1–8, 15, 16] показали плодотворность такого подхода.

Современные теоретические методы характеризуются детальным учетом физической, физико-химической и химической стадий радиобиологических процессов, а также сложными моделями клеточных структур. В работе [13] проведено моделирование повреждений ДНК и хроматина с учетом прямого, квазипрямого и косвенного действия радиации. При сравнении нескольких подходов сделан вывод о том, что неопределенности в конечных результатах разных алгоритмов остаются, и они связаны с учетом особенностей процессов превращения поглощенной энергии в повреждения ДНК и хромосом. Для протонов с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) в [14] выполнены расчеты повреждений ДНК и проанализирована роль параметров модели повреждений в предсказании эффективности образования однострунчатых и двунитевых



**Рис. 1.** Компьютерные модели фибрилл хроматина. (а)–(д) – Модели фибриллы хроматина в виде соленоида. Параметры (число нуклеосом на виток соленоида; расстояние между витками, нм; внешний диаметр соленоида, нм): (а) – 7.4-11-32, (б) – 4-11-30, (в) – 6-18-40, (г) – 5-22-30, (д) – 4-22-30. (е), (ж) – модель фибриллы в виде цепи нуклеосом. Параметры (расстояние между центрами соседних нуклеосом, нм): (е) – 7, (ж) – 18.

разрывов ДНК. Выходы двунитевых разрывов ДНК оказались чувствительны к порогу энергии индукции одноститевых разрывов ДНК и к максимальному расстоянию между одноститевыми разрывами при классификации двунитевых разрывов. В работе [17] моделировались клеточные эффекты облучения протонами с энергиями 0.5–500 МэВ. Модель структуры ядра клетки была реализована в пакете TOPAS-nBio для получения спектра начальных повреждений ДНК. Кроме молекулярных повреждений, вводилась механистическая модель репарации повреждений ДНК, рассчитывались выходы дицентриков и ацентрических фрагментов. Дозовая зависимость частоты микроядер после облучения протонами хорошо согласовывалась с экспериментальными данными. В работе [11] представлены расчеты выхода двунитевых разрывов ДНК от протонов и  $\alpha$ -частиц для модельных геометрий ядер клеток человека, заполненных плотной конденсированной фибриллой хроматина (гетерохроматином); де-конденсированной фибриллой (эухроматином); на 48% гетерохроматином и на 52% – эухроматином. Общий вывод заключался в том, что степень конденсированности хроматина является важным параметром и ее надо учитывать при моделировании индукции и репарации радиационных повреждений ДНК. В работе [12] исследовали влияние различных факторов на выход разрывов цепи ДНК и зависимость индукции разрывов от ЛПЭ излучения. Обнаружено, что вклад косвенного действия уменьшается в зависимости от ЛПЭ, так как при больших ЛПЭ активные радикалы быстро рекомбинируют друг с другом. Вклад прямого действия в выход одноститевых разрывов не зависел от ЛПЭ.

Важной характеристикой, отражающей радиационные повреждения ДНК в клетке, кроме вы-

хода полного числа двунитевых разрывов, являются распределения длин радиационно-индуцированных фрагментов ДНК [18–22]. Они обычно измеряются на масштабе длин от 10–20 тыс. пар нуклеотидов (п.н.) до 6 млн п.н. Теоретические исследования методом Монте-Карло позволили успешно прогнозировать распределения длин фрагментов ДНК и описывать экспериментальные данные в диапазоне (10 тыс. – 6 млн п.н.) [9, 21–24]. Теории, предсказывающие распределения длин коротких фрагментов (0–3 тыс. п.н.) [4–7], качественно согласовывались с экспериментальными данными для ионов железа и азота [25], но не описывали их количественно.

В данной работе роль структуры хроматина в образовании коротких фрагментов ДНК исследовалась биофизическими методами: моделированием структуры треков заряженных частиц (ионы азота и железа) и трехмерной реконструкцией структуры фибриллы. Полученные данные использовались для расчета распределений двунитевых разрывов ДНК в хроматине, подсчитывались частоты образования коротких фрагментов ДНК как функция структуры хроматина и ЛПЭ заряженных частиц. Количественное согласие между расчетными и экспериментальными распределениями достигнуто за счет введения ансамбля облучаемых структур с различной геометрией.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Учитывались различные геометрии фибриллы хроматина, модели соленоида с диаметром ~ 30–40 нм и фибриллы ~ 10 нм, представляющей собой линейную цепь нуклеосом, рис. 1. Структура соленоида моделировалась аналогично [3]. Длина нуклеосомальной ДНК равна 146 п.н., длина лин-



керной ДНК, соединяющей две соседние нуклеосомы, равна 48 п.н. Варьируемые параметры структуры: количество нуклеосом на виток соленоиды (от 4 до 7.4), расстояние между центрами соседних витков (от 11 до 22 нм), внешний диаметр соленоиды (от 30 до 40 нм). Структура цепи нуклеосом рассматривалась с теми же параметрами нуклеосомы и линкера, как и в соленоиде, но с разным расстоянием между центрами соседних нуклеосом (от 7 до 18 нм). Содержание ДНК в структурах бралось равным 5.2 тыс. п.н.

Треки ионов в жидкой воде генерировались с помощью пакета Geant4-DNA с опцией G4EmDNAPhysics\_option6 [26]. ЛПЭ определяли как тормозную способность, среднюю потерю энергии первичной частицы в слое микронной толщины. Начальную энергию частицы выбирали таким образом, чтобы ЛПЭ совпадала с величиной, указанной в [25]: 97 кэВ/мкм для азота и 190 кэВ/мкм для железа. Для железа получено близкое значение ЛПЭ — 195 кэВ/мкм. Ионы железа с ЛПЭ 440 кэВ/мкм в данной работе не рассматривались.

Моделирование взаимодействия треков заряженных частиц с хроматином включало расчеты методом Монте-Карло событий поглощения энергии в мишени при облучении заряженными частицами при данной дозе и определение вероятности повреждений структуры при заданном энерговыделении. Мишень, соленоид или цепь нуклеосом, ориентированная случайным образом, заключалась в виртуальный цилиндрический объем с радиусом, равным радиусу мишени (максимальное расстояние от центра мишени до ее края) плюс максимальному пробегу  $\delta$ -электрона для данного трека. Определялось среднее число треков, попадающих в этот объем, как произведение флюенса на площадь мишени, и вероятность попадания различного числа треков при заданном среднем числе.

Частоты радиационных повреждений ДНК в хроматине определялись путем суперпозиции координат энерговыделений в треках с координатами мишени. При расчете частот однонитевых и двунитевых разрывов на уровне ДНК использовалась объемная модель двойной спирали и механизм прямого действия радиации [27, 28]. Нуклеотид представлялся в виде двух полуцилиндров: внешнего (радиус 1.15 нм, высота 0.34 нм) и внутреннего (радиус 0.5 нм). Внешний полуцилиндр соответствует сахаро-фосфатному остову нуклеотида и бороздкам ДНК, внутренний — соответствует азотистому основанию. Предполагалось, что, если во внешнем полуцилиндре энерговыделение превосходило величину порога  $E_0$ , образовывался однонитевой разрыв ДНК. Если два однонитевых разрыва на разных цепях образовывались на расстоянии меньшем или равном 10 п.н.,

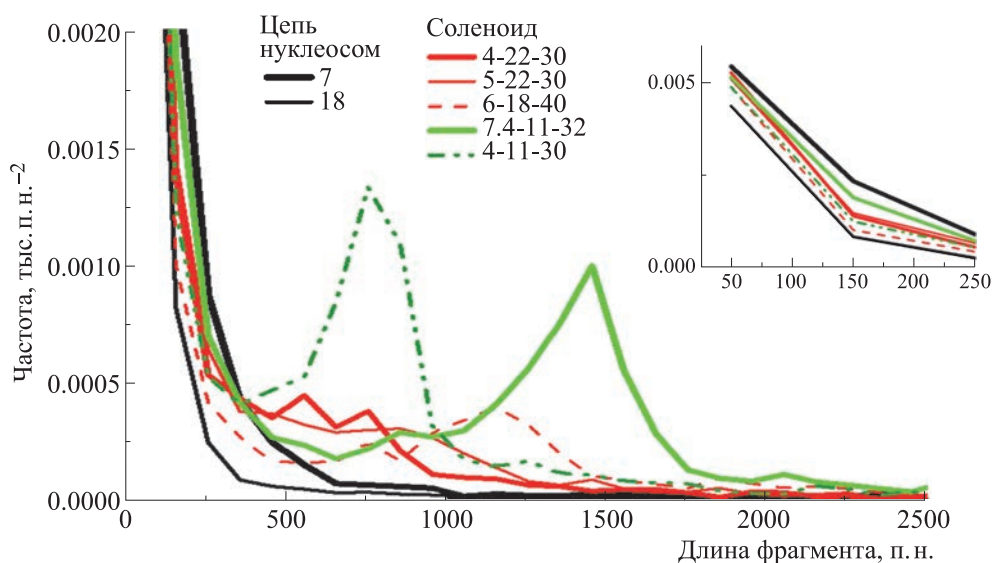
образовывался двунитевой разрыв. Кроме прямого действия, в данной работе также учтен вклад радикалов связанной воды в образование однонитевых разрывов. Такой механизм повреждений был назван квазипрямым [29]. В объемной модели ДНК подсчитывалось энерговыделение в слое толщиной 0.16 нм [13] вокруг внешнего полуцилиндра. Средняя поглощенная энергия на одну ионизацию, по нашим оценкам, для используемых треков составила примерно 13 эВ. Если предположить, что ионизация в гидратном слое приводит к разрыву цепи с вероятностью 1/3 [13], то порог квазипрямого действия  $E_1$  здесь оценивался равным 39 эВ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**3D-модели структуры хроматина.** Учитывая неопределенность знаний о структуре хроматина в клетке, для радиационных расчетов были разработаны компьютерные трехмерные модели фибрилл хроматина с различными параметрами. Для моделей соленоидов варьировались количество нуклеосом на виток, расстояние между витками, диаметр, для линейной цепи нуклеосом — расстояние между центрами соседних нуклеосом (рис. 1). Компьютерные модели фибрилл хроматина использовались для анализа влияния структуры на распределение радиационных повреждений ДНК в хроматине.

**Распределение радиационно-индуцированных фрагментов ДНК зависит от структуры хроматина и ЛПЭ.** На рис. 2–5 представлены расчетные данные, характеризующие неслучайное распределение длин радиационно-индуцированных фрагментов ДНК при действии ионов азота и железа. Форма распределений различна в зависимости от структуры трека, ЛПЭ иона, структуры фибрилл хроматина.

Для исследования влияния степени компактизации хроматина на частоту образованных фрагментов ДНК были рассчитаны распределения фрагментов, индуцированных ионами железа с ЛПЭ 195 кэВ/мкм в фибриллах с различными параметрами (рис. 2). Структуры соленоидов (4-11-30, 7.4-11-32) характеризуются высокой частотой фрагментов в диапазоне длин выше ~300 п.н., растянутая фибрилла в виде цепи нуклеосом — низкой частотой. Структуры соленоидов с параметрами (4-22-30, 5-22-30, 6-18-40) — промежуточными частотами фрагментов. Пики в районе 750–1500 п.н., наблюдаемые преимущественно для компактных фибрилл, соответствуют пространственной близости локусов ДНК на соседних витках соленоидов и образованием нескольких двунитевых разрывов одним треком частицы. Рост кривой в области малых длин фрагментов ~100 п.н. (врезка на рис. 2) обусловлен



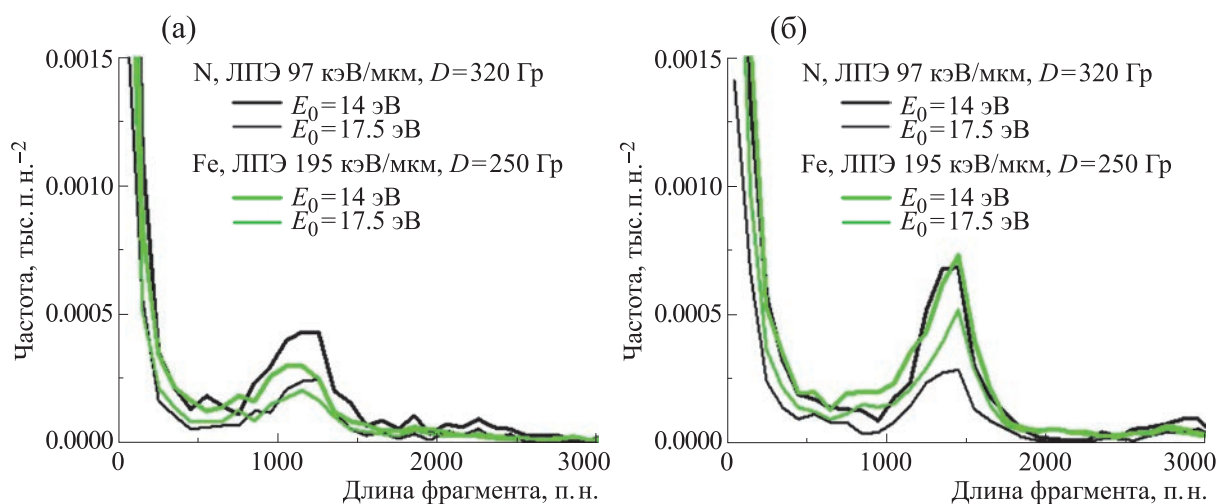
**Рис. 2.** Зависимость распределения длин фрагментов от структуры фибриллы. Облучение ионами железа, ЛПЭ 195 кэВ/мкм,  $D = 250$  Гр. Параметры фибрилл: для цепи нуклеосом – расстояние между центрами соседних нуклеосом, нм; для соленоидальных моделей, слева направо – число нуклеосом на виток соленоида; расстояние между центрами соседних витков, нм; внешний диаметр соленоида, нм. Распределения построены с разрешением 100 п.н., точки по оси  $X$  соответствуют центрам диапазонов.  $E_0 = 14$  эВ,  $E_1 = 39$  эВ. На врезке – область малых длин фрагментов.

близостью нуклеотидов ДНК на соседних витках нуклеосомы и образованием нескольких двунитевых разрывов одним треком частицы.

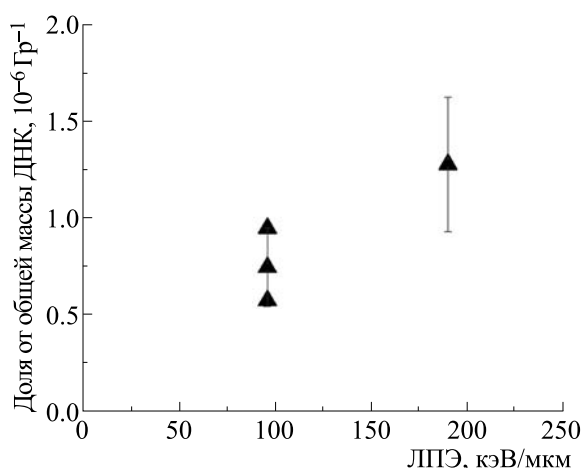
Для более детального анализа зависимости положения пика в распределении фрагментов от различных факторов мы рассмотрели облучение одной и той же структуры ионами с разной ЛПЭ (97 кэВ/мкм и 195 кэВ/мкм). Кроме того, варьировался параметр модели  $E_0$ , порог энергосвободы в сахаро-фосфатном остове, при котором

образуется однонитевой разрыв. На рис. 3 представлены расчеты для двух структур фибриллы, где пик (~1000 п.н.) хорошо выражен. Расчеты показывают, что ЛПЭ и  $E_0$  влияют на высоту пика, не изменяя его положения, как для растянутых, так и для компактных фибрилл.

При анализе экспериментальных данных по распределению радиационно-индуцированных коротких фрагментов ДНК [25] необходимо также учесть неопределенность самих данных, свя-



**Рис. 3.** Независимость положения пика в распределении длин фрагментов для различных структур от ЛПЭ и пороговой энергии  $E_0$ : (а) – фибрилла 6-18-40; (б) – фибрилла 7.4-11-32.



**Рис. 4.** Учет неопределенностей, связанных с разбросом экспериментальных данных. Точки — данные [25], массовая доля коротких фрагментов (100–2000 п.н.). Для азота с ЛПЭ 97 кэВ/мкм приведены результаты трех повторов, для железа с ЛПЭ 190 кэВ/мкм — один повтор. Погрешности на графике — как оценка неопределенности, пояснение см. в тексте.

занных с разбросом экспериментальных точек. В работе [25] не приводятся ошибки на распределениях фрагментов. Экспериментальный разброс можно оценить по графику, где представлена ЛПЭ-зависимость массовой доли коротких фрагментов в интервале 100 – 2000 п.н. [25] суммарно (рис. 4). В случае ионов азота в [25] приведены результаты для трех повторов, максимальный и минимальный из которых отличаются от среднего

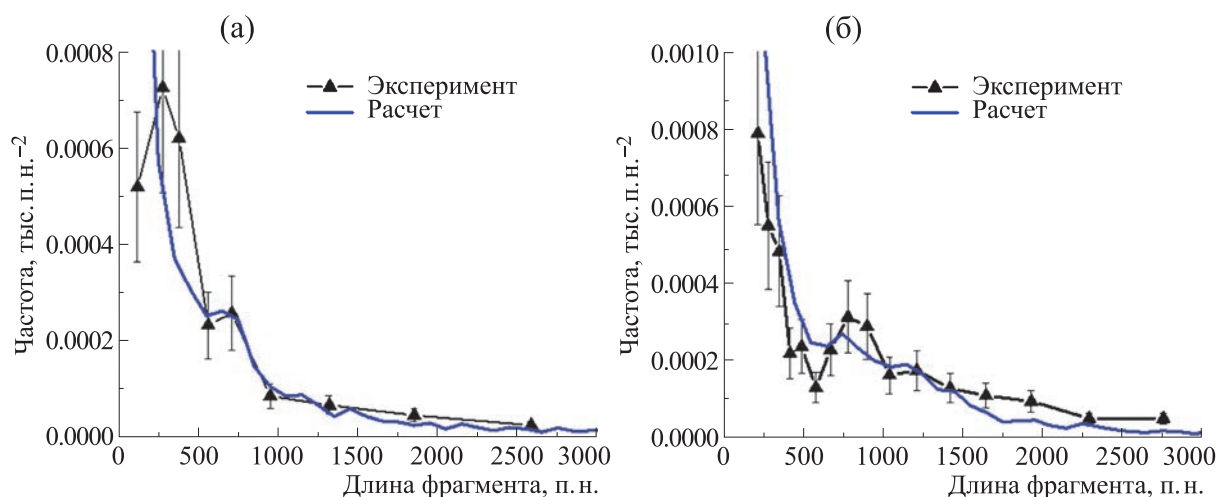
на ~30% (точки на рис. 4). Предполагая, что разброс такого уровня характерен и для ионов железа, мы далее анализируем экспериментальные распределения фрагментов, откладывая везде 30% погрешность (линии на рис. 4).

При сравнении экспериментальных распределений длин фрагментов [25] для ионов с различной ЛПЭ видно, что положение пика на распределениях различно: ~700 п.н. для азота с ЛПЭ 97 кэВ/мкм и ~800-900 п.н. для железа с ЛПЭ 190 и 440 кэВ/мкм. Это противоречит результатам расчетов, показывающих, что для фибрилл хроматина положение пика в области ~1000 п.н. не зависит от ЛПЭ. Возможное объяснение заключается в том, что хроматин даже в пределах одной хромосомы представлен не одной структурой фибриллы, а разными. В клетке всегда имеет место гетерогенность структур, характеризующая вариабельность структурной организации генома на различных уровнях организации, включая уровень фибриллы хроматина [30, 31]. С учетом этого обстоятельства мы предположили, что облучение действует на популяцию фибрилл с различной структурой. Для треков ионов азота (97 кэВ/мкм) и железа (195 кэВ/мкм) были найдены комбинации структур хроматина в пропорциях, оптимизированных с экспериментальными данными по критерию минимизации среднеквадратичного отклонения (RMSD – Root Mean Square Displacement). В табл. 1 приведены комбинации структур с соответствующими параметрами и значением пороговой энергии образования однонитевого разрыва  $E_0$ , дающие разные величины критерия близости с экспериментом RMSD совместно для

**Таблица 1.** Комбинации структур хроматина в популяциях, соответствующих наилучшему описанию экспериментальных данных для различных ионов и порогов энерговыделения  $E_0$

Тип структуры	Параметры*	$E_0 = 14$ эВ		$E_0 = 15.5$ эВ		$E_0 = 17.5$ эВ	
		N, 97 кэВ/мкм	Fe, 195 кэВ/мкм	N, 97 кэВ/мкм	Fe, 195 кэВ/мкм	N, 97 кэВ/мкм	Fe, 195 кэВ/мкм
Цепь нуклеосом	7	0.20	0.66	0.07	0.58	0.01	0.42
Соленоид	4-11-30	0	0.06	0	0.10	0	0.12
	4-22-30	0.77	0.01	0.85	0.01	0.24	0.01
	5-22-30	0.01	0.01	0.04	0.01	0.65	0.07
	6-18-40	0.01	0.22	0.01	0.22	0.05	0.27
	7.4-11-32	0.01	0.04	0.03	0.08	0.05	0.11
<i>RMSD</i>		6.33e-5	4.82e-5	8.20e-5	4.24e-5	1.22e-4	3.99e-5
<i>RMSD</i> по двум частицам		<b>5.63e-5</b>		6.53e-5		9.10e-5	

Примечание. \* — Для цепи нуклеосом приведено расстояние (в нм) между центрами соседних нуклеосом. Для соленоидов приведены (слева направо): число нуклеосом на виток соленоида; расстояние между центрами соседних витков, нм; внешний диаметр соленоида, нм.



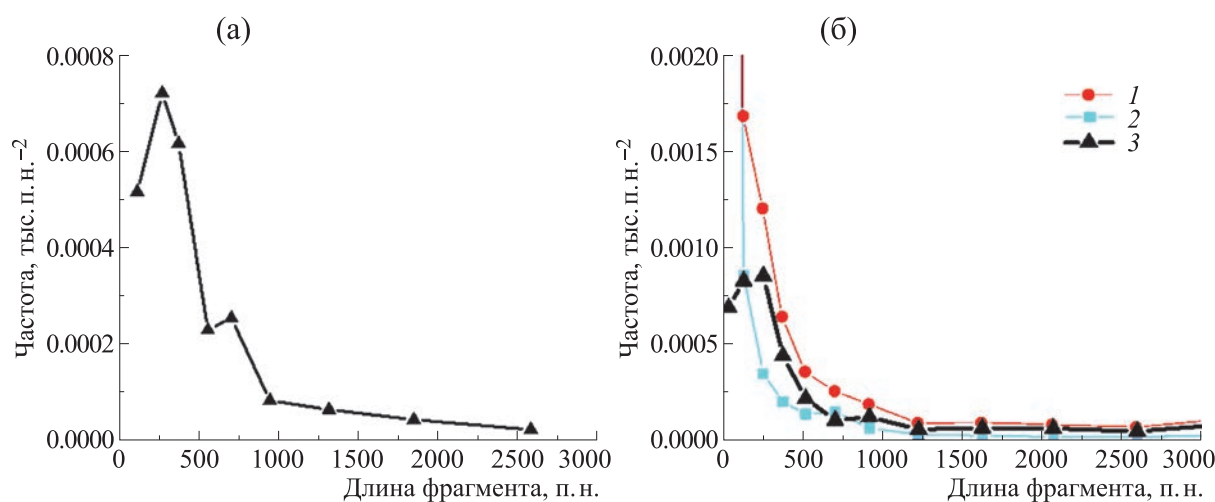
**Рис. 5.** Предположение о популяции фибрилл хроматина с различной структурой объясняет наблюдаемые в эксперименте распределения радиационно-индуцированных длин фрагментов: (а) – азот, ЛПЭ 97 кэВ/мкм,  $D = 320$  Гр; (б) – железо, ЛПЭ 195 кэВ/мкм,  $D = 250$  Гр. Расчетные результаты приведены для порога энергии  $E_0 = 14$  эВ. Составы популяций (вклады различных структур фибриллы) приведены в табл. 1. Экспериментальные данные из работы [25].

ионов с разной ЛПЭ. Каждый столбец содержит состав популяции, доли различных структур фибрилл, при которых достигается наилучшее при данном  $E_0$  согласие с экспериментом по критерию минимума RMSD. К примеру, для азота с ЛПЭ 97 кэВ/мкм при  $E_0 = 14$  эВ доля цепи нуклеосом составляет 0.20, доля фибриллы 4-22-30 – 0.77 и т.д. В предпоследней строке приведены значения RMSD для данного состава популяции, в последней – значения RMSD для двух типов частиц в совокупности. Жирным шрифтом выделено наименьшее значение RMSD по всем  $E_0$ . Наилучшее согласие достигается при  $E_0 = 14$  эВ. Сравнение расчетных и экспериментальных данных приведено на рис. 5.

Данные табл. 1 и рис. 5 показывают, что учет гетерогенности облучаемых структур объясняет экспериментальные распределения длин коротких фрагментов ДНК. В области более 1.5–2 тыс. п.н. расчетные данные идут систематически ниже экспериментальных. Возможная причина расхождения может быть связана с использованием приближений. В расчетах использовались фибриллы конечной массы (~5 тыс. п.н.) и учитывались внутренние фрагменты, чтобы избежать краевых эффектов конечной длины. Для проверки этого предположения в дальнейшем необходимо выполнить расчеты для структур больших размеров.

**Роль контроля.** При интерпретации экспериментальных данных [25] для ионов азота остается неясной причина снижения частоты самых коротких фрагментов, порядка и менее 100 п.н. [3]. Расчеты для разных структур и треков предсказывают максимум в этой области, связанный с обра-

зованием двух и более двунитевых разрывов в нуклеосоме. Мы предположили, что причина может быть связана с вкладом контроля, т.е. спонтанных двунитевых разрывов или фрагментов, детектируемых в необлученном хроматине. В эксперименте распределение радиационно-индуцированных фрагментов определяется как разность между суммарным распределением фрагментов при облучении и распределением спонтанных фрагментов (контроль) [25] (рис. 6а). Для проверки корректности такого способа учета контроля данные, представленные в виде массы ДНК в слайсах геля (рис. 2 в работе [25]), были пересчитаны в обычный вид распределений по длинам фрагментов, суммарных вместе с контролем и отдельно контрольных (рис. 6б). Рис. 6б показывает, что суммарное распределение фрагментов при облучении, которое включает в себя распределение спонтанных фрагментов, дает, как и ожидалось, максимальную частоту фрагментов при длинах порядка и менее 100 п.н. Поскольку контрольное распределение фрагментов имеет максимум в том же диапазоне (рис. 6б), то вычитание распределения спонтанных фрагментов из суммарного распределения приводит к убыванию частот фрагментов в области малых длин фрагментов, меньших 100 п.н. (рис. 6а,б). Поэтому для случая облучения азотом с ЛПЭ 97 кэВ/мкм теоретическое распределение более адекватно отражает радиационно-индуцированные фрагменты, чем экспериментальная кривая для облучения с вычтенным контролем [25] в области малых длин фрагментов. В экспериментах с ионами железа контроль другой, и такая проблема не возникает.



**Рис. 6.** Влияние спонтанных двуниевых разрывов (контроля) на вид распределения длин радиационно-индуцированных фрагментов ДНК. Ионы азота, ЛПЭ 97 кэВ/мкм,  $D = 320$  Гр. Данные из работы [25]. (а) – Распределение длин радиационно-индуцированных фрагментов как разности суммарного и контрольного распределений, согласно рис. 5 из работы [25]. (б) – Пересчет из распределения по массе ДНК в слайсах геля в распределение по длинам фрагментов, проведенный в данной работе, для суммарного распределения длин фрагментов при облучении с учетом уровня спонтанных фрагментов (кривая 1); распределения спонтанных фрагментов ДНК в отсутствие облучения (кривая 2). Кривая 3 – разность двух распределений (кривая 1 минус кривая 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что распределения длин коротких фрагментов ДНК (в интервале 0 – 3 тыс. п.н.), индуцированных облучением клеток быстрыми тяжелыми заряженными частицами, не объясняются одной определенной структурой хроматина. Структура хроматина в клетке крайне гетерогенна [31, 32], и в разных компартаментах хромосом участки фибриллярного хроматина могут находиться в различных конформациях. В данной работе исследовалась гипотеза, насколько ансамбль структур может адекватно описывать экспериментальные данные по длинам фрагментов ДНК при облучении клеток ионами азота и железа.

Компьютерное моделирование экспериментов по измерению фрагментов ДНК также показало, что спонтанные разрывы в хроматине могут влиять на форму наблюдаемых распределений длин фрагментов под действием тяжелых ионов. Теоретические исследования фрагментов ДНК, образованных плотноионизирующим излучением, проводились в ряде работ [1–14]. Тем не менее описание частот образования коротких фрагментов от ионов азота и железа [25] не было выполнено. Эксперименты не дают прямой информации о механизмах радиационной фрагментации ДНК и структуре облучаемого хроматина в клетке. Строгая интерпретация данных экспериментов по фрагментам возможна только на основе теоретической модели. В данной работе этот пробел восполнен и дано количественное объяснение данных [25].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Расчеты были проведены с использованием вычислительных мощностей Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chepel V. Yu., Khvostunov I. K., Mirny L. A., Talyzina T. A., and Andreev S. G. Computer model of condensed chromatin fiber for radiation damage simulation. In *Abstr. Book of the Eleventh Symposium on Microdosimetry* (Gatlinburg, Tennessee, USA, 1992), p. 22.
2. Khvostunov I. K., Chepel V. Yu. and Andreev S. G. Calculation of DNA and chromatin breaks for low LET irradiation. In *Abstr. Book of the 24-th Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology*, (Erfurt, Germany, 1992), p. 165.
3. Chepel V. Yu., Khvostunov I. K., Mirny L. A., Talyzina T. A., and Andreev S. G. 3-D computer modelling of chromatin fibres for radiation damage

- simulation. *Radiat. Prot. Dosim.*, **52** (1–4), 259–263 (1994). DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a082197
4. Khvostunov I. K., Andreev S. G., Pitkevich V. A., and Chepel V. Yu. Novel algorithm for analysis of DNA and chromatin damage induced by ionising radiation with different quality. In *Proc. 10th Int. Congr. Radiation Research*, Ed. by U. Hagen, D. Harder, H. Jung, and C. S. Streffer. (Wurzburg, 1995), v. 2, pp. 254–257.
  5. Holley W. R. and Chatterjee A. Theoretical modeling of radiation induced damage to chromatin. In *Proc. 10th Int. Congr. Radiation Research*, Ed. by U. Hagen, D. Harder, H. Jung, and C. S. Streffer. (Wurzburg, 1995), v. 2, pp. 249–253.
  6. Holley W. R. and Chatterjee A. Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation: Formation of short DNA fragments. I. Theoretical modeling. *Radiat. Res.*, **45** (2), 188–199 (1996). DOI: 10.2307/3579174
  7. Андреев С. Г., Хвостунов И. К., Спитковский Д. М. и Талызина Т. А. Биофизическое моделирование радиационных повреждений ДНК и хроматина, индуцированных излучением разного качества. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **37** (4), 533 (1997).
  8. Rydberg B., Holley W. R., Mian I. S., and Chatterjee A. Chromatin conformation in living cells: support for a zig-zag model of the 30 nm chromatin fiber. *J. Mol. Biol.*, **284** (1), 71–84 (1998). DOI: 10.1006/jm-bi.1998.2150
  9. Friedland W., Jacob P., Bernhardt P., Paretzke H. G., and Dingfelder M. Simulation of DNA damage after proton irradiation. *Radiat. Res.*, **159** (3), 401–410 (2003). DOI: 10.1667/0033-7587(2003)159[0401:sod-dap]2.0.co;2
  10. Friedland W., Dingfelder M., Kunderát P., and Jakob P. Track structures, DNA targets and radiation effects in the biophysical Monte Carlo simulation code PARTRAC. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, **711** (1–2), 28–40 (2011). DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.01.003
  11. Tang N., Bueno M., Meylan S., Incerti S., Tran H. N., Vaurijoux A., Gruel G., and Villagrasa C. Influence of chromatin compaction on simulated early radiation-induced DNA damage using Geant4-DNA. *Med. Phys.*, **46** (3), 1501 (2019). DOI: 10.1002/mp.13405
  12. Shin W., Sakata D., Lampe N., Belov O., Tran N. H., Petrovic I., Ristic-Fira A., Dordevic M., Bernal M. A., Bordage M. C., Francis Z., Kyriakou I., Perrot Y., Sasaki T., Villagrasa C., Guatelli S., Breton V., Emfietzoglou D., and Incerti S. A Geant4-DNA evaluation of radiation-induced DNA damage on a human fibroblast. *Cancers*, **13** (19), 4940 (2021). DOI: 10.3390/cancers13194940
  13. Bertolet A., Ramos-Méndez J., McNamara A., Yoo D., Ingram S., Henthorn N., Warmenhoven J.-W., Faddegon B., Merchant M., McMahon S. J., Paganetti H., and Schuemann J. Impact of DNA geometry and scoring on Monte Carlo track-structure simulations of initial radiation-induced damage. *Radiat. Res.*, **198** (3), 207 (2022). DOI: 10.1667/RADE-21-00179.1
  14. Zhu K., Wu C., Peng X., Ji X., Luo S., Liu Y., Wang X. Nanoscale calculation of proton-induced DNA damage using a chromatin geometry model with Geant4-DNA. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (11), 6343 (2022). DOI: 10.3390/ijms23116343
  15. Khvostunov I. K. and Andreev S. G. Microdosimetric distributions for target volumes of complex topology. In *Microdosimetry: an interdisciplinary approach*, Ed. by D.T. Goodhead, P.O'Neill, and H.G. Menzel (The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997), pp. 47–50.
  16. Andreev S. G., Khvostunov I. K., Spitkovsky D. M., and Chepel V. Yu. Clustering of DNA breaks in chromatin fibre: dependence on radiation quality. In *Microdosimetry: an interdisciplinary approach*, Ed. by D. T. Goodhead, P. O'Neill, and H. G. Menzel (The Royal society of Chemistry, Cambridge, 1997), pp. 133–136.
  17. Zhu H., McNamara A. L., McMahon S. J., Ramos-Mendez J., Henthorn N. T., Faddegon B., Held K. D., Perl J., Li J., Paganetti H., and Schuemann J.. Cellular response to proton irradiation: A simulation study with TOPAS-nBio. *Radiat. Res.*, **194** (1), 9 (2020). DOI: 10.1667/RR15531.1
  18. Newman H. C., Prise K. M., Folkard M., and Michael B. D. DNA double-strand break distributions in X-ray and alpha-particle irradiated V79 cells: evidence for non-random breakage. *Int. J. Radiat. Biol.*, **71** (4), 347 (1997). DOI: 10.1080/095530097143978
  19. Stenerlow B., Høglund E., Carlsson J., and Blomquist E. Rejoining of DNA fragments produced by radiations of different linear energy transfer. *Int. J. Radiat. Biol.*, **76** (4), 549 (2000). DOI: 10.1080/095530000138565
  20. Belli M., Cherubini R., Dalla Vecchia M., Dini V., Esposito G., Moschini G., Saporita O., Signoretti C., Simone G., Sorrentino E., and Tabocchini M. A. DNA fragmentation in mammalian cells exposed to various light ions. *Adv. Space Res.*, **27** (2), 393 (2001). DOI: 10.1016/s0273-1177(01)00007-2
  21. Pinto M., Prise K. M., and Michael B. D. Quantification of radiation induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts by PFGE: testing the applicability of random breakage models. *Int. J. Radiat. Biol.*, **78** (5), 375 (2002). DOI: 10.1080/09553000110110941
  22. Ponomarev A. L., Cucinotta F. A., Sachs R. K., and Brenner D. J. Monte Carlo predictions of DNA fragment-size distributions for large sizes after HZE particle irradiation. *Phys. Med.*, **17**, 153 (2001).
  23. Khvostunov I. K., Andreev S. G., and Yu. A. Eidelman. Biophysical analysis of radiation induced initial DNA fragmentation. *Radiat. Prot. Dosim.*, **99** (1–4), 151 (2002). DOI: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a006748
  24. Fakir H., Sachs R. K., Stenerlow B., and Hofmann W. Clusters of DNA double-strand breaks induced by different doses of nitrogen ions for various LETs: experimental measurements and theoretical analyses. *Radiat. Res.*, **166** (6), 917 (2006). DOI: 10.1667/RR0639.1
  25. Rydberg B. Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. II.



- Experimental detection. *Radiat. Res.*, **145** (2), 200 (1996). DOI: 10.2307/3579175
26. Incerti S., Kyriakou I., Bernal M. A., Bordage M. C., Francis Z., Guatelli S., Ivanchenko V., Karamitros M., Lampe N., Lee S. B., Meylan S., Min C. H., Shin W. G., Nieminen P., Sakata D., Tang N., Villagrasa C., Tran H. N., and Brown J. M. C. Geant4-DNA example applications for track structure simulations in liquid water: A report from the Geant4-DNA Project. *Med. Phys.*, e722 (2018). DOI: 10.1002/mp.13048
27. Эйдельман Ю. А., Сальников И. В. и Андреев С. Г. Анализ неопределенностей расчетов эффективности радиационных повреждений ДНК. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **63** (1), 34 (2023). DOI: 10.31857/S086980312301006X
28. Charlton D. E., Nikjoo H. and Humm J. L. Calculation of initial yields of single- and double-strand breaks in cell nuclei from electrons, protons and alpha particles. *Int. J. Radiat. Biol.*, **56** (1), 1 (1989). DOI: 10.1080/09553008914551141
29. Becker D. and Sevilla M. D. The chemical consequences of radiation damage to DNA. *Adv. Radiat. Biol.*, **17**, 121 (1993). DOI: 10.1016/B978-0-12-035417-7.50006-4
30. Risca V. I., Denny S. K., Straight A. F., and Greenleaf W. J. Variable chromatin structure revealed by *in situ* spatially correlated DNA cleavage mapping. *Nature*, **541** (7636), 237 (2017). DOI: 10.1038/nature20781
31. Finn E. H., Pegoraro G., Brandão H. B., Valton A.-L., Oomen M. E., Dekker J., Mirny L., and Misteli T. Extensive heterogeneity and intrinsic variation in spatial genome organization. *Cell*, **176** (6), 1502.e10 (2019). DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.020
32. Eidelman Y., Salnikov I., Slanina S., and Andreev S.. Chromosome folding promotes intrachromosomal aberrations under radiation- and nuclease-induced DNA breakage. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (22), 12186 (2021). DOI: 10.3390/ijms222212186

## Computer Simulation of Short DNA Fragments Induced by HIGH-LET Charged Particles

Y.A. Eidelman\*, \*\*, I.V. Salnikov\*, and S.G. Andreev\*, \*\*

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

\*\*National Research Nuclear University MEPhI, Kashirskoye shosse 31, Moscow, 115409 Russia

The formation of short DNA fragments, up to 3 kbp, induced in chromatin by nitrogen (LET 97 keV/mm) and iron (LET 190 keV/mm) ions was studied by computer simulation. Chromatin models with different structure parameters and Monte Carlo track structure simulation were used to assess the impact of chromatin fiber structure and LET on the DNA fragment size distribution. For the structures modeled (different types of solenoids, a chain of nucleosomes), the fragment size distribution had a maximum in the region of ~100 bp corresponding to the formation of DNA breaks in two neighboring turns of the helix on the nucleosome. The calculation predicted the peak in the region of ~1000 bp, corresponding to the formation of DNA breaks in two neighboring turns of the solenoid, which parameters depended on the degree of compactness of the fiber and were independent of LET. The assumption was introduced of the presence of subpopulations of various chromatin structures under irradiation. It allowed to explain the experimentally observed size distributions of the short DNA fragments induced by high-LET charged particles.

*Keywords: computer simulation, Monte Carlo technique, charged particles, Geant4-DNA, track structure, DNA damage, double-strand DNA breaks, chromatin structure*

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЗНАЧЕНИЙ GC-СОСТАВА ФРАГМЕНТОВ В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЕ ГЕНОМОВ ХЛОРОПЛАСТОВ, БАКТЕРИЙ И МИТОХОНДРИЙ

© 2024 г. М.Ю. Сенашова\*, #, М.Г. Садовский\*, \*\*, \*\*\*, ##

\*Институт вычислительного моделирования СО РАН, Академгородок,  
50/44, Красноярск, 660036, Россия

#E-mail: msen@icm.krasn.ru

\*\*Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России,  
Коломенская ул., 26, Красноярск, 660037, Россия

\*\*\*Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 79, Красноярск, 660041, Россия

##E-mail: msad@icm.krasn.ru

Поступила в редакцию 03.01.2023 г.

После доработки 26.02.2024 г.

Принята к публикации 06.03.2024 г.

Рассмотрено пространственное распределение значений GC-состава фрагментов геномов хлоропластов, митохондрий и бактерий. Обнаружено, что значения GC-состава фрагментов для большинства геномов распределены не хаотически, а упорядоченно. Были обнаружены два основных типа распределения — градиентное и центрально-симметричное. У геномов хлоропластов встречается только градиентное распределение. У бактерий для GC-бедных геномов наблюдается центрально-симметричное распределение, а для GC-богатых — градиентное. У митохондрий встречаются оба варианта распределений, причем тип распределения зависит от вида организма.

*Ключевые слова:* GC-состав, частотные словари, триплеты, структура, пространственное распределение.

DOI: 10.31857/S0006302924020049, EDN: OVJRZZ

Изучение особенностей и деталей структуры нуклеотидных последовательностей является важнейшей задачей биологии в настоящее время. Исследования ведутся в двух аспектах — структурно-функциональном и эволюционном. Выявление связи между структурными компонентами и соответствующими им функциями представляет собой классическую проблему молекулярной и системной биологии, и, несмотря на обширный поток публикаций и исследований в этом направлении, она все еще далека от завершения. Более того, исследователи выявляют все новые и новые структурные элементы либо новые виды и формы взаимодействий и взаимоотношений между структурными элементами биологических макромолекул, этому способствует развитие техники и инструментов исследований.

Понятна важность таких исследований с точки зрения эволюционных процессов. Изучение особенностей структуры биологических макромолекул у разных организмов позволяет составить более точную картину эволюции тех или иных био-

логических систем — от вполне конкретных видов до экосистем и глобальных сообществ.

Кроме того, затруднения в исследованиях такого рода всегда вызывают выбор и качество того биологического материала, который берется в рассмотрение. Дело даже не в ошибках секвенирования и/или аннотирования генетических последовательностей, неизбежных во многих случаях, а в большой сложности таких объектов, как геномы либо отдельные хромосомы. Рассматривая эти объекты, приходится анализировать набор характеристик — структуру, функцию и филогению. Эти характеристики очень сильно взаимодействуют и сильно влияют друг на друга. Причем это влияние далеко не всегда удается выделить в качестве отдельного и независимого фактора.

Прокариотические организмы с этой точки зрения являются более удобными объектами для исследования, чем эукариотические; геном бактерий заметно короче генома эукариот и всегда представлен одной хромосомой. Однако еще удобнее использовать геномы органелл, в нашем случае — митохондрий и хлоропластов, поскольку



для них полностью исключается влияние различий в кодируемых функциях: в пределах одной группы органелл функциональные различия отсутствуют.

Такой параметр, как GC-состав очень часто используется в исследованиях структуры геномов и функций отдельных участков. Под GC-составом понимают долю гуанина и цитозина по отношению к общему числу нуклеотидов в рассматриваемой нуклеотидной последовательности. Пары «гуанин–цитозин» и «аденин–тимин» отличаются количеством водородных связей между ними. Это обуславливает разные физические свойства у GC-бедных и GC-богатых нуклеотидных последовательностей. Использованию GC-состава в исследованиях структуры геномов и функций отдельных участков, именно с точки зрения физических свойств, посвящено много работ, как в случае геномов хлоропластов [1–8] и геномов бактерий [9–15], так и митохондрий [16–22]. В данной работе нуклеотидные последовательности рассматриваются с точки зрения биоинформатики. Изучается распределение значений GC-состава выделенных фрагментов геномов хлоропластов, митохондрий и бактерий в пространственной структуре генома, полученной на основе частотных словарей этих фрагментов. Возникает вопрос – имеется ли упорядоченность значений GC-состава в нуклеотидных последовательностях либо они расположены случайным образом. Естественно было бы ожидать случайное распределение значений GC-состава, но, как показывают результаты работы, наблюдается достаточно высокая упорядоченность такого распределения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Введем основные понятия. Прежде чем перейти к изложению результатов, поясним смысл используемого ниже термина «пространство». Нуклеотидная последовательность является линейным объектом и в таком качестве является одномерной. При этом в физическом трехмерном (евклидовом) пространстве у нуклеотидной последовательности могут наблюдаться и двумерные и даже трехмерные структуры: типичный пример – спиральная структура ДНК, а также плотная «намотка» нуклеотидной последовательности на гистон. Однако эти понятия пространства не будут использоваться в дальнейшей работе.

Мы будем рассматривать генетическую последовательность длины  $L$ , состоящую из символов алфавита  $\mathfrak{K} = \{A, C, G, T\}$ . Для этой последовательности будем составлять частотный словарь толщины  $3$ . Частотный словарь  $W_3$  толщины  $3$  сим-

вольной последовательности, соответствующей ДНК – это список всех троек  $v_1 v_2 v_3$  идущих подряд нуклеотидов с указанием частот этих троек; всего может быть 64 триплета. Заметим, что приведенное определение частотного словаря триплетов является частным случаем: при подсчете числа триплетов окно считывания может перемещаться на один, два, три, четыре и вообще произвольное число нуклеотидов, тем самым порождая разные частотные словари. Как правило, используется частотный словарь вида  $W_3^k$ , где  $k = 1$ .

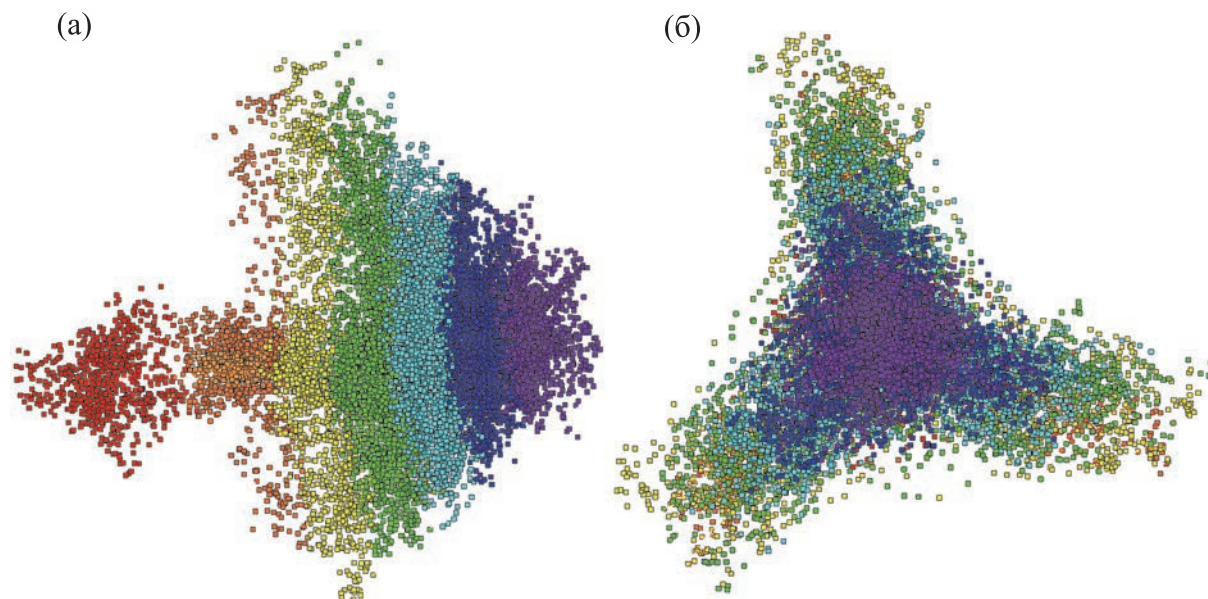
Как и в работах А.Н. Горбаня с соавторами [10, 11], мы используем частотный словарь вида  $W_3^3$ , тем самым триплеты в нашей работе подсчитывались таким образом, что они полностью покрывают последовательность и при этом не пересекаются. Частота  $f_\omega$  – это отношение числа копий  $n_\omega$  данного триплета к общему числу всех триплетов  $N$ , где  $N$  – сумма всех  $n_\omega$ :

$$f_\omega = \frac{n_\omega}{N}. \quad (1)$$

Всякий частотный словарь  $W_3^3$  отображает геном в 64-мерное метрическое (евклидово) пространство. Иначе говоря, каждому фрагменту генома, для которого подсчитывается частотный словарь, ставится в соответствие точка в 64-мерном пространстве. Осям этого пространства соответствуют триплеты. Координатами точки являются значения частот триплетов. В результате разбиения генома на фрагменты он отображается во множество точек в пространстве триплетов.

Рассмотрим более детально предварительную обработку, которая ставит в соответствие данной генетической последовательности множество точек в 64-мерном пространстве триплетов. Делалось это следующим образом: последовательность сканировалась окном длины  $\Delta$  с шагом  $t$ . Для каждого положения  $i$ -го окна определяли участок генетической последовательности, для которого вычисляли частотный словарь  $W_3^{(i)}$  соответствующий  $i$ -й точке в 64-мерном пространстве. Кроме того, с каждой точкой в 64-мерном пространстве связывали номер центрального символа рассматриваемого участка, который совпадает с номером этого символа в последовательности. Данные для исследования брали в базе EMBL-банка. Для всех генетических последовательностей длина окна  $\Delta = 603$ , шаг  $t = 11$ .

В каждом из полученных частотных словарей один из 64 триплетов исключался, поскольку сумма всех частот в словаре равна 1, что порождает линейную связь, которая может давать ложный сигнал при последующей обработке (корреляци-



**Рис. 1.** Пространственное расположение GC-состава фрагментов генома *Anthoceros angustus* в пространстве 1-й и 2-й главных компонент (рис. 1а) и 2-й и 3-й главных компонент (рис. 1б).

онном анализе, определении главных компонент и т.п.).

В нашем случае целесообразнее исключить тот триплет, для которого стандартное отклонение, наблюдаемое по ансамблю всех частотных словарей, является минимальным: такой триплет дает наименьший вклад в различимость объектов (в предельном случае, когда стандартное отклонение равно 0, различий по этому триплету вовсе нет). Таким образом, рассматриваемое нами пространство точек становится 63-мерным. Для каждого генома исключаемый триплет будет своим.

Для визуализации полученного множества точек в программе VidaExpert (<http://bioinfo-out.cugie.fr/projects/vidaexpert/>) строили проекцию данных в пространстве первых трех главных компонент, вычисленных для данного 63-мерного пространства. Тем самым мы сокращаем 63-мерное пространство до трехмерного; данные становятся обозримыми. При обработке геномов было обнаружено, что точки располагаются достаточно однотипно в проекции на плоскость, определяемую 1-й и 2-й главными компонентами. Для более полной картины рассматривалась также плоскость, определяемая 2-й и 3-й главными компонентами.

Идейно наша работа опирается на аналогичные исследования геномов хлоропластов, выполненные в работе [20]. В ней рассматривались геномы хлоропластов наземных растений; далее изучалось распределение точек, определяемых фрагментами геномов в пространстве частот три-

плетов, а в качестве преобладающей структуры такого распределения была выявлена трехлучевая с хвостом структура.

В нашей работе, кроме хлоропластов, объектом исследования являются геномы бактерий и геномы митохондрии животных и растений. Геномы бактерий значительно длиннее, а геномы митохондрий значительно короче геномов хлоропластов, что, по-видимому, может являться причиной найденных различий. Для всех геномов, кроме геномов митохондрий наземных растений и печеночных мхов, наблюдается трехлучевая структура. Под такой структурой мы понимаем распределение точек, представляющих частотные словари фрагментов в виде трех эллипсоидов (со значительным эксцентриситетом), пересекающихся одним из своих концов. В месте пересечения концентрируются точки, соответствующие некодирующим областям генома. При этом большие оси обнаруженных эллипсоидов отстоят на равные углы. Отметим, что для геномов митохондрий наземных растений и печеночных мхов все три эллипсоида совпадают и образуют единый эллипсоид.

#### ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА GC-СОСТАВА ФРАГМЕНТОВ ГЕНОМОВ ХЛОРОПЛАСТОВ

Было рассмотрено 570 геномов хлоропластов из базы EMBL. Как было показано в работе [23], подавляющее большинство геномов хлоропластов наземных растений имеет трехлучевую

структуру с хвостом. Трехлучевая структура представлена на рис. 1б (проекция на плоскость второй и третьей главных компонент), кластер, образующий так называемый «хвост» виден на рис. 1а слева в плоскости первой и второй главных компонент. На рис. 1а,б показана структура генома хлоропласта с раскрашенным распределением величины GC-состава на примере генома *Anthoceros angustus* (идентификатор AB086179 в EMBL). Исключен триплет GCG. Для всех геномов здесь и далее интервал имеющихся значений GC-состава разбивали на 7 подинтервалов равной длины. Интервалу с минимальными значениями соответствует фиолетовый цвет, с максимальными – красный. Было обнаружено, что распределение значений GC-состава фрагментов геномов хлоропластов по пространственной структуре однотипно. GC-состав фрагментов распределен по градиенту вдоль оси симметрии пространственной структуры генома – от меньших значений к большим, причем минимальные значения находятся в вершине трехлучевой структуры, а максимальные – в отдельно расположенном кластере, так называемом «хвосте» (рис. 1а).

#### ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА GC-СОСТАВА ФРАГМЕНТОВ ГЕНОМОВ БАКТЕРИЙ

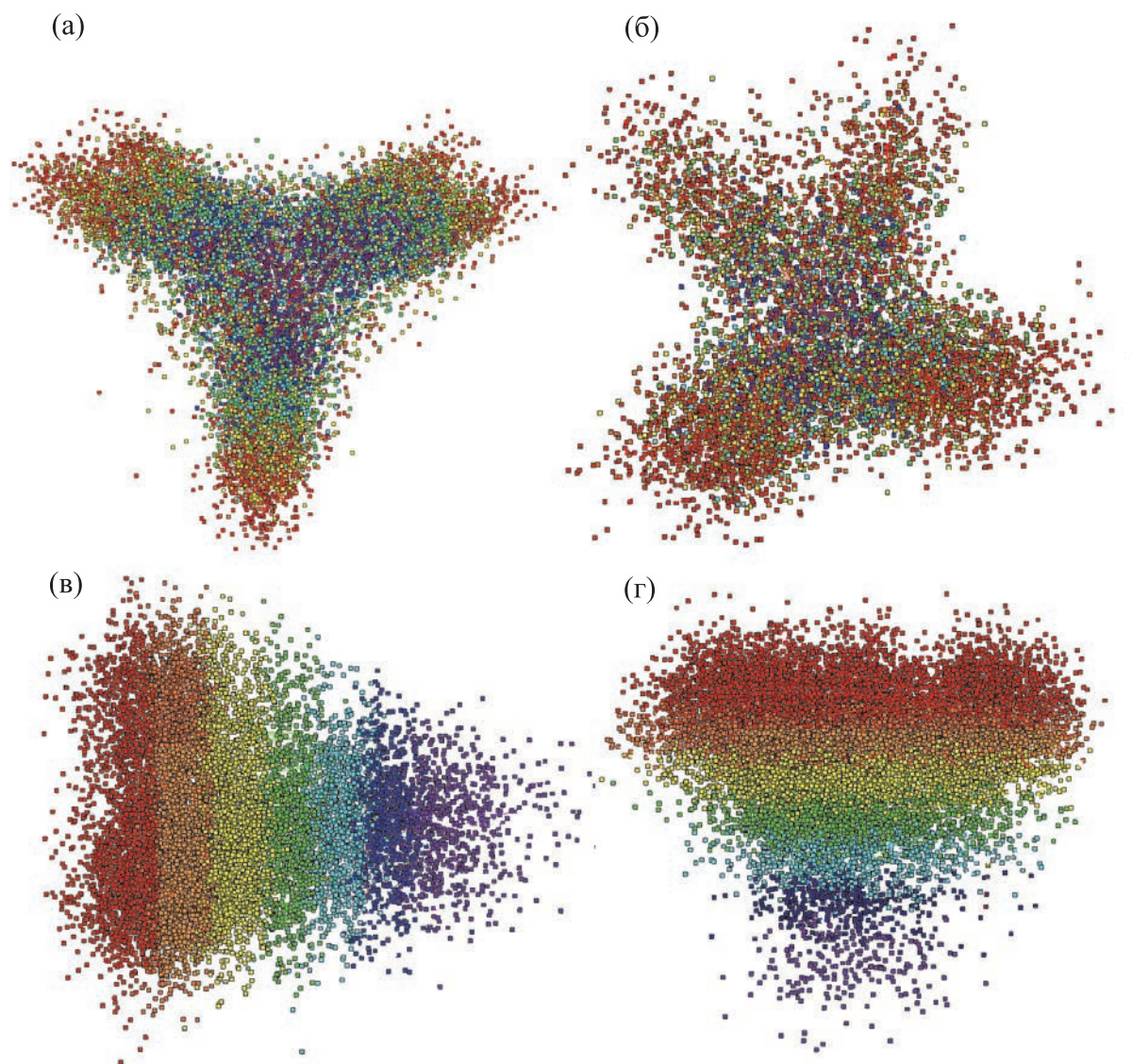
Были проанализированы 68 геномов бактерий. В работе [10] было показано, что пространственная структура бактерий делится на четыре типа в зависимости от GC-состава. Все типы представляют собой различные комбинации взаимного расположения треугольников. Эти треугольники образованы точками, соответствующими фрагментам генома, имеющим одинаковые относительные фазы прямого либо обратного стренда. Относительная фаза определяется положением стартового нуклеотида выделяемого фрагмента по отношению к началу кодирующего участка. При этом остаток от деления на 3 длины между началом кодирующего участка и выделенного фрагмента и определяет номер фазы. Значит, вершины одного треугольника содержат точки с одинаковыми относительными фазами одного стренда (прямого или обратного). Один треугольник содержит точки, относящиеся к прямому (обратному) стренду. При этом взаимное расположение вершин этих треугольников в пространстве первых трех главных компонент существенно зависит от GC-состава генома. Первый тип – «параллельные треугольники» – характерен для АТ-богатых геномов (GC-состав имеет значения от примерно 25 до 35%). Затем идут «перпендикулярные треугольники» для которых GC-состав изменяется примерно от 35 до 50%. Постепенно

происходит переход к вырожденному случаю (треугольники совпадают) в интервале значений примерно от 50 до 60%. И, наконец, при значениях GC-состава больше 60% мы имеем шестилучевую структуру, образованную повернутыми относительно друг друга треугольниками, расположенными в одной плоскости. Рассмотрим, как представлены значения GC-состава для всех четырех типов пространственной структуры геномов бактерий (рис. 2). На рисунках представлены геномы следующих бактерий: *Clostridium baratii* str. *Sullivan* (идентификатор CP006905 в EMBL), *Atopobium parvulum* DSM 20469 (идентификатор CP001721 в EMBL), *Synechococcus* sp. *CC9311* (идентификатор CP000435 в EMBL), *Synechococcus* sp. *JA-3-3Ab* (идентификатор CP000239 в EMBL). Были исключены триплеты GCG, GGG, TAC и TTA соответственно. Как видно из рис. 2а,б, для GC-бедных геномов (значение GC-состава по геному в целом меньше 50%) характерно центрально-симметричное распределение значений GC-состава фрагментов. Минимальные значения находятся в центре структуры, максимальные – по краям. При центрально-симметричном распределении нет такой ярко выраженной градации по величине значений, как при градиентном, однако минимальные значения преимущественно располагаются в центре структуры, а максимальные по краям. Промежуточные значения в большой степени перемешаны между собой, но тем не менее можно заметить, что большее количество точек, относящееся к определенному интервалу значений, расположено дальше от центра структуры, чем большинство точек предыдущего интервала. Для GC-богатых геномов (значение GC-состава по геному в целом больше 50%) наблюдается градиентное распределение значений GC-состава фрагментов вдоль оси симметрии структуры геномов (рис. 2в,г).

#### ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА GC-СОСТАВА ФРАГМЕНТОВ ГЕНОМОВ МИТОХОНДРИЙ

Было отобрано 418 митохондрий растений и животных, в среднем по 25 видов на тип, класс или группу. Пространственная структура геномов митохондрий имеет преимущественно трехлучевую структуру (пересечение трех эллипсоидов). Однако геномы митохондрий наземных растений и печеночных мхов имеют структуру, близкую к единственному эллипсоиду. Рассмотрим группы геномов, для которых наблюдается однотипное распределение значений GC-состава по пространственной структуре геномов.





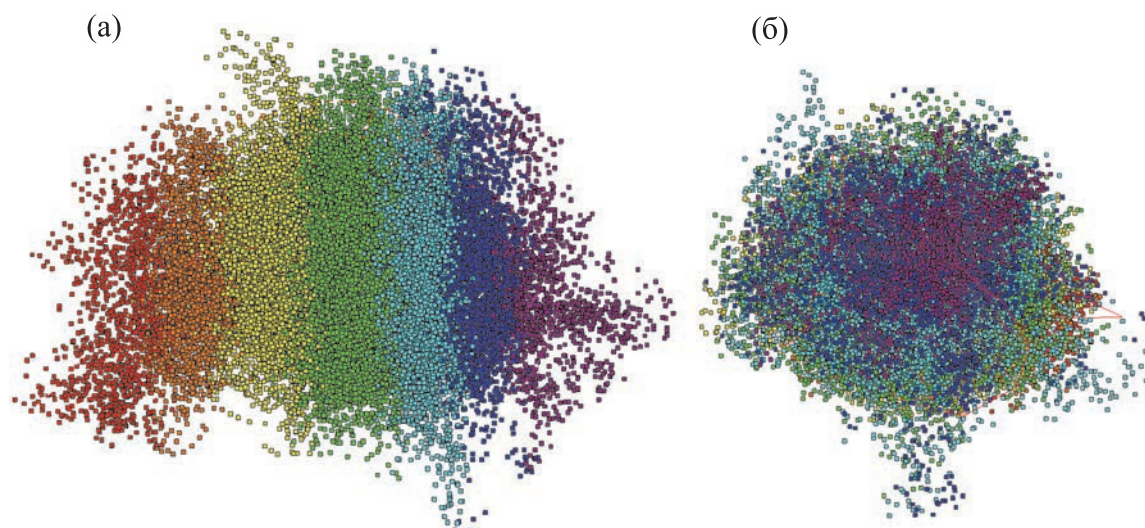
**Рис. 2.** Пространственное расположение GC-состава фрагментов генома *Clostridium baratii* str. Sullivan (рис. 2а), *Atopobium parvulum* DSM 20469 (рис. 2б), *Synechococcus* sp. CC9311 (рис. 2в) и *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab (рис. 2г) в пространстве 1-й и 2-й главных компонент.

Рассмотрим сначала геномы митохондрий наземных растений и печеночных мхов как наиболее отличающихся от всех остальных геномов митохондрий. Как уже было сказано выше, для наземных растений и печеночных мхов характерна структура геномов митохондрий эллипсоидной формы. Для их геномов характерно ярко выраженное градиентное распределение значений GC-состава вдоль оси симметрии структуры. На рис. 3 показано распределение значений GC-состава *Zea mays* (идентификатор AY506529 в EMBL, исключен триплет GCG). Как видно из рисунка, наблюдается градиентное распределение значений GC-состава фрагментов вдоль оси симметрии структуры генома. Аналогично выгля-

дит структура генома и распределение GC-состава для печеночных мхов.

Для одноклеточных водорослей, обычных мхов и высших грибов характерно градиентное распределение значений GC-состава фрагментов вдоль оси симметрии структуры генома. На рис. 4 показано распределение значений GC-состава фрагментов на примере *Mesostigma viride* (идентификатор AF353999 в EMBL, исключен триплет ccg), *Physcomitrella patens* (идентификатор AB251495 в EMBL, исключен триплет ccg) и *Agaricus bisporus* var. *bisporus* H97 (идентификатор JX271275 в EMBL, исключен триплет GCG).

Многоклеточные водоросли и низшие грибы не имеют ярко выраженного градиентного рас-



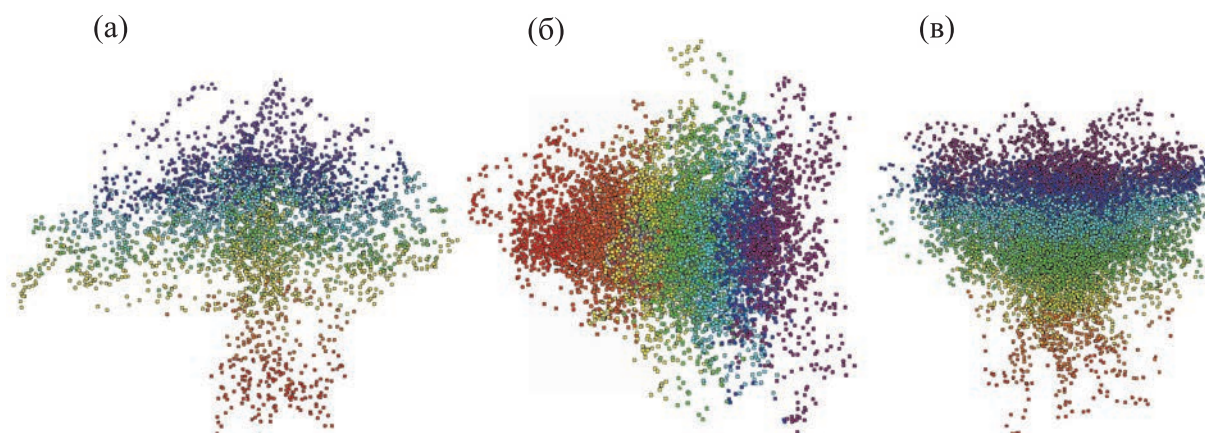
**Рис. 3.** Пространственное расположение GC-состава фрагментов генома *Zea mays* в пространстве 1-й и 2-й главных компонент (рис. 3а) и 2-й и 3-й главных компонент (рис. 3б), компонент (рис. 3а) и 2-й и 3-й главных компонент (рис. 3б).

пределения. Тем не менее можно заметить, что минимальные значения GC-состава располагаются большей частью на одном конце оси симметрии структуры, а максимальные — на другом. Распределение GC-состава фрагментов по структуре геномов показано на рис. 5 на примере *Saccharina japonica* (идентификатор AP011493 в EMBL, исключен триплет CGC) и *Candida viswanathii* (идентификатор EF536359 в EMBL, исключен триплет CCG).

Перейдем к рассмотрению геномов митохондрий животных.

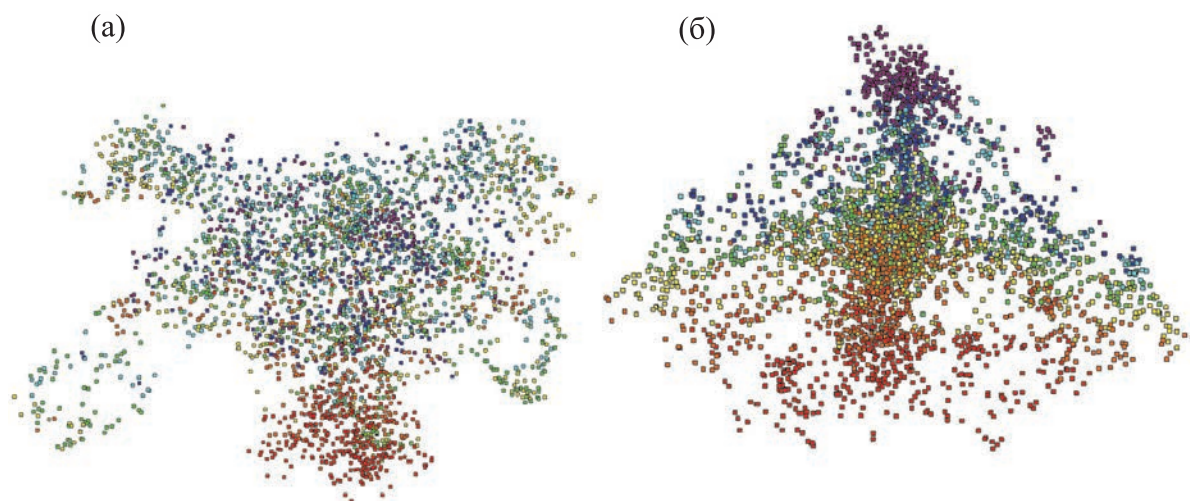
Для геномов митохондрий насекомых, паукообразных и ракообразных характерно центрально-симметричное распределение значений GC-состава фрагментов по пространственной струк-

туре геномов. Минимальные значения GC-состава расположены в центре трехлучевой структуры геномов, максимальные по краям. Промежуточные значения не имеют ярко выраженной градации по значениям, но большинство точек предыдущего интервала значений находится ближе к центру, чем большинство точек следующего интервала. На рис. 6 показано центрально-симметричное распределение значений GC-состава на примере *Homalodisca vitripennis* (идентификатор AY875213 в EMBL, исключен триплет CGG), *Liphistius erawan* (идентификатор JQ407803 в EMBL, исключен триплет CGG) и *Trigoniophthalmus alternatus* (идентификатор EU016193 в EMBL, исключен триплет GCG).



**Рис. 4.** Пространственное расположение GC-состава фрагментов генома *Mesostigma viride* в пространстве 1-й и 3-й главных компонент (рис. 4 а), *Physcomitrella patens* в пространстве 2-й и 3-й главных компонент (рис. 4 б) и *Agaricus bisporus* var. *bisporus* H97 в пространстве 1-й и 3-й главных компонент (рис. 4 в).





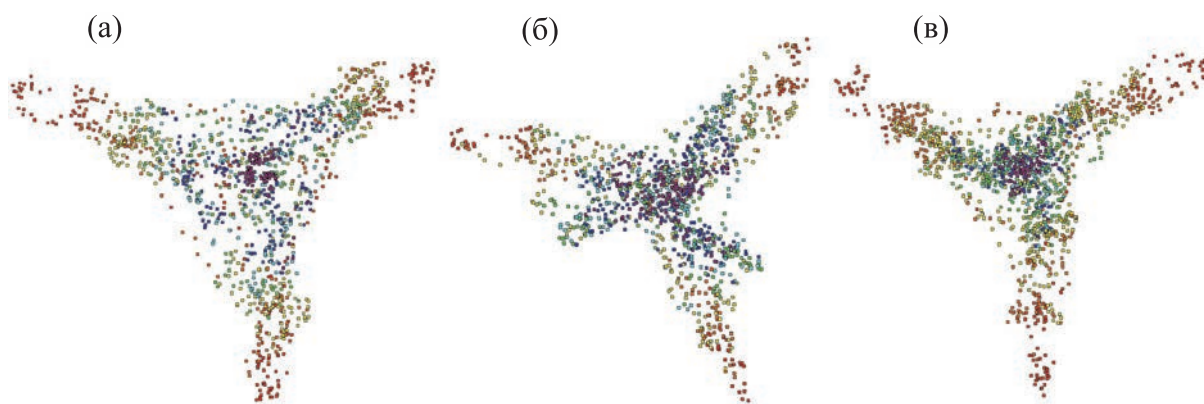
**Рис. 5.** Пространственное расположение GC-состава фрагментов генома *Saccharina japonica* (рис. 5а) и *Candida viswanathii* (рис. 5б) в пространстве 1-й и 3-й главных компонент.

Следующую группу геномов составляют губки, моллюски, плоские, кольчатые и круглые черви. Для геномов этой группы встречаются распределение значений GC-состава в виде неявного градиентного распределения и центральносимметричное. На рис. 7 представлены распределения на примере *Callyspongia plicifera* (идентификатор EU237477 в EMBL, исключен триплет CGC) и *Echinococcus equinus* (идентификатор AF346403 в EMBL, исключен триплет *gce*). Для позвоночных животных не удалось выявить какую-либо типичную картину распределения GC-состава фрагментов внутри классов и между классами.

#### УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ GC-СОСТАВА ФРАГМЕНТОВ ГЕНОМОВ

Чтобы выяснить, насколько устойчивым является обнаруженное пространственное распре-

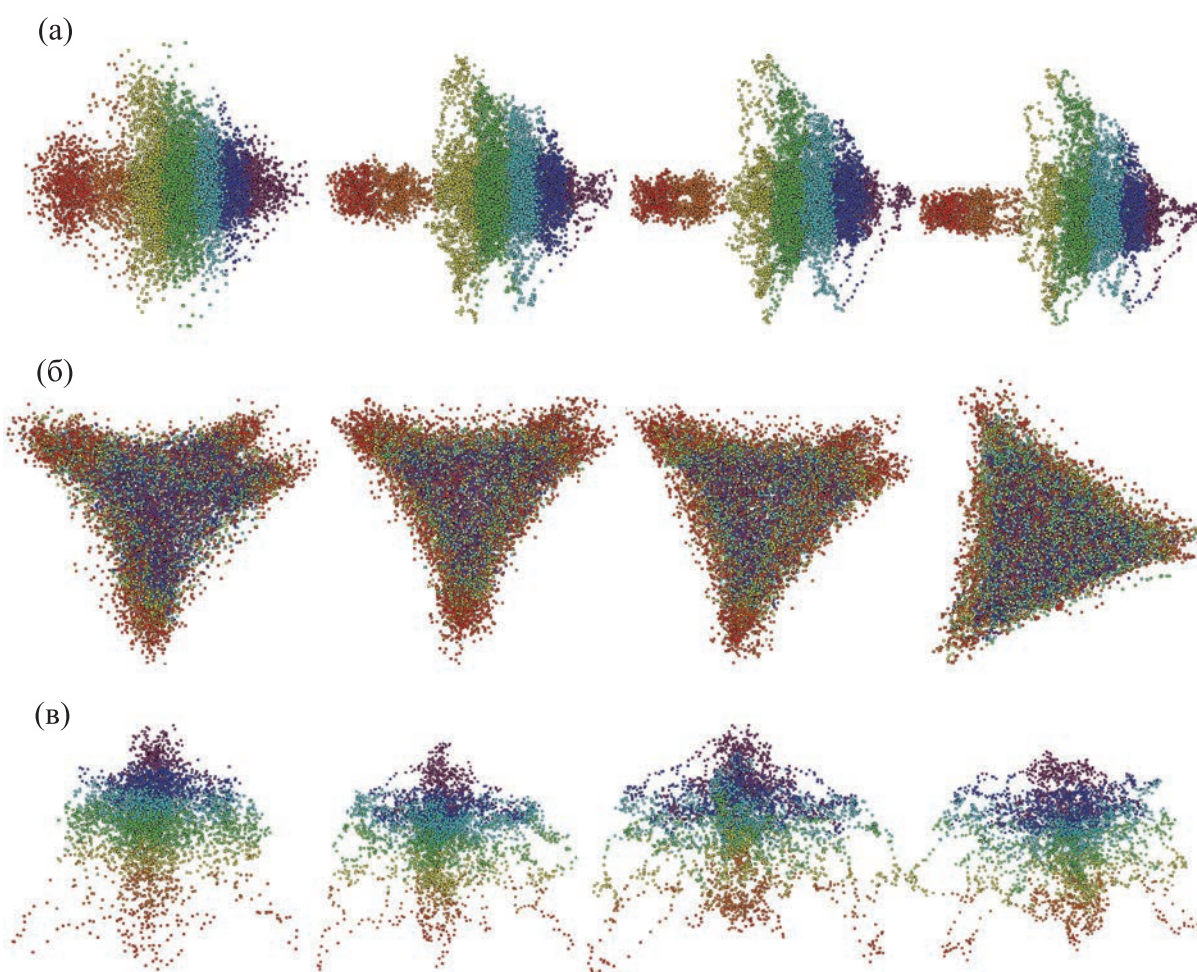
деление GC-состава фрагментов геномов, были рассмотрены такие распределения для различной длины окна  $\Delta$ . Распределения были рассмотрены в интервале сохранения тех структур геномов, которые представлены в статье. Для геномов хлоропластов и митохондрий этот интервал  $\Delta$  равен от 300 до 1500, для бактерий – от 600 до 3000. Поскольку выше мы рассматривали распределение величины GC-состава фрагментов геномов для длины окна  $\Delta = 600$ , то для выяснения устойчивости распределения были взяты длины окна  $\Delta$ , равные 300, 900, 1200 и 1500 для хлоропластов и митохондрий, и окна 900, 1200, 1500 и 3000 – для бактерий. На рис. 8 показаны полученные распределения. В качестве примера для хлоропластов взят геном *Triticum aestivum* (ID AB042240), для бактерий – *Clostridium baratii* str. Sullivan (ID CP006905), а для митохондрий – *Cladonia petrophila* (ID MG941021).



**Рис. 6.** Пространственное расположение GC-состава фрагментов генома *Homalodisca vitripennis* (рис. 6а), *Liphistius erawan* (рис. 6б) и *Trigoniphthalmus alternatus* (рис. 6в) в пространстве 1-й и 2-й главных компонент.



**Рис. 7.** Пространственное расположение GC-состава фрагментов генома *Callispongia plicifera* (рис. 7а) в пространстве 1-й и 3-й главных компонент и *Echinococcus equinus* (рис. 7б) в пространстве 1-й и 2-й главных компонент.



**Рис. 8.** Распределение величины GC-состава фрагментов геномов хлоропластов (а), бактерий (б) и митохондрий (в) для различной длины окна.

**Таблица 1.** Скалярные произведения векторов GC-состава триплетов на первые четыре главных компоненты

	1-я главная компонента	2-я главная компонента	3-я главная компонента	4-я главная компонента
<i>Anthoceros angustus</i>	<b>-0.10627</b>	0.003868	-0.0083	0.002669
<i>Synechococcus</i> sp. CC9311	<b>-0.06197</b>	-0.00552	0.000913	0.002057
<i>Clostridium baratii</i> str. Sullivan	-0.00253	-0.00733	-0.00808	<b>-0.11122</b>
<i>Trigoniophthalmus alternatus</i>	0.000549	-0.0011	-0.0455	<b>-0.06746</b>

### ЧЕМ ОБУСЛОВЛЕНО ГРАДИЕНТНОЕ ИЛИ ЦЕНТРАЛЬНОСИММЕТРИЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЗНАЧЕНИЙ GC-СОСТАВА

Рассмотрим скалярное произведение вектора, компонентами которого будут значения GC-состава всех триплетов, на вектора главных компонент. Построим 64-мерный вектор GC-состава триплетов следующим образом. Триплету AAA будет соответствовать значение GC-состава 0, триплету AAC будет соответствовать значение GC-состава 1, триплету ACC – значение 2 и т.д. Нормируем этот вектор, чтобы сумма всех компонент была равна 1. Анализ скалярного произведения показал, что при градиентном распределении значений GC-состава максимальное по абсолютной величине значение скалярного произведения наблюдается при умножении вектора GC-состава триплетов на первую или вторую главную компоненту. Для центральносимметричного распределения максимальное по абсолютной величине значение скалярного произведения наблюдается при умножении вектора GC-состава триплетов на третью или четвертую главные компоненты. В табл. 1 в качестве примера приведены скалярные произведения векторов GC-состава триплетов на первые четыре главных компоненты. Жирным шрифтом выделены максимальные по абсолютной величине значения. *Anthoceros angustus* и *Synechococcus* sp. CC9311 относятся к градиентному распределению значений GC-состава, для них максимальное значение скалярного произведения получено при умножении на первую главную компоненту. *Clostridium baratii* str. Sullivan и *Trigoniophthalmus alternatus* относятся к центральносимметричному распределению, для них максимальное значение скалярного произведения получено при умножении на четвертую главную компоненту.

### ВЫВОДЫ

Показано существование упорядоченности в распределении значений GC-состава фрагментов различных геномов. При этом данная упорядо-

ченность имеет типичный вид для отдельных групп геномов. Наибольшую однородность распределения величины GC-состава показали геномы хлоропластов наземных растений. Для них характерно градиентное распределение. Тип распределения для геномов бактерий обусловлен величиной GC-состава генома в целом. Для геномов, величина GC-состава которых менее 50%, наблюдается центральносимметричное распределение. Для геномов с величиной GC-состава больше 50% распределение носит градиентный характер. Наибольшим разнообразием в типах распределений GC-состава фрагментов обладают геномы митохондрий. Тем не менее, можно проследить некоторые закономерности и для этих геномов. Так, для геномов митохондрий растений (наземных растений, одноклеточных и многоклеточных водорослей, обычных и печеночных мхов), а также для высших и низших грибов характерно градиентное распределение. Для геномов митохондрий насекомых, паукообразных и ракообразных характерно центральносимметричное распределение. Для всех остальных групп геномов митохондрий животных наблюдались оба типа распределений в каждой группе. Возможно, это связано с более сложным строением организмов и разнообразием среды их обитания.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shimda H. and Sugiuro M. Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucl. Acids Res.*, **19** (5), 983–995 (1991). DOI: 10.1093/nar/19.5.983



2. Young H. A., Lanzatella C. L., Sarath G., and Tobias C. M. Chloroplast genome variation in upland and lowland switchgrass. *PLoS One*, **6** (8), e23980 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0023980
3. Lockhart P. J., Penny D., Hendy M. D., Howe C. J., Beanland T. J., and Larkum A. W. D. Controversy on chloroplast origins. *FEBS Lett.*, **301** (2), 127–131 (1992). DOI: 10.1016/0014-5793(92)81231-A
4. Gao L., Yi X., Yang Y. X., Su Y. J., and Wang T. Complete chloroplast genome sequence of a tree fern *Al-sophila spinulosa*: insights into evolutionary changes in fern chloroplast genomes. *BMC Evol. Biol.*, **9**, 130 (2009). DOI: 10.1186/1471-2148-9-130
5. Wu Z. Q. and Ge S. The phylogeny of the BEP clade in grasses revisited: evidence from the whole-genome sequences of chloroplasts. *Mol. Phylog. Evol.*, **62** (1), 573–578 (2012). DOI: 10.1016/j.ympev.2011.10.019
6. Qian J., Song J., Gao H., Zhu Y., Xu J., Pang X., Yao H., Sun C., Li X., Li C., Liu J., Xu H., and Chen S. The complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *PLoS One*, **8** (2), e57607 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0057607
7. Zhang T., Fang Y., Wang X., Deng X., Zhang X., Hu S., and Yu J. The complete chloroplast and mitochondrial genome sequences of *Boea hygrometrica*: insights into the evolution of plant organellar genomes. *PLoS One*, **7** (1), e30531 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0030531
8. Yang Y., Zhou T., Duan D., Yang J., Feng L., and Zhao G. Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of five *Quercus* species. *Front. Plant Sci.*, **7**, 959 (2016). DOI: 10.3389/fpls.2016.00959
9. Hildebrand F., Meyer A., and Eyre-Walker A. Evidence of selection upon genomic GC-content in bacteria. *PLoS Genetics*, **6** (9), e1001107 (2010). DOI: 10.1371/journal.pgen.1001107
10. Gorban A. N., Popova T. G., and Zinovyev A. Y. Four basic symmetry types in the universal 7-cluster structure of microbial genomic sequences. *In silico Biol.*, **5** (3), 265–282 (2005). DOI: 10.48550/arXiv.q-bio/0410033
11. Gorban A. N., Zinovyev A. Y., and Popova T. G. Seven clusters in genomic triplet distributions. *In silico Biol.*, **3** (4), 471–482 (2003). DOI: 10.48550/arXiv.cond-mat/0305681
12. Lightfield J., Fram N. R., and Ely B. Across bacterial phyla, distantly-related genomes with similar genomic GC content have similar patterns of amino acid usage. *PLoS One*, **6** (3), e17677 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0017677
13. Peano C., Pietrelli A., Consolandi C., Rossi E., Petiti L., Tagliabue L., De Bellis D., and Landini P. An efficient rRNA removal method for RNA sequencing in GC-rich bacteria. *Microb. Informatics Exp.*, **3**, 1 (2013). DOI: 10.1186/2042-5783-3-1
14. Zhou H. Q., Ning L. W., Zhang H. X., and Guo F. B. Analysis of the relationship between genomic GC content and patterns of base usage, codon usage and amino acid usage in prokaryotes: similar GC content adopts similar compositional frequencies regardless of the phylogenetic lineages. *PLoS One*, **9** (9), e107319 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0107319
15. Giannoukos G., Ciulla D. M., Huang K., Haas B. J., Izard J., Levin J. Z., Livny J., Earl A. M., Gevers D., Ward D. V., Nusbaum C., Birren B. W., and Gnirke A. Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. *Genome Biol.*, **13**, r23 (2012). DOI: 10.1186/gb-2012-13-3-r23
16. Behura S. K., Lobo N. F., Haas B., DeBruyn B., Lovin D. D., Shumway M. F., Puiu D., Romero-Severson J., Nene V., and Severson D. W. Complete sequences of mitochondria genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **41** (10), 770–777 (2011). DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.05.006
17. Johnston I. G. and Williams B. P. Evolutionary inference across eukaryotes identifies specific pressures favoring mitochondrial gene retention. *Cell Systems*, **2** (2), 101–111 (2016). DOI: 10.1101/037960
18. Ferla M. P. et al. New rRNA gene-based phylogenies of the Alphaproteobacteria provide perspective on major groups, mitochondrial ancestry and phylogenetic instability. *PLoS One*, **8** (12), e83383 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0083383
19. Nakamura Y., Sasaki N., Kobayashi M., Ojima N., Yasuike M., Shigenobu Y., Satomi M., Fukuma Y., Shi-waku K., Tsujimoto A., Kobayashi T., Nakayama I., Ito F., Nakajima K., Sano M., Wada T., Kuhara S., Inouye K., Gojobori T., and Ikeo K. The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, *Susabi-nori* (*Pyropia yezoensis*). *PLoS One*, **8** (3), e57122 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0057122
20. Godel C., Kumar S., Koutsovoulos G., Ludin P., Nilsson D., Comandatore F., Wrobel N., Thompson M., Schmid C. D., Goto S., Bringaud F., Wolstenholme A., Bandi C., Epe C., Kaminsky R., Blaxter M., and Mäser P. The genome of the heartworm, *Dirofilaria immitis*, reveals drug and vaccine targets. *FASEB J.*, **26** (11), 4650 (2012). DOI: 10.1096/fj.12-205096
21. Imanian B., Pombert J. F., Dorrell R. G., Burki F., and Keeling P. J. Tertiary endosymbiosis in two dinotoms has generated little change in the mitochondrial genomes of their dinoflagellate hosts and diatom endosymbionts. *PLoS One*, **7** (8), e43763 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0043763
22. Wei L., He J., Jia X., Qi Q., Liang Z., Zheng H., Ping Y., Liu S., and Sun J. Analysis of codon usage bias of mitochondrial genome in *Bombyx mori* and its relation to evolution *BMC Evol. Biol.*, **14**, 262 (2014). DOI: 10.1186/s12862-014-0262-4
23. Sadovsky M. G., Senashova M. Y., and Malyshev A. V. Amazing symmetrical clustering in chloroplast genomes. *BMC Bioinformatics*, **21** (Suppl. 2), 83 (2020). DOI: 10.1186/s12859-020-3350-z

## Distribution of Values of GC-Content of the Fragments in the Spatial Structure of Mitochondrial, Chloroplast and Bacterial Genomes

**M.Yu. Senashova\* and M.G. Sadovsky\*, \*\*, \*\*\***

*\*Institute of Computational Modelling, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok 50/44, Krasnoyarsk, 660036*

*\*\*Federal Siberian Research Clinical Center, FMBA of Russia, Kolomenskaya ul. 26, Krasnoyarsk, 660037 Russia*

*\*\*\*Siberian Federal University, Svobodny prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

Distribution of values of GC-content of the fragments in spatial structure of chloroplast, mitochondrial, and bacterial genomes were explored. It was found that GC-content in the fragments for most genomes is identically but not independent distributed variable. Two main types of distribution have been revealed: the gradient distribution and centrally symmetrical distribution. Chloroplast genomes have only a gradient distribution. In bacteria, for the GC-poor genomes, a centrally symmetrical distribution is observed, while there is a gradient distribution in the GC-rich genomes. In mitochondria, both types of distribution are present, the type of distribution depends on the type of an organism.

*Keywords: GC-content, frequency dictionaries, triplets, structure, spatial distribution*

## ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ОКСИБИОЛА НА ПРОЦЕСС МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ВОДОРАСТВОРИМЫМИ ПРОДУКТАМИ ФОТООКСИЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ БИСРЕТИНОИДА А2Е

© 2024 г. А.Е. Донцов\*, Н.Л. Аронштам\*., М.А. Островский\*, \*\*

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

\*\*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991, Россия

\*E-mail: nsakina@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2023 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята в печать 07.02.2024 г.

Ранее нами было показано, что гетероароматический антиоксидант оксибиол (N-ацетилцистеинат 6-гидрокси-2-аминобензотиазол) ингибирует процесс фруктозилирования сывроточного альбумина. Цель настоящего исследования – выяснение ингибирующего действия оксибиола в отношении модификации белков продуктами фотодеструкции бисретиноида А2Е – основного флуорофора липофусциновых гранул клеток ретиального пигментного эпителия глаза человека. Показано, что водорастворимая фракция, полученная из облученных видимым светом А2Е-липосом, в отличие от водорастворимой фракции из необлученных А2Е-липосом, существенно модифицировала альбумин уже через сутки инкубации при 37°C. Оксибиол в миллимолярных концентрациях эффективно ингибировал этот процесс. В основе ингибирующего действия оксибиола, вероятно, лежит его антиоксидантная активность и способность к конкурентному взаимодействию с реактивными альдегидами, образующимися в ходе фотоокислительной деструкции А2Е-кардиолипиновых липосом. Исследована острая токсичность оксибиола на мышцах при внутрибрюшинном введении, определены величины  $LD_{10}$  и  $LD_{50}$ . Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования оксибиола в фармакологии для предотвращения и лечения заболеваний, связанных с развитием окислительного стресса в различных областях медицины, в первую очередь в офтальмологии.

*Ключевые слова:* гетероароматические антиоксиданты, модификация белков, карбонильный стресс, А2Е, оксибиол.

DOI: 10.31857/S0006302924020051, EDN: OVGSEN

В последние годы достигнуты определенные успехи в изучении механизмов развития старческих и нейродегенеративных заболеваний сетчатки глаза [1]. В патогенезе этих заболеваний ключевую роль играет карбонильный стресс, развивающийся в результате накопления конечных продуктов гликирования (advanced glycation end products – AGE) и липоксидирования (advanced lipoxidation end products – ALE) [2]. Важное значение в этих процессах имеют активные карбонильные соединения (альдегиды, диальдегиды, кетоны), легко взаимодействующие со свободными аминокеттогруппами белков, вызывая их модификацию и изменение функциональных характеристик [3–5].

Накопление конечных продуктов гликирования и последующая активация соответствующих рецепторов к ним [6] вносят существенный вклад в процессы старения и развития многих патологий, в том числе таких распространенных глазных заболеваний, как возрастная макулярная дегенерация сетчатки, катаракта и диабетическая ретинопатия. Так, например, при диабетической ретинопатии карбонильный стресс приводит к аномальному развитию сосудов сетчатки, утолщению базальной мембраны, потере перицитов и увеличению проницаемости стенок сосудов, что в конечном итоге приводит к ишемии [7]. Важно отметить, что в клетках глаза одним из источников карбонильных соединений являются флуорофоры липофусциновых гранул, интенсивно накапливающиеся в тканях с возрастом или в результате различных патологий [8–11]. Эти

Сокращение: А2Е – N-ретинилиден-N-ретирилэтанол-амин.

флуорофоры представляют собой побочные продукты фотолиза зрительного пигмента родопсина, образующиеся из полностью-*транс*-ретинала. Наиболее известный из них – бисретиноид N-ретинилиден-N-ретинилэтанолламин (A2E). A2E играет важную роль в патогенезе различных дегенеративных заболеваний сетчатки человека, инициируя воспалительные процессы в клетках ретинального пигментного эпителия глаза [11–13]. Как, было показано, при окислительной деструкции бисретиноида A2E образуются различные диальдегиды, способные модифицировать молекулы белков [8, 11].

Соединения, ингибирующие процесс модификации белков активными карбонилами, могут иметь большое значение для терапевтического вмешательства при болезнях, связанных с развитием окислительного стресса. В медицинской практике широко применяются такие синтетические препараты, как мексидол (3-окси-6-метил-2-этилпиридина сукцинат), эмоксипин (3-окси-6-метил-2-этилпиридина хлорид) и мексикор (гидрохлорид и сукцинат 2-этил-6-метил-3-окси-пиридина) [14]. Однако эти препараты оказались недостаточно эффективными в отношении подавления карбонильного стресса. В этой связи важен поиск новых эффективных малотоксичных веществ, способных ингибировать развитие карбонильного стресса. Оксобиол – новый водорастворимый синтетический антиоксидант, как было нами ранее показано [15–18], превосходит мексидол по многим параметрам, в том числе по более высокой антирадикальной и антиоксидантной активности.

В настоящей работе было исследовано действие оксобиола на процесс модификации белков продуктами окислительной деструкции бисретиноида A2E – основного флуорофора липофусциновых гранул клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы синтезированные препараты оксобиола и A2E, а также реагенты и препараты фирмы Sigma-Aldrich (США). Оксобиол был получен путем совместной кристаллизации эквимольных количеств 6-гидрокси-2-аминобензотиазола и N-ацетил-L-цистеина по методике, описанной в работе [19]. Его структурная формула приведена на рис. 1. Бисретиноид A2E был получен из полностью-*транс*-ретинала и этаноламина и очищен по стандартной методике [20]. Чистоту полученного A2E контролировали методом ВЭЖХ на хроматографе фир-

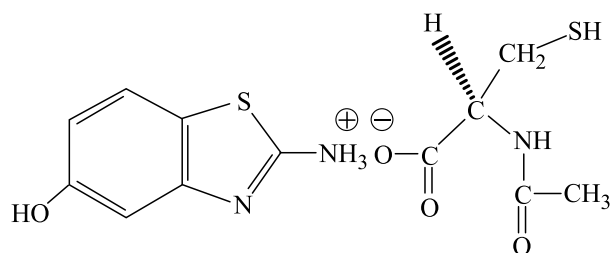


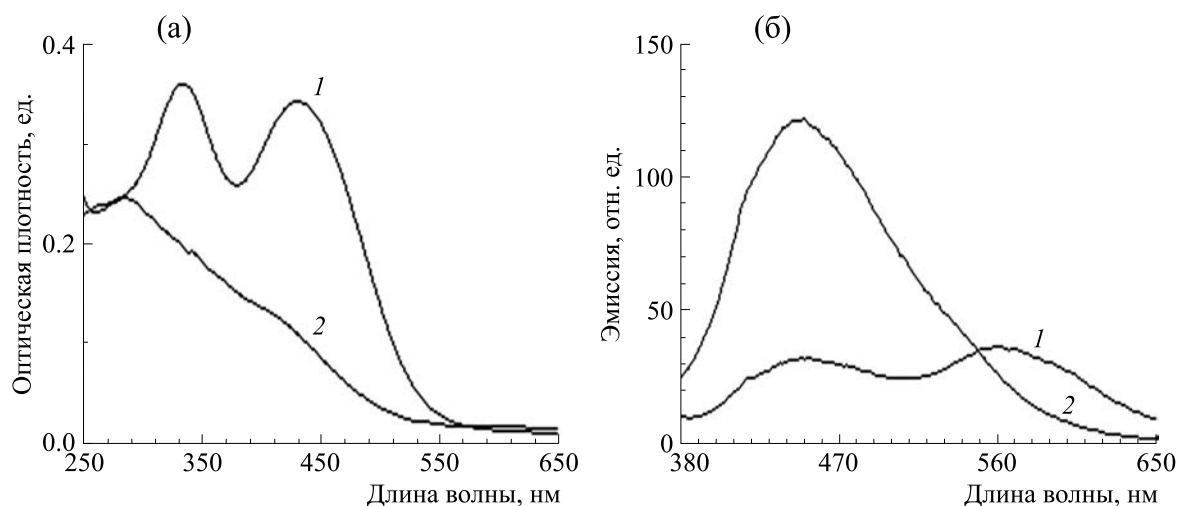
Рис. 1. Структурная формула оксобиола.

мы Кнауер (Германия): колонка – Диасфер-110-С18 с обращенной фазой, элюент – ацетонитрил/вода + 0.1% трифторуксусная кислота.

**Приготовление A2E-содержащих липосом.** A2E-липосомы были приготовлены путем смешивания метанольных растворов A2E (1 мМ) и кардиолипина (1 мг/мл) в равных объемах. Растворитель удаляли на ротормном испарителе, а к образовавшейся пленке добавляли 2–3 мл 0.1 М К-фосфатного буфера, pH 7.4. Смесь тщательно перемешивали на мешалке «Vortex» в течение часа, затем суспензию липосом оставляли в холодильнике на 10–12 ч для лучшей гидратации, после чего еще раз тщательно перемешивали на мешалке. В результате получалась однородная суспензия A2E-содержащих кардиолипидных липосом, устойчивая к осаждению в течение минимум одной недели.

**Облучение образцов видимым светом.** Облучение образцов проводили синим светом (450 нм) светодиодного источника с энергией облучения 10 мВт/см<sup>2</sup>. Освещение проводили в течение одного-полутора часов в открытом стеклянном бюксе при постоянном перемешивании и комнатной температуре, контролируя объем исходного образца. Объем образца составлял 3–4 мл, расстояние от источника облучения до поверхности образца – 5 см, площадь поверхности образца примерно 2.5 см<sup>2</sup>. Контрольные образцы инкубировали то же самое время в полной темноте. После облучения образцы были центрифугированы при 12000 g в течение 20 мин на центрифуге Allegra 64R (Beckman, США). Полученные супернатанты были использованы для модификации белков. В отдельных экспериментах для модификации альбумина использовали не водорастворимые фракции A2E-липосом, а раствор облученного и необлученного A2E в метаноле (рис. 2).

**Модификация альбумина водорастворимой фракцией фотоокисленных A2E-кардиолипидных липосом.** Процесс модификации сывороточного альбумина водорастворимой фракцией фотоокисленных A2E-липосом проводили в темноте,



**Рис. 2.** Облучение А2Е приводит к появлению продуктов, вызывающих модификацию альбумина. (а) – Сравнение спектров поглощения А2Е до (кривая 1) и после (кривая 2) облучения синим светом. (б) – Спектр флуоресценции смеси альбумина и А2Е после инкубирования при 37°C в течение 48 ч: кривая 1 – А2Е в растворе метанола был предварительно инкубирован в течение часа в темноте, после чего добавлен к раствору альбумина в фосфатном буфере (2 мг/мл); кривая 2 – А2Е в метаноле (60 мкМ) был предварительно облучен синим светом в течение часа, после чего добавлен к раствору, содержащему 2 мг/мл альбумина. Оба образца инкубировали при 37°C в течение 48 ч, после чего регистрировали спектр флуоресценции.

при температуре 37°C и постоянном перемешивании в течение 24–96 ч. В наших экспериментах мы использовали альбумин в концентрации до 4 мг/мл, приготовленный в 0.1 М К-фосфатном буфере с рН 7.4. По окончании реакции смесь диализировали, используя целлюлозно-эфирные мембраны для диализа фирмы Spectrum Labs (США), пропускающие молекулы с молекулярной массой менее 3.5 кДа. Диализ проводили против 100-кратного избытка К-фосфатного буферного раствора в течение суток при температуре 6°C для удаления непрореагировавших низкомолекулярных продуктов. Спектры флуоресценции альбумина регистрировали при длине волны возбуждающего света 365 нм. Скорость модификации альбумина рассчитывали по величине его эмиссии при 450 нм за определенный период инкубации. Ингибирующее действие оксибиола оценивали в процентах, сопоставляя скорости модификации альбумина в отсутствие и в присутствии ингибитора за 48 ч инкубации. Спектры флуоресценции образцов измеряли на спектрофлуориметре RF-5301 (Shimadzu, Япония). Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре UV-1601PC (Shimadzu, Япония).

#### Определение острой токсичности оксибиола.

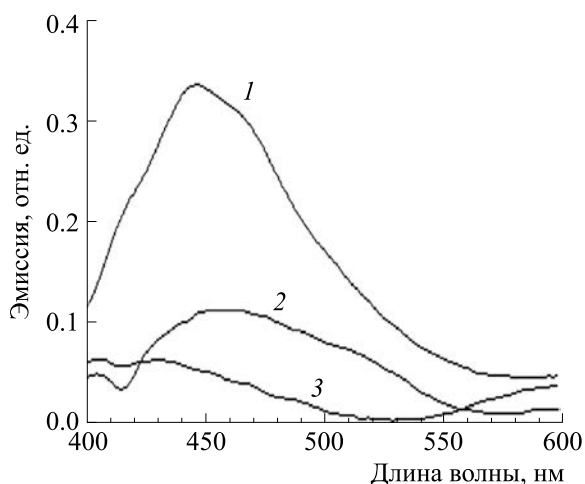
Острая токсичность оксибиола была определена на мышах колонии SHK. Для экспериментов были использованы 50 мышей колонии SHK (самцов с массой тела 20 г) разведения питомника РАМН «Столбовая». Исходный рабочий раствор

оксибиола для инъекций готовили в концентрации 20 мг/мл. Установлено, что предельная растворимость оксибиола в воде без нагревания в течение 10–15 мин составляет 30 г/л или  $9 \cdot 10^{-2}$  М. Для определения острой токсичности препарат вводили животным однократно, внутривенно, в диапазоне доз 50–500 мг/кг живого веса животного в направлении возрастания дозы. В диапазоне доз 400–450 мг/кг токсичность оксибиола была исследована более детально с введением препарата в дозах 400, 410, 420, 430, 440, 450 мг/кг каждой отдельной группе животных, состоявшей из шести мышей. Регистрировали гибель и выживаемость мышей после введения препарата. Продолжительность наблюдения за животными составляла один месяц. Определялись следующие параметры острой токсичности оксибиола – доза, летальная для 50% животных ( $LD_{50}$ ) и доза, вызывающая минимальный эффект гибели животных ( $LD_{10}$ ). Уровень токсических доз рассчитывали по методу Кербера [21].

**Статистическая обработка.** Данные представлены как среднее арифметическое из четырех различных измерений  $\pm$  стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние оксибиола на модификацию альбумина водорастворимой фракцией фотоокисленных А2Е-липосом.** В первой серии экспериментов было по-

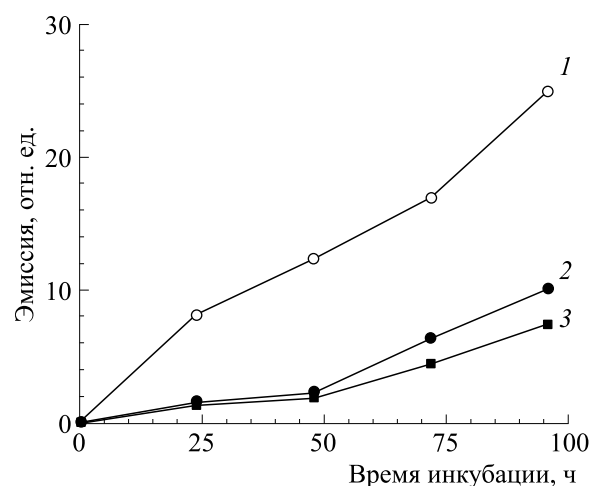


**Рис. 3.** Ингибирующее действие оксибиола на процесс увеличения флуоресценции альбумина при его инкубации с водорастворимыми продуктами фотоокислительной деструкции А2Е-липосом. Реакционная среда содержала 2.0 мг/мл сывороточный альбумин человека и 100 мкл водорастворимых продуктов фотоокислительного распада А2Е-липосом. Длина волны возбуждающего света – 365 нм. Кривая 1 – альбумин после инкубации в течение 24 ч при 37°C в присутствии водорастворимых продуктов фотодеструкции А2Е-липосом; кривая 2 – контроль (альбумин без добавок); кривая 3 – как кривая 1, но с добавлением 3 мМ оксибиола.

казано, что облучение синим светом раствора А2Е в метаноле приводит к исчезновению его максимумов поглощения как в видимой, так и в ближней УФ-области спектра (рис. 2а, кривые 1 и 2). Продукты, образующиеся в результате фотолиза А2Е, в отличие от исходного необлученного А2Е, вызывают модификацию сывороточного альбумина с образованием флуоресцирующих оснований Шиффа (рис. 2б). Этот процесс, по-видимому, связан с тем, что при фотоокислении А2Е образуются карбонильные продукты, взаимодействующие с аминогруппами белка [11, 22].

Аналогичный эффект образования флуоресцирующих продуктов при модификации альбумина имеют и водорастворимые продукты, образующиеся при фотолизе А2Е-содержащих кардиолипидных липосом (рис. 3, кривая 1).

Однако в присутствии оксибиола процесс модификации белка значительно тормозится. Оксибиол в концентрации 3 мМ практически полностью ингибирует реакцию модификации сывороточного альбумина продуктами фотоокислительной деструкции А2Е-содержащих липосом (рис. 3, кривая 3). Как видно из рис. 3, инкубация сывороточного альбумина при 37°C в присутствии водорастворимой фракции, полученной из облученных видимым светом А2Е-ли-



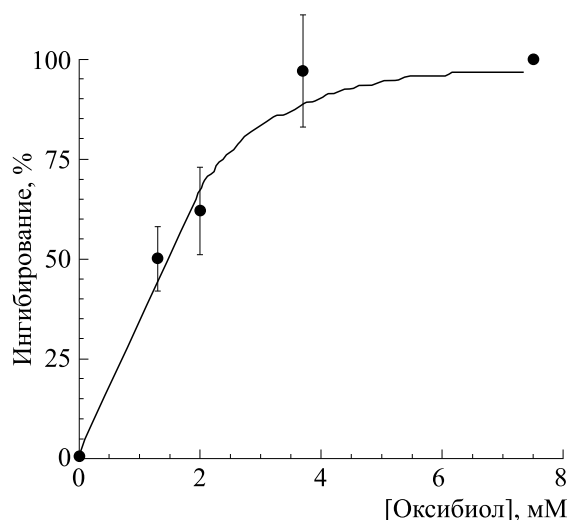
**Рис. 4.** Влияние оксибиола и амингуанидина на процесс увеличения флуоресценции альбумина при его инкубации с водорастворимыми продуктами фотоокислительной деструкции А2Е-липосом. Кривая 1 – контроль в отсутствии ингибиторов, кривая 2 – добавлен 1 мМ оксибиола, кривая 3 – добавлен 1 мМ амингуанидина. Реакционная среда содержала 2.0 мг/мл альбумина и 50 мкл водорастворимых продуктов деструкции А2Е-липосом. Инкубацию проводили при 37°C при постоянном перемешивании.

посом, в отличие от водорастворимой фракции, полученной из необлученных А2Е-липосом, уже через сутки приводила к значительной модификации белка (рис. 3, кривые 1 и 2). Однако в присутствии 3 мМ оксибиола (рис. 3, кривая 3) процесс модификации полностью тормозился.

Ингибирующее действие оксибиола было сопоставимо с ингибирующей активностью известного антигликирующего агента амингуанидина [23]. На рис. 4 приведена сравнительная кинетика нарастания флуоресценции альбумина при его инкубации с продуктами фотоокислительной деструкции А2Е-липосом (кривая 1) в присутствии оксибиола (кривая 2) или амингуанидина (кривая 3) в равных концентрациях.

Оксибиол в концентрации 1 мМ практически с той же эффективностью, что и амингуанидин, ингибировал процесс модификации альбумина, причем в наибольшей степени это было выражено в начальные периоды инкубации. В концентрации свыше 4 мМ оксибиол практически полностью препятствовал взаимодействию альбумина с продуктами фотоокислительной деструкции А2Е-кардиолипидных липосом (рис. 5).

**Изучение острой токсичности оксибиола.** Важно, что оксибиол в рабочих концентрациях не проявлял сильной токсичности. Острая токсичность оксибиола ( $LD_{50}$ ) при внутрибрюшинном однократном введении мышам составила



**Рис. 5.** Зависимость ингибирования процесса накопления флуоресцирующих продуктов в альбумине при его инкубации с водорастворимыми продуктами фотоокислительной деструкции А2Е-липосом от концентрации оксибиола. Время инкубации – 48 ч.

440 мг/кг. Это показывает, что токсичность оксибиола сопоставима с токсичностью широко используемых в практике лекарственных препаратов мексидола ( $LD_{50}$  составляет 475 мг/кг [24]) и аспирина ( $LD_{50}$  составляет 495 мг/кг [25]). Доза оксибиола, оказывающая минимальный эффект гибели мышей при внутрибрюшинном однократном введении ( $LD_{10}$ ), составила 410 мг/кг.

Таким образом, по величине острой токсичности оксибиол может быть отнесен к малотоксичным веществам.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов показали достаточно высокую антигликирующую активность оксибиола в отношении модификации сывороточного альбумина водорастворимыми продуктами деструкции А2Е – одного из основных флуорофоров липофусциновых гранул, накапливающихся в клетках ретинального пигментного эпителия глаза с возрастом и при различных патологиях. В условиях наших экспериментов А2Е мог участвовать в фотоиндуцированном окислении кардиолипина с образованием различных продуктов перекисидации таких, например, как малоновый диальдегид. Кроме того, под действием облучения, как мы показали ранее [10, 21], А2Е подвергается деструкции с образованием водорастворимых веществ альдегидной природы. Эти продукты могут формироваться и в клетках ретинального пигментного эпителия под действием света, приводя к развитию различных

патологий. Таким образом, оксибиол, имеющий относительно низкую токсичность, может рассматриваться как исходная субстанция для создания фармакологических средств при лечении целого ряда патологий, в первую очередь офтальмологических, с более широким спектром действия и большей эффективностью, по сравнению с широко применяемым мексидолом.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями Институтской комиссии по этике и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609/ЕЕС)).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Островский М. А. Молекулярная физиология зрительного пигмента родопсина: актуальные направления. *Рос. физиол. журн. имени И. М. Сеченова*, **106** (4), 401–420 (2020). DOI: 10.31857/S0869813920040056
2. Vistoli G., De Maddis D., Cipak A., Zarkovic N., Carini M., and Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an over-

- view of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.*, **47** (Suppl. 1), 3–27 (2013). DOI: 10.3109/10715762.2013.815348
3. DeGroot J. The AGE of the matrix: chemistry, consequence and cure. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4** (3), 301–305 (2004). DOI: 10.1016/j.coph.2004.01.007
  4. Höhn A., König J., and Grune T. Protein Oxidation in Aging and the Removal of Oxidized Proteins. *J. Proteomics*, **92**, 132–159 (2013). DOI: 10.1016/j.jprot.2013.01.004
  5. Sibbersen C. and Johannsen M. Dicarbonyl derived post-translational modifications: chemistry bridging biology and aging-related disease. *Essays Biochem.* **64** (1), 97–110 (2020). DOI: 10.1042/EBC20190057
  6. Yamagishi S., Nakamura K., Matsui T., Noda Y., and Imaizumi T. Receptor for advanced glycation end products (RAGE): a novel therapeutic target for diabetic vascular complication. *Curr. Pharm. Des.*, **14** (5), 487–495 (2008). DOI: 10.2174/138161208783597416
  7. Kang Q. and Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol.*, **37**, 101799 (2020). DOI: 10.1016/j.redox.2020.101799
  8. Sparrow J. R., Gregory-Roberts E., Yamamoto K., Blonska A., Ghosh S. K., Ueda K., and Zhou J. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.*, **31** (2), 121–135 (2012). DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.12.001
  9. Zhou J., Ueda K., Zhao J., and Sparrow J. R. Correlations between Photodegradation of Bisretinoid Constituents of Retina and Dicarbonyl Adduct Deposition. *J. Biol. Chem.*, **290** (45), 27215–27227 (2015). DOI: 10.1074/jbc.M115.680363
  10. Feldman T. B., Dontsov A. E., Yakovleva M. A., and Ostrovsky M. A. Photobiology of lipofuscin granules in the retinal pigment epithelium cells of the eye: norm, pathology, age. *Biophys. Rev.*, **14** (4), 1051–1065 (2022). DOI: 10.1007/s12551-022-00989-9
  11. Dontsov A., Yakovleva M., Trofimova N., Sakina N., Gulin A., Aybush A., Gostev F., Vasin A., Feldman T., and Ostrovsky M. Water-soluble products of photooxidative destruction of the bisretinoid A2E cause proteins modification in the dark. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (3), 1534 (2022). DOI: 10.3390/ijms23031534
  12. Parmar V. M., Parmar T., Arai E., Perusek L., and Mada A. A2E-associated cell death and inflammation in retinal pigmented epithelial cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.*, **27**, 95–104 (2018). doi: 10.1016/j.scr.2018.01.014
  13. Zhang D., Mihai D. M., and Washington I. Vitamin A cycle byproducts explain retinal damage and molecular changes thought to initiate retinal degeneration. *Biol. Open.*, **10** (11), bio058600 (2021). DOI: 10.1242/bio.058600
  14. Смирнов Л. Д. *Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты* (Химия, М., 2005).
  15. Сакина Н. Л., Голубков А. М., Смирнов Л. Д., Островский М. А. и Донцов А. Е. Исследование фото-защитных свойств нового класса гетероароматических антиоксидантов. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **147** (2), 152–154 (2009).
  16. Smirnov L. D., Kuznetsov Y. V., Proskuryakov S. Y., Skvortsov V. G., Nosko T. N., and Dontsov A. E. Antiradical and NO-Inhibiting activities of  $\beta$ -hydroxy(ethoxy) derivatives of nitrous heterocycles. *Biophysics*, **56**, 276–280 (2011). DOI: 10.1134/S000635091102028X
  17. Dontsov A. E., Koromyslova A. D., Kuznetsov Yu. V., Sakina N. L., and Ostrovsky M. A. Antiradical and photoprotective activity of oxibiol – a novel water-soluble heteroaromatic antioxidant. *Russ. Chem. Bull.*, **63**, 1159–1163 (2014). DOI: 10.1007/s11172-014-0565-z
  18. Dontsov A. E., Sakina N. L., Kuznetsov Y. V., and Ostrovsky M. A. Antioxidant and antiglycation properties of 6-hydroxy-2-aminobenzothiazole N-acetylcysteinate. *Russ. J. Phys. Chem. B*, **13**, 947–950 (2019). DOI: 10.1134/S1990793119060174
  19. Донцов А. Е., Сакина Н. Л., Коромыслова А. Д., Кузнецов Ю. В. и Островский М. А. *Средство, обладающее антиоксидантным, фотопротекторным и геропротекторным действием, и способ его получения*. Патент РФ № 2458714 (2012).
  20. Parish C. A., Hashimoto M., Nakanishi K., Dillon J., and Sparrow J. Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Dec 8; **95** (25), 14609–14613 (1998). DOI: 10.1073/pnas.95.25.14609
  21. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств, утвержденные МинЗдравом РФ 29.12.1997г. *Ведомости Фармакоп. Комитета*, **1**, 27–32 (1998).
  22. Яковлева М. А., Васин А. А., Донцов А. Е., Гулин А. А., Айбуш А. В., Фельдман Т. Б. и Островский М. А. Физико-химический анализ продуктов фотодеструкции бисретиноида А2Е // *Науч.-техн. ведомости СПбГПУ. Физ.-мат. науки*. **15** (3.2), 285–290 (2022). DOI: 10.18721
  23. Thornalley P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end-products. *Arch. Biochem. Biophys.*, **419** (1), 31–40 (2003). DOI: 10.1016/j.abb.2003.08.013
  24. Воронина Т. А.. Интернет-ресурс: [mexidol.ru/extra/file/voronina.pdf](http://mexidol.ru/extra/file/voronina.pdf)
  25. Колла В. Э. и Сыропятов Б. Я. *Дозы лекарственных средств и химических соединений для лабораторных животных* (Медицина, М., 1998).



## Inhibitory Effect of Oxibiol on the Process of Protein Modification by Water-Soluble Products of Photo-Oxidative Destruction of Bisretinoid A2E

A.E. Dontsov\*, N.L. Aronshtam\*, and M.A. Ostrovsky\*·\*\*

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

\*\*M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia

It has previously been shown that heteroaromatic antioxidant oxibiol (N-acetylcysteinate 6-hydroxy-2-aminobenzothiazole) inhibits the process of fructosylation of serum albumin. The aim of this study is to elucidate the inhibitory effect of oxibiol on modification of proteins by photodegradation products of bisretinoid A2E, the main fluorophore of lipofuscin granules in retinal pigment epithelial cells of the human eye. It was shown that unlike a water-soluble fraction from non-irradiated A2E-liposomes, a water-soluble fraction formed after irradiation of A2E-liposomes with visible light significantly modified albumin in a day after incubation at 37°C. Oxibiol in millimolar concentrations effectively inhibited this process. The inhibitory effect of oxibiol could be attributed to its antioxidant activity and the ability to compete with reactive aldehydes formed during the photooxidative degradation of A2E-cardiolipin liposomes. The acute toxicity of oxibiol in mice after intraperitoneal injection was studied, the values of  $LD_{10}$  and  $LD_{50}$  were determined. The results obtained demonstrate that oxibiol can be used in pharmacology for preventing and curing diseases associated with the development of oxidative stress in various fields of medicine, primarily in ophthalmology.

*Keywords: heteroaromatic antioxidants, modification of proteins, carbonyl stress, A2E, oxibiol*

УДК 535.71

## РЕНТГЕНОДИФРАКЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДНЫХ ПЛЕНОК С ИХФАНОМ

© 2024 г. А.В. Кривандин\*, #, А.Н. Голощапов\*

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

#E-mail: a.krivandin@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 23.01.2024 г.

После доработки 23.01.2024 г.

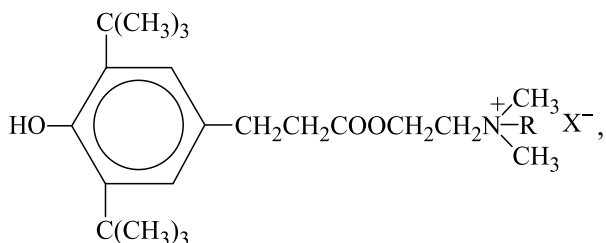
Принята к публикации 07.02.2024 г.

Методом рентгеновской дифракции проведено исследование ориентированных пленок, сформированных из растворов в хлороформе яичного фосфатидилхолина, синтетического гибридного антиоксиданта ИХФАН-10-С-10 и их смесей, содержащих 12.5 и 32 масс. % ИХФАНа. Воздушно-сухие пленки, полученные из фосфатидилхолина и ИХФАНа, были многофазными и, помимо небислойных липидных фаз, содержали кристаллическую фазу ИХФАНа. При увеличении степени гидратации таких пленок в них происходило образование одной ламеллярной фазы, состоящей из липидов и ИХФАНа. Выделение и исчезновение кристаллической фазы ИХФАНа в пленках при изменении степени их гидратации было обратимым. Профили электронной плотности липидных мембран, рассчитанные с разрешением ~1.2 нм, показали, что в присутствии ИХФАНа толщина мембраны уменьшается и упорядоченность в ней углеводородных цепей липидов понижается. Полученные результаты свидетельствуют о способности ИХФАНа встраиваться из кристаллической фазы в липидные мембраны в высоких концентрациях.

*Ключевые слова:* липидные мембраны, фосфатидилхолин, антиоксидант, ихфан, структура, рентгеновская дифракция.

DOI: 10.31857/S0006302924020065, EDN: OVAQAJ

Одним из важных направлений современной химии биоантиоксидантов является синтез «гибридных» соединений, молекулы которых содержат фрагменты, обеспечивающие этим соединениям, помимо антиоксидантной активности, ряд других специфических функций [1]. К таким соединениям относится группа фенольных антиоксидантов, синтезированных в ИБХФ РАН и получивших название ИХФАНЫ [1, 2]. ИХФАНЫ являются производными антиоксиданта фенозана-1 — 3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензил)пропионовой кислоты. Общая структурная формула ИХФАНов имеет следующий вид:



Сокращение: ФХ — фосфатидилхолин.

где R — атом водорода или алкил  $C_nH_{2n+1}$ , содержащий от 1 до 16 атомов углерода, X — атом Cl, Br или J [2]. Присутствие в структуре ИХФАНов фрагмента экранированного фенола обеспечивает им антиоксидантные свойства, фрагмент триметиламиноэтанола предполагает способность ингибировать действие холинэстеразы, а жирнокислотный фрагмент (алкил) должен способствовать их встраиванию в биологические мембраны и проникновению через гематоэнцефалический барьер.

Высокая антиоксидантная активность ИХФАНов и способность ингибировать действие холинэстеразы были продемонстрированы экспериментально [3–5]. Благодаря сочетанию этих свойств ИХФАНЫ являются перспективными соединениями для разработки новых эффективных средств лечения нейродегенеративных заболеваний, в том числе и болезни Альцгеймера — главной причины деменции у пожилых людей.

Свойства ИХФАНов в значительной степени зависят от длины алифатической цепи входящего в их состав алкильного заместителя. Оптимальным сочетанием антиоксидантной активности и способности ингибировать действие холинэсте-

разы по данным исследований, проведенных *in vitro* [4], обладает ИХФАН, у которого алкильный заместитель содержит 10 атомов углерода (ИХФАН-10-С-10 [5]).

Для понимания молекулярных механизмов биологического действия ИХФАНов необходимо изучение их взаимодействия с липидными мембранами. Исследованию этих вопросов, насколько нам известно, было посвящено лишь небольшое число работ. Так, на основании анализа кинетики аскорбат-индуцированного восстановления радикальных центров спиновых зондов в липосомах был сделан вывод, что ИХФАНы могут оказывать модифицирующее действие на структуру липидного бислоя [6]. Методом сканирующей электронной микроскопии для ИХФАНов с алкильными заместителями, содержащими 10 или 12 атомов углерода, была выявлена способность модифицировать морфологию эритроцитов, что авторы объяснили встраиванием ИХФАНов в мембрану эритроцитов [7, 8]. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния было показано, что в присутствии ИХФАН-10-С-10 происходит уменьшение периода укладки и толщины липидных мембран в многослойных липосомах из яичного фосфатидилхолина, что также свидетельствует о встраивании ИХФАНа в липидные мембраны [9]. Однако в силу плохой упорядоченности и разориентации мембран в таких липосомах пространственное разрешение рентгенодифракционных данных при изучении подобной модельной системы является низким и из-за этого возможности методов рентгеновской дифракции не могут быть использованы в полной мере. Значительно более хорошей упорядоченности и ориентации липидных мембран можно добиться в липидных пленках, сформированных на подложках, что позволяет при рентгенодифракционных исследованиях таких пленок получить существенно более точные структурные данные о взаимодействии биологически активных веществ с липидными мембранами.

В настоящей работе сообщается о первых результатах исследования ориентированных многослойных липидных пленок, содержащих ИХФАН-10-С-10.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения пленок использовали яичный L- $\alpha$ -фосфатидилхолин (тип X-E, ~60% (TLC), Sigma, США) и синтезированный в ИБХФ РАН ИХФАН-10-С-10 [5], имеющий алифатическую цепь из 10 атомов углерода и содержащий атом Вг. Навески фосфатидилхолина (ФХ) и ИХФАНа растворяли в хлороформе и полученные растворы наносили тонким слоем на алюминиевые подложки. После испарения основной части хлороформа и образования пленок их выдерживали на

воздухе в комнатных условиях не менее двух суток для испарения остатков хлороформа и формирования воздушно-сухой структуры пленок. Так были получены пленки из совместных растворов в хлороформе ФХ и ИХФАНа, содержащие 12.5% и 32% ИХФАНа от общей массы ФХ и ИХФАНа, а также пленки из растворов в хлороформе одного ФХ и одного ИХФАНа.

Гидратацию пленок проводили при заданной относительной влажности воздуха, выдерживая их при комнатной температуре (23–25°C) сутки в герметично закрытой ячейке над поверхностью воды или насыщенного раствора той или иной соли (NaCl, KBr, BaCl<sub>2</sub>, KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>), изменяя таким образом относительную влажность воздуха [10] и степень гидратации пленок. В этой же ячейке над поверхностью воды или насыщенного раствора соли гидратированные пленки находились и при измерении их дифрактограмм.

Дифрактограммы пленок получали при комнатной температуре на дифрактометре HZG4 (Freiberger Präzisionsmechanik, Германия) в геометрии Брэгга–Брентано (рентгеновская трубка с медным анодом, никелевый  $\beta$ -фильтр, регистрацию дифрактограмм осуществляли с помощью сцинтилляционного детектора с дифференциальным амплитудным дискриминатором).

Период повторяемости  $D$  мембран в пленках определяли по формуле Вульфа–Брэгга:

$$D = h\lambda / 2 \sin \theta_h,$$

где  $h$  – номер дифракционного пика (порядок отражения для ламеллярной фазы),  $2\theta_h$  – дифракционный угол, соответствующий максимуму дифракционного пика с номером  $h$ ,  $\lambda$  – среднее значение длины волны рентгеновского излучения для дублета Cu  $K\alpha_1/K\alpha_2$  (0.1542 нм).

Полагая, что распределение электронной плотности в пленках в направлении, перпендикулярном плоскости мембран, является центросимметричным (мембраны состоят из двух одинаковых липидных монослоев), одномерные профили электронной плотности мембран  $\rho(x)$  в направлении перпендикулярном плоскости мембран рассчитывали центросимметричным фурье-синтезом:

$$\rho(x) = 2 / D \sum_{h=1}^N S(h) |F(h)| \cos\left(\frac{2\pi hx}{D}\right). \quad (1)$$

В этой формуле  $N$  – число дифракционных пиков (в нашем случае  $N = 4$ ),  $F(h)$  – структурные амплитуды,  $S(h)$  – фазовые множители, которые для центросимметричных структур могут иметь значения +1 или –1. Модули структурных амплитуд  $|F(h)|$  для  $h \geq 1$  определяли по интегральным интенсивностям дифракционных пиков  $I_{\text{инт}}(h)$ ,

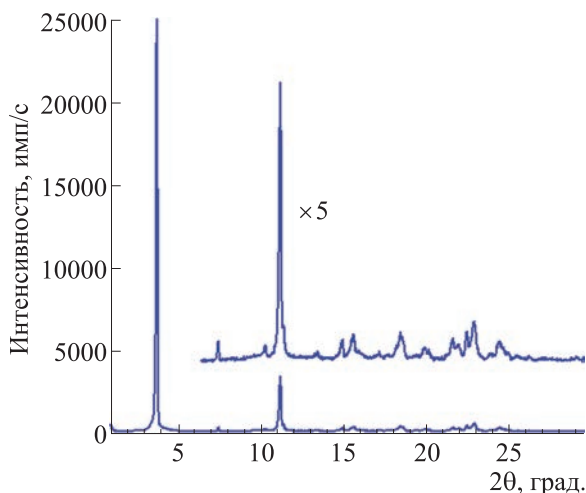


Рис. 1. Дифрактограмма воздушно-сухой пленки, полученной из ИХФАНа.

используя поправочный множитель Лоренца  $\sin(2\theta_h)$ , как

$$|F(h)| = \sqrt{I_{\text{umt}}(h) \sin(2\theta_h)},$$

и затем нормировали так, чтобы выполнялось соотношение

$$\frac{2}{D} \sum_{h=1}^N |F(h)|^2 = 1.$$

Фазовые множители  $S(h)$  определяли как в работах [11, 12], при помощи разработанной для этого компьютерной программы, основанной на расчетном методе, предложенном в работе [13]. Суть этого метода состоит в том, что для двух дифрактограмм мембранного мультислоя, полученных при разных периодах  $D$  и  $D'$  ( $D' > D$ ), проводится перебор всех возможных сочетаний фазовых множителей и попарное сравнение между собой профилей электронной плотности  $\rho(x)$  и  $\rho'(x)$ , рассчитанных по этим дифрактограммам для каждого из этих сочетаний (структура мембраны при периодах  $D$  и  $D'$  предполагается неизменной). За меру совпадения профилей  $\rho(x)$  и  $\rho'(x)$  принимается величина

$$\Delta = \int_0^{D/2} [\rho(x) - A\rho'(x) - B]^2 dx \Big/ \int_0^{D/2} [\rho(x)]^2 dx,$$

минимизированная в пространстве параметров  $A$  и  $B$ , где  $A$  — масштабирующий коэффициент, а параметр  $B$  учитывает вклад неизмеряемых экспериментально отражений с индексом  $h = 0$ :

$$B = F(0)(D - D') / D / D'.$$

Верными являются те фазовые множители, при которых величина  $\Delta$  имеет наименьшее значение. Для всех липидных пленок без ИХФАНа и

с ИХФАНа для первых четырех порядков отражений были получены одни и те же фазовые множители:  $-1, -1, +1, -1$ . Эти множители были использованы при расчетах профилей электронной плотности по формуле (1). Дифрактограммы образцов с разными периодами  $D$ , необходимые для определения фазовых множителей, получали, изменяя степень гидратации пленок, как описано выше.

Средние размеры областей когерентного рассеяния в пленках, которые дают оценку средних размеров кристаллитов, рассчитывали по ширине дифракционных пиков при помощи формулы Селякова—Шеррера:

$$L = \lambda / (\beta \cos\theta), \quad (2)$$

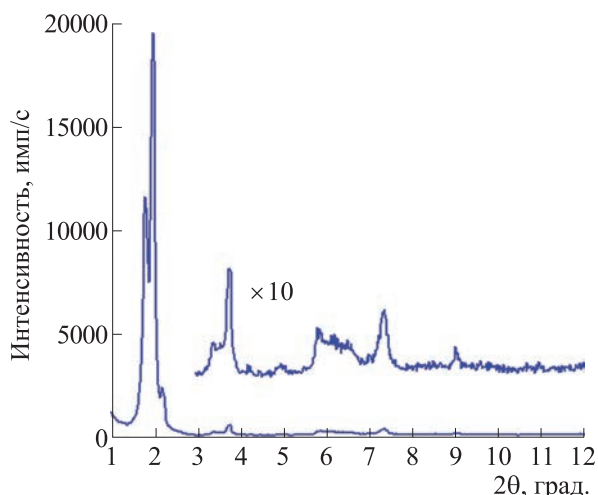
где  $L$  — средний размер областей когерентного рассеяния в направлении, перпендикулярном плоскостям отражения, дающим анализируемый дифракционный пик,  $\lambda$  — длина волны рентгеновского излучения,  $\beta$  — исправленная на инструментальное уширение интегральная ширина анализируемого дифракционного пика (отношение площади под пиком к его высоте), выраженная в шкале  $2\theta$  в радианах,  $\theta$  — половина дифракционного угла, соответствующего максимуму этого пика. Для поправки на инструментальное уширение дифракционных пиков использовали формулу [14]:

$$\beta = f(b^2 - m^2)^{0.5} + (1 - f)(b - m),$$

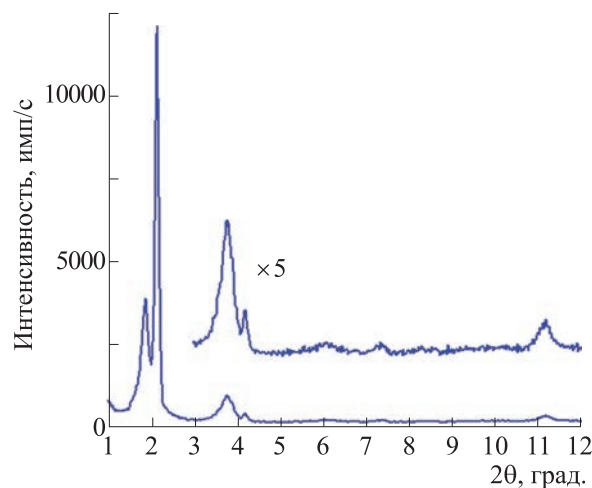
где  $b$  — экспериментальное значение интегральной ширины дифракционного пика,  $m$  — инструментальное уширение,  $f$  — параметр профиля дифракционного пика, равный доле функции Гаусса в профиле этого пика, аппроксимированного суммой функций Гаусса и Коши (Лоренца).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того, чтобы понять, какую структуру может иметь ИХФАНа в пленках, состоящих из липидов и ИХФАНа, была исследована пленка, сформированная из одного ИХФАНа. Дифрактограмма воздушно-сухой пленки из ИХФАНа, полученная через трое суток после нанесения пленки на подложку, показывает, что такая пленка имеет кристаллическую структуру (рис. 1). Совершенно идентичная дифрактограмма была получена для этой пленки и после ее продолжительной (8 суток) выдержки в парах воды. Следовательно, даже максимальное увеличение относительной влажности воздушной среды, в которой находится пленка из ИХФАНа, никак не влияет на ее кристаллическую структуру. Дифракционные пики при  $2\theta \approx 3.78^\circ$ ,  $2\theta \approx 7.48^\circ$  и  $2\theta \approx 11.19^\circ$  на дифрактограмме пленки из ИХФАНа (рис. 1) являются тремя первыми порядками отражений для межплоскостных расстоя-



**Рис. 2.** Дифрактограмма воздушно-сухой пленки, полученной из фосфатидилхолина.



**Рис. 3.** Дифрактограмма воздушно-сухой пленки, полученной из фосфатидилхолина с 12.5% ИХФАНа.

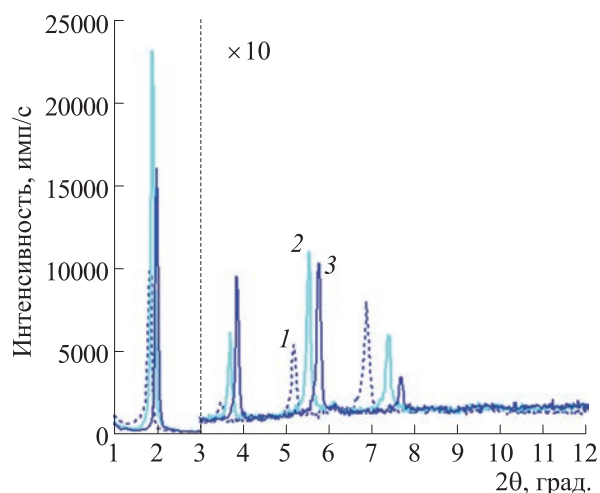
ний  $\sim 2.36$  нм. Эти дифракционные пики были использованы как реперы наличия кристаллической фазы ИХФАНа в пленках, сформированных из липидов и ИХФАНа. Интегральная ширина данных пиков на дифрактограмме (рис. 1) составляет  $\sim 0.14^\circ$ . Используя это значение без поправки на инструментальное уширение, получаем по формуле (2) нижнюю оценку среднего размера кристаллитов в исследованной пленке ИХФАНа, составляющую  $\sim 60$  нм.

Воздушно-сухие пленки, сформированные из ФХ, содержали неламеллярную липидную фазу (возможно более одной такой фазы). Одна из дифрактограмм таких пленок, полученная через двое суток после нанесения пленки на подложку, приведена на рис. 2. Образование неламеллярных структур липидами при пониженной гидратации хорошо известно [15]. Анализ этих структур в исследованных пленках не входит в цели данной работы.

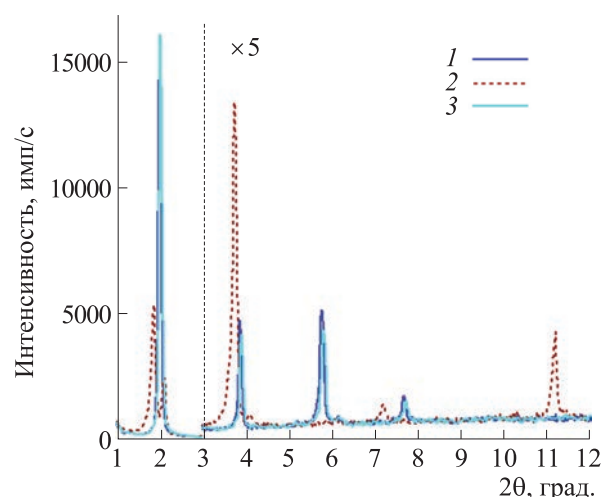
В воздушно-сухих пленках, сформированных из ФХ и ИХФАНа, присутствовали не только неламеллярные липидные фазы, но и кристаллическая фаза ИХФАНа. В качестве примера на рис. 3 приведена дифрактограмма воздушно-сухой пленки, содержащей 12.5% ИХФАНа, которая была получена через трое суток после нанесения пленки на подложку. Дифракционные пики на этой дифрактограмме при  $2\theta \approx 3.78^\circ$ ,  $2\theta \approx 7.48^\circ$  и  $2\theta \approx 11.19^\circ$  характерны для кристаллической фазы ИХФАНа. Эти пики имеют интегральную ширину  $\sim 0.3^\circ$ , которая значительно больше ширины соответствующих пиков на дифрактограмме пленки из ИХФАНа ( $\sim 0.14^\circ$ ). Оценка по формуле (2) среднего размера  $L$  кристаллитов ИХФАНа в пленке, содержащей 12.5% ИХФАНа, дает без поправки на инструментальное уширение дифрак-

ционных пиков  $L \approx 30$  нм, а с максимально возможной такой поправкой  $L \approx 50$  нм (поправка введена для лорентцевой формы дифракционных пиков, в качестве инструментального уширения взята полученная для пленки ИХФАНа интегральная ширина пика  $0.14^\circ$ ). Следует отметить, что неламеллярные липидные структуры и отдельные кристаллические фазы ИХФАНа наблюдались не только в воздушно-сухих пленках, но и в пленках, находившихся над насыщенными растворами NaCl и KBr.

При достаточно высокой влажности среды (выдерживание пленок над водой или раствором  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) пленки, сформированные из ФХ и из смеси ФХ с ИХФАНОм, становились однофазными. Дифрактограммы гидратированных в парах воды пленок из ФХ без ИХФАНа и из ФХ с 12.5% и 32% ИХФАНа представлены на рис. 4 (кривые 1, 2 и 3 соответственно). На этих дифрактограммах присутствуют по четыре дифракционных пика, которые являются четвертьными порядками отражений для структур с периодами  $D$ , равными  $\sim 5.08$  нм (без ИХФАНа),  $\sim 4.77$  нм (12.5% ИХФАНа) и  $\sim 4.58$  нм (32% ИХФАНа). На основании этого можно сделать вывод, что исследованные гидратированные пленки, сформированные из ФХ и ИХФАНа, являются однофазными и содержат одну ламеллярную фазу, образованную липидами и ИХФАНОм. Судя по полученным результатам, в этих пленках произошло встраивание ИХФАНа из его кристаллической фазы в липидные мембраны. Интегральная ширина дифракционных пиков на дифрактограммах пленок с ИХФАНОм (рис. 4, кривые 2 и 3) составляет  $\sim 0.12$ – $0.14^\circ$ , что не превосходит ширину дифракционных пиков на дифрактограмме пленки из ФХ (рис. 4, кривая 1). Это показывает, что встраи-



**Рис. 4.** Дифрактограммы гидратированных в парах воды пленок, полученных из фосфатидилхолина (дифрактограмма 1) и из фосфатидилхолина с 12.5% (дифрактограмма 2) и 32% (дифрактограмма 3) ИХФАНа. Величина интенсивности для углов  $2\theta > 3^\circ$  увеличена в 10 раз.



**Рис. 5.** Дифрактограммы пленки, полученной из фосфатидилхолина с 32% ИХФАНа, которая была гидратирована в парах воды (дифрактограмма 1), затем высушена при комнатной влажности (дифрактограмма 2) и повторно гидратирована в парах воды (дифрактограмма 3). Величина интенсивности для углов  $2\theta > 3^\circ$  увеличена в 5 раз.

вание ИХФАНа в липидные мембраны не приводит к ухудшению их упорядоченности в пленках.

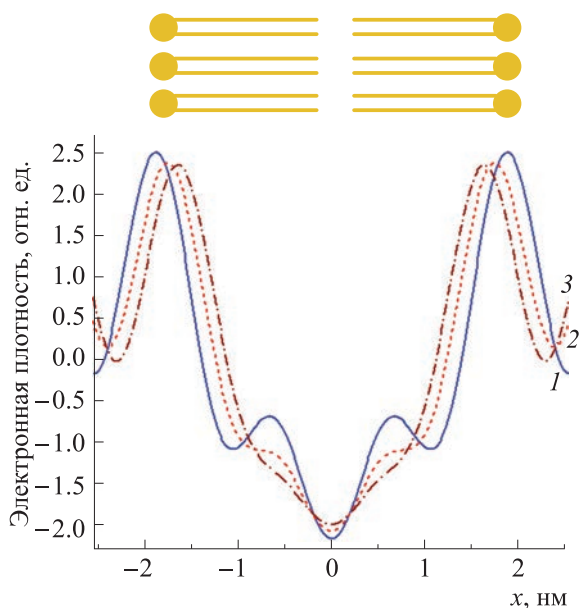
При дегидратации однофазных пленок, сформированных из ФХ и ИХФАНа, происходит их фазовое разделение с образованием неламеллярных липидных фаз и кристаллической фазы ИХФАНа, а при повторной гидратации пленки становятся опять однофазными (содержат общую ламеллярную фазу липидов и ИХФАНа), то есть этот процесс является обратимым. Для иллюстрации на рис. 5 приведены дифрактограммы пленки, содержащей 32% ИХФАНа, гидратированной в парах воды (кривая 1), затем высушенной при комнатной влажности (кривая 2) и снова гидратированной в парах воды (кривая 3).

На дифрактограмме воздушно-сухой пленки (рис. 5, кривая 2), полученной из гидратированной пленки, присутствуют дифракционные пики при  $2\theta \approx 3.8^\circ$ ,  $2\theta \approx 7.2^\circ$  и  $2\theta \approx 11.2^\circ$ , характерные для кристаллической фазы ИХФАНа. Следовательно, при дегидратации этой пленки произошло фазовое разделение ламеллярной фазы, образованной липидами и ИХФАНа, в результате чего образовалась кристаллическая фаза ИХФАНа и неламеллярная липидная фаза. При регидратации этой воздушно-сухой пленки в ней снова образовалась единая ламеллярная фаза, содержащая липиды и ИХФАН. Дифрактограмма такой регидратированной пленки (рис. 5, кривая 3) практически полностью совпадает с ее дифрактограммой, полученной до высушивания (рис. 5, кривая 1). Следовательно, при регидратации воздушно-сухой пленки кристаллические сегрегации ИХФАНа, образовавшиеся в ней при ее дегидратации, снова «растворились» в липидном бислое и произошло восстановление той структуры пленки, которую она имела до высушивания. Таким образом, ИХФАН способен встраиваться в липидный бислой из его кристаллических включений. Аналогичные обратимые изменения структуры липидной пленки с выделением отдельной фазы ИХФАНа наблюдались и при гидратации-дегидратации пленки, содержащей 12.5% ИХФАНа, но размеры кристаллических сегрегаций ИХФАНа, судя по большей ширине дифракционных пиков ИХФАНа, были в этом случае меньше (возможно, также была хуже упорядоченность кристаллической структуры ИХФАНа).

Надо отметить, что ширина дифракционных пиков кристаллической фазы ИХФАНа, образующейся при дегидратации однофазных гидратированных пленок, становилась меньше, чем на дифрактограммах воздушно-сухих пленок, изначально сформированных из совместных растворов липидов и ИХФАНа. Это показывает, что размер образующихся при этом кристаллических выделений ИХФАНа был больше, чем до гидратации пленок. По-видимому, условия для кристаллизации ИХФАНа при его выделении из ламеллярной липидной фазы при дегидратации пленок являются более благоприятными, чем при формировании воздушно-сухих пленок из совместных растворов липидов и ИХФАНа в хлороформе.

Профили электронной плотности липидных мембран, рассчитанные по четырем порядкам от-





**Рис. 6.** Профили электронной плотности липидной мембраны без ИХФАНа (кривая 1) и при содержании ИХФАНа 12.5% (кривая 2) и 32% (кривая 3). Сверху схематично показано поперечное сечение липидной мембраны.

ражений (разрешение  $\sim 1.2$  нм) для гидратированных однофазных пленок, сформированных из одного ФХ и из ФХ с добавками 12.5 и 32% ИХФАНа, приведены на рис. 6. Как видно из рис. 6, в присутствии ИХФАНа толщина липидной мембраны уменьшается. Если в качестве толщины мембраны  $t$  взять расстояние между пиками электронной плотности, соответствующими положению полярных групп липидов, то получаем для мембраны без ИХФАНа  $t = 3.75$  нм, для мембраны, содержащей 12.5% ИХФАНа,  $t = 3.46$  нм и для мембраны, содержащей 32% ИХФАНа,  $t = 3.26$  нм. Учитывая, что для этих мембран периоды  $D$  равны 5.08 нм (без ИХФАНа), 4.77 нм (12.5% ИХФАНа) и 4.58 нм (32% ИХФАНа), получаем одинаковую толщину водных прослоек между мембранами в рассматриваемых пленках:  $w = D - t = 1.32 \pm 0.01$  нм.

В присутствии ИХФАНа не только уменьшается толщина мембраны, но и происходят значительные изменения формы профиля ее электронной плотности в области углеводородных цепей липидов, которые прогрессируют с увеличением содержания ИХФАНа в пленке (рис. 6). Эти изменения формы профиля электронной плотности и уменьшение толщины мембраны в присутствии ИХФАНа, по-видимому, объясняются уменьшением упорядоченности липидов в мембране при встраивании в мембрану ИХФАНа подобно тому, как это происходит при переходе липидного бислоя из низкотемпературной жид-

кокристаллической мезофазы в высокотемпературную гелевую мезофазу [15].

## ВЫВОДЫ

Результаты проведенного рентгенодифракционного исследования показали, что воздушно-сухие пленки, состоящие из фосфатидилхолина и ИХФАНа-10-С-10, являются многофазными и, помимо неламеллярных липидных фаз, содержат кристаллическую фазу ИХФАНа. При увеличении степени гидратации таких пленок они становятся однофазными и состоят из ламеллярной фазы, образованной липидами и ИХФАНОм. Период повторяемости мембран и их толщина в таких однофазных пленках, содержащих ИХФАНа, меньше, чем в пленках без ИХФАНа, а упорядоченность углеводородных цепей липидов ниже. Выделение и исчезновение кристаллической фазы ИХФАНа при изменении степени гидратации пленок является обратимым. Полученные результаты показывают, что ИХФАНа способен в высоких концентрациях (по крайней мере, до  $\sim 50\%$  от массы липидов) встраиваться в кристаллическую фазу в липидные мембраны.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ИБХФ РАН (тема № 01201253310).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burlakova E. B., Molochkina E. M., and Nikiforov G. A., Hybrid Antioxidants. In *Chemical and biochemical physics, kinetics, and thermodynamics: new perspectives*, Ed. by P. E. Stott, G. E. Zaikov and V. F. Kablov (Nova Science Publishers, Inc., N. Y., 2007), pp. 1–18.
2. Никифоров Г. А., Брагинская Ф. И., Ершов В. В. и Бурлакова Е. Б. Соли *N,N*-диметиламиноэтил- $\beta$ -(4-гидрокси-3,5-ди-*т*-третбутилфенил)пропионата в качестве ингибитора холинэстеразы. Патент РФ 2029760, Б.И., № 6 (1995).
3. Брагинская Ф. И., Зорина О. М., Молочкина Е. М. и Бурлакова Е. Б. Синтетические биооксиданты

- ингибиторы ацетилхолинэстеразной активности. *Изв. АН СССР*, № 5, 690–698 (1992).
4. Озерова И. Б. *Новые антиоксиданты – экранированные фенолы как модуляторы активности ацетилхолинэстеразы in vitro и in vivo*. Дисс. ... канд. биол. наук (ИБХФ РАН, М., 2000).
  5. Сторожок Н. М., Перевозкина М. Г. и Никифоров Г. А. Взаимосвязь химической структуры и ингибирующего действия стерически затрудненных фенолов при окислении метилолеата в гомогенной и микрогетерогенной системах. *Изв. АН. Сер. хим.*, № 2, 323–328 (2005).
  6. Паршина Е. Ю., Гендель Л. Я. и Рубин А. Б. Влияние новых гибридных антиоксидантов – ихфанов – на кинетику аскорбат-индуцированного восстановления радикальных центров спиновых зондов в липосомах. *Биофизика*, **50** (4), 676–679 (2005).
  7. Паршина Е. Ю., Гендель Л. Я. и Рубин А. Б. Влияние новых гибридных антиоксидантов – ихфанов – на морфологию эритроцитов. *Биофизика*, **49**, № 6, 1094–1098 (2004).
  8. Паршина Е. Ю., Гендель Л. Я. и Рубин А. Б. Влияние ихфанов на структурные особенности мембраны эритроцитов. *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 6, 645–649 (2007).
  9. Кривандин А. В., Фаткуллина Л. Д., Шаталова О. В., Голощاپов А. Н. и Бурлакова Е. Б. Исследование встраивания антиоксиданта ихфана в липосомы методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *Хим. физика*, **32** (5), 91–96 (2013), DOI: 10.7868/S0207401X13050075
  10. Winston P. W. and Bates D. H. Saturated Solutions for the Control of Humidity in Biological Research. *Ecology*, **41**, 232–237 (1960), DOI: 10.2307/1931961
  11. Кривандин А. В., Протасова Т. Б., Федорович И. Б. и Фейгин Л. А. Рентгеноструктурное исследование фоторецепторных мембран в состоянии фазового разделения. *Биол. мембраны*, **9** (1), 40–51 (1992).
  12. Кривандин А. В., Федорович И. Б., Островский М. А. и Фейгин Л. А. Анализ структурных превращений липидного бислоя фоторецепторной мембраны при фазовом разделение. *Биофизика*, **41** (5), 1068–1074 (1996).
  13. Stamatoff J. B. and Krimm S. Phase determination of X-ray reflections for membrane-type systems with constant fluid density. *Biophys. J.*, **16**, 503–516 (1976), DOI: 10.1016/S0006-3495(76)85705-0
  14. Hosemann R. and Hindeleh A. M. Structure of crystalline and paracrystalline condensed matter. *J. Macromol. Sci. Part B*, **34** (4), 327–356 (1995). DOI: 10.1080/00222349508219497
  15. Ивков В. Г. и Берестовский Г. Н., *Динамическая структура липидного бислоя* (Наука, М., 1981).

## X-Ray Diffraction Study of Lipid Films with ICHPHAN

A.V. Krivandin\* and A.N. Goloschapov\*

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

The X-ray diffraction technique was used to study oriented films prepared from chloroform solutions of egg phosphatidylcholine, synthetic hybrid antioxidant ICHPHAN-10-C-10 and their mixtures containing 12.5 wt % and 32 wt % ICHPHAN. The air-dry films prepared from phosphatidylcholine and ICHPHAN were multiphase and in addition to non-bilayer lipid phases, they contained a crystalline phase of ICHPHAN. Increasing a degree of hydration of such films contributed to the formation of one lamellar phase containing lipids and ICHPHAN. The formation and disappearance of ICHPHAN crystalline phase in the films upon alteration of their degree of hydration was reversible. Electron density profiles of lipid membranes calculated at ~1.2 nm resolution showed that membrane thickness and lipid hydrocarbon chain ordering decrease in presence of ICHPHAN. The results obtained demonstrate that ICHPHAN can incorporate from crystalline phase into lipid membranes at high concentration.

*Keywords:* lipid membranes, phosphatidylcholine, antioxidant, ichphan, structure, X-ray diffraction



## АМБИОЛ МОДУЛИРУЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2024 г. И.В. Жигачева<sup>\*,#</sup>, Н.И. Крикунова<sup>\*</sup>, Ю.В. Кузнецов<sup>\*</sup>, А.Н. Голощанов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

<sup>#</sup>E-mail: zhigacheva@mail.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Исследовано влияние регулятора роста растений амбиола на функциональное состояние митохондрий этиолированных проростков гороха. Препарат предотвращал активацию перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий в концентрационном интервале  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  и  $10^{-9}$  М. Введение амбиола в среду инкубации этих органелл приводило к увеличению скоростей окисления НАД-зависимых субстратов. При этом наиболее эффективными концентрациями являлись  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  М. Изменения в биоэнергетических характеристиках митохондрий сопровождались изменением жирнокислотного состава мембран митохондрий. Наиболее значительные изменения происходили в содержании 18:2 ω6 и 18:3 ω3 жирных кислот. Предполагается, что увеличение содержания этих жирных кислот в мембранах митохондрий свидетельствует об увеличении содержания кардиолипина, обеспечивающего эффективное функционирование дыхательной цепи митохондрий и, следовательно, обеспечивающего поддержание энергетического метаболизма на высоком уровне. Обработка семян гороха амбиолом не только предотвращала снижение темпов роста проростков гороха в условиях дефицита воды, но и стимулировала их рост.

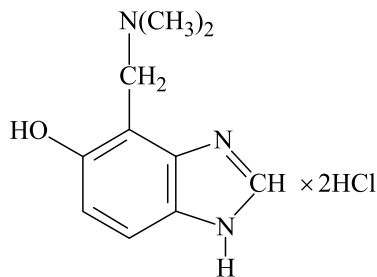
*Ключевые слова:* митохондрии, регуляторы роста растений, перекисное окисление липидов, жирные кислоты, дефицит воды.

DOI: 10.31857/S0006302924020073, EDN: OUZHUV

В результате неполного восстановления кислорода в электрон-транспортных цепях митохондрий и хлоропластов образуются активные формы кислорода (АФК), участвующие в клеточной сигнализации. Стационарный уровень АФК в органах и тканях весьма низок за счет наличия ферментативных и неферментативных систем регуляции образования и утилизации этих интермедиатов (антиоксидантной системы). Изменения в окружающей среде могут вызвать смещение антиоксидантно/прооксидантного равновесия в сторону избыточной продукции АФК, которые могут выступать в качестве клеточных сигналов, приводящих к адаптации организма к изменяющимся условиям [1]. Однако при длительном действии стрессового фактора избыточная продукция АФК может вызывать нарушение метаболизма клетки [2]. Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими

в состав липидов биологических мембран, и прежде всего мембран митохондрий, приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3]. В результате процесса ПОЛ образуются токсические для клеток растений продукты – альдегиды и 4-гидрокси-2,3-ноненали, ингибирующие ферменты, вовлеченные в фотодыхание и в цикл трикарбоновых кислот. Это оказывает влияние на транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий за счет истощения пула НАДН в матриксе митохондрий. Более того, окисление активными формами кислорода SH-группы Cys-56 в АТФ/АДФ-антипортере может привести к открытию неспецифической поры (permeability transition pore) [4], что может вызвать нарушение осмотического баланса между матриксом и межмембранным пространством митохондрий. В результате этого возможно набухание митохондрий, выход цитохрома С и индукция апоптоза [5]. Мы предположили, что антиоксиданты, уменьшая генерацию АФК митохондриями и таким образом снижая интенсивность ПОЛ, могут повышать устойчивость растений к действию стрессовых факторов. В качестве объекта исследу-

*Сокращения:* АФК – активные формы кислорода, ПОЛ – перекисное окисление липидов, БСА – бычий сывороточный альбумин, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот.



**Рис. 1.** Структурная формула амбиола (2-метил-4-диметиламинометилбензимидазол-5-ол-дигидрохлорида).

дования было выбрано производное 5-бензимидазола – амбиол (2-метил-4-диметиламинометилбензимидазол-5-ол-дигидрохлорид) (рис. 1).

Известно, что амбиол повышает устойчивость растений к абиотическим стрессорам. Он способствует выработке неспецифического иммунитета к грибным и бактериальным заболеваниям сельскохозяйственных культур и снижает содержание радионуклидов в продуктах растениеводства [6]. Повышая устойчивость растений к стрессовым факторам, амбиол, вероятно, влияет на функциональные характеристики митохондрий, поскольку эти органеллы играют одну из ведущих ролей в адаптации организма к изменяющимся условиям внешней среды [7]. В связи с этим исследовали влияние амбиола на биоэнергетические характеристики митохондрий растений, в частности митохондрий проростков гороха.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях пятисуточных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.), сорт Флора 2. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01%-ным раствором  $KMnO_4$ . Контрольную группу семян в течение часа замачивали в воде, а опытную группу – в  $10^{-6}$  М растворе амбиола. Спустя час семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение суток в темноте при температуре  $24^\circ C$ . Затем половину проростков контрольной группы (при дефиците воды) и проростки, обработанные амбиолом, на двое суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Через двое суток проростки обеих групп переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение последующих двух суток. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение пяти суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Амбиол был синтезирован в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, схема

синтеза представлена на рис. 2. Номер регистрации (свидетельства) торговой марки «Амбиола»: 258534.

**Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков гороха** проводили методом дифференциального центрифугирования [8]. Эпикотили гороха гомогенизировали в среде, содержащей: 0.4 М сахарозы, 5 мМ ЭДТА, 20 мМ  $KH_2PO_4$  (pH 8.0), 10 мМ KCl, 2 мМ дитиотреитола и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), свободного от жирных кислот. Гомогенат центрифугировали при 25000 g в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 8 мл среды и центрифугировали при 3000 g в течение 3 мин. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2–3 мл среды, содержащей 0.4 М сахарозы, 20 мМ  $KH_2PO_4$  (pH 7.4), 0.1% БСА и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

**Регистрацию потребления кислорода митохондриями** проводили полярографическим методом, используя полярограф LP-7 и кислородный электрод типа Кларка. Стандартная среда инкубации митохондрий проростков гороха содержала 0.4 М сахарозы, 20 мМ HEPES-Tris-буфера (pH 7.2), 5 мМ  $KH_2PO_4$ , 4 мМ  $MgCl_2$  и 0.1% БСА. В качестве субстратов окисления использовали малат (10 мМ) + глутамат (10 мМ).

**Уровень перекисного окисления липидов** оценивали флуоресцентным методом [9]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ : метанол = 2 : 1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3–5 мг белка. Соотношение митохондрии : смесь хлороформ-метанол = 1 : 10. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax (Horiba Yvon GmbH, Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0.3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции составляла 360 нм, испускания – 420–470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

**Исследование жирнокислотного состава мембран митохондрий проростков гороха** проводили методом газо-жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

**Метилвые эфиры жирных кислот** получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [10,11]. Метилвые эфиры жирных кислот (МЭЖК) экстрагировали гексаном и полученные растворы анализировали.

**Определение количественного состава метилвых эфиров жирных кислот** проводили на хроматографе марки «Кристалл 2000М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0.32 мм, слой 0.25 мкм; J&W Scientific, США). Анализ

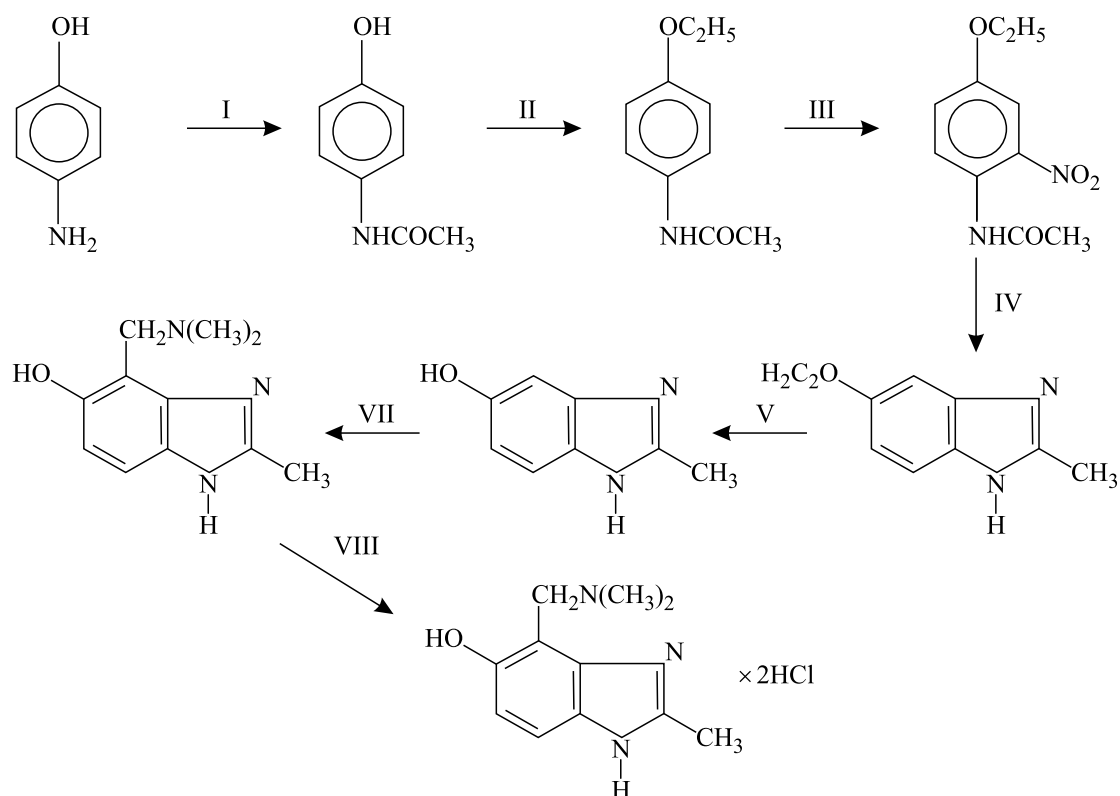


Рис. 2. Схема синтеза амбиола.

МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120°C до 270°C со скоростью 4°C/мин. Температура инжектора и детектора – 270°C; скорость газа-носителя гелия составляла 2.0 мл/мин, деление потока на входе в колонку – 1:40. Идентификацию МЭЖК осуществляли по величинам индексов удерживания [12]. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали по соотношению площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение).

**Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот** в образцах осуществляли также на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных хроматографическому анализу, на приборе Hewlett Packard-6890 (США). Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ и скорости сканирования 1 с на декаду масс в области 40–400 дальтон.

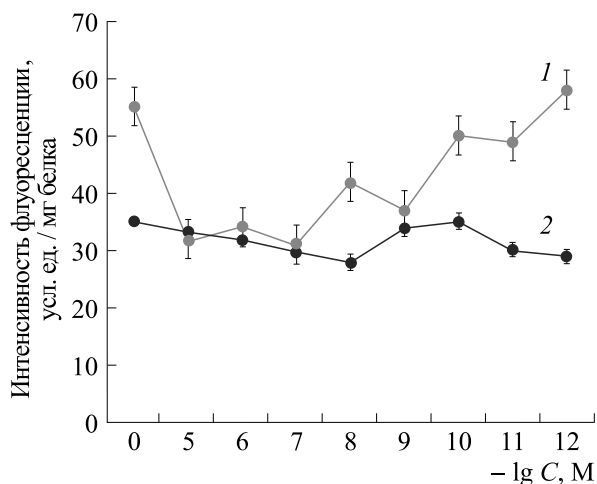
**Модель «старения» митохондрий.** Выделенные митохондрии (2–3 мг белка) помещали в 0.5 мл среды, содержащей 0.1 М КСl, 10 мМ НЕРЕС, 1 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 7.4. Митохондрии инкубировали 20–25 мин при комнатной температуре.

**Статистическую обработку экспериментальных данных** проводили определением средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами со значимостью  $P \leq 0.05$ . Обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

**Реактивы.** В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: метанол и хлороформ – Merck, Германия; сахароза, трис и КСl – Sigma, США; БСА (свободный от жирных кислот), FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразон), малат, глутамат и НЕРЕС – MP Biomedicals, Германия; дитиотреитол – Appli-Chem, США.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск концентраций амбиола, эффективно снижающих интенсивность ПОЛ, проводили, используя модель «старения» митохондрий проростков гороха. «Старение» приводило к активации ПОЛ в мембранах митохондрий, которое регистрировали по флуоресценции конечных продуктов перекисного окисления липидов (оснований Шиффа). При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в мембранах митохондрий возрастала в 1.7 раза (рис. 3). Введение в среду инкубации ми-



**Рис. 3.** Влияние «старения» и амбиола на интенсивность флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий проростков гороха: кривая 1 — «старение» + амбиол, кривая 2 — контроль + амбиол. По оси ординат — интенсивность флуоресценции (усл. ед./мг белка), по оси абсцисс — концентрация амбиола.

тохондрий амбиола вызывало снижение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольных значений. Этот эффект имел дозозависимую зависимость. Наиболее эффективными концентрациями являлись  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  М и  $10^{-9}$  М. Можно предположить, что именно в этих концентрациях препарат будет проявлять антистрессовые свойства.

Поскольку процессы адаптации требуют значительных энергетических затрат [13], митохондрии играют одну из основных ролей в устойчивости организма к действию стрессовых факторов. В связи с этим исследовали влияние амбиола

на биоэнергетические характеристики митохондрий. Введение препарата в среду инкубации приводило к изменению энергетики митохондрий. При этом наиболее значительные изменения наблюдались в максимальных скоростях окисления НАД-зависимых субстратов: препарат в концентрации  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  М и  $10^{-9}$  М в 1.4–1.5 раза повышал скорости окисления малата и глутамата в присутствии АДФ, а в присутствии FCCP — в 1.6–1.7 раза. Повышалась и эффективность окислительного фосфорилирования: величина дыхательного контроля по Чансу возрастала с  $2.09 \pm 0.06$  до  $2.83 \pm 0.07$  ( $10^{-6}$  М) и до  $3.00 \pm 0.10$  ( $10^{-5}$  М) (табл. 1).

Именно в этих концентрациях препарат снижал до контрольных величин активированное «старением» перекисное окисление липидов в мембранах митохондрий. Возможно, что регуляция метаболических процессов в растительной клетке амбиолом обусловлена изменением физико-химических свойств биологических мембран, а, следовательно, и активности связанных с ними ферментов.

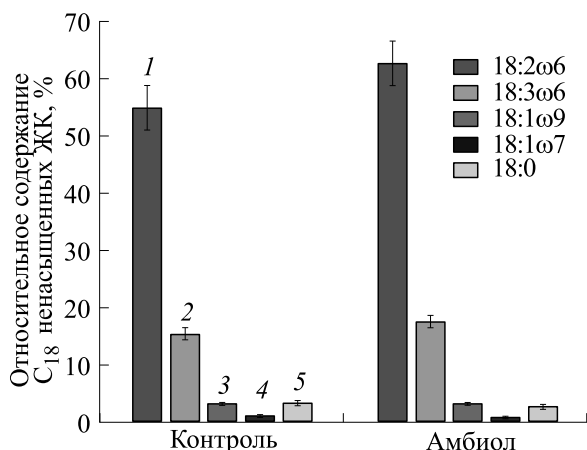
Отметим, что часовая инкубация митохондрий с  $10^{-6}$  М амбиола приводила к изменению жирнокислотного состава мембран митохондрий. При этом наиболее сильные изменения происходили в содержании  $C_{18}$  жирных кислот. Так, содержание основных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина (18:2  $\omega 6$  и 18:3  $\omega 3$ ), увеличилось на 14% и на 13% соответственно, а содержание 18:0 снизилось на 13.5% (рис. 4).

Отметим, что обработка проростков гороха  $10^{-6}$  М амбиола стимулировало рост побегов гороха (рис. 5). При этом данный эффект оказался

**Таблица 1.** Влияние амбиола на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями проростков гороха (нг атом  $O_2$ /мг белка·мин)

$V_0$	Амбиол, М	$V_2$	$V_3$	$V_4$	FCCP	$V_3/V_4$
$15.0 \pm 3.9$ (10)	—	—	$61.1 \pm 7.6$ (10)	$30.4 \pm 6.9$ (10)	$57.1 \pm 5.5$ (10)	$2.09 \pm 0.06$ (10)
$13.7 \pm 2.3$ (6)	$10^{-5}$	$22.6 \pm 2.5$ (6)	$90.0 \pm 14.5$ (6)	$30.0 \pm 8.2$ (6)	$95.5 \pm 2.0$ (6)	$3.00 \pm 0.10$ (6)
$19.8 \pm 0.8$ (7)	$10^{-6}$	$27.9 \pm 0.9$ (7)	$82.7 \pm 10.4$ (7)	$29.3 \pm 2.2$ (7)	$91.0 \pm 3.5$ (7)	$2.83 \pm 0.07$ (7)
$16.0 \pm 0.9$ (6)	$10^{-7}$	$18.5 \pm 0.4$ (6)	$58.1 \pm 4.1$ (6)	$24.9 \pm 1.0$ (6)	$60.8 \pm 4.8$ (6)	$2.14 \pm 0.02$ (6)

Примечание. Среда инкубации: 0.4 М сахарозы, 20 мМ HEPES-Tris-буфер (pH 7.2), 5 мМ  $KH_2PO_4$ , 4 мМ  $MgCl_2$ , 0.1% БСА. Дополнительные добавки: 5 мМ малата, 10 мМ глутамата или 5 мМ сукцината, 125 мкМ АДФ, 0.5 мкМ FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразона).

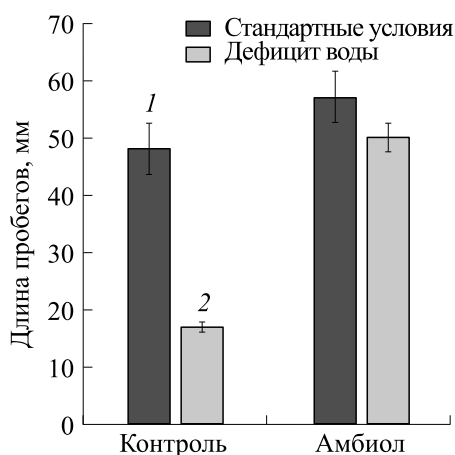


**Рис. 4.** Влияние амбиола на относительное содержание C<sub>18</sub> жирных кислот (в %) в мембранах митохондрий проростков гороха: 1 – 18:2ω6, 2 – 18:3ω6, 3 – 18:1ω9, 4 – 18:1ω7, 5 – 18:0.

наиболее выраженным в условиях дефицита воды.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании полученных данных можно прийти к заключению, что амбиол в качестве регулятора роста растений проявляет протекторные свойства благодаря влиянию на функциональное состояние митохондрий. Он получил широкое применение в сельскохозяйственной практике. Препарат малотоксичен, не обладает мутагенными и канцерогенными свойствами [14]. Амбиол ускоряет прорастание и увеличивает всхожесть семян различных сельскохозяйственных культур. По мнению ряда авторов, ростостимулирующее влияние амбиола, вероятно, обусловлено тем, что



**Рис. 5.** Длина побегов пятидневных проростков гороха в условиях дефицита воды и обработки семян гороха амбиолом: 1 – стандартные условия; 2 – дефицит воды.

он активирует процесс набухания, предшествующий началу роста осевых органов семян, в частности семян кормовых бобов *Vicia faba minor*. Авторы предполагают, что этот эффект препарата связан с особенностями его действия на липидный метаболизм, а именно на липидные компоненты мембран, и с ускоренным по сравнению с контролем проникновением воды через семенные покровы, что приводит к более быстрому достижению критических уровней оводненности, запускающих процессы подготовки клеток к началу растяжения [15]. Под влиянием амбиола ускоряются темпы роста и повышается продуктивность растений, что может быть следствием увеличения количества цитокининов и ауксинов, а также усиления процесса фотофосфорилирования и интенсивности фотосинтеза [16]. И, наконец, на тканях картофеля показано, что препарат индуцировал дифференцировку пластид в сторону усложнения их внутренней мембранной структуры, что придавало пластидам способность к синтезу изопrenoидных и фенольных соединений, выполняющих важную роль в реакциях устойчивости к действию стрессовых факторов.

Полученные данные свидетельствуют, что антистрессовые и ростостимулирующие свойства препарата, возможно, определяются его влиянием на функциональное состояние митохондрий, играющих одну из важнейших ролей в устойчивости организма к изменяющимся условиям внешней среды.

#### ВЫВОДЫ

Мы предполагаем, что защитный эффект препарата, возможно, связан с влиянием амбиола на содержание линолевой и линоленовой кислот в мембранах митохондрий. Рост их содержания в мембранах этих органелл, по-видимому, свидетельствует об увеличении содержания кардиолипина в мембранах митохондрий [17], что влечет за собой увеличение эффективности работы дыхательной цепи и, следовательно, активации энергетического метаболизма растений.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (номер темы, государственная регистрация 44.4-1201253310).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farooq M. A., Niazi A. K., Akhtar J., Saifullah, M. Farooq, Souri Z., Karimi N., and Rengel Z. *Plant Physiol. Biochem.*, **141**, 353–369 (2019). DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.04.039
2. Шиков А. Е., Чиркова Т. В. и Емельянов В. В. Функции активных форм кислорода в растительных клетках в норме и при адаптации. *Экологическая генетика*, **19** (4), 343–363 (2021). DOI: 10.17816/ecogen75975
3. Колупаев Ю. Е. и Карпец Ю. В. Активные формы кислорода и стрессовый сигналинг у растений. *Укр. биохим. журн.*, **86** (4), 18–35 (2014).
4. Благодравов М. Л., Азова М. М. и Фролов В. А. *Программированная клеточная гибель в патологии сердца* («Литтерра», М., 2013).
5. Новодержкина Е. А., Животовский Б. Д. и Гогвадзе В. Г. Индукция неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны и ее роль в гибели клеток. *Молекуляр. биология*, **50** (1), 51–68 (2016). DOI: 10.7868/S002689841601016X
6. Кирсанова Е. В. и Кириллова И. Г. Влияние препарата амбиол на продукционный процесс гороха и картофеля. *Вестн. ОрелГАУ*, № 4 (7), 7–9 (2007).
7. Войников В. К. *Митохондрии растений при температурном стрессе* («Гео», Новосибирск, 2011).
8. Попов В. Н., Рууге Э. К. и Старков А. А. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха. *Биохимия*, **68** (7), 910–916 (2003).
9. Fletcher B. I., Dillard C. D., and Tappel A. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.*, **52** (1), 1–9 (1973). DOI: 10.1016/0003-2697(73)90327-8
10. Carreau J. P. and Dubacq J. P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatogr.*, **151** (3), 384–390 (1979) DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9
11. Wang J., Sunwoo H., Cherian G., and Sim J. S. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. *Poultry Sci.*, **79** (8), 1168–1171 (2000). DOI: 10.1093/ps/79.8.1168
12. Golovina R. V. and Kuzmenko T. E. Thermodynamic evaluation of the interaction of fatty acid methyl esters with polar and non-polar stationary phases, based on their retention indices. *Chromatographia*, **10** (9), 545–548 (1977). DOI: 10.1007/BF02262915
13. Шакирова Ф. М. *Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция* («Гилем», Уфа, 2001).
14. Пальченко А. К., Пальченко С. А. и Сторожишина К. М. Влияние стимуляторов роста на биометрические показатели сеянцев сосны обыкновенной. *Лесное хозяйство*, № 2, 297–301 (2008).
15. Дубинская Н. И. и Обручева Н. В. в сб. *Физиология семян: формирование, прорастание, прикладные аспекты*. Отв. ред. Х. Х. Каримов («Дониш», Душанбе, 1990), сс. 181–183.
16. Евсюнина А. С. *Влияние эпибрасинолида и амбиола на гормональный баланс и ультраструктуру тканей растений картофеля при регуляции ростовых процессов в онтогенезе*. Дис. ... канд. биол. наук (Институт биохимии им. А.Н. Баха, М., 2006).
17. Zhou Y., Peisker H., and Dörmann P. Molecular species composition of plant cardiolipin determined by liquid chromatography mass spectrometry. *J. Lipid Res.*, **57** (7), 1308–1321 (2016). DOI: 10.1194/jlr.D068429

## Ambiol Modulates the Functional Characteristics of Pea Seedlings Mitochondria

I.V. Zhigacheva\*, N.I. Krikunova\*, Yu.V. Kuznetsov\*, and A.N. Goloshchapov\*

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

The effect of ambiol, a plant growth regulator, on the functional state of mitochondria of etiolated pea seedlings has been studied. The drug prevented the activation of lipid peroxidation in mitochondrial membranes in the concentration range of  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  and  $10^{-9}$  M. The addition of ambiol to the incubation medium of these organelles led to an increase in the oxidation rates of NAD-dependent substrates. At the same time, the most effective concentrations were  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  M. Changes in the bioenergetic characteristics of mitochondria were accompanied by alterations in the fatty acid composition of mitochondrial membranes. The most significant changes were observed in the content of 18:2  $\omega$ 6 and 18:3  $\omega$ 3 fatty acids. It is assumed that an increase in the content of these fatty acids in the mitochondrial membranes may indicate an increase in the content of cardiolipin, which provides the effective functioning of the mitochondrial respiratory chain, and, consequently, plays an essential role in the maintenance of high-energy-level metabolism. Treatment of pea seeds with ambiol not only prevented a decrease in the growth rate of pea seedlings under water-deficit conditions, but also stimulated their growth.

*Keywords: mitochondria, plant growth regulators, lipid peroxidation, fatty acids, water deficit*

## СЕРОВОДОРОД ПРИВОДИЛ К МОДИФИКАЦИИ СТРУКТУРЫ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ЭПИКОТИЛЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА *Pisum sativum* L. В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ВОДЫ

© 2024 г. Н.Ю. Герасимов<sup>\*,#</sup>, О.В. Неврова<sup>\*</sup>, И.В. Жигачева<sup>\*</sup>,  
И.П. Генерозова<sup>\*\*</sup>, А.Н. Голощапов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

<sup>\*\*</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ул. Ботаническая, 35, Москва, 127276, Россия

<sup>#</sup>E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.

После доработки 20.12.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2024 г.

Изучено изменение структурных характеристик мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха сорта Немчиновский 100, при воздействии гидросульфида натрия в различных концентрациях. Показано, что обработка семян раствором гидросульфида натрия в дозах  $2 \cdot 10^{-4}$  М и  $5 \cdot 10^{-6}$  М приводила к сдвигу термоиндуцированных структурных переходов в мембранах митохондрий в область более низких температур и к увеличению микровязкости обеих (липидных и при белковых) областей мембран митохондрий на фоне уменьшения их кристалличности. Наличие экзогенного NaHS, также как и эндогенного сероводорода, способно увеличивать активность ферментов антиоксидантной защиты и приводить к накоплению осмолитов. В результате микровязкость липидного бислоя могла увеличиваться. Для проверки данной гипотезы было исследовано влияние антиоксиданта ресвератрола на микровязкость липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков гороха как в норме, так и при предварительной обработке семян NaHS. Также были изучены биоэнергетические характеристики митохондрий. Получены данные, подтверждающие действие сероводорода на структурные характеристики мембран митохондрий путем активации ферментов антиоксидантной защиты и накопления осмолитов.

*Ключевые слова:* структура мембран, митохондрии, микровязкость мембран, проростки гороха, дефицит воды, сероводород.

DOI: 10.31857/S0006302924020086, EDN: OUUKKR

Биотические и абиотические воздействия представляют собой важные лимитирующие факторы в росте, развитии, продуктивности растений. Стресс может вызывать накопление активных форм кислорода [1, 2], усиливать пероксидное окисление липидов мембран в листьях растений [3, 4]. В этих условиях активизируется сигнальная система растений, где сероводород играет ключевую роль. Молекула сероводорода ( $H_2S$ ) входит в состав сигнального пути и принимает участие в ответе защиты растений от различных экзогенных стресс-факторов, в том числе, засухи, термического, окислительного, солевого и осмотического стрессов [5–10]. Есть сообщения о дозозависимом участии  $H_2S$  в митохондриальном дыхательном пути, в процессах митофагии [11] как при нарушении питания, задержки роста и

развития растения, так и в повышении устойчивости к стрессам у растений [12–16]. Семена растения в период прорастания очень уязвимы к внешним воздействиям, в том числе к обезвоживанию [17, 18]. Обработка  $H_2S$  семян кукурузы [6] или арабидопсиса [19] в условиях стресса улучшала прорастание семян. В ответ на стресс сероводород активировал экспрессию генов некоторых защитных ферментов в мутантных проростках *Arabidopsis thaliana* [20], в корнях клубники [21], синтазы кукурбитацина С в листьях огурца [8], регулировал активность антиоксидантных ферментов: аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы, гваяколпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы [6, 9, 20, 22], что приводило к снижению уровня активных форм кислорода (АФК),  $H_2O_2$  и супероксид-аниона, окиси азота (II) в клетках [7, 23], продуктов окисления липидов, в том числе и малонового диальдегида [9, 20–22, 24]. В литературе имеется некое общее представление о том,

Сокращения: АФК – активные формы кислорода.

что существует связь между окислением липидов, накоплением АФК, малонового диальдегида, присутствием  $H_2S$  и целостностью мембранного матрикса [3, 10, 16, 20]. Однако механизмы взаимного влияния этих процессов и структуры мембран плохо изучены.

Одними из экзогенных источников сероводорода являются сульфид натрия ( $Na_2S$ ) и гидросульфид натрия ( $NaHS$ ). Такую добавку удобно использовать в качестве удобрения или для обработки собранной продукции. Так, обработка сульфидом натрия собранных плодов клубники, брокколи, винограда и др. [21–23, 25–28] привела к увеличению срока их хранения и сохранению твердой структуры после сбора урожая за счет поддержания низкого уровня АФК и ингибирования старения продуктов. Это также показывает положительное влияние данного вещества на растения через антиоксидантную активность сероводорода. Однако взаимодействие сероводорода с эндогенными активными формами кислорода и продуктами окисления липидов, а также с экзогенными антиоксидантными молекулами является слабо изученным.

Целью работы было изучение изменений структуры мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха в условиях дефицита воды, при предварительной обработке семян раствором гидросульфида натрия в разных концентрациях. В рамках данной работы было также интересно исследовать антиоксидантную активность  $NaHS$  и ресвератрола на структурные характеристики мембран митохондрий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях пятидневных этиолированных проростков гороха *Pisum sativum* L., сорт Немчиновский 100. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01%-ным раствором  $KMnO_4$ . После промывания семена в течение часа замачивали в воде, а затем переносили на влажную фильтровальную бумагу. Спустя 20 ч часть семян помещали на 5 ч на фильтровальную бумагу, смоченную раствором  $NaHS$  в дозах  $6 \cdot 10^{-3}$  М,  $2 \cdot 10^{-4}$  М и  $5 \cdot 10^{-6}$  М (опытная группа). Затем проростки контрольной группы (дефицит воды) и проростки, обработанные  $NaHS$ , на двое суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Через двое суток проростки обеих групп переносили на смоченную водой влажную фильтровальную бумагу, где они находились в течение последующих двух суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков гороха всех исследуемых групп методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере: первое центрифугирование – при 25000 г в течение 5 мин, второе – при 3000 г в течение

3 мин. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 г. Осадок ресуспендировали в 2–3 мл среды, содержащей 0.4 М сахарозы, 20 мМ  $KH_2PO_4$  (рН 7.4). Затем определяли содержание белка методом Лоури [29].

Ресвератрол готовили методом последовательного разведения таким образом, чтобы конечные концентрации в образцах составляли  $5 \cdot 10^{-8}$  М и  $5 \cdot 10^{-14}$  М.

Регистрацию потребления кислорода митохондриями проводили полярографическим методом, используя полярограф LP-7 и кислородный электрод типа Кларка. Стандартная среда инкубации митохондрий проростков гороха содержала 0.4 М сахарозы, 20 мМ HEPES-Tris-буфера (рН 7.2), 5 мМ  $KH_2PO_4$ , 4 мМ  $MgCl_2$  и 0.1% бычьего сывороточного альбумина.

Для определения микровязкости суспензии митохондрий разбавляли в среде выделения, содержащей 0.4 М сахарозы и 20 мМ  $KH_2PO_4$  (рН 7.4), таким образом, чтобы содержание белка в образце митохондрий составляло 2 мг белка на 1 мл суспензии. Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса спиновых зондов, таких как стабильные нитрокислые радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидрокарболин-3-оксил (зонд II), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН (рис. 1).

В работе [30] было показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое липидных компонент мембраны, а зонд II – в липидах, прилегающих к белкам, что позволяет по поведению зондов I и II в липидном бислое судить о липид-белковых взаимодействиях в мембранах. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I «липидным», а зонд II – «белковым».

Из полученных ЭПР-спектров рассчитывали время корреляции вращательной подвижности ( $t_c$ ), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле  $t_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_+ \cdot ((I_+/I_-)^{0.5} - 1)$ , приведенной в работе [31]. Регистрацию ЭПР-спектров проводили в диапазоне температур 285–305 К (10–44°C) на радиоспектрометре ER 200D-SRC фирмы Bruker (США).

Статистическую обработку данных осуществляли методами параметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft® Excel и Origin® 6.1 при статистической надежности 95%.



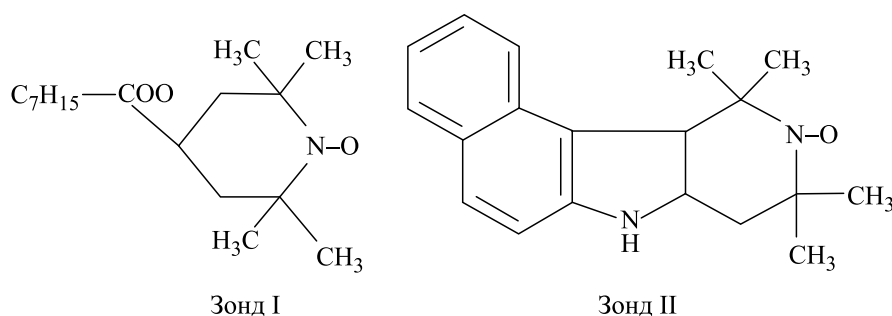


Рис. 1. Структурные формулы использованных спиновых зондов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе было изучено изменение структурных характеристик мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха сорта Немчиновский 100, при воздействии различных концентраций NaHS. Для оценки структуры мембран были получены температурные зависимости времен вращательной корреляции зондов I и II для контрольной группы и при воздействии NaHS в дозах  $6 \cdot 10^{-3}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$  и  $5 \cdot 10^{-6}$  М (рис. 2).

Для контрольной группы проростков гороха, находившихся в условиях дефицита воды, наблюдался термоиндуцированный структурный переход при температурах от 18°C до 20°C (291–293 К) в прибелковых областях (рис. 2б) и при температурах от 18°C до 24°C (291–297 К) в липидных областях мембран (рис. 2а). Данную низкотемпературную структурную перестройку связывают с переходом липидного бислоя из кристаллического в

жидкокристаллическое состояние [32, 33], т. е. при температурах выше температур переходов ( $>293$  К в прибелковых и  $>297$  К в липидных областях) мембрана находится в жидкокристаллическом состоянии. Для контрольной группы высокотемпературные структурные перестройки, которые связывают с изменениями структуры мембранных белков [33], скорее всего, находятся за пределами исследованного интервала  $>309$  К. Отметим, что такие же термоиндуцированные переходы были характерны и для растений, не подвергавшихся абиотическим стрессам [34]. При этом микровязкость обеих областей мембран митохондрий в условиях дефицита воды (контроль) оказалась ниже, чем для нативных растений (рис. 3) [34]. Увеличение текучести обеих областей мембран может быть связано с набуханием митохондрий вследствие недостаточного увлажнения [35].

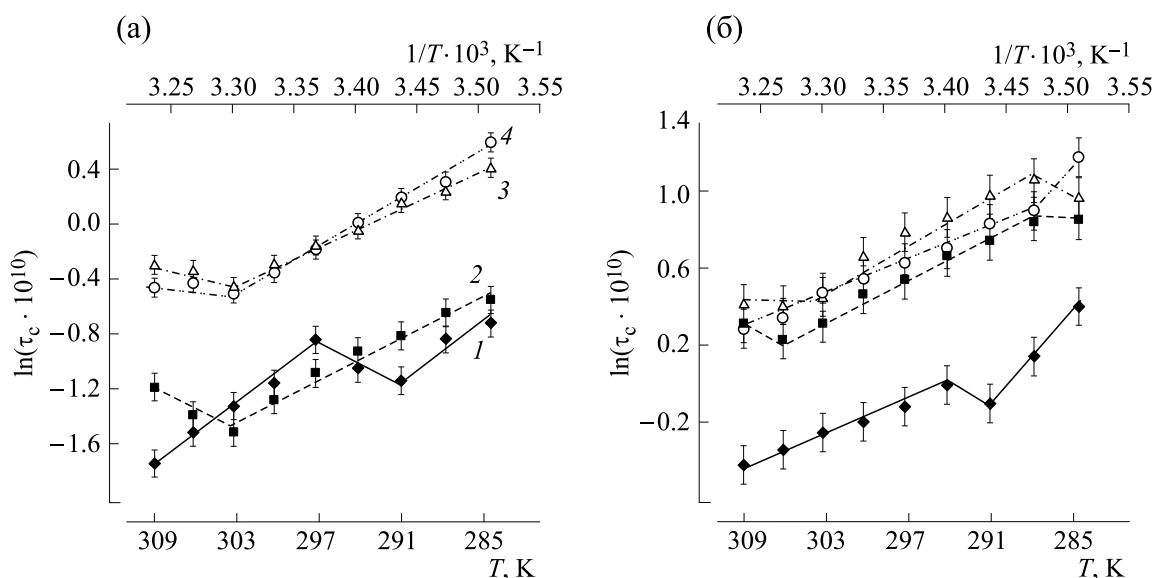
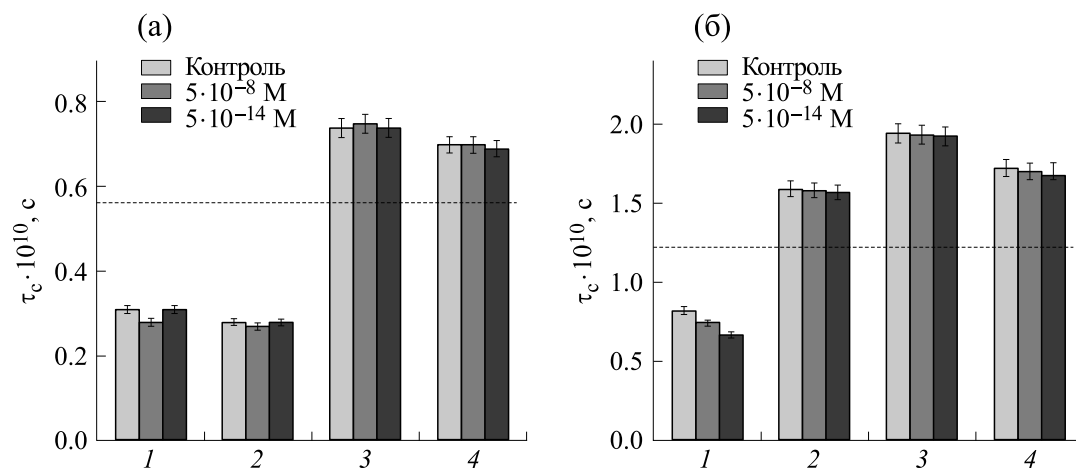


Рис. 2. Температурные зависимости времени корреляции вращательной диффузии зондов в мембране митохондрий проростков гороха, находившихся в условиях дефицита воды при воздействии сероводорода: (а) – липидный зонд, (б) – прибелковый зонд. Кривая 1 – контроль, кривая 2 –  $6 \cdot 10^{-3}$  М NaHS, кривая 3 –  $2 \cdot 10^{-4}$  М NaHS, кривая 4 –  $5 \cdot 10^{-6}$  М NaHS.



**Рис. 3.** Действие ресвератрола в концентрациях  $5 \cdot 10^{-8}$  М и  $5 \cdot 10^{-14}$  М на микровязкость мембран митохондрий при  $T = 300$  К в условиях дефицита воды; (а) – липидный зонд, (б) – приобелковый зонд. Группа 1 – контроль, группа 2 –  $6 \cdot 10^{-3}$  М NaHS, группа 3 –  $2 \cdot 10^{-4}$  М NaHS, группа 4 –  $5 \cdot 10^{-6}$  М NaHS. Горизонтальная пунктирная линия соответствует микровязкости мембран митохондрий нативных растений (без внешних воздействий).

В приобелковых областях мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха, предварительно обработанных NaHS в дозах  $6 \cdot 10^{-3}$  и  $2 \cdot 10^{-4}$  М, наблюдались по два термоиндуцированных структурных перехода при температурах от  $12^\circ\text{C}$  до  $15^\circ\text{C}$  ( $285\text{--}288$  К) и от  $30^\circ\text{C}$  до  $36^\circ\text{C}$  ( $303\text{--}309$  К) соответственно (рис. 2б). При этом в приобелковых областях липидного бислоя митохондрий при воздействии препарата в дозе  $5 \cdot 10^{-6}$  М высокотемпературный переход не наблюдался, находясь, скорее всего, за пределами исследуемого интервала температур. Для всех исследованных концентраций сероводорода (рис. 2б) низкотемпературный переход ( $285\text{--}288$  К) – из кристаллического в жидкокристаллическое состояние [32, 33] – лежал ниже, чем соответствующий переход для контроля ( $291\text{--}297$  К). Из этого следует, что обработка семян NaHS в дозах  $6 \cdot 10^{-3}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$  и  $5 \cdot 10^{-6}$  М приводила к сдвигу термоиндуцированных структурных переходов в приобелковых областях мембран митохондрий в сторону более низких температур относительно контроля. Сдвиг структурных переходов в область более низких температур указывает на уменьшение кристалличности липидного бислоя.

В липидных областях мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха (рис. 2а), предварительно обработанных NaHS в дозах  $6 \cdot 10^{-3}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$  и  $5 \cdot 10^{-6}$  М, наблюдался термоиндуцированный структурный переход при температурах от  $30^\circ\text{C}$  до  $36^\circ\text{C}$  ( $303\text{--}309$  К). Подобная перестройка наблюдалась и в приобелковых областях липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков гороха, предварительно обработанных NaHS в дозах  $6 \cdot 10^{-3}$  и  $2 \cdot 10^{-4}$  М. Поэтому наи-

более вероятно, что данный термоиндуцированный переход относится к высокотемпературной перестройке. При этом низкотемпературный структурный переход «кристалл–жидкий кристалл» липидных областей мембран опытных групп с большей вероятностью находился за пределами исследуемого интервала температур ( $<285$  К). Следовательно, обработка семян NaHS во всех трех концентрациях приводила к сдвигу обоих термоиндуцированных переходов липидных областей мембран митохондрий в область более низких температур относительно контроля.

Заметим, что все графики температурных зависимостей времен корреляции вращательной диффузии при воздействии NaHS в дозах  $5 \cdot 10^{-6}$  и  $2 \cdot 10^{-4}$  М лежат выше, чем для контрольной группы (рис. 2а,б), что указывает на увеличение микровязкости обеих областей мембран митохондрий.

Увеличение микровязкости мембран митохондрий на фоне уменьшения их кристалличности может быть объяснено одновременным накоплением осмолитов и увеличением активности антиоксидантных ферментов при воздействии экзогенного NaHS. В работе [6] было показано, что экзогенный NaHS, так же как и эндогенный сероводород, способен увеличивать активность антиоксидантных ферментов и приводить к накоплению осмолитов. По-видимому, в нашем случае обработка семян NaHS приводила к накоплению осмолитов, например, трегалозы [20], которая способна встраиваться в мембраны [36]. Эти процессы могли привести к изменению состава мембран. В результате увеличивалась микровязкость липидного бислоя (рис. 2). Кроме того, осмолиты способны влиять на вязкостные

**Таблица 1.** Влияние дефицита воды и NaHS в дозе  $5 \cdot 10^{-6}$  М на скорость окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями, выделенными из проростков гороха (в нг атом. О/(мин·мг белка)

Вариант	$V_0$	$V_3$	$V_4$	$V_3/V_4$	VFCCP
Нативные растения	$21 \pm 1$	$69 \pm 2$	$30 \pm 2$	$2,27 \pm 0,01$	$72 \pm 4$
Нативные растения + обработка семян NaHS	$22 \pm 2$	$72 \pm 3$	$30 \pm 2$	$2,40 \pm 0,02$	$74 \pm 4$
Дефицит воды (контроль)	$12 \pm 2$	$49 \pm 3$	$29 \pm 1$	$1,69 \pm 0,02$	$51 \pm 3$

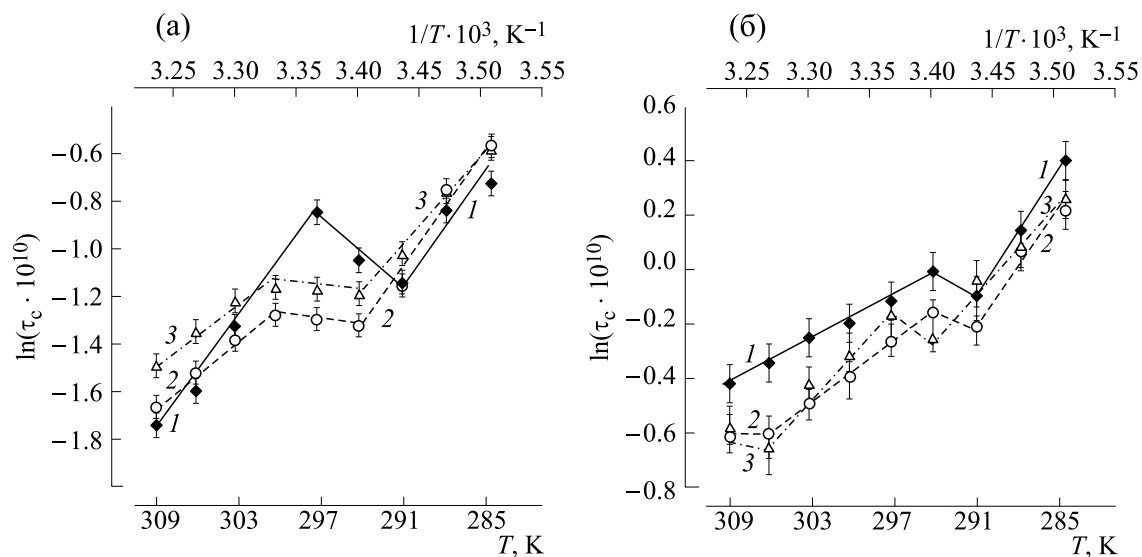
Примечание. Среда инкубации: 0,4 М сахарозы, 20 мМ HEPES-Tris-буфер (pH 7.2), 5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 10 мМ малата, 10 мМ глутамата. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ,  $10^{-6}$  М FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенил-гидразон). Число повторов – 7.

свойства воды [37], что также могло привести к изменению микровязкости мембран митохондрий. Увеличение активности антиоксидантных ферментов при воздействии NaHS приводило, по-видимому, к уменьшению количества АФК, что, в свою очередь, вело к накоплению ненасыщенных жирных кислот в липидном бислое и тем самым к уменьшению «кристалличности» мембран митохондрий (рис. 2). Кроме того, сдвиг термоиндуцированных структурных переходов в область более низких температур может быть связан с разобщением дыхательной цепи из-за стресса. В результате разобщения дыхательной цепи локальная температура могла быть выше температуры окружающей среды за счет выделения части энергии в виде тепла. С целью проверки данного предполагаемого механизма действия экзогенного NaHS на структурные характеристики мембран было изучено влияние антиоксиданта ресвератрола на микровязкость липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков гороха как в норме, так и при предварительной обработке семян NaHS, а также исследовано влияние дефицита воды и NaHS ( $\text{H}_2\text{S}$ ) на скорость окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями, выделенными из проростков гороха.

Как видно из табл. 1, обработка семян нативных растений  $5 \cdot 10^{-6}$  М раствором NaHS почти не влияет на биоэнергетические характеристики митохондрий, однако имеется тенденция к увеличению эффективности окислительного фосфорилирования ( $V_3/V_4$ ). Дефицит воды имел следствием снижение максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов по сравнению с нативными растениями, не подверженными внешним влияниям. Скорость окисления пары «глутамат + малат» в присутствии разобщителя (FCCP – карбонилцианид-*n*-трифторметок-

сифенил-гидразон) падала с  $74 \pm 4$  до  $51 \pm 3$  нг атом. О/(мг белка · мин). Эффективность окислительного фосфорилирования снижалась на 30%. При этом обработка семян NaHS не приводила к восстановлению биоэнергетических характеристик митохондрий до значений, характерных для нативных растений. Уменьшенная эффективность окислительного фосфорилирования ( $V_3/V_4$ ) при дефиците воды как с NaHS, так и без него указывает на частичное разобщение дыхательной цепи, в результате которого часть энергии выделялась в виде тепла, что могло привести к увеличению локальной температуры.

На рис. 4 показано действие ресвератрола на структурные свойства липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков гороха контрольной группы. Видно, что термоиндуцированные структурные переходы лишь слегка сдвинуты относительно контроля. Графики температурных зависимостей времен корреляции вращательной диффузии при белковом зонде при воздействии ресвератрола лежат частично ниже, чем для контрольной группы (рис. 4б). Этот факт указывает на то, что ресвератрол уменьшал микровязкость при белковых областей мембран митохондрий эпикотилей проростков контрольной группы гороха. Скорее всего, ресвератрол, обладая антирадикальной активностью, уменьшал реакционную способность АФК, что приводило к уменьшению окисления липидов, и, следовательно, к накоплению ненасыщенных липидов в при белковых областях мембран. Что касается липидных областей мембран, то ресвератрол практически не оказывал никакого воздействия на вязкостные свойства липидного бислоя (рис. 4а). Вероятно, это связано с тем, что АФК образуются в митохондриях преимущественно в дыхательных цепях, т.е. в при белковых областях. Поэтому действие



**Рис. 4.** Температурные зависимости времени корреляции вращательной диффузии зондов в мембране митохондрий эпикотилей проростков контрольной группы гороха, находившихся в условиях дефицита воды при воздействии ресвератрола: (а) – липидный зонд, (б) – прилелковый зонд. Кривая 1 – контроль, кривая 2 –  $5 \cdot 10^{-8}$  М ресвератрола, кривая 3 –  $5 \cdot 10^{-14}$  М ресвератрола.

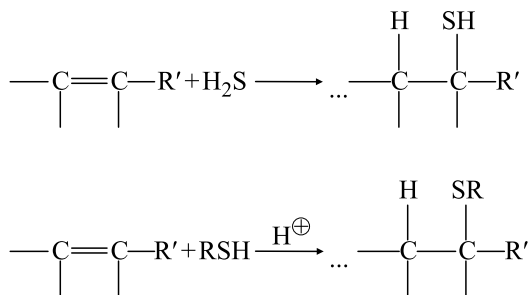
антиоксидантов сказывается в первую очередь на прилелковых областях липидного бислоя.

На рис. 3 показано действие ресвератрола на микровязкость липидных и прилелковых областей мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха, предварительно обработанных NaHS (опытные образцы). Как видно из рис. 3, антиоксидант никак не повлиял на вязкостные свойства липидного бислоя митохондрий эпикотилей проростков опытных образцов гороха, вероятнее всего, из-за увеличения активности антиоксидантных ферментов под воздействием сероводорода, приводившего к сильному уменьшению количества АФК. В то же время вязкость мембран контрольной группы уменьшалась при введении антиоксиданта (рис. 3). Таким образом, вышеизложенное доказывает наше предположение о механизме действия сероводорода на структурные характеристики мембран митохондрий путем

активации антиоксидантных ферментов и одновременного накопления осмолитов.

Отметим, что NaHS в концентрации  $6 \cdot 10^{-3}$  М увеличивал микровязкость только прилелковых областей мембран (рис. 2б). В то же время микровязкость липидных областей оставалась практически на уровне контроля (рис. 2а) и ниже, чем для меньших доз NaHS. Известно, что сероводород в больших концентрациях может проявлять токсичность. Например,  $H_2S$  может вступать в реакцию с жирными кислотами по двойным связям, образуя тиолы по схеме, представленной на рис. 5 [38].

В результате образования тиолов из ненасыщенных жирнокислотных хвостов, а также укорачивания некоторых хвостов липидов впоследствии липиды могли становиться намного подвижнее, что приводило к повышенным значениям текучести липидных областей мембран по сравнению с митохондриями при воздействии NaHS в меньшей дозе. Таким образом, увеличение микровязкости вследствие накопления осмолитов под воздействием NaHS с большой вероятностью компенсировалось токсичным действием большой концентрации экзогенного сероводорода. Поэтому микровязкость липидной фазы мембран оставалась практически на уровне контроля.



**Рис. 5.** Схема образования тиолов в результате реакции  $H_2S$  с жирными кислотами по двойным связям.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обработка семян NaHS в дозах  $5 \cdot 10^{-6}$  и  $2 \cdot 10^{-4}$  М увеличивала микровязкость на фоне уменьшения

кристалличности обеих областей мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха. Это, по-видимому, связано с активацией накопления осмолитов, в результате чего, вероятно, уменьшался объем митохондрий, что приводило к уменьшению площади поверхности липидного бислоя, а значит, к более плотной упаковке липидов. На фоне этого воздействие NaHS приводило к активации антиоксидантных ферментов. В результате количество АФК уменьшалось. Это, в свою очередь, приводило к накоплению ненасыщенных жирных кислот, тем самым приводя к уменьшению кристалличности липидного бислоя. NaHS в концентрации  $6 \cdot 10^{-3}$  М оказывал токсичное действие на структуру липидного бислоя.

В условиях дефицита воды эффективность окислительного фосфорилирования снижалась на 30%. При этом обработка семян NaHS в дозе  $5 \cdot 10^{-6}$  М не приводила к восстановлению биоэнергетических характеристик митохондрий до контрольных значений. Возможно, данной концентрации недостаточно для восстановления функций митохондрий.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nxele X., Klein A., and Ndimba B. K. Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *S. Afr. J. Bot.*, **108**, 261–266 (2017). DOI: 10.1016/j.sajb.2016.11.003
2. Bamagoos A., Alharby H., and Fahad S. Biochar coupling with phosphorus fertilization modifies antioxidant activity, osmolyte accumulation and reactive oxygen species synthesis in the leaves and xylem sap of rice cultivars under high-temperature stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **27** (9), 2083–2100 (2021). DOI: 10.1007/s12298-021-01062-7
3. Hetherington A. M., Hunter M. I. S., and Crawford R. M. M. Contrasting effects of anoxia on rhizome lipids in Iris species. *Phytochemistry*, **21** (6), 1275–1278 (1982). DOI: 10.1016/0031-9422(82)80125-8
4. Abbas S. R., Ahmad S. D., Sabir S. M., and Shah A.H. Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidant activity, glycine-betaine and proline contents. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **14** (1), 233–243 (2014). DOI: 10.4067/S0718-95162014005000019
5. Ma D., Ding H., Wang C., Qin H., Han Q., Hou J., Lu H., Xie Y., and Guo T. Alleviation of drought stress by hydrogen sulfide is partially related to the abscisic acid signaling pathway in wheat. *PLoS One*, **11** (9), e0163082 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0163082
6. Zhou Z.-H., Wang Y., Ye X.-Y., and Li Z.-G. Signaling molecule hydrogen sulfide improves seed germination and seedling growth of maize (*Zea mays* L.) under high temperature by inducing antioxidant system and osmolyte biosynthesis. *Front. Plant Sci.*, **9**, 1288 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.01288
7. Cheng T., Shi J., Dong Y., Ma Y., Peng Y., Hu X., and Chen J. Hydrogen sulfide enhances poplar tolerance to high-temperature stress by increasing S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) activity and reducing reactive oxygen/nitrogen damage. *Plant Growth Reg.*, **84** (1), 11–23 (2018). DOI: 10.1007/s10725-017-0316-x
8. Liu Z., Li Y., Cao C., Liang S., Ma Y., Liu X., and Pei Y. The role of H<sub>2</sub>S in low temperature-induced cucurbitacin C increases in cucumber. *Plant Mol. Biol.*, **99** (6), 535–544 (2019). DOI: 10.1007/s11103-019-00834-w
9. Zhu C. Q., Zhang J. H., Sun L. M., Zhu L. F., Abliz B., Hu W. J., Zhong C., Bai Z. G., Sajid H., Cao X. C., and Jin Q. Y. Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity via decreasing apoplast and symplast Al contents in rice. *Front. Plant Sci.*, **9**, 294 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.00294
10. Tang X., An B., Cao D., Xu R., Wang S., Zhang Z., Liu X., and Sun X. Improving photosynthetic capacity, alleviating photosynthetic inhibition and oxidative stress under low temperature stress with exogenous hydrogen sulfide in blueberry seedlings. *Front. Plant Sci.*, **11**, 108 (2020). DOI: 10.3389/fpls.2020.00108
11. Bindu D. P., Solomon H. S., and Khosrow K. Effects of hydrogen sulfide on mitochondrial function and cellular bioenergetics. *Redox Biol.*, **38**, 101772 (2021). DOI: 10.1016/j.redox.2020.101772
12. Koch M. S. and Erskine J. M. Sulfide as a phytotoxin to the tropical seagrass *Thalassia testudinum*: interactions with light, salinity and temperature. *J. Ex. Mar. Biol. Ecol.*, **266** (1), 81–95 (2001). DOI: 10.1016/S0022-0981(01)00339-2
13. Koch M. S., Mendelssohn I. A., and McKee K. L. Mechanism for the hydrogen sulphide-induced growth

- limitation in wetland macrophytes. *Limnol. and Oceanogr.*, **35** (2), 399–408 (1990). DOI: 10.4319/lo.1990.35.2.0399
14. Li Z. G. Hydrogen sulfide: a multifunctional gaseous molecule in plants. *Rus. J. Plant Physiol.*, **60** (6), 733–740 (2013). DOI: 10.1134/S1021443713060058
  15. Hancock J. T. and Whiteman M. Hydrogen sulfide signaling: interactions with nitric oxide and reactive oxygen species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1365** (1), 5–14 (2016). DOI: 10.1111/nyas.12733
  16. Huo J., Huang D., Zhang J., Fang, H., Wang B., Wang C., and Liao W. Hydrogen sulfide: a gaseous molecule in postharvest freshness. *Front. Plant Sci.*, **9**, 1172 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.01172
  17. Kim J. Y., Lee H. J., Jung H. J., Maruyama K., Suzuki N., and Kang H. Overexpression of microRNA395c or 395e affects differently the seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Planta*, **232** (6), 1447–1454 (2010). DOI: 10.1007/s00425-010-1267-x
  18. Sadeghian S. Y. and Yavari N. Effect of water-deficit stress on germination and early seedling growth in sugar beet. *J. Agron. Crop Sci.*, **190** (2), 138–144 (2004). DOI: 10.1111/j.1439-037X.2004.00087.x
  19. Chen Z., Huang Y., Yang W., Chang G., Li P., Wei J., Yuan X., Huang J., and Hu X. The hydrogen sulfide signal enhances seed germination tolerance to high temperatures by retaining nuclear COP1 for HY5 degradation. *Plant Sci.*, **285**, 34–43 (2019). DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.04.024
  20. Zhao M., Liu Q., Zhang Y., Yang N., Wu G., Li Q., and Wang W. Alleviation of osmotic stress by H<sub>2</sub>S is related to regulated PLD $\alpha$ 1 and suppressed ROS in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.*, **133** (3), 393–407 (2020). DOI: 10.1007/s10265-020-01182-3
  21. Christou A., Filippou P., Manganaris G. A., and Fotopoulos V. Sodium hydrosulfide induces systemic thermotolerance to strawberry plants through transcriptional regulation of heat shock proteins and aquaporin. *BMC Plant Biol.*, **14** (1), 42 (2014). DOI: 10.1186/1471-2229-14-42
  22. Hu L. Y., Hu S.-L., Wu J., Li Y.-H., Zheng J.-L., Wei Z.-J., Liu J., Wang H.-L., Liu Y.-S., and Zhang H. Hydrogen sulfide prolongs postharvest shelf life of strawberry and plays an antioxidative role in fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **60** (35), 8684–8693 (2012). DOI: 10.1021/jf300728h
  23. Li S.-P., Hu K.-D., Hu L.-Y., Li Y.-H., Jiang A.-M., Xiao F., Han Y., Liu Y.-S., and Zhang H. Hydrogen sulfide alleviates postharvest senescence of broccoli by modulating antioxidant defense and senescence-related gene expression. *J. Agric. Food Chem.*, **62** (5), 1119–1129 (2014). DOI: 10.1021/jf4047122
  24. Yao G.-F., Wei Z.-Z., Li T.-T., Tang J., Huang Z.-Q., Yang F., Li Y.-H., Han Z., Hu F., Hu L.-Y., Hu K.-D., and Zhang H. Modulation of enhanced antioxidant activity by hydrogen sulfide antagonization of ethylene in tomato fruit ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **66** (40), 10380–10387 (2018). DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03951
  25. Joshi N. C., Yadav D., Ratneret K., Kamara I., Aviv-Sharon E., Irihimovitch V., and Charuvi D. Sodium hydrosulfide priming improves the response of photosynthesis to overnight frost and day high light in avocado (*Persea americana* Mill, cv. 'Hass'). *Physiol. Plant.*, **168** (2), 394–405 (2020). DOI: 10.1111/pp1.13023
  26. Ni Z.-J., Hu K.-D., Song C.-B., Ma R.-H., Li Z.-R., Zheng J.-L., Fu L.-H., Wei Z.-J., and Zhang H. Hydrogen sulfide alleviates postharvest senescence of grape by modulating the antioxidant defenses. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 4715651 (2016). DOI: 10.1155/2016/4715651
  27. Ge Y., Hu K.-D., Wang S.-S., Hu L.-Y., Chen X.-Y., Li Y.-H., Yang Y., Yang F., and Zhang H. Hydrogen sulfide alleviates postharvest ripening and senescence of banana by antagonizing the effect of ethylene. *PLoS One*, **12** (6), e0180113 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0180113
  28. Liu D., Li J., Li Z., and Pei Y. Hydrogen sulfide inhibits ethylene-induced petiole abscission in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Hort. Res.*, **7** (1), 14 (2020). DOI: 10.1038/s41438-019-0237-0
  29. Бинюков В. И., Борунова С. Ф., Гольдфельд М. Г., Жукова И. Г., Кудлай Д. Г., Кузнецов А. Н., Шапиро А. Б. и Островский Д. Н. Исследование структурных переходов в биологических мембранах методом спинового зонда; температурные изменения мембран бактерий. *Биохимия*, **36** (6), 1149–1155 (1971).
  30. Вассерман А. М., Бучаченко А. Л., Коварский А. Л. и Нейман М. Б. Исследование молекулярных движений в полимерах методом парамагнитного зонда. *Высокомолекуляр. соединения*, **10А** (8), 1930–1936 (1968).
  31. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** (1), 265–275 (1951).
  32. Комов В. П. и Шведова В. Н. *Биохимия: учебник для вузов* (Юрайт, М., 2021).
  33. Гендель Л. Я., Гольдфельд М. Г., Кольтовер В. К., Розанцев Э. Г. и Сускина В. И. Исследование конформационных переходов в биомембранах методом слабо связанного парамагнитного зонда. *Биофизика*, **13** (6), 1114–1116 (1968).
  34. Герасимов Н. Ю., Неврова О. В., Жигачева И. В., Генерозова И. П. и Голощапов А. Н. Действие антиоксидантной системы «ресвератрол – серанитрозильный комплекс железа натрий- $\mu$ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат» тетрагидрат на митохондрии эпикотилей проростков гороха

- in vitro*». *Биофизика*, **68** (4), 653–659 (2023). DOI: 10.31857/S000630292304004X
35. Миль Е. М., Бинюков В. И., Жигачева И. В., Албантова А. А., Фаттахов С. Г., Коновалов А. И., Заиков Г. Е. и Тунакова Ю. А. Изучение влияния стрессовых воздействий и регулятора роста растений мелафена на митохондрии проростков гороха методом АСМ. *Вестн. КНИТУ*, **16** (13), 141–144 (2013).
36. Конов К. Б. *Исследование методами ЭПР воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны*. Дис. ... к-та физ.-мат. наук (Каз. физ.-тех. инст. им. Е. К. Завойского, Казань, 2016).
37. Ganong W. F. *Review of Medical Physiology* (McGraw-Hill Med., Minneapolis, 2005).
38. Коваль И. В. Тиолы как синтоны. *Rus. Chem. Rev.*, **62** (8), 769–786 (1993). DOI: 10.1070/RC1993v062n08ABEH000046

## Hydrogen Sulfide Led to a Modification in the Structure of Mitochondrial Membrane of Epicotyls of Pea Seedlings *Pisum sativum* L. under Water Deficit Conditions

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

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

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

The present study has been carried out to investigate changes in the structural characteristics of mitochondrial membranes isolated from epicotyls of pea seedlings of variety Nemchinovskiy 100 under the influence of different concentrations of NaHS. It was shown that treatment of pea seeds with NaHS at doses of  $2 \cdot 10^{-4}$  and  $5 \cdot 10^{-6}$  M resulted in the shift of thermally-induced structural transitions toward the region of lower temperatures and an increase in the microviscosity of both lipid and preprotein regions of mitochondrial membrane due to a decrease in the volume of their crystallization matrix. The presence of exogenous NaHS or endogenous hydrogen sulfide can enhance the activity of antioxidant defense enzymes and lead to accumulation of osmolytes. As a result, the microviscosity of the lipid bilayer could increase. To test this hypothesis, the effect of resveratrol, an antioxidant agent, on microviscosity of the lipid bilayer of epicotyl mitochondria of pea seedlings was investigated using normal pea seeds treated with resveratrol with or without pre-treatment with NaHS. Additionally, bioenergetic characteristics of mitochondria were studied. The results obtained confirmed that hydrogen sulfide has an effect on the structural characteristics of mitochondrial membranes through the activation of antioxidant enzymes and accumulation of osmolytes.

*Keywords: membrane structure, mitochondria, membrane microviscosity, pea seedlings, water deficit, hydrogen sulfide*



удк 577.352.336

## ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НАТРИЙ- $\mu$ 2-ДИТИОСУЛЬФАТОТЕТРАНИТРОЗИЛДИФЕРАТ ТЕТРАГИДРАТА НА СТРУКТУРУ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭПИКОТИЛЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2024 г. Н.Ю. Герасимов<sup>\*,#</sup>, О.В. Неврова<sup>\*</sup>, И.В. Жигачева<sup>\*</sup>, Н.И. Крикунова<sup>\*</sup>, А.К. Воробьева<sup>\*</sup>, И.П. Генерозова<sup>\*\*</sup>, А.Н. Голощапов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

<sup>\*\*</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Ботаническая ул., 35, Москва, 127276, Россия

<sup>#</sup>E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.

После доработки 22.12.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2024 г.

Оксид азота является сигнальной молекулой растений в стрессовых условиях, также эта молекула может обладать токсичным действием. В работе проведено исследование дозозависимого действия донора оксида азота натрий- $\mu$ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрата на структурное состояние мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха. При обработке митохондрий данным препаратом в концентрации  $10^{-8}$  М наблюдались термоиндуцированные структурные переходы при температурах от 15°C до 21°C и от 30°C до 36°C в липидных областях и при температурах от 12°C до 15°C и от 27°C до 33°C – в приобластных областях мембран. В липидных областях мембран препарат проявлял антиоксидантные свойства, приводя к накоплению содержания длинных ненасыщенных жирных кислот. Обработка митохондрий натрий- $\mu$ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидратом в дозе  $10^{-4}$  М, по-видимому, приводила к значительному увеличению уровня пероксидного окисления липидов и текучести липидной фазы мембран.

*Ключевые слова: структура мембран, митохондрии, микровязкость мембран, проростки гороха, донор оксида азота, ТНКЖ-тио.*

DOI: 10.31857/S0006302924020093, EDN: OUFFMQ

Митохондрии являются энергетическим центром клетки, поэтому имеют важное значение во многих клеточных процессах. Митохондрии играют ключевую роль в ответе на внешние стресс-факторы, а также выступают в качестве центральных органелл в процессах апоптоза. Кроме того, значительное количество активных форм кислорода производится на мембранах митохондрий в процессах окислительного фосфорилирования. В свою очередь, выработка большого количества активных форм кислорода может приводить к увеличению уровня пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и окислительному стрессу. Уровень ПОЛ в мембранах значительно влияет на структуру и состав мембран [1, 2]. Нарушения в структуре

и составе липидов мембран могут приводить к дисфункции мембранных белков и ферментов [3].

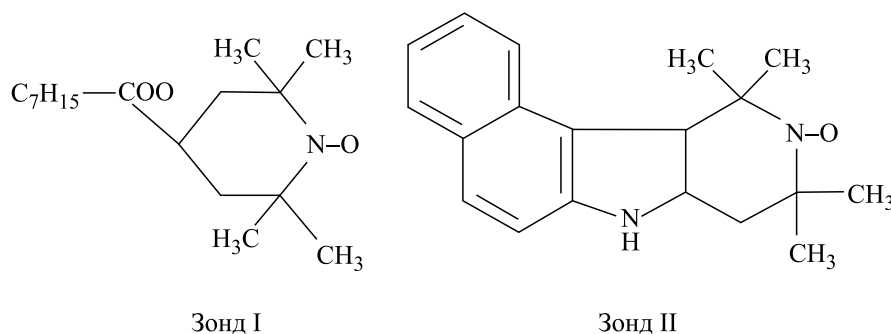
Донор оксида азота натрий- $\mu$ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрата (ТНКЖ-тио) способен защищать растения от теплового шока путем предотвращения дисфункции митохондрий [4]. ТНКЖ-тио генерирует NO и частицы  $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]$  [5]. Оксид азота (II) и ионы железа могут обладать не только полезным, но и токсичным действием [6–8], поэтому необходимо изучить действие ТНКЖ-тио в норме.

Поэтому целью исследования было изучение действия ТНКЖ-тио на структуру мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха, вне стрессовых условий.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ТНКЖ-тио – кристаллический водорастворимый донор оксида азота натрий- $\mu$ 2-дитиосульфа-

*Сокращения:* ПОЛ – пероксидное окисление липидов, ТНКЖ-тио – серанитрозильный комплекс железа с тиосульфатом, натрий- $\mu$ 2-дитиосульфатотетранитрозилдиферрат тетрагидрат.



**Рис. 1.** Структурные формулы использованных в работе зондов: зонд I — 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил, зонд II — 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- $\gamma$ -карболин-3-оксил.

тетранитрозилдиферрат тетрагидрат  $([Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]_2 \cdot 4H_2O)$  был синтезирован в Институте проблем химической физики РАН (Черноголовка, Московская обл.). Генерация NO и образование мононитрозильного интермедиата и частицы  $[Fe(S_2O_3)]$  из ТНКЖ-тио начинается только через 40 мин после растворения комплекса [5]. Семена гороха сорта Немчиновский 100 промывали мыльной водой и 0.01%  $KMnO_4$ . От  $KMnO_4$  тщательно промывали дистиллированной водой. Затем контрольные семена замачивали в воде, опытные семена — в  $10^{-8}$  М и  $10^{-4}$  М ТНКЖ-тио в течение 1 ч (инкубация). После этого семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение 7 суток. Затем выделяли митохондрии из эпикотилей гороха методом дифференциального центрифугирования в калий-фосфатном буфере. Для приготовления образца митохондрии разбавляли в среде выделения таким образом, чтобы содержание белка в конечном растворе составляло 2 мг/мл.

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

В работе [9] было показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое липидных компонент мембраны, а зонд II — в липидах, прилегающих к белкам, что позволяет по поведению зондов I и II в липидном бислое судить о липид-белковых взаимодействиях в мембранах. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I «липидным», а зонд II — «белковым».

Из полученных ЭПР-спектров рассчитывали время корреляции вращательной подвижности

( $\tau_c$ ), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле  $\tau_c = 6.65 \cdot 10^{10} \cdot \Delta H_+ \times ((I_+/I_-)^{0.5} - 1)$ , приведенной в работе [10]. Регистрацию ЭПР-спектров проводили в диапазоне температур 285–305 К (10–44°C) на радиоспектрометре ER 200D-SRC фирмы Bruker (США).

Известное соотношение Стокса–Энштейна (см., напр., работу [11]) связывает параметр  $\tau_c$  и вязкость среды, окружающей зонд  $\tau_c = \eta V / kT$ , где  $V$  — объем радикала (его можно считать прямо пропорциональным молекулярному весу);  $\eta$  — динамическая вязкость среды;  $k$  — постоянная Больцмана и  $T$  — абсолютная температура. Динамическая вязкость  $\eta$  связана с температурой следующим эмпирическим соотношением  $\eta = A' e^{b/T} / T$  [12], откуда следует  $\ln \tau_c = A'' + b/T + \ln(1/T)$ , где  $A'$ ,  $A''$  и  $b$  — константы. Исследуемый нами температурный интервал (от 283 до 305 К) достаточно узок, и на его протяжении  $\ln(1/T)$  меняется очень незначительно по сравнению со слагаемым  $b/T$ , поэтому можно считать  $\ln \tau_c = a + b/T$ .

Статистическая обработка данных осуществлялась методами параметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft® Excel и Origin® 6.1 при статистической надежности 95%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе было изучено влияние инкубации семян гороха с ТНКЖ-тио в концентрациях  $10^{-8}$  М и  $10^{-4}$  М на изменение структурного состояния мембран митохондрий, выделенных из 7-дневных эпикотилей проростков гороха, по сравнению с нативными растениями (контроль). Для оценки структуры мембран были получены температурные зависимости времен вращательной корреляции зондов I и II для контрольной группы и в присутствии препарата в дозах  $10^{-8}$  М и  $10^{-4}$  М.

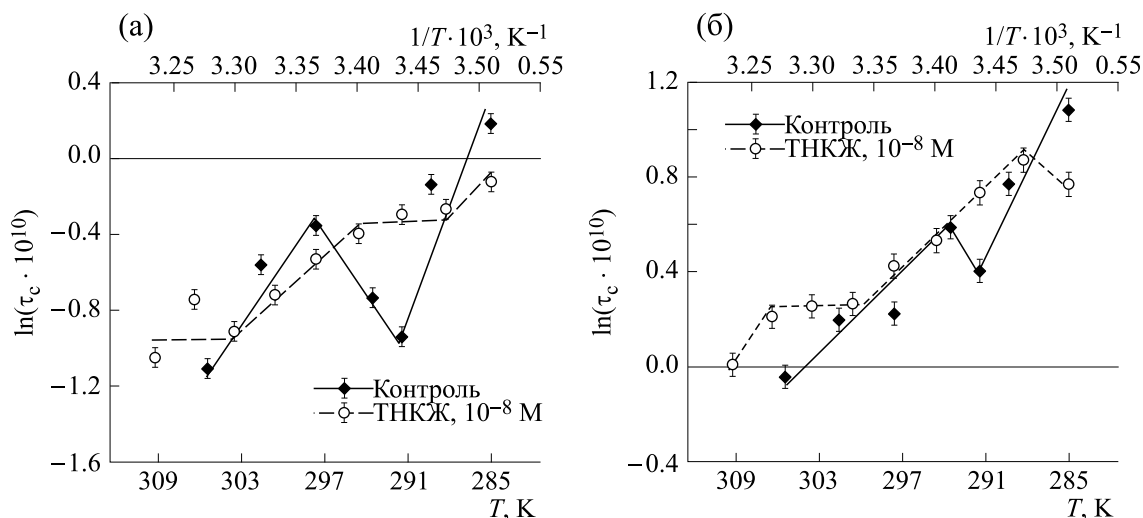


Рис. 2. Температурные зависимости времени корреляции вращательной диффузии после обработки семян гороха ТНКЖ-тио в концентрации  $10^{-8}$  М: (а) – липидный зонд, (б) – белковый зонд.

Для контрольной группы наблюдался термоиндуцированный структурный переход при температурах от  $18^\circ\text{C}$  до  $20^\circ\text{C}$  (291–293 К) в приобелковых областях (рис. 2б, 3б) и при температурах от  $18^\circ\text{C}$  до  $24^\circ\text{C}$  (291–297 К) в липидных областях мембран (рис. 2а, 3а). Данную низкотемпературную структурную перестройку связывают с переходом липидного бислоя из кристаллического в жидкокристаллическое состояние [13, 14], т.е. при температурах выше этих перестроек ( $>293$  К для приобелковых и  $>297$  К для липидных областей) мембрана находится в жидкокристаллическом состоянии.

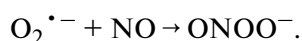
В митохондриях эпикотилей проростков гороха, предварительно обработанных ТНКЖ-тио в дозе  $10^{-8}$  М, наблюдались по два термоиндуцированных структурных перехода при температурах от  $15^\circ\text{C}$  до  $21^\circ\text{C}$  (288–294 К) и от  $30^\circ\text{C}$  до  $36^\circ\text{C}$  (303–309 К) в липидных областях (рис. 2а) и при температурах от  $12^\circ\text{C}$  до  $15^\circ\text{C}$  (285–288 К) и от  $27^\circ\text{C}$  до  $33^\circ\text{C}$  (300–306 К) в приобелковых (рис. 2б) областях мембран. Низкотемпературный переход является переходом «кристалл – жидкий кристалл» [13, 14] и для приобелковых областей мембран лежит в интервале температур ниже (на 6 К), чем соответствующий переход для контроля (рис. 2б). Следовательно, ТНКЖ-тио в концентрации  $10^{-8}$  М сдвигал термоиндуцированные структурные переходы в приобелковых областях мембран митохондрий в сторону более низких температур. Подобный сдвиг, но в меньшей степени (на 3 К), наблюдался также и в липидных областях мембран (рис. 2а). Сдвиг структурных переходов «кристалл–жидкий кристалл» в область более низких температур указывает на увеличение «жидкости» мембран (уменьшение

кристалличности). Высокотемпературные структурные переходы в мембранах связывают с изменениями структуры мембранных белков [14]. Появление структурных перестроек в приобелковых областях мембран (рис. 2б) в температурном интервале от  $27^\circ\text{C}$  до  $33^\circ\text{C}$  (300–306 К), по-видимому, связано со сдвигом соответствующих высокотемпературных перестроек для опытной группы относительно контрольной в сторону более низких температур. Наиболее вероятно, что высокотемпературные структурные перестройки для контрольной группы находились за пределами исследованного интервала  $>305$  К. Вслед за перестройками в приобелковых областях происходила перестройка и в липидной фазе мембран при температурах от  $30^\circ\text{C}$  до  $36^\circ\text{C}$  (303–309 К) более низких, чем для контроля. В работе [15] было показано, что в присутствии ТНКЖ-тио в дозе  $10^{-8}$  М происходило умеренное разобщение в электрон-транспортной цепи митохондрий, что, по-видимому, приводило к нагреву системы вследствие выделения части энергии электрон-транспортной цепи в виде тепла [16]. В результате локальная температура увеличивалась, что, вероятно, и приводило к сдвигу всех наблюдаемых нами термоиндуцированных переходов в область более низких температур. Приобелковые области разогревались сильнее, так как именно здесь происходило выделение тепла, поэтому переходы сдвигались сильнее, чем в липидных областях.

Наиболее эффективным температурным интервалом для вегетационного периода у гороха является интервал от  $22^\circ\text{C}$  до  $34.5^\circ\text{C}$  (от 294 К до 307.5 К) [17]. При температурах выше  $24^\circ\text{C}$  (297 К) как липидные, так и приобелковые области мембран митохондрий эпикотилей проростков гороха контрольной группы находились в жидкокри-

сталлическом состоянии. По-видимому, жидкокристаллическое состояние мембран важно для функционирования клеток растений. Для опытной группы ( $10^{-8}$  М ТНКЖ-тио, рис. 2) жидкокристаллическое состояние липидных областей мембран соответствует участку температур от  $21^{\circ}\text{C}$  до  $30^{\circ}\text{C}$  (294–303 К), а при белковых – от  $15^{\circ}\text{C}$  до  $27^{\circ}\text{C}$  (288–300 К).

В липидных областях мембран (рис. 2а) график зависимости  $\ln(\tau_c)$  от  $1/T$  на участке температур от  $21^{\circ}\text{C}$  до  $30^{\circ}\text{C}$  для опытного образца лежал ниже, чем для контрольного при температурах больше  $24^{\circ}\text{C}$  (297 К). Следовательно, обработка семян ТНКЖ-тио в дозе  $10^{-8}$  М приводила к уменьшению микровязкости жидкокристаллического состояния липидных областей мембран митохондрий, выделенных из эпикотилей проростков гороха. По-видимому, высвободившийся из ТНКЖ-тио оксид азота (II) в данном случае приводил к увеличению общего содержания всех длинных ненасыщенных жирных кислот (НЖК)  $\text{C}_{20}$  (табл. 1). Накопление липидов с НЖК, в свою очередь, приводило к увеличению текучести липидной фазы бислоя (рис. 2а) относительно контроля. Поскольку происходит накопление НЖК, это означает, что в липидных областях мембран оксид азота проявлял антиоксидантные свойства. В то же время микровязкость жидкокристаллического состояния при белковых областях мембран опытной группы совпадала с микровязкостью контроля (рис. 2б), о чем свидетельствует совпадение соответствующих уравнений прямых  $\ln(\tau_c) = -14.4 + 4.4 \cdot 1/T$ . При этом ТНКЖ-тио в дозе  $10^{-8}$  М также уменьшал кристалличность при белковых областях мембран митохондрий, о чем свидетельствует сдвиг низкотемпературного термоиндуцированного перехода в область более низких температур (рис. 2б). Это, по-видимому, связано со значительным уменьшением содержания линолевой кислоты 18:2 (табл. 1), входящей в состав кардиолипина, который локализуется в основном возле белков дыхательной цепи [18]. Уменьшение количества линолевой кислоты могло происходить двумя путями. Во-первых, в при белковых областях, где концентрация активных форм кислорода значительно выше, так как эти формы генерируются при окислительном фосфорилировании на белках и ферментах митохондриальной мембраны, NO может взаимодействовать с супероксид-анион радикалом с образованием пероксинитрита [5]:

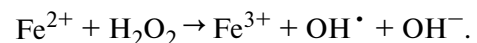


Пероксинитрит способен инициировать пероксидное окисление липидов при белковых областях мембран, что могло приводить к уменьшению содержания линолевой кислоты 18:2

(табл. 1). Во-вторых, уменьшение содержания линолевой кислоты могло быть связано с ее участием в качестве субстрата в процессах окисления [19]. При окислении линолевой кислоты задействуются все компоненты дыхательной цепи, как фосфорилирующие, так и нефосфорилирующие [19]. К последним относится, например, разобщающий белок альтернативная цианидрезистентная оксидаза, функционирование которой приводит к диссипации энергии и выделению тепла [20]. Выделение тепла, в свою очередь, могло привести к увеличению эффективной температуры ближайшего окружения митохондрий и, как следствие, к сдвигу термоиндуцированных структурных переходов мембран в область более низких температур (рис. 2б).

На рис. 3 показаны графики зависимости  $\ln(\tau_c)$  от  $1/T$  зондов I и II в мембранах митохондрий эпикотилей проростков гороха после обработки семян ТНКЖ-тио в концентрации  $10^{-4}$  М. В при белковых областях мембран наблюдалась термоиндуцированная структурная перестройка при температурах от  $21^{\circ}\text{C}$  до  $27^{\circ}\text{C}$  (294–300 К) (рис. 3б). ТНКЖ-тио в дозе  $10^{-4}$  М на всем исследованном температурном интервале приводил к резкому уменьшению микровязкости липидной фазы митохондриальных мембран, которая не зависела от температуры (рис. 3а). Такое низкое значение микровязкости соответствует жидкому, а не жидкокристаллическому состоянию липидного бислоя, и характерно, например, для животных с патологией [21]. Это могло быть вызвано несколькими сценариями. Первый сценарий связан со сдвигом термоиндуцированных структурных переходов в область более низких температур, а второй – с разрушением митохондрий.

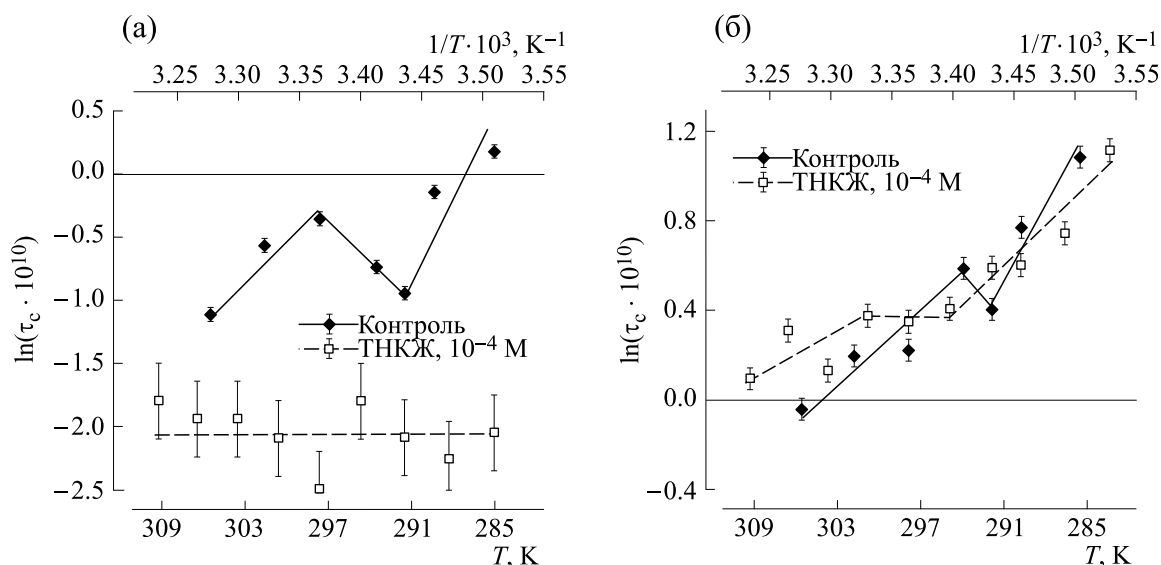
Согласно первому сценарию, оксид азота (II), как показано выше, может участвовать в пероксидном окислении липидов и тем самым проявлять прооксидантные свойства. Кроме того, высокая концентрация железа, содержащегося в ТНКЖ-тио, может ускорять ПОЛ путем образования гидроксильного радикала в реакции Фентона:



Таким образом, ТНКЖ-тио в большой концентрации ( $10^{-4}$  М), по-видимому, приводил к значительному увеличению уровня ПОЛ. Затем окислительный стресс, вероятно, приводил к набуханию митохондрий [22]. Вследствие этого увеличилась текучесть липидной фазы мембран из-за уменьшения плотности упаковки липидов (рис. 3а). Кроме того, из-за высокого уровня ПОЛ, по-видимому, практически полностью окислялись липиды с длинными жирнокислотными хвостами 20:1 и 20:3 и накапливались более

**Таблица 1.** Влияние различных концентраций ТНКЖ-тио на жирнокислотный состав общей липидной фракции мембран митохондрий проростков гороха (отн.%)

Название	Контроль	ТНКЖ $10^{-4}$	ТНКЖ $10^{-8}$
14:0	$0.67 \pm 0.30$	$0.96 \pm 0.20$	$0.91 \pm 0.22$
16:1 $\omega$ 7	$0.90 \pm 0.12$	$1.31 \pm 0.09$	$1.13 \pm 0.11$
16:0	$16.16 \pm 0.5$	$22.00 \pm 1.00$	$15.82 \pm 0.80$
17:0	$2.14 \pm 0.07$	$3.00 \pm 0.10$	$1.37 \pm 0.08$
18:2 $\omega$ 6	$50.00 \pm 0.21$	$52.00 \pm 0.38$	$43.2 \pm 0.51$
18:3 $\omega$ 3	$5.06 \pm 0.02$	$7.07 \pm 0.02$	$4.52 \pm 0.02$
18:1 $\omega$ 9	$2.25 \pm 0.11$	$2.25 \pm 0.09$	$2.47 \pm 0.08$
18:1 $\omega$ 7	$0.60 \pm 0.02$	$0.60 \pm 0.01$	$1.2 \pm 0.01$
18:0	$3.00 \pm 0.21$	$4.50 \pm 0.18$	$7.40 \pm 0.25$
20:3 $\omega$ 6	$2.76 \pm 0.11$	$0.42 \pm 0.14$	$4.00 \pm 0.18$
20:2 $\omega$ 6	$4.90 \pm 0.23$	$8.00 \pm 0.34$	$4.26 \pm 0.21$
20:1 $\omega$ 9	$6.72 \pm 0.61$	$0.59 \pm 0.32$	$8.40 \pm 0.43$
20:1 $\omega$ 7	$3.84 \pm 0.18$	$0.10 \pm 0.01$	$2.82 \pm 0.12$
20:0	$1.00 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.01$	$2.50 \pm 0.03$
Длинные (18-20)	$80 \pm 2$	$73 \pm 2$	$81 \pm 2$
Короткие (<18)	$20 \pm 2$	$27 \pm 2$	$19 \pm 2$
Насыщенные	$23 \pm 2$	$31 \pm 2$	$28 \pm 2$
Ненасыщенные	$77 \pm 2$	$69 \pm 2$	$72 \pm 2$



**Рис. 3.** Температурные зависимости времени корреляции вращательной диффузии после обработки семян гороха ТНКЖ-тио в концентрации  $10^{-4}$  М: (а) – липидный зонд, (б) – белковый зонд.

короткие липиды с НЖК 14:0, 16:0, 16:1, 17:0 (табл. 1), что приводило к еще большему уменьшению микровязкости липидной фазы мембран. В этом случае структура приобелковых областей мембран, по-видимому, сохранялась (рис. 3б) за счет деструкции липидной фазы из-за миграции липидов. Таким образом, вероятно, большая концентрация  $10^{-4}$  М ТНКЖ-тио сдвигала низкотемпературные термоиндуцированные структурные переходы обеих фаз мембран в область более низких температур сильнее, чем доза  $10^{-8}$  М, за пределы исследуемого интервала ( $<10^{\circ}\text{C}$ ), и в приобелковых областях мембран жидкокристаллическому состоянию соответствует температурный интервал от  $10^{\circ}\text{C}$  до  $21^{\circ}\text{C}$  (294–300 К) (рис. 3б).

По второму сценарию слишком большая концентрация  $\text{NO}$ , высвобождающегося из ТНКЖ-тио, могла привести к разрыву наружной мембраны митохондрий [23] вплоть до разрушения митохондрий, вследствие чего зонд I мог локализоваться преимущественно в среде выделения, микровязкость которой значительно ниже микровязкости мембран, поэтому значения  $\tau_c$  были слишком низкими (рис. 3а). При таком сценарии разрушения мембран зонд II локализовался в отдельных липидных рафтах [24] трансмембранных белков, находящихся вне мембран. Из-за гидрофобных взаимодействий липидные рафты, находясь вне мембраны, образовывали более жесткую структуру, чем в составе мембран. Это могло привести к увеличению кристалличности приобелковых областей липидного бислоя и, следовательно, к сдвигу термоиндуцированного структурного

перехода «кристалл–жидкий кристалл» в сторону более высоких температур (рис. 3б).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что ТНКЖ-тио в концентрации  $10^{-8}$  М приводил к сдвигу термоиндуцированных структурных перестроек в область более низких температур, при этом снижал микровязкость липидной фазы мембран. ТНКЖ-тио в концентрации  $10^{-4}$  М может приводить к деструкции липидной фазы мембран митохондрий, вплоть до разрушения мембран. Таким образом, при использовании данного препарата в качестве защиты от неблагоприятных факторов следует тщательно подбирать концентрацию ТНКЖ-тио.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аристархова С. А., Архипова Г. В., Бурлакова Е. Б., Гвахария В. О. и Глущенко Н. Н. Регуляторная роль взаимосвязи изменений в концентрации антиоксидантов в составе липидов клеточных мембран. *ДАН СССР*, **228** (1), 215–218 (1976).
2. Бурлакова Е. Б. и Храпова Н. Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты. *Успехи химии*, **54** (9), 1540–1558 (1985). DOI: 10.1070/RC1985v054n09ABEN003121
3. Horvath S. E. and Daum G. Lipids of mitochondria. *Progr. Lipid Res.*, **52** (4), 590–614 (2013). DOI: 10.1016/j.plipres.2013.07.002
4. Жигачева И. В., Бинюков В. И., Генерозова И. П., Миль Е. М., Крикунова Н. И., Расулов М. М. и Албантова А. А. Натрий- $\mu$ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрат тетрагидрат предотвращает обусловленную тепловым шоком дисфункцию митохондрий. *Физиология растений*, **69** (2), 198–206 (2022). DOI: 10.31857/S0015330322010225
5. Санина Н. А. и Алдошин С. М. Строение и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами. *Изв. РАН. Сер. хим.*, **7**, 1199–1227 (2011). DOI: 10.1007/s11172-011-0192-x
6. Barone M. C., Darley-Usmar V. M., and Brookes P. S. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase by peroxynitrite proceeds through ascorbate-dependent generation of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **278** (30), 27520–27524 (2003). DOI: 10.1074/jbc.M304129200
7. Иванищев В. В. Доступность железа в почве и его влияние на рост и развитие растений. *Изв. ТулГУ. Естественные науки*, № 3, 127–138 (2019).
8. Blokhina O. and Fagerstedt K. V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, **138** (4), 447–462 (2010). DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01340.x
9. Бинюков В. И., Борунова С. Ф., Гольдфельд М. Г., Жукова И. Г., Кудлай Д. Г., Кузнецов А. Н., Шапиро А. Б. и Островский Д. Н. Исследование структурных переходов в биологических мембранах методом спинового зонда. *Биохимия*, **36** (6), 1149–1155 (1971).
10. Вассерман А. М., Бучаченко А. Л., Коварский А. Л. и Нейман М. Б. Исследование молекулярных движений в полимерах методом парамагнитного зонда. *Высокомолекуляр. соединения*, **10A** (8), 1930–1936 (1968).
11. Кузнецов А. Н. *Метод спинового зонда* (Наука, М., 1976).
12. Кухлинг Х. *Справочник по физике* (Мир, М., 1983).
13. Комов В. П. и Шведова В. Н., *Биохимия: учебник для вузов* (Юрайт, М., 2021).
14. Гендель Л. Я., Гольдфельд М. Г., Кольтовер В. К., Розанцев Э. Г. и Сускина В. И. Исследование конформационных переходов в биомембранах методом слабо связанного парамагнитного зонда. *Биофизика*, **13** (6), 1114–1116 (1968).
15. Жигачева И. В., Крикунова Н. И., Генерозова И. П., Буцанец П. А., Герасимов Н. Ю., Неврова О. В., Васильев С. В. и Голошапов А. Н. Натрий- $\mu$ 2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрата тетрагидрат повышает эффективность работы дыхательной цепи митохондрий проростков гороха. *Биофизика*, **67** (4), 671–679 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922040056
16. Seymour R. S. Biophysics and physiology of temperature regulation in thermogenic flowers. *Biosci. Rep.*, **21** (2), 223–236 (2001). DOI: 10.1023/a:1013608627084
17. Макашева Р. Х. *Горох* (Колос, Лен., 1973).
18. Kurz C. R., Kissner R., Nauser T., Perrin D., and Koppenol W. H. Rapid scavenging of peroxynitrous acid by monohydroascorbate. *Free Rad. Biol. Med.*, **35** (12), 1529–1537 (2003). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.012
19. Грабельных О. И., Побежимова Т. П., Колесниченко А. В., Сумина О. Н., Пивоварова Н. Ю. и Войников В. К. Изучение возможности свободных жирных кислот выступать в качестве субстрата окисления в митохондриях озимой пшеницы. *Вестн. ХНАУ. Сер. биол.*, **5** (3), 7–15 (2003).
20. Grabelnych O. I. The energetic functions of plant mitochondria under stress. *J. Stress Physiol. Biochem.*, **1** (1), 37–54 (2005).
21. Голошапов А. Н. и Бурлакова Е. Б. Исследование термоиндуцированных структурных переходов в мембранах органов животных при введении им антиоксидантов и злокачественном росте. *Биофизика*, **25** (1), 97–101 (1980).
22. Сергеев О. С., Уксусова Л. И., Сапрыкин В. В., Денисова Е. А. и Прохоренко И. О. *Типовые патологические процессы. Воспаление. Лихорадка. Повреждение клетки* (СамГМУ, Самара, 2004).
23. Casolo V., Petrusa E., Krajňáková J., Macri F., and Vianello A. Involvement of the mitochondrial KATP+ channel in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, **56** (413), 997–1006 (2005). DOI: 10.1093/jxb/eri093
24. Геннис Р. *Биомембраны: Молекулярная структура и функции* (Мир, М., 1997).



## Study of the Effect of Sodium- $\mu$ 2-Dithiosulphate-Tetranitrosyl Diferrate Tetrahydrate on the Structure of Mitochondrial Membranes Isolated from Epicotyls of Pea Seedlings

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

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

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

Nitric oxide is a signaling molecule of plants under stressful conditions, and also this molecule can have a toxic effect. This study focused on investigation of a dose-dependent effect of the nitric oxide donor, sodium- $\mu$ 2-dithiosulphate-tetranitrosyl diferrate tetrahydrate, on the structural state of mitochondrial membranes of epicotyls of pea seedlings. Treatment of mitochondria with  $10^{-8}$  M of this drug led to thermo-induced structural transitions within the temperature range from 15°C to 21°C and from 30°C to 36°C in the lipid regions, and within the temperature range from 12°C to 15°C and from 27°C to 33°C in preprotein regions of membranes. In the lipid regions of the membranes, the compound exhibited antioxidant activity, leading to accumulation of long unsaturated fatty acids. Treatment of mitochondria with  $10^{-4}$  M sodium- $\mu$ 2-dithiosulphate-tetranitrosyl diferrate tetrahydrate most likely led to a significant increase of the lipid peroxidation level and membrane lipid phase fluidity.

*Keywords: membrane structure, mitochondria, membrane microviscosity, pea seedlings, nitric oxide donor, TNIC-thio*

УДК 577.3

## ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ДИСФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ КАРНИТИНАТОМ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНА

© 2024 г. И.В. Жигачева\*., И.Ф. Русина\*\*., Н.И. Крикунова\*, Ю.В. Кузнецов\*,  
М.М. Расулов\*\*\*., М.А. Яковлева\*, А.Н. Голощапов\*

\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия  
#E-mail: zhigacheva@mail.ru

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

##E-mail: rusina939@mail.ru

\*\*\*ГНЦ РФ «Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений», шоссе Энтузиастов, 38, Москва, 105118, Россия

###E-mail: rasulovmaksud@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Исследована биологическая активность карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина. Препарат проявлял высокую антирадикальную и антиоксидантную активность, что могло свидетельствовать о наличии у него антистрессовых свойств, наличие которых изучали на модели острой гипобарической гипоксии. Острая гипобарическая гипоксия в 2.3 раза активировала перекисное окисление липидов, что приводило к изменениям в содержании C<sub>18</sub> и C<sub>20</sub> жирных кислот в мембранах митохондрий: индекс двойных связей C<sub>18</sub> жирных кислот снизился на 18.2%, содержание 20:3ω3 – на 13%, 20:2ω6 – на 80% и 20:1ω9 – на 33%. Эти изменения сопровождались изменением биоэнергетических характеристик митохондрий. Максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов сократились на 28–35%. Введение животным 10<sup>-6</sup> моль/кг карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина в течение пяти суток предотвращало перекисное окисление липидов, предупреждало изменения состава жирных кислот мембран митохондрий, а, следовательно изменения биоэнергетических характеристик митохондрий, что, вероятно, определило антистрессовые свойства препарата: увеличение продолжительности жизни в 3.5–4.0 раза и повышение выживаемости мышей на 12–40% в условиях различных видов гипоксии. Кроме того, препарат стимулировал всхожесть и рост проростков пшеницы.

*Ключевые слова:* митохондрии, антиоксиданты, перекисное окисление липидов, жирные кислоты, гипоксия, динамическая работоспособность.

DOI: 10.31857/S0006302924020105, EDN: OUCNRP

Производные 3-гидроксипиридина имеют широкий спектр биологического действия: антиоксидантное, антигипоксическое, противовоспалительное и противоишемическое [1], кардио- и эндотелиопротекторное [2, 3], антистрессовое и нейропротекторное [1] действие. Они получили широкое применение в медицине. Это эмоксипин (3-окси-6-метил-2-этилпиридина гидрохлорид), мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат), этоксидол (2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридиний гидроксидиоат). В настоящее

время идет поиск новых синтетических производных 3-гидроксипиридина и исследование их биологической активности.

В качестве объекта исследования был выбран карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (КП) (рис. 1).

Выбор данного препарата в качестве объекта исследования обусловлен тем, что входящий в состав препарата 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридин обладает антирадикальными свойствами: он, как и другие 3-гидроксипиридины, активно взаимодействует с гидроксильными радикалами и первичными свободными радикалами белков. Более того, показано, что он может ингибировать ферментативное и не ферментативное перекис-

*Сокращения:* КП – карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридина, ПОЛ – перекисное окисление липидов, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот, ЖК – жирные кислоты, ОГГ – острая гипобарическая гипоксия.

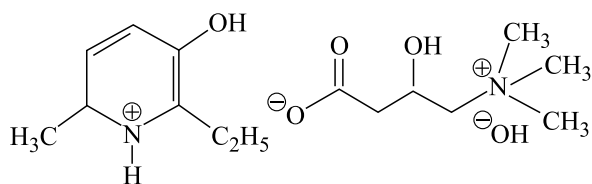


Рис. 1. Схематическая формула карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина.

ное окисление липидов (ПОЛ), а также влиять на активность антиоксидантных ферментов [4].

Второй компонент этого соединения – L-карнитин – является прямым антиоксидантом, ингибирующим свободнорадикальное окисление, а также подавляющим генерацию активных форм кислорода ферментами в цитоплазме клеток и непосредственно в дыхательной цепи митохондрий, поскольку L-карнитин образует комплексы с ионами  $Fe^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  в их активных центрах. При этом он повышает активность ряда антиоксидантных ферментов и неферментативных антиоксидантов, в основном через факторы транскрипции, включая Nrf2 и NF- $\kappa$ B [5].

Основываясь на этих данных исследовали антиоксидантные, антирадикальные свойства КП и возможность его использования в качестве антистрессового препарата.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина** впервые синтезировали в ИБХФ РАН. В настоящее время подана заявка на патент РФ № 2023117835.

**Антирадикальные свойства препарата** оценивали хемилюминисцентным методом по эффекту торможения жидкофазного окисления этилбензола, которое инициировали термическим распадом азобисизобутиронитрила ( $50^\circ$ ). Интенсивность хемилюминисценции усиливали 9,10-дибромантраценом. Эффективную константу ингибирования свободнорадикального окисления ( $k_{INH}$ ) рассчитывали из серии хемилюминисцентных кривых с разной концентрацией карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина [6]. Концентрации компонентов в реакционном растворе: КП –  $5.2 \cdot 10^{-6}$  М, этилбензол – 20%, инициатор –  $2 \cdot 10^{-3}$  М, дибромантрацен –  $5 \cdot 10^{-3}$  М. Реакционным сосудом служила термостатированная при  $50^\circ\text{C}$  цилиндрическая стеклянная кювета. Реакционную смесь барботировали воздухом для ее насыщения кислородом и перемешивания.

**Объекты.** Работу проводили на мышах линии Valb/c массой 20–25 г. Мышам в течение 5 суток внутрибрюшинно вводили  $10^{-6}$  моль/кг карнити-

нат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина. Последнее введение состоялось за 45 мин до опыта.

**Регулирующие стандарты.** Исследования выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasburg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, а также с «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях» [7]. Наше исследование выполнено по утвержденной Министерством науки и высшего образования Российской Федерации теме 44.4 «Комплексное изучение механизмов и эффектов действия природных и синтетических антиоксидантов, противоопухолевых препаратов, химических и физических факторов. Изучение биологических механизмов старения». На эту тему работа проводится с использованием разрешенных лабораторных животных (мышей) на постоянной основе под контролем Комитета по этике Института биохимической физики РАН.

**Проращивание семян пшеницы.** Эксперимент также проводили на проростках пшеницы (*Triticum L.*). Использовали семена пшеницы сорта Каликсо. Контрольные семена замачивали в воде и проращивали на влажной фильтровальной бумаге, а опытные семена замачивали в  $2.48 \cdot 10^{-3}$  или  $1.20 \cdot 10^{-3}$  М карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридине и проращивали, используя эти растворы. Проращивание проводили при комнатной температуре ( $18\text{--}20^\circ\text{C}$ ) в закрытых крышками чашках Петри при дневном освещении. На пятые сутки фильтровальную бумагу во всех чашках Петри дополнительно смачивали водой. Измерения проводили на третьи и девятые сутки. На девятые сутки срезали и взвешивали зеленую биомассу. Корни проростков обрабатывали таким же образом.

**Выделение митохондрий** из печени мышей проводили методом дифференциального центрифугирования [8]. Первое центрифугирование при 600 g в течение 10 мин, второе – при 9000 g, 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань: среда – 1:0.25. Среда выделения содержала 0.25 М сахарозы, 10 мМ HEPES, pH 7.4.

**Уровень перекисного окисления липидов** оценивали флуоресцентным методом [9]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ : метанол = 2 : 1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3–5 мг белка. Соотношение митохондрии : смесь хлороформ–метанол = 1 : 10. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварце-

вых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax (Horiba Yvon GmbH, Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0.3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания — 420–470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

**Исследование жирнокислотного состава мембран митохондрий печени мышей** проводили методом газо-жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

**Метилловые эфиры жирных кислот** получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [10, 11]. Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) экстрагировали гексаном, полученные растворы анализировали.

**Определение количественного состава МЭЖК** проводили на хроматографе марки «Кристалл 2000М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0.32 мм, слой 0.25 мкм (J&W Scientific, США)). Анализ МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин. Температура инжектора и детектора — 270°C, скорость газа-носителя гелия составляла 2.0 мл/мин, деление потока на входе в колонку — 1:40. Идентификацию МЭЖК осуществляли по величинам индексов удерживания [12]. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали по соотношению площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Математическую обработку результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

**Идентификацию МЭЖК** в образцах осуществляли также на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных ГХ анализу, на приборе Hewlett Packard-6890 (США). Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ и скорости сканирования 1 с на декаду масс в области 40–400 дальтон.

**Модель «старения» митохондрий.** Выделенные митохондрии (2–3 мг белка) помещали в 0.5 мл среды, содержащей 65 мМ КСl, 10 мМ НЕРЕС и 1 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, рН 7.4. Митохондрии инкубировали 20–25 мин при комнатной температуре.

**Протекторную активность препарата** исследовали, используя модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ), острой гемической гипоксии, острой цитотоксической гипоксии и динамической работоспособности.

**Острую гипобарическую гипоксию** у мышей Balb/c моделировали в стеклянной барокамере в атмосфере низкого давления (206 мм рт. ст.), что

соответствует высоте 11000 м над уровнем моря. В первые минуты в камере создавали разрежение, соответствующее 5000 м над уровнем моря (давление 405 мм рт. ст.). В каждую последующую минуту проводили «подъем» еще на одну тысячу метров. Регистрировали время пребывания мышей на «высоте» 11000 м над уровнем моря.

**Острую гемическую гипоксию** вызывали внутрибрюшинным введением мышам линии Balb/c нитрита натрия в дозе 250 мг/кг.

**Острую цитотоксическую гипоксию** вызывали внутрибрюшинным введением мышам азида натрия из расчета 20 мг/кг.

**Динамическую работоспособность** мышей определяли в тесте принудительного плавания с грузом 2% от массы тела в воде при температуре 10°C до утомления животных [13].

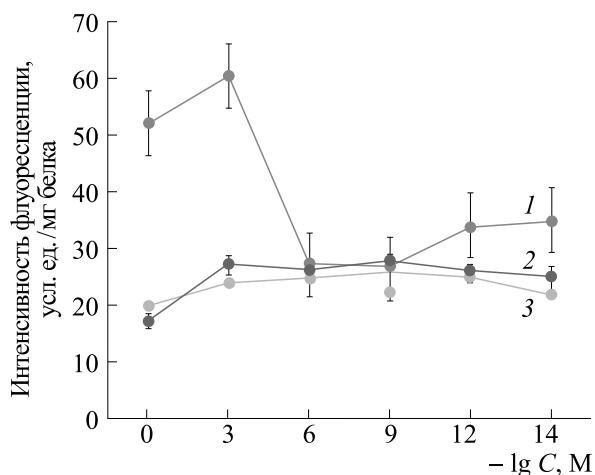
**Реактивы.** В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: метанол, хлороформ, карбонат калия — Merck, Германия; сахароза и Трис — Sigma, США; НЕРЕС — MP Biomedicals, Германия; гексан — Panreac, Испания; ацетилхлорид — Acros, Бельгия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Способность карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина предотвращать перекисное окисление липидов исследовали по его влиянию на интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в мембранах митохондрий печени мышей. Перекисное окисление липидов в мембранах этих органелл активировали, используя модель «старения» митохондрий. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий возрастала в 2.5–3.0 раза (рис. 2). Введение различных концентраций КП в среду инкубации митохондрий приводило к снижению флуоресценции вплоть до контрольных значений. При этом наиболее эффективными концентрациями оказались 10<sup>-6</sup>–10<sup>-12</sup> М. Однако в концентрации 10<sup>-3</sup> М препарат проявлял прооксидантный эффект. Отметим, что введение КП в различной концентрации в среду инкубации митохондрий, которые не подвергались «старению», не влияло на интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ, что свидетельствовало о влиянии препарата только на активацию перекисного окисления липидов.

Карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин проявлял также антирадикальные свойства, которые оценивали хемилюминесцентным методом (см. раздел «Материалы и методы»). Кинетическая кривая ингибированного окисления этилбензола в присутствии КП представлена на рис. 3.

Максимальный наклон (tgφ) кинетической кривой тушения хемилюминесценции в точке перегиба позволяет определить константу скорости



**Рис. 2.** Влияние «старения» и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на интенсивность флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей: кривая 1 – «старение» + КП, кривая 2 – контроль + КП, кривая 3 – контроль. По оси ординат – интенсивность флуоресценции (усл. ед./мг белка), по оси абсцисс – концентрация КП.

$k_{inh}$  реакции ингибирования окисления (реакции антиоксиданта с перекисным радикалом) по формуле:

$$(k_{inh})_{tg\phi} = \frac{\sqrt{2k_t}}{\sqrt{W_i \cdot 0.273 \cdot T_{sec}}}, \quad (1)$$

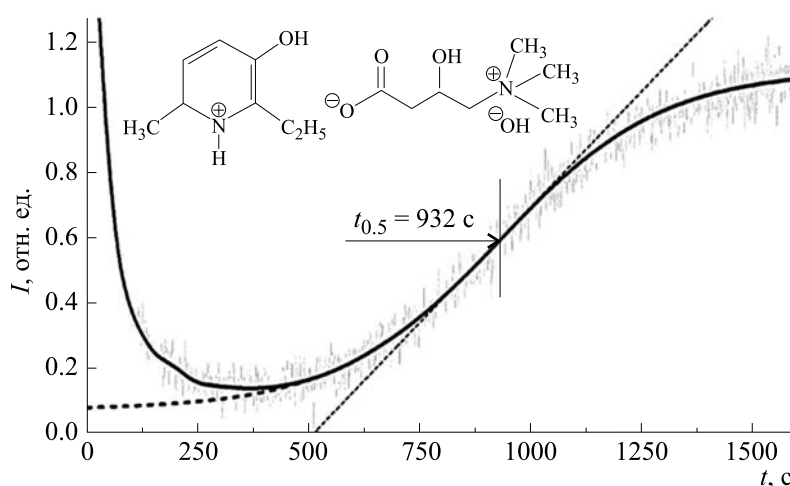
где  $W_i$  – скорость инициирования радикалов;  $T_{sec} = 1/tg\phi$ ;  $k_t$  – константа скорости диспропорционирования пероксильных радикалов этилбензола:  $2k_t = 1.64 \cdot 10^7 M^{-1}c^{-1}$  [6].  $W_i$  рассчитыва-

ли по известной формуле:  $W_i = 2e \cdot k_0 \cdot [Y]$ , где  $e$  – эффективность выхода радикалов из клетки,  $k_0$  – константа скорости распада инициатора  $Y$  [21].

Для концентрации инициатора  $[Y] = 2 \cdot 10^{-3} M$  при температуре реакции  $50^\circ C$  скорость инициирования радикалов составила  $W_i = 1.12 \cdot 10^{-8} M \cdot c^{-1}$ . При известных  $W_i$  и  $2k_t$  из кинетической кривой определяли  $k_{inh}$  по формуле (1).

Константа ингибирования пероксильных радикалов карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина ( $k_{inh}$ ) составляла  $2.3 \cdot 10^5 M^{-1}c^{-1}$ , а стехиометрический коэффициент  $f$  ингибирования свободнорадикальных реакций, показывающий, сколько цепей (радикалов) обрывается при участии одной молекулы антиоксиданта, равен двум, что сопоставимо с антирадикальными свойствами ресвератрола (табл. 1).

Обладая антирадикальными и антиоксидантными свойствами, карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин, вероятно, может проявлять антистрессовую активность, поскольку в условиях стресса активизируется свободнорадикальное окисление, а следовательно и ПОЛ. Проверку на наличие антистрессовых свойств у препарата проводили, используя модель острой гипобарической гипоксии. ОГГ приводила к активации ПОЛ. При этом интенсивность флуоресценции возрастала почти в 2.3 раза (рис. 4). Введение мышам  $10^{-6}$  моль/кг КП предупреждало активацию ПОЛ. Отметим, что введение мышам  $10^{-3}$  моль/кг КП не только не предотвращало ПОЛ, но даже его активировало. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в районе 410–420 нм возрастала в 2.5 раза, что свидетельствовало о преиму-



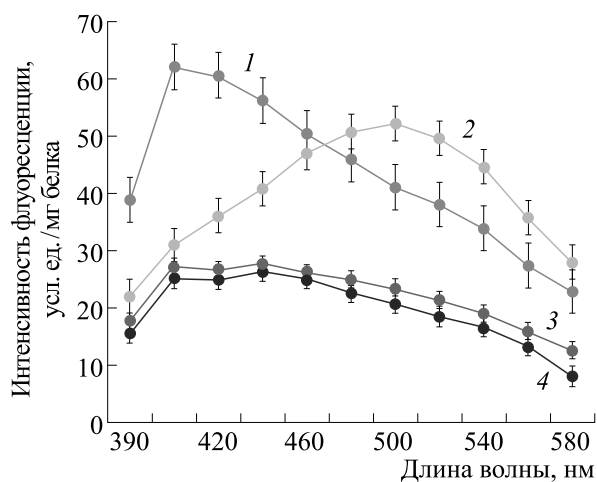
**Рис. 3.** Кинетическая кривая тушения хемилюминесценции, сопровождающей окисление этилбензола, инициированное карнитинатом 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина:  $[КП]_0 = 5.2 \cdot 10^{-6} M$ ,  $W_i = 1.12 \cdot 10^{-8} M \cdot c^{-1}$ , активатор (дибромантрацен) =  $5 \cdot 10^{-3} M$ ,  $50^\circ C$ .

**Таблица 1.** Сравнительная антирадикальная активность антиоксидантов

Антиоксидант	$k_{inh} \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$	$f$	Ссылки
Соль карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина	$23.0 \pm 0.04$	$2.0 + 0.2$	–
2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин	$3.3 \pm 0.05$	2.0	–
Дибунол	$2.0 \pm 0.2$	1.9	[21]
Мексидол	4.7	1.9	[21]
Хроман СгСl	452	2.0	[21, 22]
Пирокатехин (о-дигидроксибензол)	60.0	2.0	[23]
Ресвератрол	23.6	2.1	[24]

ществленном образовании в результате ПОЛ 4-гидрокси-2,3-нонаналей. На основании полученных данных для экспериментов по выявлению антистрессовых свойств препарата было выбрано введение животным КП в дозе  $10^{-6}$  моль/кг.

Активация перекисного окисления липидов, по-видимому, должна была повлиять на жирнокислотный состав общей липидной фракции митохондрий. Действительно острая гипобарическая гипоксия вызывала изменения в содержании  $C_{18}$  и  $C_{20}$  жирных кислот (ЖК). Так, содержание 18:3 $\omega$ 6 снизилось в 2.6 раза, а содержание 18:1 $\omega$ 9 – в 1.4 раза. При этом индекс двойных связей  $C_{18}$  ЖК понизился с  $0.35 \pm 0.01$  до  $0.29 \pm 0.01$  (рис. 5). Введение мышам  $10^{-6}$  моль/кг КП не

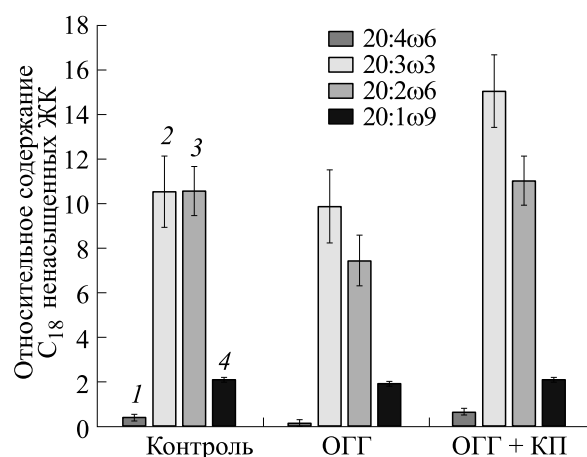


**Рис. 4.** Влияние острой гипобарической гипоксии и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на спектры флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей: кривая 1 – ОГГ+ введение мышам  $10^{-3}$  моль/кг КП; кривая 2 – ОГГ; кривая 3 – контроль; кривая 4 – ОГГ+ введение мышам  $10^{-6}$  моль/кг КП. По оси ординат – интенсивность флуоресценции (усл. ед./мг белка), по оси абсцисс – длина волны испускания.

только предотвращало изменения в содержании  $C_{18}$  ненасыщенных ЖК, но в 1.6 раза и в 1.4 раза увеличивало содержание 18:3 $\omega$ 6 и 18:2 $\omega$ 6 по сравнению с контролем.

Отметим, что ОГГ вызывала изменения и в содержании  $C_{20}$  ЖК в мембранах митохондрий печени мышей (рис. 6). Содержание эйкозатриеновой кислоты в мембранах митохондрий в условиях ОГГ снижалось на 13%, эйкозациеновой – на 80%, а эйкозеновой – на 33%. Соотношение между ЖК – предшественниками и ингибиторами синтеза эйкозаноидов – 20:4 $\omega$ 6/22:6 $\omega$ 3 в условиях ОГГ снизилось с  $2.22 \pm 0.12$  до  $1.43 \pm 0.10$ , что свидетельствовало о снижении метаболизма в эйкозаноидном цикле.

Известно, что эйкозаноиды являются сигнальными молекулами и имеют широкий спектр биологических функций, включая усиление или подавление воспалительных и аллергических реакций, контроль артериального давления, сокращения или расслабления гладких мышц и многое



**Рис. 5.** Влияние ОГГ и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на относительное содержание (в %)  $C_{18}$  ЖК в мембранах митохондрий печени мышей: 1 – 18:3 $\omega$ 6, 2 – 18:2 $\omega$ 6, 3 – 18:1 $\omega$ 9, 4 – 18:1 $\omega$ 7.

другое [15]. Снижение содержания этих ЖК, возможно, так же как и снижение содержания линолевой кислоты, могло повлиять на устойчивость организма к стрессовым воздействиям. КП предотвращал изменения в содержании ненасыщенных  $C_{20}$  ЖК в мембранах митохондрий. При этом содержание эйкозеновой кислоты возросло более чем в пять раз по сравнению с контролем.

ОГГ, влияя на жирнокислотный состав мембран митохондрий, приводила к изменению биоэнергетических характеристик митохондрий. При этом максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии АДФ снижались на 28%, а в присутствии разобщителя (FCCP) – на 35%. Введение животным КП восстанавливало биоэнергетические характеристики митохондрий (табл. 2).

Влияя на функциональное состояние митохондрий препарат оказывал протекторный эффект в условиях стресса. Пятисуточное введение карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина в дозе  $10^{-6}$  моль/кг в 3.5–4.3 раза увеличивало продолжительность жизни и на 12–40% повышало выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии. При этом препарат увеличивал динамическую работоспособность животных: продолжительность плавания мышей с грузом в холодной воде увеличивалась более чем в три раза (табл. 3). Более того, препарат оказывал стимулирующее воздействие на семена пшеницы. Так, на третьи сутки появились проростки высотой 2–3 мм из семян, замоченных в растворах препарата (70% семян). В контроле семена только набухли и появились лишь единичные проростки (20%). На девятые сутки вес зеленой массы в опытной группе семян превышал контрольные значения на 51% ( $2.48 \cdot 10^{-3}$  М) и 68% ( $1.2 \cdot 10^{-3}$  М), а вес корней – на 13% ( $2.48 \cdot 10^{-3}$  М) и 24% ( $1.2 \cdot 10^{-3}$  М) (табл. 4).

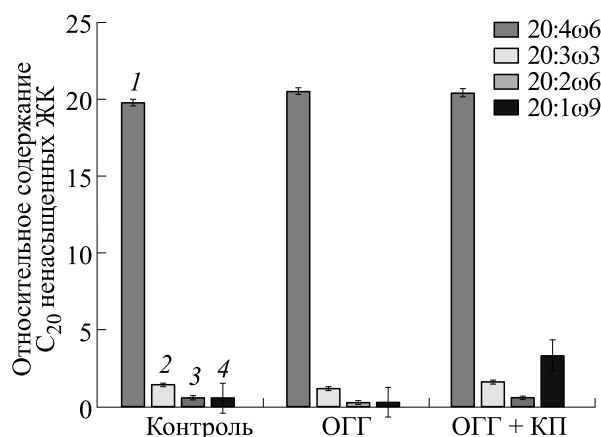


Рис. 6. Влияние ОГГ и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на относительное содержание (в %)  $C_{20}$  ЖК в мембранах митохондрий печени мышей: 1 – 20:4ω6, 2 – 20:3ω3, 3 – 20:2ω6, 4 – 20:1ω9.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании полученных данных можно прийти к заключению, что исследуемый препарат обладает антистрессовой активностью благодаря своим антиоксидантным и антирадикальным свойствам. Он представляет собой комплекс алкилпроизводного 3-гидроксипиридина и карнитина. Как и другие 3-гидроксипиридины, он является гетероциклическим аналогом ароматического фенолов, содержащим в ароматическом цикле гидроксильные и алкильные группы, что обеспечивает липофильность и антирадикальную активность этого соединения. Более того, наличие алкильной цепи в ароматическом цикле позволяет ему легко проникать в живые клетки [16]. Входящий в состав препарата 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин способен активно реагировать с перекисными радикалами липидов, радикалами пептидов и белков. Кроме этого, в качестве производного 3-гидроксипиридина он обладает спо-

Таблица 2. Влияние ОГГ и карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина на скорости окисления НАД-зависимых субстратов митохондриями мышей

Группа	$V_0$	$V_3$	$V_4$	$V_3/V_4$	FCCP
Контроль	$7.5 \pm 1.5$	$30.8 \pm 1.1$	$8.0 \pm 0.4$	$3.85 \pm 0.03$	$31.5 \pm 1.2$
ОГГ	$9.3 \pm 1.3$	$22.4 \pm 1.5$	$10.3 \pm 0.2$	$2.17 \pm 0.02$	$20.4 \pm 1.1$
ОГГ+КП	$7.0 \pm 1.8$	$32.0 \pm 1.6$	$8.2 \pm 0.9$	$3.90 \pm 0.02$	$31.4 \pm 1.5$

Примечание. Скорости даны в нг·молях  $O_2$ /мг белка × мин по данным 10 опытов. Среда инкубации: 0.25 М сахарозы, 10 мМ Трис-НСl, 2 мМ  $KH_2PO_4$ , 5 мМ  $MgSO_4$ , 10 мМ KCl, pH 7.5. Дополнительные добавки: 200 мкМ АДФ,  $10^{-6}$  М FCCP (карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразон), 4 мМ глутамата, 1 мМ малата. Обозначения:  $V_0$  – скорости окисления субстратов,  $V_3$  – скорости окисления субстратов в присутствии АДФ,  $V_4$  – скорости окисления в состоянии покоя (скорости окисления субстрата при исчерпании АДФ).



**Таблица 3.** Протекторная активность карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	[КП]·10 <sup>-6</sup> моль/кг
Подъем на высоту 11000 тыс. м (гипобарическая гипоксия)	Время жизни в минутах, % выживших	3.8 ± 1.2 11%	13.5 ± 2.0 35%
Инъекция нитрита натрия 250 мг/кг (гемическая гипоксия)	Время жизни в минутах, % выживших	4.1 ± 1.5 14%	12.3 ± 2.1 28%
Инъекция азиды натрия 20 мг/кг (цитотоксическая гипоксия)	Время жизни в минутах, % выживших	2,4 ± 0.5 0%	10.3 ± 0.9 40%
Плавание с грузом при температуре	Время жизни в минутах, % выживших	3.6 ± 0.5 0%	11.4 ± 1.1 12%

Примечание. Представлены результаты 10 опытов.

**Таблица 4.** Рост зеленой массы и корней пшеницы при обработке семян водным раствором карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина

№ п/п	[КП]·10 <sup>-3</sup> М	Вес зеленой массы, г	Прирост зеленой массы, г	% прироста зеленой массы, г	Вес корней, г	Прирост корней, г	% прироста корней, г
1	2.48	1.56 ± 0.08	0.53±0.03	57.3	3.61 ± 0.18	0.43 ± 0.02	13.40
2	1.20	1.73 ± 0.09	0.70±0.04	67.9	3.96 ± 0.20	0.77 ± 0.04	24.19
3*	0.00	1.03 ± 0.05	—	—	3.1 ± 0.16	—	—

Примечание. \* — Контроль (замачивание семян пшеницы в воде без препарата). Прирост зеленой массы на девятые сутки проращивания — 68% (1.2·10<sup>-3</sup> М КП). Прирост корней на девятые сутки проращивания — 24% (1.2·10<sup>-3</sup> М КП). Измеряли вес 50 побегов или 50 корней проростков пшеницы.

способностью повышать активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталазы и др.) [4]. В условиях стресса, когда активируется гипоталамо-гипофизарная система и увеличивается уровень глюкокортикоидов в крови, повышается активность моноаминоксидаз, приводящая к образованию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, избыточная генерация которой приводит к свободнорадикальному повреждению липидов, белков и нуклеиновых кислот. Показано, что производные 3-гидроксипиридина являются ингибиторами моноаминоксидаз и, следовательно, ингибируют ПОЛ, обладают антиапоптотическим и органопротекторным действием при различных стрессовых воздействиях [17]. Более того, производные 3-гидроксипиридина модулируют активность NF-κB-сигнальной системы, контролирующую процессы воспаления, пролиферации клеток и апоптоз [18].

Второй компонент препарата L-карнитин является антиоксидантом: он ингибирует свободнорадикальное окисление, а также подавляет генерацию активных форм кислорода ферментами в цитоплазме клеток и непосредственно в дыха-

тельной цепи митохондрий, что обусловлено образованием комплексов L-карнитина с ионами Fe<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup> в активных центрах ферментов. Показано, что антиоксидантное действие карнитина в значительной степени связано с окислительно-восстановительной сигнализацией в клетке. Так, L-карнитин усиливает регуляцию Nrf2 и PPARα и подавляет NF-κB, что приводит к экспрессии генов антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, глутатиопероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза и др. При этом L-карнитин повышает устойчивость организма к стрессу за счет активации синтеза протекторных молекул: белков теплового шока, сиртуинов, тиреоредоксинов и небольших молекул антиоксидантов [19].

L-Карнитин повышает энергетический статус организма за счет транспорта длинноцепочечных жирных кислот из цитозоля в матрикс митохондрий, где происходит β-окисление жирных кислот, он стабилизирует отношение коэнзим А/ацетил-коэнзим А (CoASH/acetylCoA) в митохондриях и снижает выработку лактата [20]. Особое значение имеет β-окисление жирных кислот, протекающее в митохондриях мышечных тка-

ней в условиях повышенных мышечных нагрузок. Именно наличием L-карнитина, вероятно, объясняется наблюдаемое повышение динамической работоспособности у мышей, получавших карнитинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина. Кроме того, повышая энергетический статус организма, препарат обладает ростостимулирующими свойствами для растений. При этом наиболее эффективной концентрацией препарата является  $1.2 \cdot 10^{-3}$  М.

### ВЫВОДЫ

На основании полученных данных можно предположить, что исследуемый препарат обладает антистрессовой активностью благодаря своим антиоксидантным и антирадикальным свойствам. Предотвращая перекисное окисление жирных кислот, входящих в состав липидной фазы мембран митохондрий, КП, вероятно, предотвращает дисфункцию митохондрий при стрессовых воздействиях и, следовательно, способствует сохранению энергетического метаболизма на высоком уровне, что, возможно, обеспечивает устойчивость организма к действию стрессовых факторов.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем огромную благодарность сотрудникам лаборатории фото- и хемилюминесцентных процессов Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН Ю. Б. Цаплеву за помощь в регистрации спектров флуоресценции конечных продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени мышей.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (номер государственной регистрации темы 44.4-1201253310) и Госзадания № 1220328000859).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования осуществлялись в соответствии с требованиями Этического комитета РАН по работе с использованием лабораторных животных, с соблюдением международных рекомендаций по медико-биологическим исследованиям (СИ-ОМС), согласно приказу Министерства здравоохранения и социального развития России «Об утверждении лабораторной практики. Правила»

(№ 708 от 23.08.2019) и другим нормативным документам по этой проблеме.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронина Т. А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия. *Фарматека*, **6**, 28–31 (2009).
2. Коробкин М. В., Пашин Е. Н., Бобер К. Е., Покровский М. В., Рагулина В. А., Артющкова Е. Б., Покровская Т. Г., Корокина Л. В., Цепелев В. Ю. и Даниленко Л. М. Изучение эндотелиопротективного и коронарного действия производных 3-оксипиридина. *Кубанский науч.-мед. вестн.*, **109** (4), 137–140 (2009).
3. Бугрова М. Л., Абросимов Д. А. и Яковлева Е. И. Влияние мексидола на мозговой натрийуретический пептид кардиомиоцитов в постреперфузионном периоде в эксперименте. *Современные технологии в медицине*, **7** (3), 40–47 (2015). DOI: 10.17591/stm2-15.7.3.05
4. Дюмаев К. М., Воронина Т. А. и Смирнов Л. Д. *Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС* (Изд-во Ин-та биомедицинской химии РАН, М. 1995).
5. Surai P. Carnitine Enigma: From antioxidant action to vitagene regulation. Part 2. Transcription factors and practical application. *Veterinary Sci.*, **2** (1), 66–84, (2015). DOI: 10.13188/2325-4645.1000018
6. Шляпинтох В. Я., Карпунин О. Н., Постников Л. М., Захаров И. В., Вичутинский А. А. и Цепалов В. Ф. 1966. *Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов* (Наука, М., 1966).
7. Каркищенко Н. Н. и Грачевой С. В. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* (Профиль, М., 2010).
8. Mokhova E. N., Skulachev V. P., and Zhigacheva I. V. Activation of the external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 415–423 (1977). DOI: 10.1016/0005-2728(78)90109-3
9. Fletcher B. I., Dillard C. D., and Tappel A. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues, *Anal. Biochem.*, **52**, 1–9 (1973). DOI: 10.1016/0003-2697(73)90327-8
10. Carreau J. P. and Dubacq J. P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatogr.*, **151** (3), 384 (1979). DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9Get
11. Wang J., Sunwoo H., Cherian G., and Sim I. S. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. *Poult Sci.*, **79** (8), 1168 (2000). DOI: 10.1093/ps/79.8.1168
12. Golovina R. V. and Kuzmenko T. E. Thermodynamic evaluation of the interaction of fatty acid methyl esters with polar and non-polar stationary phases, based on

- their retention indices. *Chromatography*, **10** (9), 545 (1977).
13. Каркищенко В. Н., Каркищенко Н. Н., Шустов Е. Б., Берзин И. А., Фокин Ю. В. и Алимкина О. В. Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой. *Биомедицина*, **4**, 34–46 (2016).
  14. Островская Р. У., Клейменова Н. Н., Камышева В. А., Молодавкин Г. М., Яворский А. Н. и Бойко С. С. В кн. *Фармакологическая коррекция утомления*, под ред. Ю. Г. Бобкова (Медицина, М., 1982), сс. 39–42.
  15. De Carvalho C. S. C. R., and Caramujo M. J. The Various roles of fatty acids. *Molecules*, **23** (10), 2583 (2018), DOI: 10.3390/molecules23102583
  16. Danilenko L. M., Skachilova S. Ya., Nadezhdin S. V., Timokhina A. S., Shcheblykina O. V., and Kotelnikova A. S. Pharmacological screening of substances with cardioprotective effect in the group of 3-oxypyridine derivatives. *Res. Result: Pharmacol.*, **4**, 125–131 (2018). DOI: 10.3897/grpharmacology.4.28414
  17. Волчегорский А., Синицкий А. И., Мирошниченко И. Ю. и Рассохина Л. М. Влияние производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты на активность моноаминоксидаз *in vitro*. *Хим.-фармацевт. журн.*, **52** (1), 3–7 (2018).
  18. Skachilova S. Ya., Ragulina V. A., Kostina D. A., and Burda Y. E. Test system for evaluation of the influence of the biological activity of substances on the signal system of NF-κB: focus on the derivatives of 3-hydroxypyridine. *Res. Result: Pharmacol. Clin. Pharmacol.*, **3** (2), 50–56 (2017). DOI: 10.18413/2313-8971-2017-3-2-50-56
  19. Асташкин Е. И. и Глейзер М. Г. Влияние L-карнитина на оксидативный стресс при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Мед. совет.*, **10**, 94–100 (2016).
  20. Gnoni A., Longo S., Gnoni G. V., and Giudetti A. M. Carnitine in human muscle bioenergetics: Can carnitine supplementation improve physical exercise? *Molecules*, **25** (1), 182 (2020). DOI: 10.3390/molecules25010182
  21. Русина И. Ф., Карпунин О. Н. и Касаикина О. Т. Хемилюминесцентные методы в исследовании ингибированного окисления. *Хим. физика*, **32** (8), 53, (2013). DOI: 10.7868/s0207401x13080098
  22. Беляков В. А., Васильев Р. Ф. и Федорова Г. Ф. Кинетика окси-хемилюминесценции и ее использование для анализа антиоксидантов *Кинетика и каталит.*, **45** (3), 355–362 (2004)
  23. Русина И. Ф., Вепринцев Т. Л. и Васильев Р. Ф. Антиоксидантная активность двухатомных фенолов. *Хим. физика*, **41** (2), 12–19 (2022). DOI: 10.31857/S0207401X22020108
  24. Жигачева И. В., Бинюков В. И., Русина И. Ф., Миль Е. М. и Генерозова И. П. Антиоксидантные и антирадикальные свойства ресвератрола и его антистрессовая активность. *Хим. физика*, **39** (7), 41–48 (2020). DOI: 10.1134/S1990793120040120

## Prevention of Mitochondrial Dysfunction with 2-Ethyl-6-Methyl-3-Hydroxypyridine Carnitinate

I.V. Zhigacheva\*, I.F. Rusina\*\*, N.I. Krikunova\*, Yu.V. Kuznetsov\*, M.M. Rasulov\*\*\*,  
M.A. Yakovleva\*, and A.N. Goloshchapov\*

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

\*\*N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

\*\*\*State Scientific Center “State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds”,  
shosse Entuziastov 38, Moscow, 105118 Russia

The biological activity of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine carnitinate was studied. This substance exhibited high antiradical and antioxidant activity. It could indicate that 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine carnitinate might have the ability to modulate stress-related alterations. The aim of this study was to examine the results supporting antistress property of this drug using a model of acute hypobaric hypoxia. Acute exposure to hypobaric hypoxia increased the rate of lipid peroxidation by 2.3 times, leading to changes in the content of C18 and C20 fatty acids in mitochondrial membranes: the double bond index of C18 fatty acids decreased by 18.2%, the content of 20:3 $\omega$ 3, 20:2 $\omega$ 6 and 20:1 $\omega$ 9 dropped by 13%, 80% and 33%, respectively. These changes were accompanied by changes in the bioenergetic characteristics of mitochondria. The maximum rates of NAD-dependent substrate oxidation decreased by 28–35%. Administration of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine carnitinate ( $10^{-6}$  mol/kg) to animals for 5 days suppressed lipid peroxidation, prevented changes in fatty acids composition of mitochondrial membranes, and, consequently, alterations in mitochondrial bioenergetics what most likely determined the anti-stress properties of the drug: 3.5–4.0-fold increase in life expectancy and 12–40% increase in the survival rate of mice under various types of hypoxia. The preparation was also able to enhance wheat seed germination and seedlings growth.

*Keywords: mitochondria, antioxidants, lipid peroxidation, fatty acids, hypoxia, dynamic performance*

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ БЛОКАДА ВЫСОКОПОРОГОВЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ L-ТИПА КАРДИОМИОЦИТОВ ВОССТАНАВЛИВАЕТ АКТИВНОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ, НАРУШЕННУЮ ВИБРАЦИЕЙ

© 2024 г. В.В. Воробьева\*., О.С. Левченкова\*\*, П.Д. Шабанов\*

\*Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376, Россия

\*\*Смоленский государственный медицинский университет, ул. Крупской, 28, Смоленск, 214019, Россия

#E-mail: v.v.vorobeva@mail.ru

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2023 г.

Перенос ионов кальция через клеточную мембрану кардиомиоцита сопряжен с преодолением высокого энергетического барьера и может быть нарушен воздействием вибрации. Поскольку лекарственные препараты группы блокаторов кальциевых каналов способны уменьшать повреждение митохондрий и клеточных мембран, оценено действие блокаторов кальциевых каналов нифедипина (адалата) в дозе 7.5 мг/кг на энергетический обмен кардиомиоцитов в условиях вибрационно-опосредованной (56 сеансов вибрации с частотой 44 Гц и амплитудой 0.5 мм) модели клеточной гипоксии. Функциональные состояния митохондрий в составе 30% гомогената ткани миокарда левого желудочка сердца кролика изучали полярографическим методом с помощью закрытого кислородного датчика гальванического типа в термостатируемой кювете объемом 1 мл при содержании белка в ячейке  $2.4 \pm 0.5$  мг, измеренного модифицированным микробиуретовым методом. У животных, подвергнутых вибрации на фоне блокаторов кальциевых каналов, скорость эндогенного дыхания ( $V_3$ ) удержалась на уровне интактных животных и составила  $16.4 \pm 4.1$  [нг-атом O]  $\text{мин}^{-1}\text{мг}^{-1}$  белка, чувствительность к амиталу возросла на 39%, а чувствительность к малонату снизилась на 40% по сравнению с показателями животных, подвергнутых вибрации без фармакологической защиты. Показатели соотношения активности митохондриальных ферментных комплексов I и II и процессов регуляции в разных метаболических состояниях митохондрий подтвердили восстановление активности митохондриального ферментного комплекса I, угнетенное воздействием вибрации, и регуляторное ограничение митохондриального ферментного комплекса II. Выявленное энергопротективное действие блокаторов кальциевых каналов повысило виброустойчивость ткани, предотвратив развитие в ней некротических изменений.

*Ключевые слова:* вибрация, энергетический обмен кардиомиоцита, митохондрии, блокаторы кальциевых каналов, тканевая гипоксия.

DOI: 10.31857/S0006302924020111, EDN: OUBAOP

Ионизированный кальций поступает в клетку через несколько типов кальциевых каналов клеточной мембраны, отличающихся по электрофизиологическим параметрам [1]. Кальциевые каналы активируются при высоких потенциалах на мембране (свыше  $-10$  мВ), характеризуются высокой проводимостью и очень медленной кинетикой инактивации ( $t < 500$  мс), регулируются

метаботропными рецепторами, сопряженными с G-белками [2], вторичным мессенджером в которых выступает циклический АМФ (цАМФ). Энергетический профиль медленного кальциевого канала L-типа имеет три энергетических барьера и две потенциальные энергетические «ямы», соответствующие наружному и внутреннему селективным фильтрам. Молекулярная структура подобного  $\text{Ca}^{2+}$ -канала [3] представлена пятью белковыми субъединицами, из которых  $\alpha_1$ -субъединица выполняет такие функции, как селективность, проводимость, чувствительность

*Сокращения:* БКК – блокаторы кальциевых каналов, МФК – митохондриальный ферментный комплекс, КП – коэффициент приращения, КС – коэффициент стимуляции, КР – коэффициент разобщения.

к мембранному потенциалу и блокирующим агентам. [4].

В клетках есть также внутриклеточные кальциевые каналы, локализованные в мембранах цитоплазматического матрикса и митохондрий, транспортирующие ионы кальция с помощью митохондриального  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортера [5], макромолекулярная структура которого функционирует параллельно с эндоплазматическим ретикулом благодаря наличию МАМ-контактов (мембраны, ассоциированные с митохондриями) [6], в которых высвобождаемые ионы кальция могут быть поглощены митохондриями. За освобождение ионов кальция из ретикулума в зону МАМ-контакта отвечают  $\text{IP}_3$  рецепторы ( $\text{IP}_3\text{R}$  – рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата), после контакта с которыми  $\text{Ca}^{2+}$  свободно движется в митохондрии через VDAC-каналы (порин) внешней митохондриальной мембраны благодаря функционированию белка-шаперона GRP75 (glucose-regulated protein 75), митофузину 2 (MFN2) и восьми белкам, содержащим домен PDZ (PDZ domain-containing protein 8). Все названные структуры функционально сопряжены и работают в зависимости от их окислительно-восстановительного потенциала [7]. Накопленный оргanelлами кальций освобождается через электронейтральные обменники типа  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (в печени) и  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  (в возбудимых тканях сердца и мозга), активность которых зависит от редокс-состояния мембраны митохондрий и от уровня восстановленности пиридиннуклеотидов [8]. Обмен ионов кальция на ионы натрия считается электрогенным со стехиометрией три иона  $\text{Na}^+$  на один ион  $\text{Ca}^{2+}$  и осуществляется переносчиком антипортером (60 кДа) внутренней мембраны митохондрий, способным выбрасывать ион  $\text{Ca}^{2+}$  в обмен на ионы  $\text{Na}^+$  или  $\text{Li}^+$  (NCLX- $\text{Na}^+/\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger) и принадлежащим к суперсемейству  $\text{Ca}^{2+}$ /катион<sup>+</sup>-антипортеров [9].

Концентрации цитоплазматического свободного кальция в животной клетке в состоянии покоя поддерживаются на определенном уровне (0.04–0.10 мкм), однако, существует целый ряд физических факторов, в частности, вибрация, воздействие которой вызывает дисбаланс кальция в клетке [10, 11], приводящий прежде всего к нарушениям функции сердечно-сосудистой системы у больных с вибрационной болезнью [12–14] и развитию тканевой и биоэнергетической гипоксии [15].

Как известно, свойства клеточных мембран можно модифицировать различными агентами, например, селективными блокаторами кальциевых каналов (БКК), дигидропиридиновые производные которых действуют на высокопороговые

кальциевые каналы L-типа, ответственные за сопряжение возбуждения и сокращения в клетках миокарда и сосудов [16–18]. На клеточном уровне в условиях эксперимента блокатор кальциевых каналов адалат (международное название – нифедипин) уменьшал или предотвращал повреждение митохондрий и клеточных мембран во время гипоксии благодаря уменьшению гиперкальциемии [16, 17, 19]. Однако детальные механизмы взаимодействия между проницаемостью клеточной мембраны для ионов кальция, измененной с помощью БКК, и активностью дыхательной цепи клетки на фоне гипоксии, вызванной вибрацией, не описаны.

Целью исследования явилось экспериментальное изучение взаимосвязи блокады кальциевых каналов клеточной мембраны с помощью антагониста кальциевых каналов производного диметилового эфира 1,4-Дигидро-2,6-диметил-4-(2-нитрофенил)-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты (адалата) и активностью митохондриальных ферментных комплексов (МФК) дыхательной цепи кардиомиоцитов кролика на модели вибрационно-опосредованной клеточной гипоксии [20].

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на кроликах-самцах породы *Oryctolagus cuniculus*, *Linnaeus* массой 2.5–3.0 кг в возрасте трех-четырех месяцев. Действие общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм осуществляли с помощью промышленной установки. Ежедневно в течение 56 суток проводили сеансы общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм и частотой 44 Гц по 60 мин во временной промежуток с 9.00 до 11.00 в осенне-зимний период.

В качестве средства фармакологической защиты использовали БКК с коммерческим названием адалат (нифедипин; Pliva, Хорватия) в разовой дозе 7.5 мг/кг массы животного. Препарат вводили в виде суспензии по 2 мл внутрипищеводно с помощью тонкого эластичного зонда за 60 мин до вибрационного воздействия. Интактные и контрольные животные, которых подвергали воздействию вибрации без фармакологической защиты, получали физиологический раствор.

После вскрытия грудной полости животного быстро извлекали сердце, иссекали часть миокарда в области верхушки и помещали в среду выделения фиксированного состава [20, 21], охлажденную до 0°C. Для имитации состава внутриклеточной среды использовали сложные солевые растворы. Концентрация компонентов среды выделения: 250 ммоль сахарозы, 10 ммоль трис-НCl (pH 7.2). Концентрация компонентов среды инкубации: 10 ммоль трис-НCl (pH 7.2), 20 ммоль

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 ммоль  $\text{MgSO}_4$ , 150 ммоль  $\text{KCl}$ . Происхождение реактивов: сахароза,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$  – «Реахим», Россия); трис- $\text{HCl}$  – Serva, Германия. Все растворы готовили *ex tempore* на бидистиллированной воде [21]. Из среды выделения и инкубации исключали этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) [22].

Кусочки ткани сердца массой примерно 250–300 мг после промывания от крови помещали в охлажденный стальной пресс с отверстием 1 мм и продавливали в калиброванный гомогенизатор Даунса из кварцевого стекла с тефлоновым пестиком при соотношении «среда выделения» : «ткань» = 1 : 2. Через 7–10 мин с момента извлечения тканей из организма животного получали 30%-ный гомогенат [23]. Энергетический обмен нативных митохондрий сердца в гомогенате изучали полярографическим методом, регистрируя скорости поглощения кислорода митохондриями при 37°C в 1 мл солевой среды инкубации, уравновешенной с кислородом воздуха, как описано в ранее опубликованных работах [15, 20].

Единицей измерения скорости дыхания митохондрий ( $V$ ) принимали [нг-атом O]  $\text{мин}^{-1}\text{мг}^{-1}$  белка. Вклад в эндогенную дыхательную активность митохондрий НАД- и ФАД-зависимых субстратов оценивали по данным ингибиторного анализа с амиталом или малонатом [24, 25], вычисляя чувствительность эндогенного дыхания ( $V_3$ ) к ингибиторам по формуле: «показатель чувствительности к ингибитору» =  $(1 - V_{\text{инг}}/V_{\text{энд}}) \cdot 100\%$ , где «показатель чувствительности к ингибитору» – чувствительность эндогенного дыхания к малонату (малонатчувствительность) или амиталу (амиталчувствительность);  $V_{\text{инг}}$  ( $V_{\text{ам}}$  или  $V_{\text{мал}}$ ) – скорость окисления эндогенных энергетических субстратов в присутствии соответствующего ингибитора в ячейке в концентрации 2 мМ.

Метаболические состояния митохондрий  $V_{\text{як}}$  и  $V_{\text{глу+мал}}$  «покоя» [26, 27] моделировали *in vitro* при варьировании экзогенных энергетических субстратов: ФАД-зависимого – янтарной кислоты 1 мМ или смеси НАД-зависимых субстратов – яблочной и глутаминовой кислот (малат + глутамат) по 3 мМ.

Введением в ячейку разобщителя 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) до 20 мкМ имитировали состояние АТФазной «активности» митохондрий и получали показатели  $V_{\text{як-днф}}$  и  $V_{\text{мал+глу-днф}}$  [26, 27].

Отклик митохондрий на неблагоприятный фактор *in vivo* оценивали не только по совокупности кинетических ( $V$ ), но и расчетных регуляторных параметров, которые количественно характеризовали переход митохондрий в разные состо-

яния (от эндогенного дыхания в состояние «покоя», от «покоя» в «активное» состояние). Для этого в доступных для нашего исследования метаболических состояниях митохондрий дополнительно ввели «регуляторные» коэффициенты приращения субстратного дыхания (КП) в состоянии покоя ( $\text{КП}_\text{п}$ ) и разобщения ( $\text{КП}_\text{р}$ ) [28]. Рассчитывали коэффициенты стимуляции (КС) и коэффициенты разобщения (КР), которые выражали в относительных единицах измерения.

С целью проведения морфологического анализа иссекали часть мышцы миокарда левого желудочка в области верхушки, помещали в 10%-й нейтральный раствор формалина, обрабатывали материал стандартным методом спиртово-парафиновой проводки. Окраску гистологических препаратов осуществляли гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакетов прикладных программ Excel 2002 и STATISTICA 6.0. Значимость межгрупповых различий оценивали параметрическим ( $t$ -критерий Стьюдента) и непараметрическим ( $U$ -тест Манна–Уилки) критериями в зависимости от типа распределения, который определяли в модуле «Basic Statistica/Tables. Frequency tables» пакета программ STATISTICA 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Энергетические возможности органов с импульсным характером функционирования (сердце, мышцы) отличаются от органов с постоянным уровнем функциональной активности (печень, мозг) [29–31]. В проведенных экспериментах для митохондрий миокарда интактных контрольных животных получены показатели метаболических состояний (табл. 1, 2), согласующиеся с литературными данными [32].

Экспериментальное изучение феномена воздействия вибрации на энергопродукцию миокарда показало, что по мере накопления максимальной для обсуждаемого исследования вибрационной дозы (56 сеансов с частотой 44 Гц и амплитудой 0.5 мм) вклад активности НАД-зависимого МФК снизился [33], что согласуется с представлениями о его большей уязвимости [34].

Активность ФАД-зависимого МФК постепенно повышалась (от 7 к 21 сеансу с частотой 44 Гц), свидетельствуя о его ведущей роли в поддержании функции дыхательной цепи в неблагоприятных условиях [34]. Однако после 56 сеансов вибрации наблюдали гиперактивацию сукцинатдегидрогеназной системы окисления с нарастанием морфогистологических признаков дистрофии в ткани миокарда вплоть до развития некротических изменений [15]. Анализ оснащенности митохондрий миокарда эндогенными энергетиче-



**Таблица 1.** Показатели кинетических параметров метаболических состояний митохондрий сердца интактных кроликов

Показатели	$M \pm m$
$V_3$	$16.3 \pm 4.3$
Амита́лчувствительность, %	$50.6 \pm 10.6$
Малонатчувствительность, %	$35.1 \pm 7.8$
$V_{\text{як}}$	$34.3 \pm 7.6$
$V_{\text{глу+мал}}$	$22.7 \pm 5.0$
$V_{\text{як-р}}$	$47.7 \pm 14.2$
$V_{\text{глу+мал-р}}$	$48.1 \pm 15.7$

Примечание. Скорости дыхания митохондрий сердца даны в (нг-атом О)  $\text{мин}^{-1}\text{мг}^{-1}\text{белка}$ . Указаны средние значения показателей с их 95%-ми доверительными интервалами.

скими субстратами в переживающих гомогенатах ткани сердца кролика подтвердил выявленные зависимости между физическими характеристиками вибрации и совокупностью биоэнергетических параметров [35], а также признаки угнетения в системе окисления янтарной кислоты, вероятно, вследствие торможения шавелевоуксусной кислотой (ЩУК-ового торможения), снижения доступности эндогенных субстратов к дыхательной цепи митохондрий, нарушения функции митохондриально-ретикулярной сети, ее распада и утрате регулирующей функции в адаптации [35] и развитие тканевой и биоэнергетической гипоксии [36].

На фоне адалата скорость эндогенного дыхания ( $V_3$ ) оставалась на уровне интактных животных (табл. 1), тогда как амита́лчувствительность повысилась на 39% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с группой вибрированных и на 40% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с показателем интактной группы животных. Малонатчувствительность уменьшилась на 40% ( $p < 0.05$ ) и сохранялась на уровне интактных животных (табл. 1). Коэффициент КП<sub>3</sub> уменьшался на 56%, что свидетельствовало о восстановлении и преобладании активности НАД-зависимых оксидаз подобно интактным животным (табл. 2). Скорость окисления композиции субстратов «глутамат + малат» в состоянии «покоя» увеличивалась на 27%, приближалась к показателю интактного контроля.

В окислении экзогенной янтарной кислоты наблюдали тенденцию к уменьшению гиперактивации. Коэффициент КП<sub>п</sub> снижался на 35% (табл. 2), приближаясь к показателю интактных животных (1.51), что свидетельствовало о сохранности НАД-зависимого звена на фоне фармако-

логической защиты БКК, с одной стороны, и о регуляторном сдерживании гиперактивации сукцинатдегидрогеназы – с другой.

Скорость окисления ФАД-зависимых субстратов (экзогенной янтарной кислоты) была снижена незначительно и сохранялась на уровне интактных животных, однако коэффициент КП<sub>р</sub> уменьшался на 33%, оставаясь выше показателя интактного контроля (0.98). Это также свидетельствовало о том, что гиперактивация сукцинатдегидрогеназы снижалась и функционирование МФК II в митохондриях миокарда осуществлялось в более отрегулированном режиме на фоне фармакологической защиты.

Совокупность изменений, характеризующих метаболические состояния митохондрий миокарда в условиях защиты адалатом, свидетельствует о том, что характер вибропротективного действия БКК сводится к повышению активности НАД-зависимого участка дыхательной цепи и регуляторному сдерживанию гиперактивации сукцинатзависимого окисления.

Если неблагоприятные эффекты вибрации неизменно вызывали дистрофию кардиомиоцитов, уменьшение капиллярной сети, спазм артериол, увеличение межклеточного и межпучкового отека, очаги кровоизлияний и некроза, то гистоморфологическая картина ткани миокарда у животных, получавших адалат, была более благоприятна. В частности, в кардиомиоцитах наблюдались признаки набухания и зональной дистрофии, признаки компенсаторной гипертрофии отсутствовали, стромально-клеточная реакция была представлена преимущественно лимфоцитарными элементами. Несмотря на то, что степень полнокровия в сосудах сердца оказалась значительно выраженной и отмечались диапедезные кровоиз-



Таблица 2. Показатели переходных метаболических состояний митохондрий сердца интактных кроликов

Показатели	$M \pm m$
$KC_{як}$	$2.1 \pm 0.7$
$KC_{глу+мал}$	$1.3 \pm 0.3$
$KP_{як}$	$1.4 \pm 0.5$
$KP_{глу+мал}$	$2.1 \pm 0.6$
$KП_{э}$	0.79
$KП_{п}$	1.51
$KП_{р}$	0.98

Примечание:  $KC_{як}$  и  $KC_{глу+мал}$  – коэффициенты стимуляции;  $KP_{як}$  и  $KP_{глу+мал}$  – коэффициенты разобщения;  $KП$  – коэффициент приращения скоростей дыхания митохондрий: исходного или эндогенного ( $KП_{э}$ ), в состоянии покоя при нагрузке субстратами ( $KП_{п}$ ), на фоне применения разобщителя 2,4- ДНФ ( $KП_{р}$ )

лияния, дистрофические изменения были ограничены, признаки некроза ткани отсутствовали.

Митохондрии разных тканей отличаются активностью кальцийтранспортирующих систем [37], и по кинетическим параметрам энергозависимые системы поглощения и выделения ионов кальция в митохондриях мозга и миокарда существенно превосходят системы печени, почек, легких [38, 39]. Так как в митохондриях функционирует целый ряд кальцийзависимых ферментов (пируватдегидрогеназа, НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа, пирофосфатазы, АТФ-синтазы), между уровнями кальция и функциями митохондрий осуществляется взаимобратная связь [40]. Ионы  $Ca^{2+}$ , избыточно поступающие в клетку через потенциалзависимые медленные кальциевые каналы клеточной мембраны, могут подавлять интенсивность дыхания в клетке, усиливать гликолиз, снижать содержание АТФ, разобщать окислительное фосфорилирование, активировать АТФ-потребляющие ферменты [41]. Феномен повышения продукции АФК под действием ионов кальция отмечается многими авторами [42] и представляется одной из причин патофизиологических последствий кальциевой перегрузки митохондрий.

Блокатор кальциевых каналов адонат, подавляя активность ионопроводящей поры кальциевого канала клеточной мембраны кардиомиоцитов в зоне  $\alpha 1$ -субъединицы, снижает уровни кальция в органеллах, что, вероятно, повышает окислительную и сохраняет сопрягающую активность МФК I, а также регуляторно сдерживает гиперактивацию ФАД-зависимого участка

дыхательной цепи (МФК II), содержащего метаболитные пуринергические G-белок-сопряженные рецепторы (GPR91) из семейства P2Y (лиганд – янтарная кислота).

Поэтому к известным эффектам дигидропиридиновых БКК, таким как снижение силы сердечных сокращений [43], уменьшение сердечного выброса, увеличение диастолического расслабления, снижение постнагрузки на миокард [16], можно добавить энергопротективное действие. Обнаруженная нами оптимизация работы МФК I и регулируемое фармакологическое ограничение гиперактивации МФК II обеспечивают «минимизацию» потребления  $O_2$ , сохранение синтеза АТФ в условиях вибрационно-опосредованной тканевой гипоксии и согласуются с современными представлениями о фармакодинамике блокаторов кальциевых каналов. Морфогистологический анализ подтверждает, что фармакологическая коррекция дисбаланса  $Ca^{2+}$  с помощью БКК при неблагоприятном воздействии вибрации является патогенетически обоснованной и может способствовать смягчению и устранению сердечно-сосудистых нарушений, вызванных вибрационным воздействием.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №№ 10-04-00473, 13-04-00186).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики проведения доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ Р 53434-2009) и Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ertel E. A., Campbell K. P., Harpold M. M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R. W., and Catterall W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **25**, 533 (2000).
- Ткачук В. А. и Авакян А. Э. Молекулярные механизмы сопряжения G-белков с мембранными рецепторами и системами вторичных посредников. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **94** (12). 1478 (2008).
- Catterall W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 521 (2000).
- Foell J. D., Balijepalli R. C., Delisle B. P., Yunker A. M. R., Robia S. L., Walker J. W., McEnery M. W., January C. T., and Kamp T. J. Molecular heterogeneity of calcium channel  $\beta$ -subunits in canine and human heart: evidence for differential subcellular localization. *Physiol. Genomics*, **17**, 183 (2004).
- Hrynevich S. V., Waseem T. V., and Fedorovich S. V. Estimation of the mitochondrial calcium pool in rat brain synaptosomes using rhod-2 am fluorescent dye. *Biophysics*, **62** (1), 75 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917010079
- Leung A. W., Waranyuwatana P., and Halestrap A. P. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J. Biol. Chem.*, **283**, 26312 (2008). DOI: 10.1074/jbc M805235200
- Hirabayashi Y., Kwon S.K., Paek H., Pernice W.M., Paul M.A., Lee J., Erfani P., Raczkowski A., Petrey D.S., Pon L.A., Polleux F. ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca<sup>2+</sup> dynamics in mammalian neuros. *Science*, **358**, 623 (2017). DOI: 10.1126/science.aan6009
- Зинченко В. П., Каймачников Н. П., Долгачева Л. П. и Черных А. М. Регуляция и функциональное значение рецепторзависимого Ca<sup>2+</sup> сигнала митохондрий. В сб. *Матер. симп. «Митохондрии, клетки и активные формы кислорода»* (Пушино, 2000), 179.
- Palty R., Silverman W. F., Hershfinkel M., Caporale T., Sensi S. L., Parnis J., Nolte C., Fishman D., Shoshan-Barmatz V., Herrmann S., Khananshvil D., and Sekler I. NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 435 (2010).
- Коломиец В. В. О патофизиологической роли нарушений обмена кальция в развитии ангиодистонического синдрома вибрационной болезни. *Гигиена труда и проф. заболевания*, **10**, 21 (1987).
- Костюк И. Ф. и Капустник В. А. Роль внутриклеточного обмена кальция в развитии вазоспастических реакций при вибрационной болезни. *Медицина труда и пром. экология*, № 7, 14 (2004).
- Кирияков В. А., Павловская Н. А., Лапко И. В., Богатырева И. А., Антошина Л. И. и Ошкодеров О. А. Воздействие производственной вибрации на организм человека на молекулярно-клеточном уровне. *Медицина труда и пром. экология*, № 9, 34 (2018). DOI: 10.31089/1026-9428-2018-9-34-43
- Корзенева Е. В. и Синева Е. Л. Заболевание сердечно-сосудистой системы у рабочих ведущих профессий горнорудной и машиностроительной промышленности. *Медицина труда и пром. экология*, № 10, 26 (2007).
- Мелентьев А. В., Серебряков П. В. и Жеглова А. В. Влияние шума и вибрации на нервную регуляцию сердца. *Медицина труда и пром. экология*, № 9, 19 (2018).
- Vorobieva V. V. and Shabanov P. D. Exposure to whole body vibration impairs the functional activity of the energy producing system in rabbit myocardium. *Biophysics*, **64** (2), 337 (2019). DOI: 10.1134/2FS0006350919020210
- Vater W., Kroneberg G., and Hoffmeister F. Pharmakologie von 4-(2 Nitrophenyl)-2, 6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3, 5-dicarbonsauredim ethylester (Bay a 1040, Nifedipine). *Arzneim. Forsch.*, **22**, 1 (1972).
- Abernethy D. R. and Soldatov J. Structure-functional diversity of human L-type Ca<sup>2+</sup> channel: perspective for new pharmacological targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300** (3), 724 (2002). DOI: 10.1124/jpet.300.3.724
- Pogzig H. and Becher C. Voltage-dependent cooperative in interactions between Ca-channel blocking drugs in intact cardiac cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **560**, 306 (1994).
- Clarc R. E., Christieb I. Y., Henry P. D., Fischer A. E., Nora J. D., Williamson J. R., Sobel B. E. Nifedipine: a

- miocardial protective agent. *Amer. J. Cardiol.*, **44** (5), 825–831 (1979). DOI: 10.1016/0002-9149(79)90204-2
20. Воробьева В. В. и Шабанов П. Д. Вибрационная модель гипоксического типа клеточного метаболизма, оцененная на кардиомиоцитах кролика. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **147** (6), 712 (2009).
21. Солодовникова И. М., *Морфофункциональные характеристики митохондрий кардиомиоцитов изолированных кусочков миокарда при инкубации в условиях гипоксии*. Дис. ...канд. биол. наук (Москва, 2007).
22. Захарченко М. В., Хундерякова Н. В. и Кондрашова М. Н. Важность сохранения биофизической организации выделенных митохондрий для выявления физиологической регуляции их функций *Биофизика*, **56** (5), 840 (2011).
23. *Руководство по изучению биологического окисления полярнографическим методом*, под ред. Г. М. Франка и М. Н. Кондрашовой (Наука, М., 1973).
24. Никольс Д. *Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию* (Мир, М., 1985).
25. Коваль А. Н., Грицук А. И. и Свергун В. Т. Параметры тканевого дыхания миокарда белых крыс при продолжительной инкорпорации радиоцезия. В сб. Матер. Всерос. раб. сов. «Митохондрии в патологии» (Пушино, 2001), с. 125.
26. Chance B. and Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **217** (1), 324 (1955).
27. Chance B. and Hollunger G. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **236** (5), 1534 (1961).
28. Маевский Е. И., Розенфельд А. С., Гришина Е. В. и Кондрашова М. Н. *Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий* (Пушино, 2001).
29. Akopova O. V., Nosar V. I., Mankovskaya I. N., and Sagach V. F. Effect of potential-dependent potassium uptake on production of reactive oxygen species in rat brain mitochondria. *Biochemistry*, **73**, (10), 1429 (2008). DOI: 10.1134/s0006297914010076
30. Brustovetsky N. N., Maevsky E. I., Kolaeva S. G., Danilova L. S., and Solomonov N. G. Regulation of the degree of coupling of oxidation with phosphorylation in rat liver mitochondria: relation to thermogenesis *Biochem. Physiol.*, **82** (3), 545 (1985).
31. Koves T. R., Noland R. C., Bates A. L., Henes S. T., Muoio D. M., and Cortright R. N. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am. Physiol. Cell. Physiol.*, **288**, (1), 1074 (2005). DOI: 10.1152/ajpcell.00391.2004
32. Grishina E. V., Maevsky E. I., Brustovetsky N. N., and Okon M. S. Energy efficiency of anaerobic substrate transformation in mitochondria in rats. *Hypoxia Med. J.*, **2**, 30 (1996).
33. Vorobieva V. V. and Shabanov P. D., Tissue-specific peculiarities of vibration-induced hypoxia in rabbit liver and kidney. *Bull. Experim. Biol. Med.*, **167** (5), 621 (2019) DOI: 101007/s10517-019-04583-0
34. Лукьянова Л. Д. *Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты* (Медицина, М., 2004).
35. Воробьева В. В. и Шабанов П. Д. Тканеспецифические особенности вибрационно-опосредованной гипоксии сердца, печени и почки кролика. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **14** (1), 46 (2016). DOI: 10.17816/RCF14146-62
36. Погорелов А. Г., Погорелова В. Н. и Дубровкин М. И. Активация специфических мембранных механизмов мышечной клетки сердца на начальной стадии ишемии. *Биофизика*, **47**, 744 (2002).
37. Дерябина Ю. И., Исакова Е. П. и Звягильская Р. А. Ca<sup>2+</sup>-транспортирующие системы митохондрий: свойства, регуляция, таксономические особенности. *Биохимия*, **69** (1), 114 (2004).
38. Авдонин П. В. и Ткачук В. А. *Рецепторы и внутриклеточный кальций* (Наука, М., 1994).
39. Белостоцкая Л. И., Чайка Л. А. и Гомон О. Н. Влияние циннаризина на митохондриальную систему окисления мозга, антиоксидантную активность крови и поведение крыс при гипоксии. *Эксперим. клин. фармакология*, **66** (6), 16 (2003).
40. Кудюков Д. Н. и Векшин Н. Л. О «набухании» митохондрий под действием пальмитиновой кислоты, кальция и гипотонии. *Биофизика*, **61** (4), 736 (2016).
41. Chastukhin D. S., Borodin A. V., and Khodorov B. I. Mathematical modeling of delayed calcium deregulation in brain neurons caused by hyperstimulation of glutamate receptors. *Biophysics*, **59** (2), 236 (2014). DOI: 10.1134/s0006350914020067.
42. Facundo H. T. F., de Paula J. G., and Kowaltowski A. J. Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**, 75–82 (2005). DOI: 10.1007/s10863-005-4130-1.
43. Катцунг Б. Г. *Базисная и клиническая фармакология*, в 2-х томах (Бином, Диалект, М., 2004).

## Pharmacological Blockade of High Threshold L-Type Calcium Channels in Cardiomyocytes Restores Respiratory Chain Activity Disturbed by Vibration

V.V. Vorobieva\*, O.S. Levchenkova\*\*, and P.D. Shabanov\*

\**Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

\*\**Smolensk State Medical University, ul. Krupskoj, 28, Smolensk, 214019 Russia*

The transport of calcium ions across the cardiomyocyte cellular membrane is associated with crossing a high energy barrier and can be dysregulated by the vibration. Calcium channel blockers are a group of medication that reduce damage of mitochondria and cell membranes. In this study, the effects of nifedipine (adalat), a calcium channel blocker drug, 7.5 mg/kg on energy metabolism of cardiomyocytes which underwent vibration-induced hypoxia (exposure to 56 vibration sessions at a single frequency, 44 Hz with an amplitude of 0.5 mm) were evaluated. The functional states of mitochondria in 30% rabbit left ventricular myocardial tissue homogenate were studied polarographically using a closed galvanic oxygen sensor in a 1 ml cuvette with thermostatic holder, the protein concentration in the system was  $2.4 \pm 0.5$  mg and a modified microbiuret method was used for protein determination. In animals injected with calcium channel blockers and exposed to vibration, the rate of endogenous respiration ( $V_o$ ) remained at the level as in intact animals and was  $16.4 \pm 4.1$  [ng-atom O]  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  protein, amytal sensitivity increased by 39%, and malonate sensitivity decreased by 40% as compared to animals that were not injected with calcium channel blockers but exposed to vibration. The indices of the ratio of the activity of mitochondrial enzyme complex I and complex II and the processes of regulation of mitochondria in different metabolic states indicate that the activity of mitochondrial complex I, inhibited by vibration, is restored and mitochondrial complex II exhibits limited regulatory functions. This study has shown the energy-protective action of calcium channel blockers, due to which tissue resistance in response to vibration increases, thereby preventing the development of necrotic changes in the tissue.

*Keywords: vibration, cardiomyocyte energy metabolism, mitochondria, calcium channel blockers, tissue hypoxia*

## ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОГО ЛИЗИСА НА ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА КУЛЬТУРОЙ ЧЕРНОМОРСКОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Tetraselmis viridis*

© 2024 г. С.А. Шоларь\*, #, О.А. Степанова\*\*, ##

\*ФИЦ «Морской гидрофизический институт РАН», Капитанская ул., 2, Севастополь, 299011, Россия

#E-mail: sa.sholar@mail.ru

\*\*Институт природно-технических систем РАН, ул. Ленина, 28, Севастополь, 299011, Россия

##E-mail: solar-ua@ya.ru

Поступила в редакцию 27.02.2023 г.

После доработки 03.03.2023 г.

Принята к публикации 16.06.2023 г.

С помощью спектрофотометрии изучено влияние вирусного лизиса на поглощение света в инфицированной вирусом культуре микроводоросли *Tetraselmis viridis* на фоне контрольного роста неинфицированной культуры. Отработаны некоторые методические особенности проведения многодневных экспериментов с учетом природных титров альговирюсов, равных объемов составных микробиоты (альговирюсы или питательная среда, культуры микроводоросли) и условий (температура, освещенность) в опыте и контроле с предотвращением возможности вирусной контаминации микроводоросли в контроле. Установлено, что в динамике экспериментов во время разрушения (лизиса) хозяев вирусюв (клеток микроводоросли) отмечается увеличение количества растворенного органического вещества.

*Ключевые слова:* *Tetraselmis viridis*, поглощение света, спектрофотометрия, интегрирующая сфера, морские альговирюсы, микробиота.

DOI: 10.31857/S0006302924020125, EDN: OTYFVU

Автохтонные вирусюв водоемов, являясь самыми многочисленными среди гидробионтов, занимают ключевую позицию в экологическом контроле планктонных микроорганизмов, в том числе представителей значимого в глобальной экологии нашей планеты фитопланктона [1, 2]. Известно, что вирусюв, в том числе и водные, могут быстро лизировать (разрушать до растворимого состояния) своих одноклеточных хозяев и в ряде случаев очищать мутную водную среду их обитания, что предлагалось применять в практике для прекращения «цветения» цианобактерий в естественных и искусственных водоемах [3]. На основании литературных данных логично утверждать, что вирусный лизис вызывает заметные изменения форм, размеров и численности своих одноклеточных хозяев (бактерий, микроводорослей, простейших), что в итоге приводит к изменению оптических свойств, например, поглощения, рассеяния и затухания света водной среды их обитания. Анализ имеющихся сведений по данной проблеме отражен в литературном обзоре [4], куда были включены и наши первые результаты изучения возможной роли вирусного лизиса в оптике моря с использованием изобретенной на базе Морского гидрофизического института лабор-

аторной установки [5]. Таким образом, следует резюмировать, что вирусная инфекция оптически значимых биологических частиц (бактерий, микроводорослей, простейших) представляет собой еще один процесс, который может быстро трансформировать планктонные клетки в новые типы оптически значимого материала (окрашенное растворенное органическое вещество и детрит, в том числе осколки и обломки разрушенных в результате вирусного лизиса клеток-хозяев вирусюв). Следовательно, вирусный лизис в гидросфере оказывает значительное влияние на оптические свойства воды, в том числе и морской. Такой современный подход настоятельно рекомендует учитывать водные вирусюв и вирусный лизис в физике (оптике) моря, как и всей гидросферы.

Особый интерес у исследователей вызывает вирусный лизис фитопланктона, являющегося основой водной, как и морской, пищевой цепи и играющего жизненно важную роль в обогащении среды, в том числе и атмосферы, кислородом; в углеродном цикле, при поглощении CO<sub>2</sub> из атмосферы, что, в свою очередь, отражается и на климате нашей планеты. По данным исследователей, прекращение «цветения» (сезонный пик числен-

ности) фитопланктона вирусной инфекцией может сместить баланс между эукариотическими и прокариотическими переработчиками его биомассы [6].

Для некоторых представителей фитопланктона процесс вирусного лизиса, в том числе и на уровне оптических изменений, подробно описан, что отражено в нашем литературном обзоре [4]. Однако для многих других значимых для экологии гидросферы представителей фитопланктона таких исследований пока проведено не было. В частности, вирусный лизис черноморских микроводорослей, в том числе определяемых учеными как наиболее распространенных в Черном море [7], изучен пока недостаточно. По нашему мнению, вирусный лизис каждого отдельного вида микроводорослей может отличаться своими особенностями и спецификой, в том числе и в изменениях оптических характеристик, сопутствующих контакту вируса с клетками хозяина в водной среде их обитания.

Широко распространенная в черноморской среде микроводоросль *Tetraselmis viridis* относится к наиболее перспективным источникам биологически ценных продуктов из микроводорослей, стимулирующих рост и выживаемость личинок рыб и повышающих качество конечной продукции [8–12]. Из литературных данных известно, что в морских видах микроводорослей определяется высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот, которые важны не только для аквакультуры, но и для здоровья человека, особенно  $\omega_3$ - и  $\omega_6$ -кислоты [13–15].

Цель работы – путем экспериментов с использованием спектрофотометрии установить изменения поглощения света черноморской микробиоты, в состав которой включали культуру микроводоросли *Tetraselmis viridis*, моделируя пик «цветения», и альговирус этой микроводоросли.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

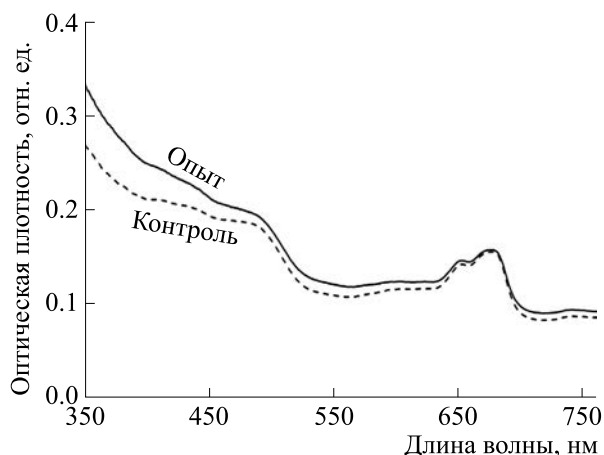
В работе использовали жидкую альгологически чистую культуру микроводоросли *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E. Norris, Hori & Chihara, 1980 из коллекции живых культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» (Севастополь, Россия), которую в дальнейшем поддерживали в стабилизирующей питательной среде Гольдберга в лабораторных условиях на базе Института природно-технических систем РАН. В качестве альговируса этой микроводоросли использовали штамм TvV-S11, свойства которого, как и состав его генома, описаны ранее [16, 17]. Инфекционный титр альговируса в ходе опытов для контакта с клетками микроводоросли применяли в

приближенном к природным значениям величинам –  $10^5$  IE/мл [16].

Эксперименты выполняли с использованием в опыте смеси в бактериологической пробирке культуры микроводоросли объемом 4.0 мл и вирусной суспензии объемом 1.0 мл. В контроль, кроме культуры микроводоросли в объеме 4.0 мл, добавляли пастеризованную морскую воду или стабилизирующую питательную среду Гольдберга в идентичном вирусной суспензии объеме – 1.0 мл. Такие условия – близкое к природному значение инфекционного титра альговируса, соответствующее понятиям его концентрации, а также подготовка опыта и контроля в описанных объемах (4 к 1) позволили замедлить и продлить процесс вирусного лизиса на несколько дней, что дало возможность проводить спектрофотометрическое исследование до семи суток.

Измерения проводили с помощью спектрофотометра MC 122A (ООО «СОЛ инструментс», Минск, Беларусь) в кювете 1 см, для чего из бактериологических пробирок, где размещали опыт и контроль, отбирали аликвоты (по 3.5 мл) один раз в день в утренние часы. Для измерения «нуля» использовали стабилизирующую среду Гольдберга, применяемую для поддержания культуры микроводоросли в логарифмической фазе роста в лабораторных условиях. Поскольку исследование в данном направлении (спектрофотометрическое изучение вирусного лизиса черноморской микробиоты в динамике) проводилось нами впервые, это потребовало отработки не только определенных условий в подготовительном процессе экспериментов, но и некоторого усовершенствования в методическом плане, например, учета того, что кюветы могут загрязняться альговирусом, а это предполагает контаминацию контроля, а также возможное испарение содержимого опытных и контрольных проб и др.

Логично, что для предотвращения возможной вирусной контаминации контрольной пробы в первую очередь изучали аликвоту неинфицированной культуры микроводоросли. Затем после промывки кюветы дистиллированной водой (для устранения возможного повышения концентрации клеток в опыте за счет оставшихся в кювете клеток из контроля) приступали к спектрофотометрическим измерениям инфицированной микроводоросли из опытной пробы. После этого кювету промывали вначале проточной, а затем дистиллированной водой и оставляли в дистилляте до начала следующих измерений (до утра). Перед измерением кювету обрабатывали спиртом, высушивали феном, ополаскивали дистиллированной водой, оставляя с дистиллированной водой не менее чем на 30 мин. Перед каждым измерением кюветы протирали хлопчатобумажной тканью.



**Рис. 1.** Спектры поглощения света культурой *Tetraselmis viridis* на момент начала эксперимента (в течение часа). Пунктирная линия – контроль роста и развития культуры (без альговируса); сплошная линия – опыт, контакт клеток культуры микроводоросли с альговирусом (инфицированная альговирусом культура микроводоросли).

В содержимое пробирок опытных и контрольных проб после измерений доливали дистиллированную воду до начального уровня, начиная со вторых суток и до конца эксперимента, это было сделано для исключения расхода на испарение и остатки аликвот на стенках измерительной кюветы.

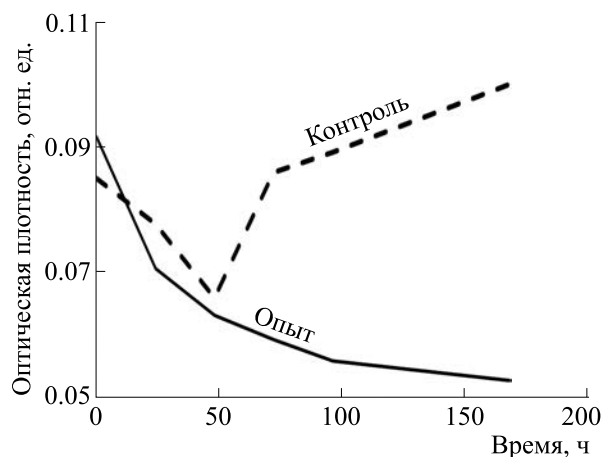
Спектрофотометрические измерения в аликвотах опытных и контрольных проб проводили трехкратно для получения и подтверждения стабильного результата. Используемый спектрофотометр был оснащен устройством диффузного пропускания и отражения с интегрирующей сферой [18], кювета размещалась перед интегрирующей сферой в кюветодержателе устройства.

В ходе проводимых экспериментов комнатное освещение было в пределах 250–300 лк (в зависимости от погоды и сезона), температура – 20°C – 24°C (комнатная).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры поглощения культуры из опыта (инфицированная альговирусом культура) и контроля (неинфицированная культура) используемой в эксперименте микроводоросли *T. viridis* в первый день эксперимента представлены на рис. 1.

Так как в «опытной» пробе, кроме живых клеток микроводоросли, присутствует вирусная суспензия (вирусный лизат с наличием обломков и осколков разрушенных и лизированных клеток), а в «контрольной» пробе – питательная среда, логично предположить, что в коротковолновой области спектра значения  $D$  в опыте (культура микроводоросли с вирусной суспензией) больше, чем



**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности культуры микроводоросли на длине волны 750 нм от времени.

в контроле (культура микроводоросли с питательной средой). Полученные в ходе экспериментов спектры (рис. 1) сравнимы с данными работ других исследователей, где представлены спектры изучаемой культуры микроводоросли [21].

На рис. 2 представлен график зависимости  $D_{750}$  (оптическая плотность  $D$  на длине волны 750 нм) от шкалы времени. Показатель  $D_{750}$  является косвенным показателем численности клеток используемых в экспериментах культур микроводорослей [20, 21].

В первые 48 ч на графике отражена адаптация культуры [19], как в контроле, так и в опыте. При этом первоначально отмечается снижение  $D_{750}$ , но с дальнейшим ростом в контроле (рост и развитие культуры) и продолжающемся снижением в опыте, что обусловлено вирусным лизисом («растворением» или разрушением) клеток.

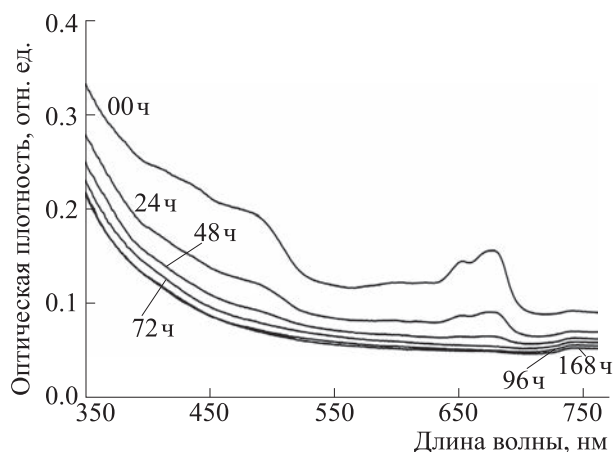
На рис. 3 представлена динамика изменения спектра поглощения света инфицированной альговирусом культурой в ходе эксперимента (от 0 ч до 168 ч).

Уже в первые сутки (24 ч) наблюдается заметное на графике снижение оптической плотности по сравнению с первоначальными значениями с дальнейшим уменьшением и исчезновением пиков поглощения на длине волны 675 нм и двух пиков на длинах волн 475 нм и 425 нм.

На рис. 4 показаны спектры поглощения света культурой микроводоросли в опытной и контрольной пробах в последний день эксперимента (спустя 168 ч).

Спектр поглощения света «контрольной» культуры (без вирусного лизиса) соответствует спектрам культуры *T. viridis*, представленным в работе других исследователей [21]. В результате вирусного лизиса спектр «опытной» культуры, в отличие от спектра контроля, не имеет пиков в

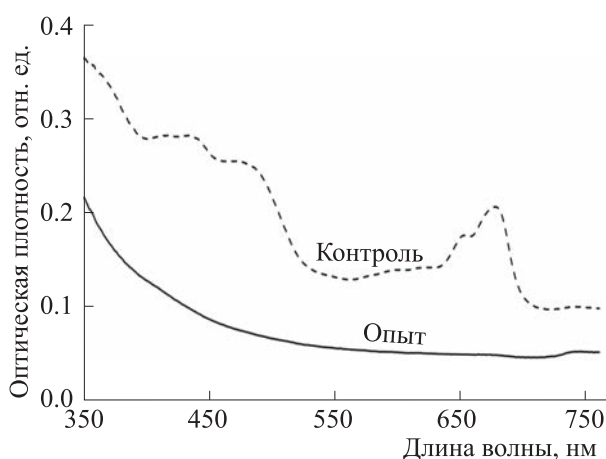




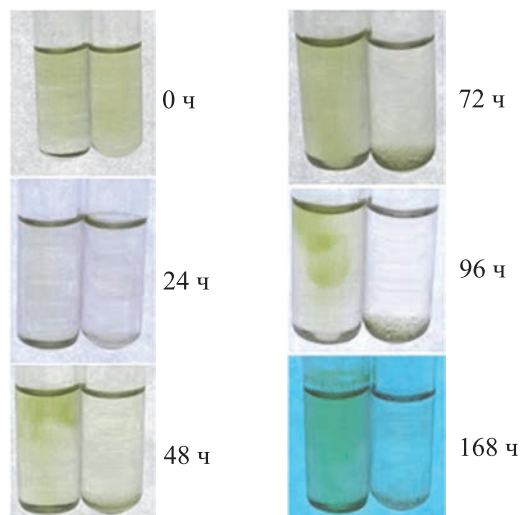
**Рис. 3.** Спектры поглощения света культурой *Tetraselmis viridis*, зараженной альговирусом TvV (штамм TV-S11).

области каротиноидов (440 и 475 нм) и хлорофилла *a* (675 нм). Также в спектре «опытной» культуры наблюдается максимум в коротковолновой области, что свидетельствует о наличии растворенного органического вещества. О подобных фактах упоминалось и в работах других исследователей [4, 22].

На протяжении пяти суток каждые 24 ч проводили фотографирование исследуемых образцов («опытные» и «контрольные» пробирки), также фотографии были сделаны через 168 ч. Фотографии делали в утренние часы перед началом измерений в спектрофотометре. Полученные фото представлены на рис. 5. Видно, что в первый день эксперимента (0 ч) нет видимых различий между контролем и опытом, однако через 48 ч эти разли-



**Рис. 4.** Спектр поглощения света культурой *Tetraselmis viridis* через 168 ч. Сплошная линия — контроль (культура микроводоросли без альговируса), пунктирная линия — опыт (культура с добавлением альговируса).



**Рис. 5.** Фотографии «опытных» и «контрольных» пробирок с культурой *Tetraselmis viridis* на разных сроках эксперимента: слева — контроль, справа — опыт (инфицированная альговирусом культура).

чия становятся заметны невооруженным глазом. Отличия заметны и на протяжении всего эксперимента, длительность которого составила 168 ч.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Впервые методом спектрофотометрии были проведены исследования динамики процесса вирусного лизиса культуры черноморской микроводоросли *Tetraselmis viridis* (опыт) в сравнении с процессом роста неинфицированной культуры («контроль»).

В ходе экспериментов были разработаны некоторые методические особенности постановки многодневных экспериментов с учетом природных титров альговирусов, равных объемов составных микробиоты (альговирусы или питательная среда, культуры микроводоросли) и условий (температура, освещенность) в опыте и контроле для предотвращения возможности вирусной контаминации микроводоросли в контроле.

Было установлено, что вирусный лизис изучаемой культуры *Tetraselmis viridis* приводил к изменению спектров поглощения света этой культурой и уменьшению численности клеток, причем сходные результаты были получены при трехкратном повторении эксперимента. Во время разрушения клеток «хозяев» в результате вирусного лизиса отмечается увеличение количества растворенного органического вещества.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания по госбюджетной теме МГИ РАН

FNNN-2024-0012 «Оперативная океанология» и ИПТС № 0012-2021-0010 «Разработка новых средств и измерительных информационных технологий исследований прирودных вод».

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fuhrman J. A. and Suttle C. A. Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography*, **6** (2), 51–63 (1993). DOI: 10.5670/oceanog.1993.14
- Suttle C. A. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature Rev. Microbiol.*, **5** (10), 801–812. (2007). DOI: 10.1038/nrmicro1750
- Mendzhul M. I., Lysenko T. G., and Syrchin S. A. Development of cyanobacterial phages at the Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine (History and perspectives). *Mikrobiol. Zhurn.*, **65** (1), 133–140 (2003). EDN: OHZKQG
- Sholar S. A. and Stepanova O. A. The Role of Viruses and Viral Lysis in Changing the Optical Properties of the Water Environment of their Habitat. *Biophysics*, **66** (2), 182–191 (2021). DOI: 10.1134/S0006350921020226
- Ли М. Е. Г. и Шоларь С. А. *Мобильная установка для определения в режиме удаленного доступа влияния штаммов черноморских альговирюсов и вирусного лизиса представителей фитопланктона на оптико-физические свойства морской воды*. Патент РФ на изобретение № 2759907 С1, Бюл. № 32 (2021). EDN: RSLILU
- Vincent F., Gralka M., Schleyer G., Schatz D., Cabrega-Brufau M., Kuhlisch C., Sichert A., Vidal-Melgosa S., Mayers K., Barak-Gavish N., Flores J. M., Masdeu-Navarro M., Egge J. K., Larsen A., Hehemann J.-H., Marrasé C., Simó R., Cordero O. X., and Vardi A. Viral infection switches the balance between bacterial and eukaryotic recyclers of organic matter during coccolithophore blooms. *Nature Commun.*, **14** (1), 510 (2023). DOI: 10.1038/s41467-023-36049-3
- Токарев Ю. Н., Финенко З. З. и Шадрин Н. В. *Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования* (ИнБИОМ, Севастополь, 2008). EDN: YWHYTV
- Горбунова С. Ю. и Тренкеншу Р. П. Опыт получения альгологически чистой культуры *Tetraselmis viridis* Rouch. в нестерильных условиях. *Вопр. соврем. альгологии*, **1** (22), 94–100 (2020). DOI: 10.33624/2311-0147-2020-1(22)-94-100, EDN: YMN LAP
- Das P., Thaher M. I., Hakim M. A. Q. M. A., Al-Jabri H. M. S. J., and Alghasal G. S. H. S. . A comparative study of the growth of *Tetraselmis* sp. in large scale fixed depth and decreasing depth raceway ponds. *Biore-source Technol.*, **216**, 114–120 (2016). DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.058
- Pulz O. and Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65** (6), 635–648 (2004). DOI: 10.1007/s00253-004-1647-x
- Griffiths M. J., van Hille R. P., and Harrison S. T. L. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.*, **24**, 989–1001 (2012). DOI: 10.1007/s10811-011-9723-y
- Kleivdal H., Chauton M. S., and Reitan K. I. *Industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA rich raw material in fish feed—Basis, knowledge status and possibilities* (SINTEF, Bergen, 2013).
- Bucher H. C., Hengstler P., Schindler C., and Meier G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Med.*, **112** (4), 298–304 (2002). DOI: 10.1016/S0002-9343(01)01114-7
- Whelan J. Dietary stearidonic acid is a long chain (n-3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits. *J. Nutrition*, **139** (1), 5-10 (). DOI: 10.3945/jn.108.094268
- Ulmann L., Blanckaert V., Mimouni V., Andersson M., Schoefs B., and Chénais B. Microalgal fatty acids and their implication in health and disease. *Mini Rev. Med. Chem.*, **17** (12), 1112–1123 (2017). DOI: 10.2174/1389557516666160722132736
- Stepanova O. A. Black Sea algal viruses. *Russ. J. Mar. Biol.*, **42** (2), 123–127 (2016). DOI: 10.1134/S1063074016020103
- Stepanova O. A., Воiko A. L., and Shcherbatenko I. S. Computational genome analysis of three marine algoviruses. *Mikrobiol. Zhurn.*, **75** (5), 76-81 (2013).
- <https://solinstruments.by/produkcija/spektrofotometriya/mc-122/dopolnitelnoe-oborudovanie/>
- Тренкеншу Р. П. и Лелеков А. С., *Моделирование роста микроводорослей в культуре* (ООО «Константа», Белгород, 2017). EDN: XTJPCN
- Новикова Т. М. Влияние средней поверхностной освещенности на ростовые характеристики *Tetraselmis viridis*. *Вопр. соврем. альгологии*, № 1 (13) (2017). EDN ZCDLNP.
- Чернышев Д. Н., Горбунова С. Ю. и Тренкеншу Р. П. Разделение спектров поглощения культуры и ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* на спектры отдельных пигментов. *Актуал. вопр. биол. физики и химии*, **5** (2), 232–238 (2020). EDN: UVYKFN
- Simis S. G. H., Tjeldens M., Hoogveld H. L., and Gons H. J. Optical changes associated with cyanobacterial bloom termination by viral lysis. *J. Plankton Res.*, **27** (9), 937–949 (2005). DOI: 10.1093/plankt/fbi068, EDN: IYRQHR

## Effects of Viral Lysis on Light Absorption Properties of Black Sea Microalgae *Tetraselmis viridis*

S.A. Sholar\* and O.A. Stepanova\*\*

\*Federal Research Center «Marine Hydrophysical Institute of the Russian Academy of Sciences»,  
Kapitanskaya ul. 2, Sevastopol, 299011 Russia

\*\*Institute of Natural and Technical Systems, Russian Academy of Sciences, ul. Lenina 28, Sevastopol, 299011 Russia

Spectrophotometry was used to investigate the effects of viral lysis on the absorbance properties of microalgal culture *Tetraselmis viridis* inoculated with virus, and compare them to control (growth of control culture of the microalgal culture without inoculated virus). Some peculiarities of methodological approach to conducting multi-day experiments were brought to attention, taking into the natural titers of algal viruses, equal volumes of the marine microbiota (algal viruses or nutrient medium, microalgal cultures) and conditions (temperature, illumination) in the experiment and control, preventing possible viral contamination of microalgae in the control. It has been established that in the dynamics of experiments during the destruction (lysis) of viral hosts (microalgae cells), an increase in the amount of dissolved organic material is observed.

*Keywords: Tetraselmis viridis, light absorption, spectrophotometry, integrating sphere, marine algal viruses, microbiota*

УДК 544.6

## СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ И УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДЫ ОТ ПАТОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ *Escherichia coli*

© 2024 г. С.Б. Бибиков\*, А.И. Сергеев\*\*, И.И. Барашкова\*\*,#, М.В. Мотякин\*. \*\*

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

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

#E-mail: irbarashk@rambler.ru

Поступила в редакцию 08.12.2023 г.

После доработки 08.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Исследовано совместное влияние электролиза и ультразвука на популяцию бактерий *E. coli* в водном растворе сульфата натрия. Определена кинетика инактивации бактерий при применении этих методов для очистки воды. Показано, что совместное действие ультразвуковой и электрохимической обработки водного раствора значительно увеличивает скорость инактивации бактерий. Высказано предположение, что за гибель бактерий ответственны гидроксильные радикалы, образующиеся в процессе комбинированной обработки. Установлена корреляция между скоростью образования гидроксильных радикалов и скоростью инактивации бактерий.

*Ключевые слова:* обеззараживание воды, электролиз, *Escherichia coli*, спиновая ловушка, ультразвук, гидроксильный радикал.

DOI: 10.31857/S0006302924020136, EDN: OTXLSM

Вода – важнейший ресурс нашей планеты. Вся жизнедеятельность человека связана с водой. С ростом населения земли и промышленности одновременно происходит рост потребления воды, следовательно, происходит и увеличение количества воды, загрязненной отходами человеческой деятельности. Разработка эффективных и безопасных методов очистки сточных вод для их дальнейшего использования, как в промышленности, так и для персональных потребностей человека, является актуальнейшей проблемой современности.

В настоящее время процесс очистки сточных вод, как правило, является многоступенчатым и включает в себя использование механических (отстаивание, фильтрование), физических (коагулирование, сорбция, флотация), химических (окисление, нейтрализация), биологических (аэробный, анаэробный) и других методов [1–3]. Одним из важных этапов очистки является дезинфекция, которая приводит к уничтожению патогенных микроорганизмов. Наиболее опасные патогены присутствуют в сточной воде, загрязненной фекалиями человека и животных. Индика-

тором патогенного загрязнения воды может служить *Escherichia coli* [4]. Бактерия *E. coli* относится к группе термотолерантных колиформных бактерий, которые способны вызвать серьезные кишечные расстройства и даже приводить к летальному исходу. Данные бактерии живут и размножаются в нижнем отделе пищеварительного тракта человека и теплокровных животных. Именно по *E. coli* проводится проверка качества воды с точки зрения микробного загрязнения и эффективности дезинфекции.

Традиционным методом дезинфекции является использование хлора. Хлор применяется в газообразном виде или образуется при электролизе водных растворов хлорида натрия [1–3]. Хлорирование является одним из самых дешевых и в то же время эффективных методов биологической очистки воды. Однако хлор токсичен и его использование при обработке воды приводит к образованию побочных химических веществ, среди которых хлорсодержащие токсины, мутагенные и канцерогенные вещества [5]. Альтернативой хлорированию являются озонирование, ультрафиолетовая иррадиация, электрохимические процессы, использование ультразвука [6–10]. Выбор метода дезинфекции в значительной степени

Сокращение: RNO – N, N-диметил-4-нитрозоанилин.

зависит от затрат энергии, особенно в тех случаях, когда необходимо обработать большое количество воды.

В последние десятилетия для обеззараживания и стерилизации загрязненной воды предложены различные методы с использованием электричества [10–12]. По сравнению с прямым хлорированием электрохимические методы демонстрируют гораздо более сильную дезинфицирующую способность [13, 14]. Например, показано, что гидроксильные радикалы, образующиеся при электрохимическом воздействии, подавляют жизнедеятельность биологических клеток в сточных водах [15], а их окислительные и бактерицидные свойства намного сильнее, чем у соединений хлора и сравнимы с озоном [13, 16].

Обработка ультразвуком также широко используется для инактивации бактерий [17–19]. Физико-химический механизм, с помощью которого ультразвук убивает микроорганизмы, до конца не изучен. Однако общепризнано, что бактерии могут быть инактивированы путем образования, роста и схлопывания микропузырьков в обработанной ультразвуком жидкости, что приводит к механическим воздействиям и сонохимическим реакциям [20–22].

В настоящей работе рассмотрено совместное действие электрохимической и ультразвуковой (20 кГц) обработки для очистки воды, загрязненной *E. coli*, определены особенности такого комбинированного воздействия на популяцию бактерий *E. coli*, выдвинуто предположение о механизме инактивации бактерий.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Образцы и материалы.** В экспериментах использовали деионизированную воду, которую получали с помощью Ultra-Pure Water System, Model D8961 (Barnstead/Thermolyne, США). *E. coli* ATCC® 15144™ приобретена на портале ATCC Genome Portal (США). Начальную бактериальную нагрузку *E. coli* в воде, а также бактериальную популяцию в анализируемых образцах определяли с помощью метода Pour Plate Method for Heterotrophic Plate Count. N,N-Диметил-4-нитроанилин (RNO) (Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве спиновой ловушки.

**Методы исследования.** В работе использовали установку с замкнутой циркуляцией воды (рис. 1), которая состояла из насоса, расходомера, пластиковой электрохимической ячейки с 10 электродами, изготовленными из сетки нержавеющей стали и установленными параллельно друг другу. Ультразвуковую обработку проводили с помощью установки Bandelin SONOPULS (Германия) с номинальной мощностью 70 Вт, частотой 20 кГц, диаметр ультразвукового излуча-

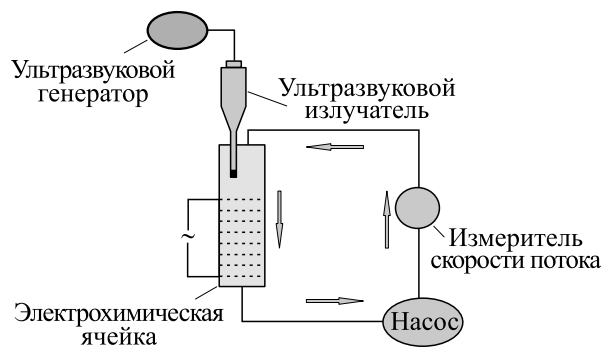


Рис. 1. Устройство для электрохимической и ультразвуковой обработки воды, загрязненной *E. coli*.

теля – 6 мм. Полезную мощность  $P_{\Pi}$ , выделяемую в контрольном опыте при облучении раствора воды массой  $m$ , определяли по повышению температуры  $\Delta T$  в термостатических условиях за время  $\Delta t$ :

$$P_{\Pi} = C \cdot m \cdot \Delta T / \Delta t,$$

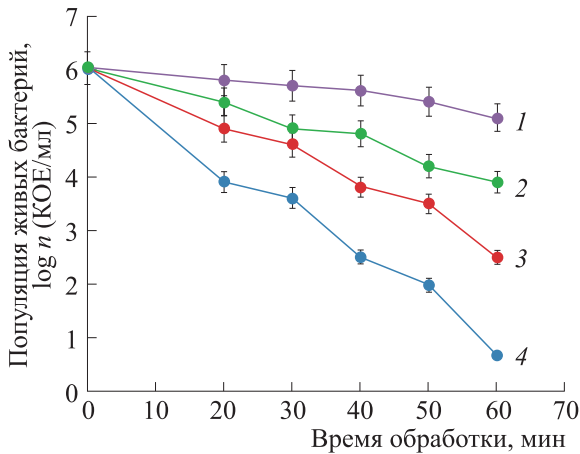
где  $C$  – теплоемкость воды (4.19 Дж/г°C),  $m = 100$  г,  $\Delta t = 120$  с. Среднее значение  $P_{\Pi} = 14.1 \pm 0.8$  Вт (4 измерения).

В качестве электролита использовали раствор сульфата натрия (Sigma-Aldrich, США) в воде с концентрацией 0.2%, слабый переменный ток от 0.25 до 0.30 А и начальное напряжение 21 В. Расход воды в системе составлял 0.63 л/с. Перед началом каждого эксперимента лабораторное оборудование дезинфицировали в течение 20 мин струей горячей воды при температуре 80°C. Через открытую крышку электрохимической ячейки отбирали образцы (10 мл) для микробиологического анализа и хранили их при температуре 4°C. Подсчет колоний *E. coli* проводили после 48-часового инкубационного периода при температуре 35°C.

Процесс образования гидроксильных радикалов контролировали по изменению линии спектра поглощения 440 нм при обесцвечивании раствора RNO. Спектры поглощения измеряли с помощью спектрофотометра Cary 60 (Agilent Technologies, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выполненные эксперименты по инактивации бактерий *E. coli* в деионизированной воде показали, что ультразвуковая и электрохимическая обработка, а также их совместное действие являются эффективными методами дезинфекции, приводящими к уменьшению количества колониеобразующих единиц бактерий в воде (рис. 2). Для количественных расчетов использовали кинетическую модель, предложенную в работах [2,



**Рис. 2.** Влияние времени обработки воды на концентрацию *E. coli* в 0.2%-ном растворе сульфата натрия: кривая 1 – только прокачка, кривая 2 – прокачка с ультразвуковой обработкой, кривая 3 – прокачка с электролизом, кривая 4 – прокачка с электролизом и одновременной ультразвуковой обработкой.

15, 19, 21]. Согласно этой модели, кинетика инактивации бактерий может быть описана уравнением:

$$\frac{dn}{dt} = -k(n)^x, \tag{1}$$

где  $t$  – время обработки,  $n$  – текущее количество колониеобразующих бактерий (КОЕ/мл),  $k$  – константа инактивации бактерий,  $x$  – порядок реакции инактивации бактерий.

Зависимость логарифма количества живых бактерий ( $\log n$ ) в воде, содержащей *E. coli*, от времени обработки ( $t$ ) представлена на рис. 2. Как видно из рисунка, все экспериментальные значения хорошо описываются линейной зависимостью, что указывает на первый порядок реакции инактивации бактерий. Интегрируя уравнение (1), получаем данную линейную зависимость:

$$\log n = \log n_0 - k \cdot t, \tag{2}$$

где  $n_0$  – начальное количество колониеобразующих единиц бактерий (КОЕ/мл).

Отметим, что константа инактивации бактерий ( $k, c^{-1}$ ) зависит от множества факторов, таких как величина тока при постоянном объеме обрабатываемой воды и постоянной площади поверхности электродов, частота и мощность ультразвуковой обработки. Определение данных зависимостей предполагается сделать в следующей работе.

Зависимости на рис. 2 позволяют рассчитать константу инактивации  $k$  и определить важный параметр процесса дезинфекции – минимальное время  $t_d$ , необходимое для полного уничтожения бактерий. Расчетная величина времени  $t_d$  соответствует точке пересечения экспериментальной линии с осью времени.

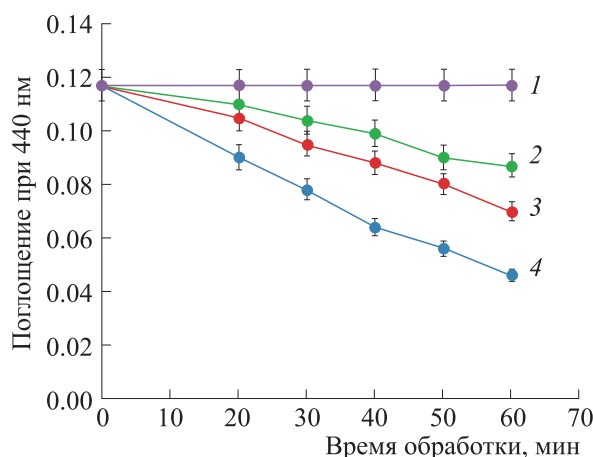
В табл. 1 приведены значения параметров  $k$  и  $t_d$ , рассчитанные для трех экспериментов, проведенных в одной и той же электрохимической ячейке, при одинаковых параметрах электролиза, одинаковой концентрации сульфата натрия и приблизительно одинаковой начальной концентрации бактерий. Первый эксперимент проводили с применением только ультразвуковой обработки; второй – только с применением электролиза и третий – с применением обоих видов обработки одновременно. Установлено, что при комбинированном воздействии электролиза и ультразвука для полной дезинфекции требуется меньше времени, чем в случае, когда применялась только электрохимическая обработка или только ультразвуковая обработка.

Одним из основных вкладов в наблюдаемый дезинфицирующий эффект, инициируемый электролизом и ультразвуком, может являться образование гидроксильных радикалов и их последующая реакция с бактериями [12, 13, 23]. Образующиеся гидроксильные радикалы способны к окислению клеточных стенок, что приводит к разрыву цитоплазматической мембраны и дальнейшему разрушению клетки. Также возможна их диффузия в клетку с последующим окислени-

**Таблица 1.** Значения констант инактивации бактерий ( $k$ ) и время, необходимое для полной дезинфекции воды ( $t_d$ )

Способ обработки	$\log n_0, \text{КОЕ/мл}$	$k, \text{мин}^{-1}$	$t_d, \text{мин}$
Ультразвук	6.03	0.0355	169.8
Электролиз	6.05	0.0617	98.1
Ультразвук и электролиз	6.01	0.0885	67.9

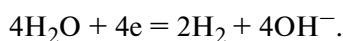




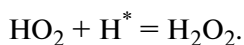
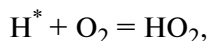
**Рис. 3.** Интенсивность поглощения в УФ-спектрах, измеренная при длине волны 440 нм, в зависимости от времени: кривая 1 – только прокачка, кривая 2 – прокачка с обработкой ультразвуком, кривая 3 – прокачка с электролизом, кривая 4 – прокачка с электролизом и одновременной ультразвуковой обработкой. Начальная концентрация N,N-диметил-4-нитрозоанилина составляла 1 мг/л ( $6.7 \cdot 10^{-6}$  М/л).

ем ферментов, нарушению синтеза белка и повреждению органелл. Отметим, что возможные реакции гидроксильных радикалов с микроорганизмами мало изучены.

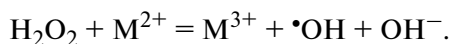
Механизм образования радикала  $\cdot\text{OH}$  при электролизе водных растворов был рассмотрен в работе [24]. Общепринятыми схемами анодного окисления и катодного восстановления являются следующие:



Образование атомарного водорода ( $\text{H}^*$ ) происходит на одной из промежуточных стадий в процессе катодного восстановления и может инициировать следующую последовательность реакций:

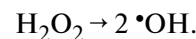
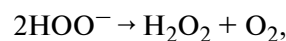
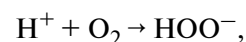


В присутствии металлических (М) электродов перекись водорода расщепляется на гидроксильные радикалы в соответствии с известной реакцией Фентона:



Механизм образования радикала  $\cdot\text{OH}$  при ультразвуковом облучении водных растворов был рассмотрен в работах [23, 25]. При прохождении ультразвуковой волны в воде образуются зоны сжатия и разрежения, что является причиной образования пузырьков воздуха, которые увеличиваются с каждым прохождением волны. Последующее схлопывание пузырьков – явление кавитации – характеризуется значительным повыше-

нием температуры и давления ( $\sim 5000$  К,  $\sim 100$  МПа). Такой эффект приводит к термической диссоциации водных паров с образованием  $\text{OH}^-$  и  $\text{H}^+$ . В данных работах была предложена следующая схема образования гидроксильного радикала:



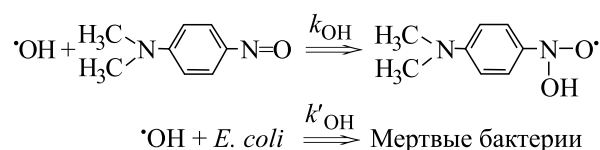
Для обнаружения гидроксильных радикалов в наших экспериментальных условиях в качестве спиновой ловушки использовали N,N-диметил-4-нитрозоанилин [26]. Выбор данного соединения обусловлен тем, что реакция RNO с гидроксильными радикалами очень избирательна и имеет высокую скорость.

Спектры поглощения RNO в водном растворе сульфата натрия, загрязненном *E. coli*, были измерены в трех различных условиях: во время ультразвуковой обработки, во время электролиза и во время обоих видов воздействия одновременно. Все три типа спектров имеют максимум поглощения при 440 нм. Изменение интенсивности поглощения в спектрах УФ от времени каждой обработки воды показано на рис. 3. Как видно из рисунка, наибольшие изменения происходят при совместном действии ультразвука и электролиза. Отметим, что эти зависимости коррелируют с изменениями уменьшения количества колониеобразующих бактерий, представленных на рис. 2, что подтверждает, на наш взгляд, предположение об определяющей роли гидроксильных радикалов в инактивации бактерий.



Интересно оценить константу скорости реакции гидроксильного радикала с бактериями *E. coli*. Если пренебречь возможностью протекания других реакций с участием гидроксильных

радикалов и рассматривать их взаимодействие только с RNO и с бактериями, то количественный расход гидроксильных радикалов можно представить следующими схемами:



Кинетическая модель, предложенная для описания двух конкурентных реакций с участием гидроксильных радикалов, выглядит следующим образом [27]:

$$1/G_t = 1/G_0 \{1 + (k'_{\text{OH}} [B]) / (k_{\text{OH}} [RNO])\}, \quad (3)$$

где  $G_t$  – скорость обесцвечивания RNO в присутствии бактерий,  $G_0$  – скорость обесцвечивания RNO в отсутствие бактерий,  $[B]$  – концентрация бактерий в воде,  $[RNO]$  – концентрация RNO в воде,  $k'_{\text{OH}}$  и  $k_{\text{OH}}$  – константы скорости соответствующих реакций.

Согласно уравнению (3), график  $1/G_t$  в зависимости от  $[B]/[RNO]$  должен давать прямую линию с наклоном  $1/G_0 \cdot (k'_{\text{OH}}/k_{\text{OH}})$ , из которого можно рассчитать константу скорости реакции гидроксильных радикалов с бактериями. Концентрацию RNO измеряли после 40 мин электрохимической обработки в четырех экспериментах с различными концентрациями бактерий. Для *E. coli* были выбраны следующие концентрации:  $1.1 \cdot 10^6$ ,  $1.64 \cdot 10^6$ ,  $2.1 \cdot 10^6$  и  $7.9 \cdot 10^6$  КОЕ/мл. Таким образом, константа скорости реакции инактивации бактерий оказалась равна  $5.92 \cdot 10^6 \text{ КОЕ}^{-1} \text{ с}^{-1}$  (принимая во внимание, что  $k_{\text{OH}} = 1.2 \cdot 10^{10} \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$  [27]). Отметим, что данная оценка приближенная, но дает представление о скорости реакции гидроксильного радикала с бактерией.

### ВЫВОДЫ

Таким образом, электрохимическая дезинфекция без использования хлора является одним из наиболее перспективных методов обеззараживания воды, загрязненной бактериями *E. coli*. Обработка ультразвуком (20 кГц) в процессе электролиза увеличивает эффект дезинфекции. Образование гидроксильных радикалов, которое было экспериментально подтверждено при использовании N,N-диметил-4-нитрозоанилина в качестве спиновой ловушки, очевидно, вносит значительный вклад в совместное дезинфицирующее действие электрохимической и ультразвуковой обработки. Предложенный метод дезинфекции

сточных вод является безопасным, дешевым и эффективным.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spellman F. R. *Handbook of water and wastewater treatment plant operations* (CRC Press, Boca Raton, 2013).
2. Sperling M. V. *Biological waste treatment series. V. 2. Basic principles of wastewater treatment* (IWA Publishing, London, 2007).
3. Ahuja S. Overview of advances in water purification techniques. In *Advances in water purification technique*, ed. by S. Ahuja (Elsevier Press, 2019), pp. 1–15.
4. Edberg S. C., Rice E. W., Karlin R. J. and Allen M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 106–116 (2000). DOI: 10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x
5. *Carcinogens from water disinfection*, Ed. by S. Sciacca, G. O. Conti, M. Fiore, R. Fallico, and M. Ferrante (Nova Science Publishers, NY, 2011).
6. Al-Holy M. A. and Rasco B. A. The bactericidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on raw fish, chicken and beef surfaces. *Food Control*, **54**, 317–321 (2015). DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.02.017
7. Wolf Y., Oster S., Shuliakovich A., Brückner I., Dolny R., Linnemann V., Pinnekamp J., Hollert H. and Schiwy S. Improvement of wastewater and water quality via a full-scale ozonation plant? – A comprehensive analysis of the endocrine potential using effect-

- based methods. *Sci. Total Environ.*, **803** (12) 149756 (2021). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149756
8. Brisbin R., Zhou J., Bond T., Voss L., Simon A. J., Baxter R., and Chang A. S. P. Plasmonics-Enhanced UV Photocatalytic Water Purification. *J. Phys. Chem. C*, **125**, 9730–9735 (2021). DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c00613
  9. Wang J., Wang Z., Vieira C. L. Z., Wolfson J. M., Pingtian G., and Huang S. Review on the treatment of organic pollutants in water by ultrasonic technology. *Ultrason. Sonochem.*, **55**, 273–278 (2019). DOI: 10.1016/j.ultsonch.2019.01.017
  10. Swanckaert B., Geltmeyer J., Rabaey K., De Buysser K., and Bonin L. A review on ion-exchange nanofiber membranes: properties, structure and application in electrochemical (waste)water treatment. *Separation and Purification Technology*, **287**, 120529 (2022). DOI: 10.1016/j.seppur.2022.120529
  11. Chaplin B. P. The prospect of electrochemical technologies advancing worldwide water treatment. *Acc. Chem. Res.*, **52** (3), 596–604 (2019). DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00611
  12. Mousset E., Trelu C., Olvera-Vargas H., Pechaud Y., Fourcade F. and Oturan M. A. Electrochemical technologies coupled with biological treatments. *Curr. Opin. Electrochem.*, **26**, 100668 (2020). DOI: 10.1016/j.coelec.2020.100668
  13. Li X. Y., Diao H. F., Fan F. X. J., Gu J. D., Ding F. and Tong A. S. F. Electrochemical wastewater disinfection: identification of its principal germicidal actions. *J. Env. Eng.*, **130** (10), 1217–1221 (2004). DOI: 10.1061/(asce)0733-9372(2001)130:10(1217)
  14. Patermarakis G. and Fountoukidis E. Disinfection of water by electrochemical treatment, *Water Res.*, **24**, 1491–1496 (1990). DOI: 10.1016/0043-1354(90)90083-I
  15. Barashkov N. N., Eisenberg D., Eisenberg S., Shegebaeva G. S., Irgibaeva I. S. and Barashkova I. I. Electrochemical chlorine-free AC disinfection of water contaminated with *Salmonella typhimurium* bacteria. *Russ. J. Electrochem.*, **46** (3), 306–311 (2010). DOI: 10.1134/S1023193510030079
  16. Halpin R. M., Duffy L., Cregenzan-Alberti O., Lyng J. G., and Noci F. The effect of non-thermal processing technologies on microbial inactivation: An investigation into sub-lethal injury of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, **41**, 106–115 (2014). DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.01.011
  17. Gao S., Lewis G. D., Ashokkumar M., and Hemar Y. Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 2. A simple model for the inactivation mechanism. *Ultrason. Sonochem.*, **21**, 454–460 (2014). DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.06.007
  18. Al-Juboori R. A. and Yusaf T. Improving the performance of ultrasonic horn reactor for deactivating microorganisms in water. *IOP Conf. Series: Mater. Sci. Engineer.*, **36** (1), 012037 (2012). DOI: 10.1088/1757-899X/36/1/012037
  19. Lee Y., Zhou B., Liang W., Feng H., and Martin S. E. Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling. *J. Food Engineer.*, **93**, 352–364 (2009). DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2009.01.037
  20. Kadkhodae R. and Povey M. J. Ultrasonic inactivation of *Bacillus alpha-amylase*. I. Effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrason. Sonochem.*, **15**, 133–142 (2008). DOI: 10.1016/j.apenergy.2013.08.085
  21. Drakopoulou S., Terzakis S., Fountoulakis M. S., Mantzavinos D., and Manios T. Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater. *Ultrason. Sonochem.*, **16**, 629–634 (2009). DOI: 10.1016/j.ultsonch.2008.11.011
  22. Ashokkumar M. The characterization of acoustic cavitation bubbles – an overview. *Ultrason. Sonochem.*, **18**, 864–872 (2011). DOI: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.016
  23. Gong C., Jiang J., and Tian D. L. Ultrasonic application to boost hydroxyl radical formation during Fenton oxidation and release organic matter from sludge. *Sci. Reports*, **5**, 1–8 (2015). DOI: 10.1038/srep11419
  24. Kasai P. H. and McLeod D. Detection by spin trapping of hydrogen and hydroxyl radicals generated during electrolysis of water. *J. Phys. Chem.*, **82**, 619–621 (1978). DOI: 10.1021/j100494a024
  25. Sergeev A., Motyakin M., Barashkova I., Zaborova V., Krasulya O., and Yusof N. S. M. EPR and NMR study of molecular components mobility and organization in goat milk under ultrasound treatment. *Ultrason. Sonochem.*, **77**, 105673 (2021). DOI: 10.1016/j.ultsonch.2021.105673
  26. Zhang B.-T., Zhao L.-X., and Lin J.-M. Study on superoxide and hydroxyl radicals generated in indirect electrochemical oxidation by chemiluminescence and UV-Visible spectra. *J. Environ. Sci.*, **20**, 1006–1011 (2008). DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62200-7
  27. Comninellis C. H. Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste water treatment. *Electrochim. Acta*, **39** (11–12) 1857–1862 (1994). DOI: 10.1016/0013-4686(94)85175-1

## Combination of Electrochemical and Ultrasonic Treatments for Purification of Water Contaminated with Pathogenic Bacteria: a Case Study of *Escherichia coli*

S.B. Bibikov\*, A.I. Sergeev\*\*, I.I. Barashkova\*\*, and M.V. Motyakin\*, \*\*

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

\*\*N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

Combined effects of electrolysis and ultrasound on the population of *E. coli* bacteria in aqueous solution of sodium sulfate were investigated. The kinetics of bacteria inactivation was determined employing these water purification techniques. It has been shown that the combination of ultrasonic and electrochemical treatments of aqueous solution significantly increases the rate of bacterial inactivation. It has been suggested that hydroxyl radicals formed as a result of the reaction occurred after treatment of aqueous solution by employing a combination of electrolysis and ultrasound are responsible for the death of bacteria. A correlation between the rate of hydroxyl radical formation and the inactivation rate of bacteria has been obtained.

*Keywords: water disinfection, electrolysis, Escherichia coli, spin trap, ultrasound, hydroxyl radical*

УДК 577.3

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ  
ЛАКТОБАЦИЛЛ В ОТНОШЕНИИ *Pseudomonas aeruginosa***

© 2024 г. С.А. Кишилова\*,#, А.Ю. Колоколова\*, И.В. Рожкова\*

\*Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности,  
Люсиновская ул., 35/7, Москва, 115093, Россия

#E-mail: s\_kishilova@vnimi.org

Поступила в редакцию 28.02.2024 г.

После доработки 07.03.2024 г.

Принята к публикации 13.03.2024 г.

Целью работы была сравнительная оценка антагонистической активности коллекционных штаммов *Lactobacillus helveticus* NK1, *Lacticaseibacillus rhamnosus* F, грибковой кефирной закваски и их метаболитных комплексов по отношению к представителям штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. В результате проведенных исследований подтверждена высокая антагонистическая активность коллекционных лактобацилл, грибковой кефирной закваски и их метаболитных комплексов относительно условно-патогенных бактерий *P. aeruginosa*, как коллекционного типового штамма, так и изолятов дикого типа. Штамм *L. helveticus* NK1 зарекомендовал себя как более активный антагонист *P. aeruginosa* по сравнению с *L. rhamnosus* F, что, возможно, связано с его способностью к образованию пептидов с антимикробным действием. Полученные данные подтверждают перспективность использования штамма *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваски для разработки кисломолочного продукта, обогащенного метаболитами пробиотических культур. Полученные результаты обосновали дальнейшие исследования по определению механизмов их антимикробного действия.

*Ключевые слова:* *Pseudomonas aeruginosa*, коллекционные лактобациллы, штаммы-антагонисты, метаболитные комплексы.

DOI: 10.31857/S0006302924020141, EDN: OTWPBZ

Поиск безопасных и эффективных антипатогенных агентов является в настоящее время актуальным направлением исследований. Перспективным объектом изучения могут являться представители пробиотических молочнокислых микроорганизмов и вырабатываемые ими метаболитные комплексы [1]. Особенностью лактобацилл является способность сбрасывать сахара с образованием ряда антимикробных комплексов: органических кислот – молочной, уксусной, пропионовой, масляной; бактериоцинов; перекиси водорода; антимикробных бактериоциноподобных ингибирующих субстанций [2–4]. Их использование можно рассматривать как метод естественной защиты от патогенов, а также для разработки инновационных технологий с применением метаболитных комплексов для различных областей промышленности [5–8]. Отмечено, что *Lactobacillus plantarum* и его метаболиты оказывали сильное ингибирующее действие на продукцию молекул, определяющих кворум у *Pseudomonas aeruginosa* [9]. Исследование 57 штаммов лактобацилл позволило выделить два штамма,

идентифицированных как *Lactobacillus fermentum*, с мощным ингибирующим действием на рост штаммов *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью [10]. Таким образом, действие *Lactobacillus* может включать в себя, кроме выработки антимикробных метаболитов, способность конкурировать с патогеном, не допуская первичной адгезии нежелательного микроорганизма на поверхности. [11].

Исследования штаммов лактобацилл из коллекции пробиотических и молочнокислых микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ» проводятся сотрудниками института в течение ряда лет. Подтверждены их антимикробные свойства в отношении условно патогенных представителей энтеробактерий [2, 3].

Подтверждены выраженные антимикробные свойства штамма *L. rhamnosus* F по отношению к госпитальному штамму *Klebsiella pneumoniae* 10898 с множественной антибиотикорезистентностью. С использованием штамма *L. rhamnosus* F разработана ассоциация заквасочных микроорга-

низмов, обладающих пробиотическими свойствами. В настоящий момент ведутся исследования разработки обогащенного кисломолочного продукта на основе данной ассоциации и метаболитных комплексов *Lactobacillus helveticus* H9 [5].

Грибковая кефирная закваска представляет собой симбиоз молочнокислых микроорганизмов, дрожжей и уксуснокислых бактерий и включает в себя представителей рода *Lactobacillus*. В результате работ, проводимых нами ранее, было установлено, что кефир, выработанный на кефирных грибах, обладает выраженной антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре [12]. По данным ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», кефир оказывал угнетающее действие на рост грибов рода *Candida*, протей и стафилококка у детей, принимавших продукт [13]. Известно, что кефир обладает значительным антимикробным действием, так как содержит метаболитный комплекс, включающий в себя сильнейший антисептик – молочную кислоту, перекись водорода, лизоцим и вещества с антибиотической активностью – реутерин, плантарицин [14]. Согласно результатам исследований антипатогенных свойств национальных продуктов, кефир и айран проявляли выраженную способность замедлять рост и подавлять жизнедеятельность ряда патогенных бактерий. Наиболее сильный антимикробный эффект наблюдался относительно *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* – 60.0% и 55.7% соответственно. При этом ингибирующее действие кефира на кишечную палочку было на 21.2% выше, чем у айрана [13]. Доказательства того, что кефир может предотвратить диарейный энтероколит, спровоцированный *Clostridium difficile*, приведены в работах по исследованию защитных свойств смеси молочнокислых бактерий и дрожжей, выделенных из кефирного грибка в экспериментальной модели острой кишечной инфекции [12, 13]. В работе [14] авторы показали, что бесклеточный супернатант метаболитов, полученный в результате культивирования кефирных грибов, обладал выраженными бактериостатическими свойствами по отношению к *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli*.

Целью данного исследования являлось определение антимикробной активности *Lactobacillus helveticus* NK1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F (старое название *Lactobacillus rhamnosus*), эффективных антагонистов энтеробактерий, а также кефирной закваски относительно типового коллекционного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 и двух «диких» штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных с доильных аппаратов молочной фермы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись *Lactobacillus helveticus* NK1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F, выделенные из желудочно-кишечного тракта здоровых людей, находящиеся в коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности, и грибковая кефирная закваска. Штаммы *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47 были выделены с цехового оборудования (доильных аппаратов) частной молочной фермы. Предположительным источником контаминации являлась вода из скважины, используемая для мытья помещений и оборудования. Идентификацию выделенных штаммов проводили согласно ГОСТ ISO 16266-2018 «Качество воды. Обнаружение и подсчет *Pseudomonas aeruginosa*. Метод мембранной фильтрации» и МР «Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)» от 24 мая 1984 года. В качестве контрольного использовали типовой штамм *Pseudomonas aeruginosa* 25668, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Коллекционные штаммы лактобактерий хранили в лиофилизированном состоянии. Восстановление культур лактобацилл проводили в стерильном обезжиренном коммерческом молоке марки «Стандарт» («Комплимилк», Слуцкий сыродельный комбинат, Слуцк, Беларусь) путем инкубации при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Для исследования использовали 24-часовые культуры, вторую генерацию. Грибковую кефирную закваску получали согласно «Инструкции по приготовлению и применению заквасок для кисломолочных продуктов на предприятиях молочной промышленности» ФГАНУ «ВНИМИ, утверждена 27.09.2022 г. Штаммы *Pseudomonas aeruginosa* культивировали на среде СПА («Агар сухой питательный») производства Научно-производственного Центра ООО «Биокомпас-С» (Углич Ярославской обл., Россия). Для исследования использовали 24-часовые культуры. Для определения способности пробиотических штаммов *L. helveticus* NK1 и *L. rhamnosus* F, грибковой кефирной закваски и их метаболитных комплексов подавлять рост штаммов *Pseudomonas aeruginosa* использовали метод совместного культивирования согласно МУ 2.3.2.2789-10 [15]. При совместном культивировании в 20 см<sup>3</sup> стерильного обезжиренного молока вносили по 1 см<sup>3</sup> инокулятов лактобацилл, грибковой кефирной закваски и суспензий штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и инкубировали в течение 24 и 48 ч при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  при сокультивирова-

**Таблица 1.** Сравнение чувствительности к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47 (дикого типа) и коллекционного штамма *P. aeruginosa* 25668

Штамм <i>P. aeruginosa</i>	Зона подавления роста, мм					
	ампициллин	азитромицин	гентамицин	тетрациклин	левомицетин	линкомицин
25668	R	22	20	11	12	R
42	R	22	22	12	12	R
47	R	20	20	7	10	R

Примечание. R – резистентный.

нии с лактобациллами и температуре  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  – при сокультивировании с грибковой кефирной закваской. Контролем являлись монокультуры *Pseudomonas aeruginosa*, выращенные в тех же условиях. По окончании инкубирования проводили подсчет клеток *Pseudomonas aeruginosa*, выросших в монокультуре и при совместном культивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской на среде СПА.

Для исследования антибиотикорезистентности штаммов *Pseudomonas aeruginosa* использовали диско-диффузионный метод согласно МУК 4.2.1890–04 [16].

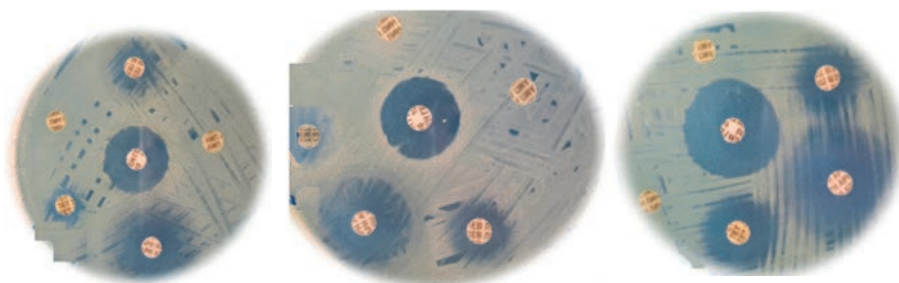
Результаты учитывали через 24 и 48 ч инкубирования при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Все результаты представлены по данным трех независимых экспериментов. Построение таблиц и графиков проводили с использованием программ Microsoft Office. Результаты исследования обработаны с применением программ Statistica 10 и MS Excel 2003. Поиск литературы осуществляли по научным базам данных eLIBRARY.ru и Google Scholar.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании наблюдались фенотипические отличия выделенных штаммов от типового *P. aeruginosa* ATCC 25668. Так, *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47 демонстрировали существенно более выраженное пигментообразование на агаре для псевдомонад и на СПА. Исходя из того, что пигментообразование коррелирует с вирулентностью [17], сравнили чувствительность выделенных штаммов и коллекционного *P. aeruginosa* 25668 к ряду антибиотиков на предмет обнаружения возможной резистентности и разницы в чувствительности к антибиотикам у выделенных штаммов.

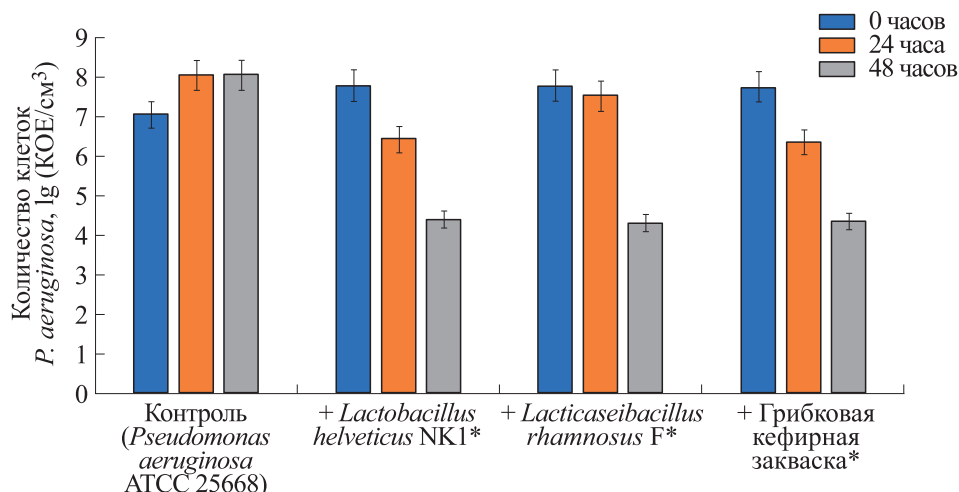
Данные по чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что у всех трех штаммов наблюдалась устойчивость к линкомицину и ампициллину. Чувствительность к гентамицину, левомицетину и азитромицину была примерно одинакова. У *P. aeruginosa* 42 зона подавления роста гентамицином и тетрациклином была даже несколько больше по сравнению с контролем. Штамм *P. aeruginosa* 47 показал большую устойчивость к тетрациклину (примерно в два раза) по от-



**Рис. 1.** Зоны подавления антибиотиками роста штаммов *P. aeruginosa*.





**Рис. 2.** Изменение количества клеток *P. aeruginosa* ATCC 25668 в монокультуре и при сокультивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской.

ношению к *P. aeruginosa* 42 и контрольному штамму. Зоны подавления роста штаммов антибиотиками на плотной среде показаны на рис. 1.

Для определения способности пробиотических штаммов *Lactobacillus helveticus* NK 1, *Lacticaseibacillus rhamnosus* F и грибковой кефирной закваски подавлять рост штаммов *P. aeruginosa* определяли их антагонистическую активность методом совместного культивирования. Результаты, полученные с помощью электронной микроскопии, продемонстрировали, что реакция патогенов на ингибирующее действие лактобацилл при совместном культивировании проявляется в возрастании доли лизированных и покоящихся клеток, разрушении клеточных органелл. У самих лактобацилл наблюдалось увеличение толщины клеточной стенки и образование на ее поверхности дополнительных слоев [18].

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании типового штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668, коллекционных лактобацилл и грибковой кефирной закваски представлены на рис. 2.

Анализ полученных данных показал, что динамика подавления роста *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 при сокультивировании с штаммом *Lactobacillus helveticus* NK 1 и грибковой кефирной закваской на вторые сутки была примерно одинакова и снижалась на один порядок — до  $2.7 \cdot 10^6$  КОЕ/см<sup>3</sup> и до  $2.2 \cdot 10^6$  КОЕ/см<sup>3</sup> соответственно по сравнению с контролем. В монокультуре в то же время наблюдался рост — с  $5.1 \cdot 10^7$  до  $1.1 \cdot 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Антагонистическое действие

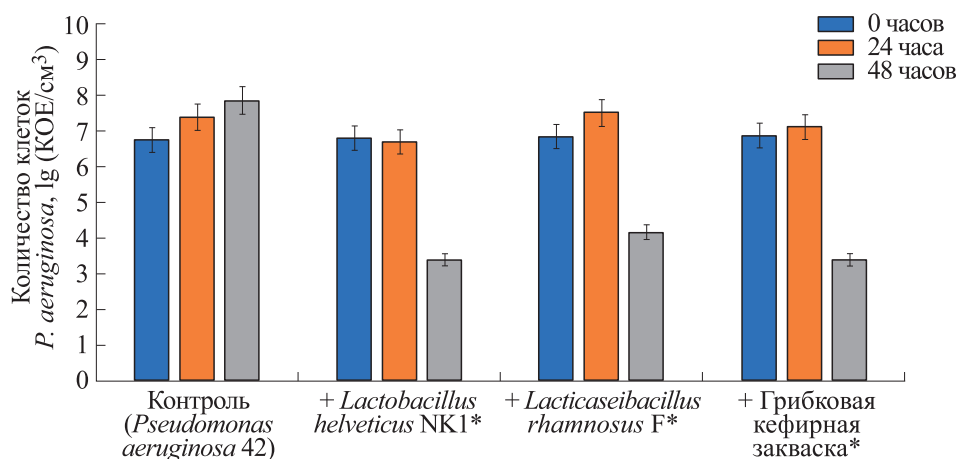
*Lacticaseibacillus rhamnosus* F через 24 ч сокультивирования было минимально и составило  $3.4 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Ингибирующее действие на *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 через 48 ч сокультивирования во всех трех вариантах было примерно одинаковым: количество клеток составило  $2.0 \cdot 10^4$  —  $2.6 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>, снижаясь на три порядка. Исследования, проведенные ранее, показали, что при сокультивировании с госпитальным штаммом *Klebsiella pneumonia* с множественной устойчивостью к антибиотикам разных групп именно штамм *Lacticaseibacillus rhamnosus* F показал высокую антагонистическую активность уже на вторые сутки с дальнейшим снижением количества патогена, в то время как *Lactobacillus helveticus* NK 1 не проявил значительного антагонистического эффекта [3].

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании выделенного штамма *Pseudomonas aeruginosa* 42, коллекционных лактобацилл и грибковой кефирной закваски представлены на рис. 3.

Через 24 ч сокультивирования *Lactobacillus helveticus* NK 1 с *Pseudomonas aeruginosa* 42 антагонистическая активность не проявлялась и количество клеток оставалось на том же уровне, что и в исходной точке. Через 48 ч сокультивирования отмечено снижение количества клеток патогена на три порядка, оно составило  $2.5 \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Антагонистическое действие *L. rhamnosus* F также через 24 ч сокультивирования не проявлялось, наблюдался рост синегнойной палочки по сравнению с исходной точкой — количество





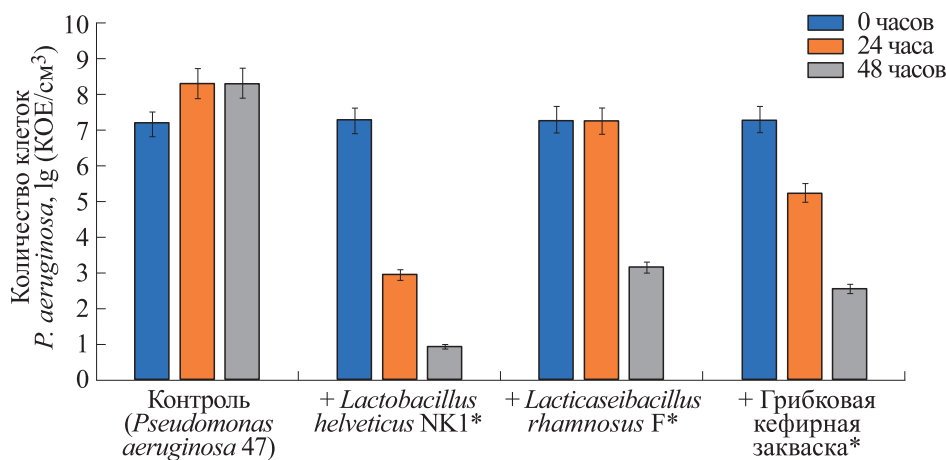
**Рис. 3.** Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 в монокультуре и при сокультивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской.

клеток при сокультивировании составило  $3.2 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Через 48 ч антагонистическое действие было выраженным – наблюдалось снижение количества клеток *P. aeruginosa* 42 на два порядка по сравнению с исходным значением, оно составило  $1.5 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

При сокультивировании *P. aeruginosa* 42 с грибковой кефирной закваской отмечалась тенденция, аналогичная результатам, полученным для *L. rhamnosus* F, где через 24 ч отмечался рост культуры на порядок. Однако через 48 ч сокультивирования антагонистическое действие было более выраженным, наблюдалось снижение количества клеток *P. aeruginosa* на три порядка, их количество составило  $2.5 \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании выделенного штамма *P. aeruginosa* 47, коллекционных лактобацилл и грибковой кефирной закваски представлены на рис. 4.

При сокультивировании с *L. helveticus* NK1 через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось с  $2.0 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup> до  $1.0 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> (на четыре порядка). Влияние *L. rhamnosus* F на рост *P. aeruginosa* 47 практически отсутствовало. Количество клеток *P. aeruginosa* 47 при сокультивировании составило  $1.9 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup> по сравнению с  $2.1 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup> в контроле. На вторые сутки сокультивирования антагонистический эффект *L. rhamnosus* F возрастал и количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось на четыре порядка. Ин-



**Рис. 4.** Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 в монокультуре и при сокультивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской.

гибирующий эффект грибковой кефирной закваски был менее заметным — количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось на два порядка — с  $1.9 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup> до  $1.9 \cdot 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup>. При этом в монокультуре наблюдался рост с  $2.3 \cdot 10^7$  КОЕ/см<sup>3</sup> до  $2.1 \cdot 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

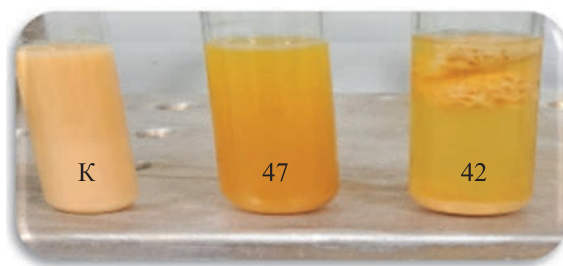
Анализ полученных данных показал различия в степени подавление роста *Pseudomonas aeruginosa* 47 при сокультивировании с *L. helveticus* NK1, *L. rhamnosus* F и грибковой кефирной закваской как через 24 ч, так и через 48 ч инкубирования, что подтверждает штаммоспецифичность антагонистического действия на патоген. Так, через 24 ч сокультивирования наибольший ингибирующий эффект на *P. aeruginosa* оказывал штамм *L. helveticus* NK1, количество клеток патогена снижалось до  $1.6 \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Однако ингибирующий эффект грибковой кефирной закваски и *L. helveticus* NK1 был еще более ощутимым и составил  $7 \cdot 10^2$  и менее  $10^2$  КОЕ/см<sup>3</sup> соответственно.

Проведенные ранее исследования антагонистической активности штаммов *L. helveticus* NK1 и *L. rhamnosus* F в отношении ряда полирезистентных госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* показали, что наибольший антагонистический эффект отмечался у штамма *L. helveticus* NK1, в то время как штамм *L. rhamnosus* F имел меньшую степень подавления, но более широкий спектр действия на патогенные штаммы [2]. В работе [3], также проведенной ранее в ФГАНУ «ВНИМИ», подтвердилась антагонистическая эффективность *L. rhamnosus* F по отношению к изоляту *Klebsiella pneumoniae* 10898, полученному из Национального медицинского исследовательского центра хирургии им. Вишневецкого (Москва, Россия), в то время как штамм *L. helveticus* NK1 в отношении данного госпитального штамма не проявлял значительно антагонистического эффекта. Известна способность лактобацилл проявлять избирательную активность в отношении различных видов патогенных бактерий. При исследовании антимикробного действия 21 штамма лактобацилл в отношении госпитальных штаммов *Clostridium difficile* были выделены три наиболее активных штамма, у которых подтвердилось наличие бактериоцинов [19]. Исследования *L. rhamnosus* F при совместном культивировании с *Klebsiella pneumoniae* продемонстрировали наличие в его секрете большого спектра литических ферментов (транслабозиназы) [2], действие которых на клеточную стенку грамотрицательных бактерий сходно с действием бактериофагов (лизис). Возможны и другие механизмы, дающие этому штамму

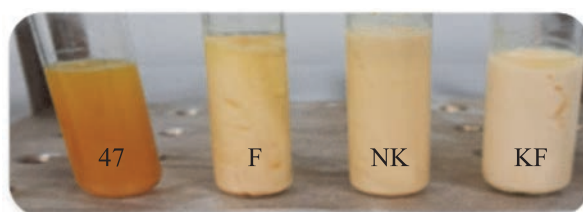
возможности ингибировать широкий круг патогенов. Полученные данные дали основания предположить значительную антимикробную эффективность штамма *L. rhamnosus* F также относительно представителей *P. aeruginosa*. Однако результаты показали, что наибольшее ингибирующее действие на «дикие» штаммы синегнойной палочки оказывал штамм *L. helveticus* NK1, причем в случае с *P. aeruginosa* 47 подавление роста составляло практически 100%. Есть данные об антимикробной активности пептидов, образующихся в результате действия протеаз молочнокислых бактерий на казеин — основной белок молока [4]. В проведенном ранее исследовании антагонистической активности штаммов *L. rhamnosus* F и *L. helveticus* NK1 относительно *Klebsiella pneumoniae* в зависимости от питательной среды культивирования методом диффузии в агар показано, что при инкубировании на бульоне MRS зона ингибирования *L. rhamnosus* F превышает зону ингибирования патогена штаммом *L. helveticus* NK1 почти в два раза, а при культивировании на молоке различия практически отсутствовали [3]. Полученные нами результаты выраженной антагонистической активности штамма *L. helveticus* NK1 при инкубировании на молоке могут косвенно подтвердить предположение о его способности образовывать антимикробные пептиды как ответ на стрессовое условие — присутствие в ростовой среде бактерий другого вида. Многочисленные исследования различных видов лактобацилл свидетельствуют, что у отдельных штаммов при стрессовых воздействиях могут включаться специфические метаболические пути, что приводит к изменениям в составе их секретомов [20, 21].

В процессе культивирования наблюдались отличия в характере роста культур *P. aeruginosa* на молоке. При культивировании монокультуры *P. aeruginosa* 42 отмечались визуальные выраженные признаки порчи молока — образование плотного пористого сгустка, расслоение, изменение цвета. Контрольный тест-штамм не оказывал на молоко столь значительного разрушающего действия, визуально фиксировалось только некоторое изменение цвета. Для *P. aeruginosa* 47 было характерно сильное пигментообразование в среде инкубирования, сгустки отсутствовали, наблюдался характерный для *P. aeruginosa* поверхностный пленочный рост (рис. 5). Это свидетельствует о различиях биохимической активности выделенных диких штаммов по сравнению с коллекционным и, возможно, более высокой у них активности протеолитических ферментов.

Оценка характера роста на молоке чистой культуры *P. aeruginosa* 47 и при совместном куль-



**Рис. 5.** Характер роста штаммов *P. aeruginosa* ATCC 25668, *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47 на молоке через 48 ч инкубирования.



**Рис. 6.** Характер роста монокультуры (*P. aeruginosa* 47) при сокультивировании с *L. rhamnosus* (F), *L. helveticus* (NK1) и грибковой кефирной закваской (KF) через 48 ч.

тивировании *P. aeruginosa* 47 с *L. rhamnosus* F, *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской представлена на рис. 6.

На основе полученных данных можно судить о соответствии визуальных изменений среды инкубирования (молока) с антагонистическим действием культур. В монокультуре отмечается изменение цвета молока с поверхностным пленочным ростом *P. aeruginosa* 47.

При сокультивировании с *L. rhamnosus* F наблюдается незначительное изменение цвета молока. При совместном инкубировании с *L. helveticus* NK1 с грибковой кефирной закваской, проявивших более высокую антимикробную активность, заметные визуальные изменения среды культивирования не наблюдались.

Полученные данные могут свидетельствовать о вариабельности штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих на одном предприятии и возможности их мутаций.

## ВЫВОДЫ

Подтверждена высокая антагонистическая активность коллекционных лактобацилл, грибковой кефирной закваски и их метаболитных комплексов относительно условно-патогенных бактерий *P. aeruginosa*, как коллекционного типового штамма, так и изолятов дикого типа. Штамм *L. helveticus* NK1 зарекомендовал себя как более

активный антагонист *P. aeruginosa* по сравнению с *L. rhamnosus* F, что, возможно, связано с его способностью к образованию пептидов с антимикробным действием. Полученные данные подтверждают перспективность использования штамма *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваски для разработки кисломолочного продукта, обогащенного метаболитами пробиотических культур.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания (шифр темы FNSS-2022-0004).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева С. В., Бахарева Л. И. и Нохрин Д. Ю. Видовой состав микрофлоры ожоговых ран пациентов Челябинского областного ожогового центра. *Вестн. Челябинского гос. ун-та*, № 7 (298), 58–59 (2013).

2. Рожкова И. В., Бегунова А. В., Васина Д. В., Кубанова М. Х., Крупенио Т. В. Шарапченко, С. О. и Габриэлян Н. И. Антагонистическая активность *Lactobacillus* spp. в отношении госпитальных штаммов *Klebsiella* spp. *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*, **20** (S1), 180–180 (2018). DOI: 10.7868/S05551099118030054
3. Кишилова С. А., Терехова Р. И., Рожкова И. В. и Юрова Е.А. Сравнительная оценка антагонистической активности коллекционных лактобацилл в отношении полирезистентных *Klebsiella pneumoniae*. *Вопросы питания*, **92** (6), 120–127 (2023). DOI: 10.33029/0042-8833-2023-92-6-00-00
4. Кручинин А. Г. и Агаркова Е. Ю. Биологически активные пептиды молока: обзор. *Пищевая промышленность*, № 12, 92–96 (2020). DOI: 10.24411/0235-2486-2020-10151
5. Savinova O. S., Glazunova O. A., Moiseenko K. V., Begunova A. V., Rozhkova I. V., and Fedorova T. V. Exoproteome analysis of antagonistic interactions between the probiotic bacteria *Limosilactobacillus reuteri* LR1 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* F and multidrug resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (20), 10999 (2021). DOI: 10.3390/ijms222010999
6. Zimina M., Babich O., Prosekov A., Sukhikh S., Ivanova S., Shevchenko M., and Noskova S. Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. *Antibiotics*, **9** (9), 553 (2020). DOI: 10.3390/antibiotics9090553
7. Стоянова Л. Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием. *Изв. Тимирязев. с.-х. акад.*, № 5, 41–61 (2017). DOI: 10.26897/0021-342X-2017-5-41-61
8. Файзуллина Р. А., Самороднова Е. А. и Федотова О. Б. Кисломолочные продукты в питании детей раннего возраста: эволюция от традиционных к функциональным. *Рос. вестн. перинатологии и педиатрии*, **64** (4), 133–140 (2019). DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-4-133-140
9. Valdez J. C., Peral M. C., Rachid M., Santana M., and Perdigon G. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clin. Microbiol. and Infection*, **11** (6), 472–479 (2005). DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01142.x
10. Shokri D., Khorasgani M. R., Mohkam M., Fatemi S. M., Ghasemi Y., and Taheri-Kafrani A. The inhibition effect of lactobacilli against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **10** (1), 34–42 (2018). DOI: 10.1007/s12602-017-9267-9
11. Пиядина А. Ю. Воздействие антибактериальных веществ на рост и развитие биопленок клинических изолятов. В кн. *Фундаментальные и прикладные исследования: от теории к практике* (2018), сс. 245–250.
12. Каледина М. В., Федосова А. Н. и Байдина И. А. Антипатогенная активность национальных кисломолочных напитков. *Пищевая промышленность*, № 10, 72–75 (2019). DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10163
13. Bolla P. A., Carasi P., de los Angeles Bolla M., De Antoni G. L., and de los Angeles Serradell M. Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, **21**, 28–33 (2013). DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.03.010
14. Garrote G. L., Abraham A. G., and De Antoni G. L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *J. Food Protection*, **63** (3), 364–369 (2000). DOI: 10.4315/0362-028X-63.3.364
15. МУ 2.3.2789-10 «Продовольственное сырье и пищевые продукты. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов».
16. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».
17. Pang Z., Raudonis R., Glick B. R., Lin T. J., and Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.*, **37** (1), 177–192 (2019). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
18. Рыбальченко О. В. и Бондаренко В. М. Образование биопленок симбионтными представителями микробиоты кишечника как форма существования бактерий. *Вестн. Санкт-Петербургского университета. Медицина*, № 1, 179–186 (2013).
19. Сухина М. А., Шельгин Ю. А., Жуховицкий В. Г., Фролов С. А., Кашников В. Н., Веселов А. В. и Чистякова Д. А. Перспективы использования антагонистической активности лактобацилл для подавления роста *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile*. *Эксперим. клинич. гастроэнтерология*, № 12 (160), 19–24 (2018). DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-19-24
20. Calasso M., Di Cagno R., De Angelis M., Campanella D., Minervini F., and Gobbetti M. Effects of the peptide pheromone plantaricin A and cocultivation with *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA174 on the exoproteome and the adhesion capacity of *Lactobacillus plantarum* DC400. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79** (8), 2657–2669 (2013). DOI: 10.1128/AEM.03625-12
21. Агаркова Е. Ю. и Кручинин А. Г. Ферментативная конверсия как способ получения биологически активных пептидов. *Вестн. Мурманского гос. техн. ун-та*, **21** (3), 412–419 (2018). DOI: 10.21443/1560-9278-2018-21-3-412-419

## Antimicrobial Activity of Metabolite Complexes of *Lactobacillus* against *Pseudomonas aeruginosa*

S.A. Kishilova\*, A.Y. Kolokolova\*, and I.V. Rozhkova\*

\*All-Russian Dairy Research Institute, Lyusinovskaya ul. 35/7, Moscow, 115093 Russia

The aim of the work was to carry out a comparative evaluation of antagonistic activities of collection strains *Lactobacillus helveticus* NK1 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* F, fungal kefir starter culture and their metabolite complexes against representatives of *Pseudomonas aeruginosa* strains. The results obtained confirmed high activities of collection strains lactobacilli, fungal kefir starter culture and their metabolite complexes against opportunistic pathogenic bacteria *P. Aeruginosa*, used both as a type strain from culture collection and a wild-type isolate. Compared with *L. rhamnosus* F, the strain *L. helveticus* NK1 is regarded as an active antagonist of *P. aeruginosa*. It might be due to the ability of *L. helveticus* NK1 to create peptides with the antimicrobial effect. Our findings demonstrate perspectives on the application of the strain *L. helveticus* NK1 and fungal kefir starter culture in the development of fermented dairy products enriched with metabolites of probiotic cultures. Further research is needed to determine the mechanisms of the antimicrobial action of these metabolites.

*Keywords: Pseudomonas aeruginosa, collection strains lactobacilli, antagonist strains, metabolite complexes*

УДК 577.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ A549 ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ПРОТОННЫМ ПУЧКОМ ВО ФЛЭШ- И СТАНДАРТНОМ РЕЖИМАХ

© 2024 г. А.В. Рзянина<sup>\*,#</sup>, Г.В. Мицын<sup>\*</sup>, А.В. Агапов<sup>\*</sup>, Е.А. Грицкова<sup>\*</sup>, С.С. Углова<sup>\*</sup>, В.Н. Гаевский<sup>\*</sup>, К.Н. Шипулин<sup>\*</sup>, И. Хасенова<sup>\*</sup>

*\*Объединенный институт ядерных исследований, ул. Жолио-Кюри, 6, Дубна Московской области, 141980, Россия  
E-mail: rzjanina@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 10.07.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

Флэш-терапия – инновационный метод облучения, который обеспечивает подведение лечебной дозы к патологическому очагу за времена порядка нескольких десятков миллисекунд. В таком режиме облучения уменьшается степень повреждения нормальных тканей, окружающих опухоль и попадающих под действие излучения, в то же время воздействие на раковые клетки сохраняется практически на прежнем уровне, что улучшает перспективу локального контроля опухоли при меньшей частоте возникновения побочных эффектов. На сегодняшний день точные радиобиологические механизмы, лежащие в основе флэш-эффекта, до конца неясны. В статье приведены результаты работы по формированию высокоинтенсивного пучка протонов с энергией 660 МэВ от ускорителя «фазотрон» Объединенного института ядерных исследований (Дубна), предназначенного для проведения радиобиологических исследований при облучении методом флэш-терапии клеточных культур и малых лабораторных животных (мыши, крысы). Также проведено сравнение выживаемости клеток линии A549 при облучении протонным пучком в двух режимах: флэш и стандартном. Обнаружено различие в изменении выживаемости клеток A549, облученных в флэш- и стандартном режимах. Величина флэш-эффекта представлена фактором изменения дозы.

*Ключевые слова: протонная терапия, флэш-эффект, облучение сверхвысокой мощностью дозы, клонированная выживаемость, культура клеток A549.*

DOI: 10.31857/S0006302924020158, EDN: OTSRTL

Основной проблемой лучевой терапии является тот факт, что она может наносить вред окружающим опухоль здоровым тканям. Поэтому подводимая к опухоли доза ограничена ее токсичностью для близлежащих здоровых биологических структур. Это может привести к снижению эффективности проводимой лучевой терапии и неполному уничтожению опухоли. Исходя из этого, в основе методов лучевой терапии лежат принципы, учитывающие различия в реакции на облучение между нормальными и опухолевыми тканями, а также подходы, обеспечивающие сохранение здоровых тканей на приемлемом уровне. Для достижения этой цели можно варьировать параметрами облучения: величиной поглощенной дозы, мощностью дозы, использовать фракционирование дозы и совершенствовать способы доставки дозы в опухоль.

Допустимая величина поглощенной в опухоли дозы определяется как максимально переноси-

мая доза, которая может быть доставлена в опухоль безопасно для здоровых тканей. Для уменьшения частоты возникновения радиационно-индуцированных побочных эффектов можно применять фракционирование дозы. Наиболее перспективным методом доставки излучения в опухоль является протонная терапия, обеспечивающая высокую конформность дозных распределений форме опухоли, что позволяет уменьшить лучевую нагрузку на нормальные ткани. Наряду с усовершенствованием методов способа доставки дозы в опухоль и режимов фракционирования до недавнего времени недостаточно внимания уделялось возможности модификации мощности дозы. Однако сегодня все больше исследований проводится в новой области, получившей название «флэш-терапия».

Этот метод предполагает подведение терапевтической дозы облучения к опухолевому объему при сверхвысокой мощности дозы в пучке, на не-

сколько порядков превышающей обычно используемую при стандартной радиотерапии. Исследования показывают, что флэш-терапия, по сравнению со стандартной радиотерапией, позволяет уменьшать степень повреждения нормальных тканей, окружающих опухоль и попадающих под действие излучения, в то же время воздействие на раковые клетки сохраняется на прежнем уровне, что улучшает перспективу локального контроля опухоли при меньшей частоте возникновения побочных эффектов [1–5].

Первые сообщения об исследовании сверхвысоких мощностей дозы при облучении биологических объектов появились в научной литературе еще в 70-х годах прошлого века [6–8], однако массово эти исследования стали проводиться в различных центрах после опубликования в 2014 г. работы В. Фаводона с соавторами из Института Кюри (Париж, Франция) [2], которые предложили использовать этот эффект в дистанционной лучевой терапии.

В настоящее время получены определенные результаты, в частности, показано что флэш-терапия эффективно снижает токсичность в легких [2, 9] кишечнике [10], головном мозге [11] и коже [12], а также позволяет сохранять противоопухолевый эффект в раковых клетках [9, 13, 14].

Следует отметить, что на сегодняшний день биологические механизмы флэш-эффекта досконально не изучены. Среди авторитетных ученых в области радиобиологии мнения о перспективах использования этого эффекта в клинической практике, как и о реальности существования самого эффекта, сильно разнятся. Некоторые из них сомневаются в возможности существования флэш-эффекта, другие же, наоборот, считают, что данный эффект в будущем позволит заменить мелкофракционированные курсы дистанционной лучевой терапии на одно- или двукратные облучения при сохранении или даже увеличении эффективности лечения. Действительно, на сегодняшний день не существует однозначной теории, способной объяснить механизм возникновения флэш-эффекта, но то, что он реально существует доказывают многочисленные исследования, проводимые во множестве научно-исследовательских центров на различных радиобиологических моделях [15].

Более того, ведущие мировые фирмы, производящие оборудование для центров протонной терапии «под ключ» (Varian, IBA, США), с недавнего времени приступили к модернизации выпускаемого ими оборудования для возможности проведения протонной флэш-терапии. Уже начаты первые клинические исследования по эффективности ее использования [16].

Не так давно было создано международное общество (<https://frpt-conference.org/about-frpt/>),

объединившее ученых из разных стран, занимающихся исследованиями в области флэш-терапии с применением различных ионизирующих излучений.

В настоящее время отличия эффектов при облучении в стандартном и флэш-режимах объясняют различиями в физико-химических реакциях, возникающих после облучения. Воздействие ионизирующего излучения на биологические системы приводит к очень быстрым физическим и химическим изменениям, которые впоследствии преобразуются в биологические повреждения. Одним из основных следствий облучения является ионизация воды и образование свободных радикалов, которые взаимодействуют с ключевыми биологическими мишенями. Присутствие кислорода увеличивает вероятность фиксации повреждений, вызванных радикалами. На данный момент основными версиями объяснения флэш-эффекта являются: истощение кислорода в облучаемых здоровых тканях; метаболизм перекисных соединений и химия Фентона, а также рекомбинация свободных радикалов.

**Истощение кислорода.** Кислород играет роль сенситизатора при радиационном воздействии. По сравнению с испытывающими гипоксию опухолевыми клетками богатая кислородом здоровая ткань имеет более высокую радиочувствительность при тех же условиях облучения. Поскольку при флэш-режиме облучение происходит за очень короткое время (миллисекунды) по сравнению со стандартной терапией (минуты), в самом начале облучения кислород в ткани быстро истощается, а реоксигенация не может произойти слишком быстро. После того как уровень кислорода был истощен, последующее облучение нормальной ткани происходит в гипоксических условиях, т.е. в резистентном состоянии [17]. По этой причине в нормальных тканях наблюдается более выраженное снижение уровня кислорода по сравнению с опухолевыми после облучения в флэш-режиме [18].

**Метаболизм перекисных соединений и химия Фентона.** Некоторые авторы считают, что опухолевые и нормальные клетки имеют разную способность удалять продукты реакций перекиси водорода [19]. Клетки здоровой ткани имеют меньшую окислительную нагрузку по сравнению с опухолевыми клетками. Кроме того, содержание лабильного железа в нормальных тканях также ниже, что предотвращает повреждение здоровых тканей в результате реакции Фентона. Нормальные ткани имеют более высокую антиоксидантную способность, следовательно, они будут быстрее удалять продукты реакций перекиси водорода.

**Рекомбинация свободных радикалов.** В нормоксических условиях при сверхвысоких мощностях



доз было обнаружено, что отдельные активные формы кислорода агломерируются с образованием резонансных или метастабильных молекулярных состояний, связанных водородными связями. Полученные агломерации обладают низкой диффузионной способностью и, следовательно, становятся неактивными формами кислорода с ограниченным потенциалом биологического повреждения. Наблюдаемая агломерация и возникающая в результате этого защита нормальных тканей при сверхвысоких дозах является потенциальным преимуществом при флэш-терапии [20, 21]

**Формирование пучка протонов для облучения в флэш-режиме.** Объединенный институт ядерных исследований (ОИЯИ, Дубна, Московская обл.) является одним из пионеров в исследовании эффективности применения протонных пучков для радиотерапии [22]. Здесь накоплен богатый опыт проведения трехмерной конформной протонной терапии онкологических больных. С 2000 по 2019 г. на пучках ускорителя фазотрона прошли курс облучения около 1300 пациентов с различными заболеваниями.

На сегодняшний день ОИЯИ совместно с НИИЭФА им. Д.В. Ефремова (Санкт-Петербург) уже приступили к реализации проекта создания сверхпроводящего изохронного циклотрона MSC230, на котором планируется проведение научных исследований, а также работ по развитию методик протонной флэш-терапии [23]. Для этого в конструкцию будущего ускорителя закладывается возможность работы в импульсном режиме с силой выходного тока пучка до 10 мкА и длительностью импульса до 10–200 мс. Это позволит формировать равномерные по дозе высокоэнергетичные (100–230 МэВ) протонные пучки с мгновенной мощностью дозы до 100 Гр/с и диаметром в изоцентре облучения до 10–15 см. Такие параметры пучка дадут возможность в будущем использовать этот ускоритель при проведении клинических исследований по применению методик протонной флэш-терапии для лечения широкого круга локализаций.

Пилотные работы по исследованию флэш-эффекта были начаты в ОИЯИ еще в 2020 г. на пучке действующего ускорителя фазотрона с энергией протонов 660 МэВ и максимальным током 1 мкА. С этой целью был сформирован однородный в сечении протонный пучок с диаметром около 45 мм (по 90 % изодозе) и с мощностью дозы 70 Гр/с.

Были также спроектированы, изготовлены и успешно испытаны две ионизационные камеры для мониторинга интенсивности пучка и измерения его горизонтального и вертикального профилей, разработано программное обеспечение для экспресс-обработки отсканированных изображений с радиохромных пленок. Все это

позволило начать проведение исследований флэш-эффекта при облучении как клеточных культур, так и малых лабораторных животных (мышей, крыс). Кроме того, такой высокоинтенсивный пучок полезен при тестировании различных создаваемых детекторов для дозиметрии в условиях сверхвысоких мощностей дозы, что является крайне актуальным для реализации будущего проекта.

В итоге была определена основная цель работы – облучение клеточных культур карциномы легкого человека линии A549 протонным пучком в двух режимах – стандартном и флэш-режиме.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Облучение протонами.** Облучение культуры клеток A549 проводили на протонном пучке 660 МэВ фазотрона ОИЯИ методом «на пролет» в двух режимах – стандартном, при мощности дозы около 0.1 Гр/с, и в флэш-режиме, при мощности дозы 70 Гр/с (см. рис. 1). Остальные параметры пучка были одинаковы для обоих режимов облучения.

**Клеточная культура.** Клетки карциномы легкого человека A549 культивировали в чашках Петри либо в культуральных флаконах в зависимости от задачи эксперимента. Клетки инкубировали в стандартных условиях (37.0°C, 5% CO<sub>2</sub>). Для культивирования использовалась питательная среда Игла MEM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамин, пенициллин-стрептомицин (50 ед./мл).

**Определение клоногенной выживаемости клеток.** Клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером, снимали с культурального флакона с помощью раствора трипсин-версена, ресуспендировали в эппендорфы и облучали протонами в дозе 0, 0.5, 1, 2, 4 и 6 Гр. Затем клетки высевали в культуральные флаконы из расчета 50 клеток/мл среды. Клетки культивировали в стандартных условиях в течение времени, необходимого для формирования колоний. Далее клетки промывали фосфатно-солевым буфером и окрашивали смесью метанола и кристаллического фиолетового в течение 30 мин при комнатной температуре. Для определения выживаемости клеток через 12–14 суток после посева подсчитывали количество выросших колоний, где каждая колония считается представляющей выжившую клетку, способную к пролиферации. Для определения выживаемости рассчитывали по формуле (1) эффективность посева ( $\mathcal{E}П$ ) для облученных и необлученных клеток:

$$\mathcal{E}П = \frac{\text{Число выросших колоний}}{\text{Число посеянных клеток}} \times 100\%. \quad (1)$$

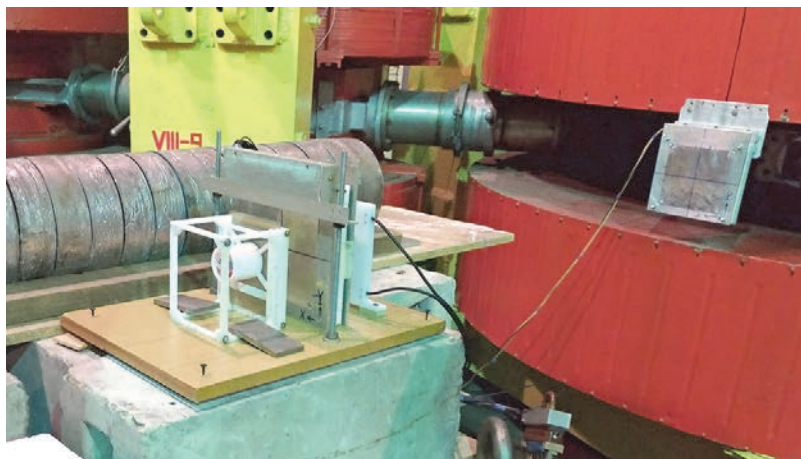


Рис. 1. Установка для облучения биологических образцов методом «на пролет».

Далее по формуле (2) рассчитывали выживаемость ( $S$  – survival):

$$S = \frac{\text{ЭП}_{\text{облученных клеток}}}{\text{ЭП}_{\text{контрольных клеток}}} \times 100\%. \quad (2)$$

**Статистическая обработка.** Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение. Сравнение групп данных проводили с помощью  $t$ -критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения поставленных задач был сформирован протонный пучок (рис. 2), однородный в сечении (в пределах  $\pm 5\%$ ) с диаметром плоской части 45–47 мм, при этом мощность дозы можно было варьировать параметрами ускорителя от 0.05 Гр/с до 70–75 Гр/с. Для получения информации о поперечном распределении пучка использовали радиохромную пленку ЕВТ-3 [24] и специально разработанное программное обеспечение для экспресс-обработки информации со сканов облученной пленки, а также созданную пиксельную ионизационную камеру с малым межэлектродным зазором.

Предписанная доза отпускалась по показаниям специально созданной мониторинговой плоскопараллельной ионизационной камеры, работающей в линейном режиме для всего диапазона используемых мощностей дозы. Предварительно эту камеру в начале сеанса работы калибровали на протонном пучке с помощью клинического дозиметра Unidos E с плоскопараллельной ионизационной камерой Markus производства фирмы РТW

(Freiburg, Германия) [25] при стандартной мощности дозы.

На рис. 3 представлены результаты экспериментов по изучению изменения клоногенной выживаемости клеток линии А549 при облучении в нормоксических условиях в стандартном и флэш-режиме. Было обнаружено незначительное различие в изменении выживаемости клеток А549, облученных в флэш- и стандартном режимах. Следует отметить, что статистически значимый уровень различий ( $p < 0.05$ ) появляется только при больших дозах (4 и 6 Гр), а в диапазоне доз до 2 Гр планки погрешностей пересекаются, статистически значимые различия между кривыми не обнаружены. Тем не менее если рассматривать общую тенденцию по всем точкам, то отчетливо видно, что облучение протонами при сверхвысокой мощности дозы снижает выживаемость клеток карциномы легкого человека линии А549 меньше, чем при облучении в стандартном режиме. В данной работе величина флэш-эффекта представлена фактором изменения дозы. Фактор изменения дозы определялся как отношение

$\frac{\text{Доза флэш}}{\text{Доза стандарт}}$  для 10%-го уровня выживаемости.

Для данных исследований он составил 1.1. Такое значение не противоречит данным других исследовательских групп, где фактор изменения дозы обычно составлял 1.1–1.5 [26]. Анализ работ *in vivo* свидетельствует о том, что облучение во флэш-режиме способствует сохранению нормальных тканей [2, 4, 27–29]. Однако результаты исследования клоногенной выживаемости *in vitro* при нормоксических условиях облучения носят противоречивый характер как в последних работах [18, 30–32], так и в более ранних исследованиях [33–38].

С полученными нами данными, а именно, более высоким уровнем выживаемости при облуче-

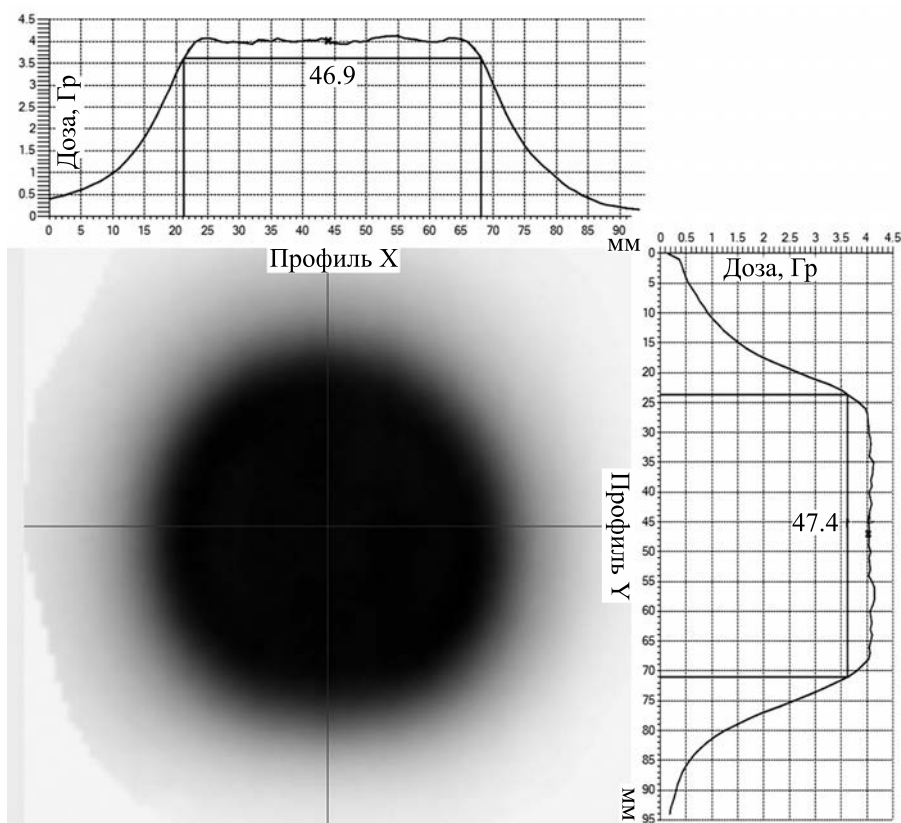


Рис. 2. Восстановленные горизонтальный и вертикальный профили сформированного протонного пучка, полученные с помощью радиохромной пленки.

нии со сверхвысокой мощностью дозы, согласуются работы [18, 28, 37–41], но следует отметить, что есть и другие результаты, указывающие на отсутствие различий [30, 31, 33–36] или даже на обратный эффект [42]. Наличие противоречивых

результатов требует дальнейшего более детального исследования этой проблемы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на наличие противоречивых результатов в различных исследовательских группах, дальнейшее изучение флэш-эффекта представляет огромный теоретический и практический интерес. Применение флэш-режима в радиотерапии может минимизировать повреждения здоровой ткани и сократить количество фракций облучения. Тем не менее на данный момент отсутствует хорошо проработанное представление о механизме действия флэш-эффекта. Необходимы дальнейшие исследования, которые помогут прояснить его радиобиологический механизм. Также следует уделить особое внимание разработке специального оборудования и средств дозиметрии для проведения экспериментов в режиме флэш-облучения.

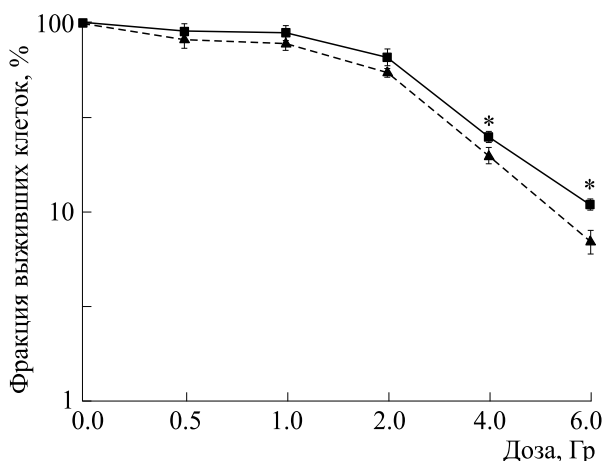


Рис. 3. Кривые выживаемости клеток линии A549 при облучении в двух режимах: стандартном и флэш (\* –  $p < 0.05$ ).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Favaudon V., Labarbe R., and Limoli C. L. Model studies of the role of oxygen in the FLASH effect. *Med. Phys.*, **49** (3), 2068 (2022).
- Favaudon V., Caplier L., Monceau V., Pouzoulet F., Sayarath M., Fouillade C., Poupon M. F., Brito I., Hupé P., Bourhis J., Hall J., Fontaine J. J., and Vozenin M. C. Ultrahigh dose-rate flash irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice, *Sci. Transl. Med.*, **6** (245), 245ra93 (2014). DOI: 10.1126/scitranslmed.3008973
- Fouillade C., Curras-Alonso S., Giuranno L., Quelenec E., Heinrich S., Bonnet-Boissinot S., Beddok A., Leboucher S., Karakurt H. U., Bohec M., Baulande S., Vooijs M., Verrelle P., Dutreix M., Londoño-Vallejo A., and Favaudon V. FLASH irradiation spares lung progenitor cells and limits the incidence of radio-induced senescence. *Clin. Cancer Res.*, **26** (6), 1497–1506 (2020). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1440
- Vozenin M. C., De Fornel P., Petersson K., Favaudon V., Jaccard M., Germond J. F., Petit B., Burki M., Ferrand G., Patin D., Bouchaab H., Ozsahin M., Bochud F., Bailat C., Devauchelle P., and Bourhis J. The advantage of FLASH radiotherapy confirmed in minipig and cat-cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, **25** (1), 35–42 (2019). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3375
- Bourhis J., Sozzi W. J., Jorge P. G., Gaide O., Bailat C., Duclos F., Patin D., Ozsahin M., Bochud F., Germond J. F., Moeckli R., and Vozenin M. C. Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy. *Radiother. Oncol.*, **139**, 18–22 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.019
- Hornsey S. and Bewley D. K. Hypoxia in mouse intestine induced by electron irradiation at high dose-rates. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem., Med.*, **19** (5), 479 (1971).
- Weiss H., Epp E. R., Heslin J. M., Ling C. C., and Santomaso A. Oxygen depletion in cells irradiated at ultrahigh dose-rates and at conventional dose-rates. *Int. J. Radiat. Biol.*, **26** (1), 17–29 (1974). DOI: 10.1080/09553007414550901
- Epp E. R., Weiss H., Djordjevic B., and Santomaso A. The radiosensitivity of cultured mammalian cells exposed to single high intensity pulses of electrons in various concentrations of oxygen. *Radiat. Res.*, **52** (2), 324 (1972).
- Gao F., Yang Y., Zhu H., Wang J., Xiao D., Zhou Z., Dai T., Zhang Y., Feng G., Li J., Lin B., Xie G., Ke Q., Zhou K., Li P., Shen X., Wang H., Yan L., Lao C., Shan L., Li M., Lu Y., Chen M., Feng S., Zhao J., Wu D., and Du X. First demonstration of the FLASH effect with ultrahigh dose rate high-energy X-rays. *Radiother. Oncol.*, **166**, 44–50 (2022). DOI: 10.1016/j.radonc.2021.11.004
- Loo B. W., Schuler E., Lartey F. M., Rafat M., King G. J., Trovati G. J., Koong A. C., and Maxim P. G. Delivery of ultra-rapid flash radiation therapy and demonstration of normal tissue sparing after abdominal irradiation of mice, *Int. J. Radiat. Oncol.*, **98**, E16 (2017).
- Simmons D. A., Lartey F. M., Schüller E., Rafat M., King G., Kim A., Ko R., Semaan S., Gonzalez S., Jenkins M., Pradhan P., Shih Z., Wang J., von Eyben R., Graves E. E., Maxim P. G., Longo F. M., and Loo B. W., Jr. Reduced cognitive deficits after FLASH irradiation of whole mouse brain are associated with less hippocampal dendritic spine loss and neuroinflammation. *Radiother. Oncol.*, **139**, 4–10 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.006
- Singers S. B., Krzysztosf S. M., Ankjærgaard C., Johansen J., Andersen C. E., Kanouta E., Overgaard C., Grau C., and Poulsen P. In vivo validation and tissue sparing factor for acute damage of pencil beam scanning proton FLASH, *Radiother. Oncol.*, **167**, 109–115 (2022). DOI: 10.1016/j.radonc.2021.12.022
- Montay-Gruel P., Acharya M. M., Gonçalves Jorge P., Petit B., Petridis I. G., Fuchs P., Leavitt R., Petersson K., Gondré M., Ollivier J., Moeckli R., Bochud F., Bailat C., Bourhis J., Germond J. F., Limoli C. L., and Vozenin M. C. Hypofractionated FLASH-RT as an Effective Treatment against Glioblastoma that Reduces Neurocognitive Side Effects in Mice. *Clin. Cancer Res.*, **27** (3), 775–784 (2021). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0894
- Levy K., Natarajan S., Wang J., Chow S., Eggold J. T., Loo P. E., Manjappa R., Melemenidis S., Lartey F. M., Schüller E., Skinner L., Rafat M., Ko R., Kim A., H Al-Rawi D., von Eyben R., Dorigo O., Casey K. M., Graves E. E., Bush K., Yu A. S., Koong A. C., Maxim P. G., Loo B. W. Jr, Rankin E. B. Abdominal FLASH irradiation reduces radiation-induced gastrointestinal toxicity for the treatment of ovarian cancer in mice. *Sci Rep.*, **10** (1), 21600 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-78017-7
- Вайнсон А. А. и Соловьева Е. В., Флэш-эффект в лучевой терапии злокачественных новообразований и поиски его радиобиологического объяснения. *Онкологич. журн.: лучевая диагностика, лучевая терапия*, **5** (4), 9 (2022).
- Bourhis J., Sozzi W. J., Jorge P. G., Gaide O., Bailat C., Duclos F., Patin D., Ozsahin M., Bochud F., Germond J. F., Moeckli R., and Vozenin M. C. Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy.

- Radiother. Oncol.*, **139**, 18–22 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.019
17. Durante M., Bräuer-Krisch E., and Hill M. Faster and safer? FLASH ultra-high dose rate in radiotherapy. *Br. J. Radiol.*, **91**, 20170628 (2018).
  18. Adrian G., Konradsson E., Lempart M., Bäck S., Ceberg C., and Petersson K. The FLASH effect depends on oxygen concentration, *Br. J. Radiol.*, **93**, 20190702 (2020).
  19. Spitz D. R., Buettner G. R., Petronek M. S., St-Aubin J. J., Flynn R. T., Waldron T. J., and Limoli C. L., An integrated physico-chemical approach for explaining the differential impact of FLASH versus conventional dose rate irradiation on cancer and normal tissue responses. *Radiother. Oncol.*, **139** (16), 23 (2019).
  20. Petersson K., Adrian G., Butterworth K., and McMahon S. J. A quantitative analysis of the role of oxygen tension in flash radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **107**, 539 (2020).
  21. Wardman P. Radiotherapy using high-intensity pulsed radiation beams (flash): a radiation-chemical perspective. *Radiat. Res.*, **194**, 607 (2020).
  22. Агапов А. В., Гаевский В. Н., Лучин Е. И., Мицын Г. В., Молоканов А. Г., Цейтлина М. А., Швидкий С. В. и Шипулин К. Н. 50 лет со дня облучения первого пациента протонным пучком в Объединенном институте ядерных исследований (Дубна). *Мед. физика*, **4** (76), 121 (2017).
  23. Карамышев В., Бунятов К. С., Гибинский А. Л., Гурский С. В., Карамышева Г. А., Ляпин И. Д., Малинин В. А., Попов Д. В., Ширков Г. Д. и Ширков С. Г. Исследования и разработка сверхпроводящего циклотрона SC230 для протонной терапии. *Письма в ЭЧАЯ*, **18** (1), 73 (2021).
  24. Официальный сайт GafChromic. URL: <http://www.gafchromic.com/>
  25. Официальный сайт PTW The Dosimetry Company. URL: <https://www.ptwdosimetry.com/en>
  26. Wilson J. D., Hammond E. M., Higgins G. S., and Petersson K. Ultra-high dose rate (flash) radiotherapy: silver bullet or fool's gold? *Front. Oncol.*, **9**, 1563 (2020).
  27. Montay-Gruel P., Petersson K., Jaccard M., Boivin G., Germond J.-F., Petit B., Doenlen R., Favaudon V., Bochud F., Bailat C., Bourhis J., Vozenin M. C. Irradiation in a flash: unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation with dose rates above 100 Gy/s, *Radiother. Oncol.*, **124**, 365–369 (2017). DOI: 10.1016/j.radonc.2017.05.003
  28. Montay-Gruel P., Acharya M. M., Petersson K., Alikhani L., Yakkala C., Allen B. D., Ollivier J., Petit B., Jorge P. G., Syage A. R., Nguyen T. A., Baddour A. A. D., Lu C., Singh P., Moeckli R., Bochud F., Germond J. F., Froidevaux P., Bailat C., Bourhis J., Vozenin M. C., and Limoli C. L. Long-term neurocognitive benefits of FLASH radiotherapy driven by reduced reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116** (22), 10943–10951 (2019). DOI: 10.1073/pnas.1901777116
  29. Fouillade C., Curras-Alonso S., Giuranno L., Quelenec E., Heinrich S., Bonnet-Boissinot S., Beddok A., Leboucher S., Karakurt H. U., Bohec M., Baulande S., Vooijs M., Verrelle P., Dutreix M., Londoño-Vallejo A., and Favaudon V. FLASH irradiation spares lung progenitor cells and limits the incidence of radio-induced senescence. *Clin. Cancer Res.*, **26** (6), 1497–1506 (2020). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1440
  30. Buonanno M., Grilj V., and Brenner D. J. Biological effects in normal cells exposed to flash dose rate protons. *Radiother. Oncol.*, **139**, 51 (2019).
  31. Khan S., Bassenne M., Wang J., Manjappa R., Melemenidis S., Breikreutz D. Y., Maxim P. G., Xing L., Loo B. W. Jr, and Pratz G. Multicellular Spheroids as In Vitro Models of Oxygen Depletion During FLASH Irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **110** (3), 833–844 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.01.050
  32. Venkatesulu B. P., Sharma A., Pollard-Larkin J. M., Sadagopan R., Symons J., Neri S., Singh P. K., Taylor R., Lin S. H., and Krishnan S. Ultra high dose rate (35Gy/sec) radiation does not spare the normal tissue in cardiac and splenic models of lymphopenia and gastrointestinal syndrome. *Sci Rep.*, **9** (1), 17180 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-53562-y
  33. Cygler J., Klassen N. V., Ross C. K., Bichay T. J., and Raaphorst G. P. The survival of aerobic and anoxic human glioma and melanoma cells after irradiation at ultrahigh and clinical dose rates, *Radiat. Res.*, **140**, 79 (1994).
  34. Zackrisson B. U., Nystrom U. H., and Ostbergh P. Biological response in vitro to pulsed high dose rate electrons from a clinical accelerator. *Acta. Oncol. (Madrid)*, **30**, 747 (1991).
  35. Nias A. H. W., Swallow A. J., Keene J. P., and Hodgson B. Survival of HeLa cells from 10 nanosecond pulses of electrons, *Int. J. Radiat. Biol.*, **17**, 595 (1970).
  36. Berry R. J. and Stedeford J. B. H. Reproductive survival of mammalian cells after irradiation at ultra-high dose-rates: further observations and their importance for radiotherapy. *Br. J. Radiol.*, **45**, 171 (1972).
  37. Town C. D. Effect of high dose rates on survival of mammalian cells. *Nature*, **215**, 847 (1967).
  38. Berry R. J., Hall E. J., Forster D. W., Storr T. H., and Goodman M. J. Survival of mammalian cells exposed to x rays at ultra-high dose-rates. *Br. J. Radiol.*, **42**, 102 (1969).
  39. Guo Z., Buonanno M., Harken A., Zhou G., and Hei T. K. Mitochondrial damage response and fate of normal cells exposed to flash irradiation with protons. *Radiat. Res.*, **197** (6), 569 (2022).

40. Adrian G., Konradsson E., Beyer S., Wittrup A., Butterworth K. T., McMahon S. J., Ghita M., Petersson K., Ceberg C. Cancer cells can exhibit a sparing flash effect at low doses under normoxic in vitro-conditions. *Front. Oncol.*, **29** (7), 686142 (2021).
41. Auer S., Hable V., Greube C., Drexler G. A., Schmid T. E., Belka C., Dollinger G., Friedl A. A. Survival of tumor cells after proton irradiation with ultra-high dose rates. *Radiat. Oncol.*, **6**, 139 (2011). DOI: 10.1186/1748-717X-6-139
42. Venkatesulu B. P., Sharma A., Pollard-Larkin J. M., Sadagopan R., Symons J., Neri S., Singh P. K., Tailor R., Lin S. H., and Krishnan S. Ultra high dose rate (35 Gy/sec) radiation does not spare the normal tissue in cardiac and splenic models of lymphopenia and gastrointestinal syndrome. *Sci Rep.*, **9** (1), 17180 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-53562-y

## Research on Survival of A549 Tumor Cells Following Proton Beam Irradiation Using FLASH Radiotherapy and Conventional Dose Rate Irradiation

A.V. Rzyanina\*, G.V. Mytsin\*, A.V. Agapov\*, E.A. Gritskova\*, S.S. Uglova\*, V.N. Gaevsky\*, K.N. Shipulin\*, and I. Khassenova\*

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

FLASH radiotherapy is the innovative radiotherapy technique in which the short treatment times, few tens of milliseconds, are used to deliver a therapeutic dose of radiation to the tumor. This novel approach reduces damage and minimizes the dose to normal tissues surrounding the tumor and to tissues that are affected by radiation, whilst maintaining the treatment effect on cancer cells. This regimen may improve the level of local control of the tumor and lower the occurrence of side effects. To date, the exact radiobiological mechanisms underpinning the FLASH effect are not completely understood. The paper presents the results on the delivery of a high-intensity proton beam at an energy of 660 MeV produced by Phasotron, a proton accelerator at the Joint Institute for Nuclear Research, Dubna. This proton beam has been created to perform radiobiological studies involving cell cultures and small laboratory animals (mice, rats) using FLASH radiation. Also, the survival rates were compared between A549 cells irradiated at extremely high dose rates (FLASH technique) and those exposed to conventional irradiation with the lower dose rate. It was found that there is a difference between these groups of A549 cells in the survival rates. The magnitude of the FLASH effect is represented by a factor of different dose rates.

*Keywords: proton therapy, flash effect, ultrahigh dose rate irradiation, clonogenic cell survival assay, cell culture A 549*

УДК 571.3

## ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СОСТАВОМ ПРИРОДНОЙ ВОДЫ И СОСТОЯНИЕМ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

© 2024 г. Л.Н. Шишкина\*, А.С. Дубовик\*, В.О. Швыдкий\*, М.В. Козлов\*,  
Е.В. Штамм\*\*, А.Г. Георгиади\*\*\*

\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия  
E-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

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

\*\*\* Институт географии РАН, Старомонетный переулок, 29, Москва, 119017, Россия

Поступила в редакцию 25.01.2024 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Изучены взаимосвязи между составом компонентов пяти образцов природной воды и состоянием параметров системы регуляции перекисного окисления липидов модельной системы на основе природных фосфолипидов, а также их участие в формировании токсичности природной воды. Показано, что присутствие N- и P-содержащих соединений в пробах природной воды приводит к ингибированию процессов автоокисления лецитина и интенсивности люминесценции светящихся бактерий, оказывает существенное влияние на спонтанную агрегацию лецитина, а рост содержания гидрофобных соединений увеличивает отрицательное значение  $\zeta$ -потенциала его частиц. Высокая чувствительность параметров системы регуляции перекисного окисления липидов к наличию компонентов в природной воде даже в малых концентрациях позволяет рассматривать их в качестве перспективных тестов для оценки влияния природной воды на биологические объекты. Математическая обработка ультрафиолетовых спектров природной воды по методу Гаусса может быть использована в качестве экспресс-теста для анализа ее гидрохимического состава. Влияние компонентов природной воды на состояние мембран биологических объектов и внутриклеточные процессы подтверждено методами биотестирования.

*Ключевые слова:* природная вода, гидрохимические показатели, перекисное окисление липидов, регуляция, лецитин, УФ-спектрометрия, метод Гаусса, биотестирование.

DOI: 10.31857/S0006302924020161, EDN: OTRCGX

Несмотря на то что исследования структурированности воды, обусловленной ее способностью образовывать водородные связи, начались давно [1–3], они не утратили своей актуальности до сих пор [4]. С одной стороны, это связано с образованием в высокоразбавленных растворах присутствующими в воде соединениями наноасоциатов, что обуславливает их физико-химические и биологические свойства [5–7]. С другой стороны, биологически активные вещества и физические факторы низкой интенсивности харак-

теризуются широким спектром биологической активности при воздействии на биологические объекты даже в фоновых концентрациях [8–11].

Вода, обладающая высокой диэлектрической проницаемостью, является уникальным растворителем. Это создает условия для присутствия в природной воде огромного количества соединений от неорганических ионов до микроорганизмов. Необходимо также иметь в виду, что возрастание антропогенной нагрузки на биоту и способность химических токсикантов перемещаться на значительные расстояния от источников загрязнения оказывают существенное влияние на многокомпонентный состав и концентрацию растворенных в природной воде соединений, способных вызывать различные биологические эффекты при поступлении их в организм. Не-

*Сокращения:* ПОЛ – перекисное окисление липидов, ХПК – химическое потребление кислорода, БПК – биологическое потребление кислорода, ФЛ – фосфолипиды, ТБК-АП – ТБК-активные продукты (продукты окисления, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой), УФ – ультрафиолетовый.



предсказуемость совместного действия разных факторов, особенно в низких концентрациях, обуславливает необходимость поиска метаболически важных показателей, изменения которых позволили бы адекватно оценить последствия их воздействия на биообъекты.

Окислительные процессы играют важную роль как в регуляции метаболизма в биологических системах разной сложности, так и в формировании баланса окислительно-восстановительных процессов в природной воде [12, 13]. Выявленная ранее высокая чувствительность параметров физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях лабораторных мышей к воздействию различных токсикантов в малых дозах [14, 15] и возможность использования модельных систем на основе природных липидов для оценки качества водной среды [16] позволяют предложить использования данных подходов для выявления взаимосвязей в системе «природная вода – биообъект».

Целью работы явилось изучение взаимосвязи между гидрохимическими показателями и состоянием параметров физико-химической системы регуляции ПОЛ модельных биологических систем и токсичностью природной воды рек Среднерусской равнины.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы воды отбирали из поверхностного слоя (глубина 10 см, объем 500 мл) рек Среднерусской равнины в летний период и хранили в холодильнике, добавив в каждую пробу 1 мл хлороформа для фиксации. Места и дата отбора проб приведены в табл. 1. Для удаления механических примесей пробы воды фильтровали и определяли рН и гидрохимические показатели: количество общего азота ( $N_{\text{общ}}$ ) в соответствии с РД 52.24.364-2007, содержание аммонийного азота ( $NH_4^+$ ) фотометрически с реактивом Несслера (метод А) при 425 нм, содержание нитритов ( $NO_2^-$ ) фотометрически при 540 нм с реактивом Грисса, количество ортофосфатов ( $PO_4^{3-}$ ) и общего фосфора ( $P_{\text{общ}}$ ) по ГОСТ 18309-2014, варианты Б и В.

Для определения химического потребления кислорода (ХПК), т.е. количества кислорода, требующегося для окисления находящихся в воде органических и неорганических восстановителей, аликвоты проб объемом 100 мл фиксировали 1 мл 4 мМ серной кислоты и далее хранили в морозильной камере холодильника ( $-18^\circ\text{C}$ ) с последующим определением по ГОСТ 13859-2012. Для определения биологического потребления кислорода (БПК), т.е. количества кислорода, необходимого для окисления органических веществ в аэробных условиях, пробы хранили без доступа

света при  $20^\circ\text{C}$  в течение 5 суток и анализировали в соответствии с РД 52.24.420-2006.

В качестве модельной системы природных фосфолипидов (ФЛ) использовали 10%-ный раствор соевого лецитина в этаноле («БИОЛЕК», Харьков, Украина). После вскрытия ампулы и отгонки этанола лецитин растворяли либо в хлороформе (для определения состава липидов), либо в дистиллированной воде (для мицеллообразования). Качественный состав липидов лецитина определяли методом тонкослойной хроматографии, используя стеклянную пластинку размером  $90 \times 120$  мм, силикагель типа Н (Sigma, США) и смесь хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота : дистиллированная вода в объемном соотношении 12.5 : 7.5 : 2 : 1 в качестве мобильной фазы [17]. На пластинку наносили пять параллельных дорожек. Хроматограмму проявляли в парах йода. После удаления пятен ФЛ с пластинки и сжигания их хлорной кислотой до неорганического фосфора количественный анализ состава ФЛ проводили по образованию фосфомолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты при длине волны 815 нм на спектрофотометре ПЭ 5400ВИ (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия). Подробности методики приведены в работе [9]. Помимо количественного соотношения фракций, ФЛ оценивали также обобщенные показатели состава липидов: доля (%) ФЛ и отношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ ( $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$ ), характеризующее способность липидов к окислению [18]. Отношение  $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$  вычисляли по формуле:

$$(\text{ФИ} + \text{ФС} + \text{ФЭ} + \text{КЛ} + \text{ФК}) / (\text{ЛФХ} + \text{СЛ} + \text{ФХ}),$$

где ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, КЛ – кардиолипид, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы ФЛ, СЛ – сфинголипиды, ФХ – фосфатидилхолин.

Ультрафиолетовые (УФ) спектры проб природной воды, разбавленных в два раза дистиллированной водой, регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (PharmaSpec, Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм. Полученные УФ-спектры подвергали математической обработке по методу Гаусса в программе Excel solver при условии совпадения контура исходного спектра с расчетным после аппроксимации на уровне  $10^{-3} - 10^{-5}$ .

Содержание вторичных продуктов окисления, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты, ТБК-АП), определяли при длине волны 532 нм на спектрофотометре ПЭ 5400ВИ (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия) по методу [19] и относили к 1 мг лецитина.

Таблица 1. Место и дата отбора проб природной воды и рН воды

№ пробы	Место отбора	Дата отбора	рН
Проба 1	р. Ока, район Колычево, г. Коломна, Московская область	26.07.2022	7.90
Проба 2	р. Верда, выше г. Скопин, Рязанская область	28.07.2022	6.70
Проба 3	р. Пра, Брыкин бор, Окский биосферный заповедник, Рязанская область	29.07.2022	8.50
Проба 4	р. Воймега, выше г. Рошаль, Шатурский район. Московская область	30.07.2022	8.20
Проба 5	р. Дубна, около д. Юркино, Талдомский район, Московская область	14.08.2022	7.95

Размер и дзета-потенциал ( $\xi$ -потенциал) агрегатов лецитина в дистиллированной и в природной воде определяли методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) при температуре 25°C и угле рассеяния 173°. Источником света являлся гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм. Концентрация лецитина составляла  $4.3 \cdot 10^{-5}$  М. Сбор данных и первичную обработку осуществляли с помощью программы Zetasizer Software 6.20 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Каждое измерение повторяли не менее пяти раз.

Токсичность проб воды ( $T$ ) оценивали, используя две модельные системы: биотест «ЭКОЛЮМ» (ЗАО «НВО Иммунотех», Москва, Россия) и инфузории *Tetrahymena pyriformis* (штамм WH14) из коллекции Всероссийского НИИ санитарии и экологии (Москва, Россия). Препарат «ЭКОЛЮМ» представляет собой раствор лиофилизированных светящихся бактерий в 0.3%-ном хлориде натрия. Интенсивность биолюминесценции регистрировали спустя 5 и 30 мин экспозиции с помощью биолюминометра 8810 (СКТБ «Наука», Красноярск, Россия). Количественную оценку тест-реакции, выраженную в %, рассчитывали по формуле:

$$T = 100 \times (I_0 - I) / I_0,$$

где  $I_0$  и  $I$  – интенсивность биолюминесценции 1.5%-го раствора NaCl в дистиллированной и природной воде соответственно. Острую токсичность природной воды определяли в соответствии с ПНД ФТ ( $K, \%$ ) по приросту числа клеток *Tetrahymena pyriformis* спустя 20 ч экспозиции в 0.15%-ном NaCl в природной и дистиллированной воде ( $K = A_{\text{оп}} / A_{\text{контр}}$ ) соответственно с помощью программно-технического автоматизированного комплекса биотестирования «БиоЛаТ-3» (ООО «Евролитест», Москва, Россия).

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными статистическими методами, используя программный продукт MS Excel и пакет компьютерных программ KINS [20]. Данные представлены в виде средних арифметических

значений с указанием их среднеквадратичных ошибок ( $M \pm m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы явился анализ состава и физико-химических свойств проб речной воды из пяти рек Московской и Рязанской областей. Значения рН проб воды и их гидрохимические показатели приведены в табл. 1 и 2. Величины рН исследованных проб речной воды варьируют от слабокислых до щелочных значений (табл. 1), что соответствует ранее полученным данным для проб природной воды из Воронежской и Московской областей [16].

Безусловно, гидрохимический состав исследованных образцов природной воды существенно зависит от места отбора проб (табл. 2). Даже визуально пробы № 2, № 3 и № 4 имеют слабую коричневатую окраску разной интенсивности. Необходимо обратить внимание, что соотношение неорганических и органических N- и P-содержащих соединений также обусловлено различиями протекающих в водной среде гидрохимических и биологических процессов. Так, в исследованных образцах № 2 и № 4 выявлено высокое количество N-содержащих веществ, среди которых преобладают органические соединения (табл. 2). Количество P-содержащих соединений в исследованных образцах существенно меньше, чем N-содержащих соединений. При этом в образцах № 3 и № 4 среди P-содержащих веществ преобладают неорганические фосфаты, а в природной воде р. Ока (образец № 1) количество P-содержащих органических соединений почти в 1.5 раза выше, чем фосфатов (табл. 2). Необходимо отметить также, что в исследованных пробах содержание нитритов превышает предельно допустимую концентрацию (ПДК) только в образцах № 2 и № 5, а NH<sub>4</sub>-содержащих веществ и фосфатов – в образце № 4. Обнаружено, что значения ХПК (табл. 2) проб №3 и №4, характеризующихся повышенным содержанием фосфатов, существенно превышают предельно допустимые нормативные показатели для общего водопотребления, а в остальных пробах величины ХПК ниже нормативных значений (ПДК < 30). Однако значения

**Таблица 2.** Значения химического и биологического потребления кислорода и гидрохимические показатели проб природной воды

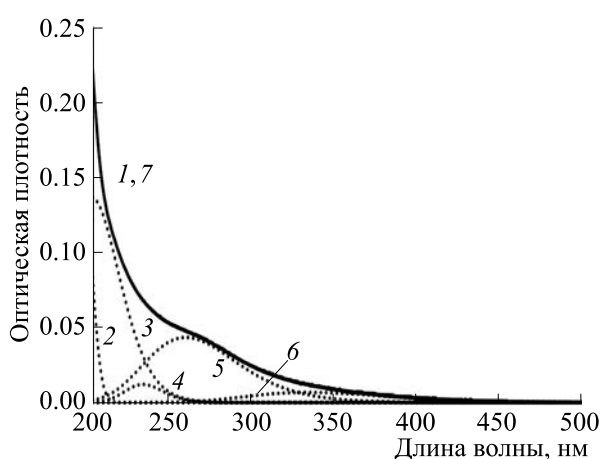
Показатель	р. Ока (проба № 1)	р. Верда (проба № 2)	р. Пра (проба № 3)	р. Воймега (проба № 4)	р. Дубна (проба № 5)
ХПК, мг/л	22.2 ± 3.6	20.8 ± 0.5	63.8 ± 1.2	75.0 ± 15.0	28.6 ± 2.5
БПК, мг/л	3.2 ± 1.2	1.5 ± 0.6	2.6 ± 1.0	0.7 ± 0.3	–
[N <sub>общ.</sub> ], мг/л	0.24 ± 0.07	1.60 ± 0.4	0.87 ± 0.26	1.38 ± 0.41	–
[NO <sub>2</sub> ], мг/мл	0.015 ± 0.005	0.055 ± 0.024	0.004 ± 0.004	0.003 ± 0.003	0.090 ± 0.010
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ], мг/мл	0.180 ± 0.037	0	0.540 ± 0.076	0.410 ± 0.058	0.113 ± 0.039
[P <sub>общ.</sub> ], мг/л	0.263 ± 0.078	0.035 ± 0.014	0.322 ± 0.097	0.431 ± 0.103	–
[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ], мг/л	0.105 ± 0.005	0.022 ± 0.002	0.171 ± 0.021	0.316 ± 0.036	0.187 ± 0.014

БПК (табл. 2) соответствуют величинам, характерным для поверхностных вод (БПК < 4.0), что, очевидно, обусловлено относительно низким содержанием органических веществ в исследуемых образцах природной воды.

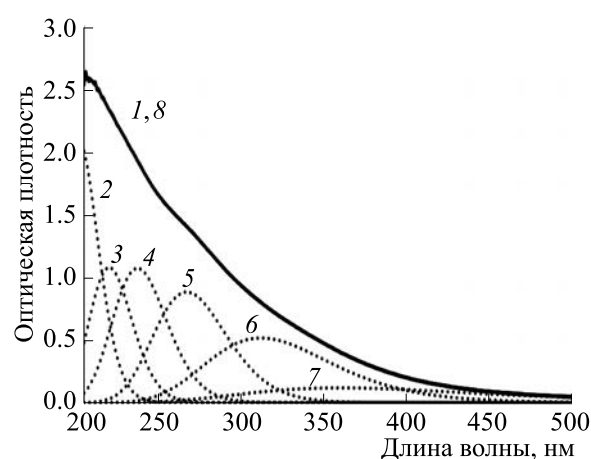
Различия в составе проб природной воды четко выявляются и при математическом анализе их УФ-спектров по методу Гаусса. Типичные УФ-спектры природной воды и их гауссианы приведены на рис. 1 и 2. В образце № 1 (рис. 1) выявлены максимумы полос поглощения, характерные для гидрофобных соединений, в том числе и липидной природы ( $\lambda = 200$  нм), соединений с сопряженными двойными связями ( $\lambda = 231$  нм), N-содержащих соединений ( $\lambda = 257$  нм) и P-содержащих веществ ( $\lambda = 333$  нм). Природная вода образца № 4 характеризуется не только повышенным содержанием, но и большим набором ком-

понентов (рис. 2). В этом образце присутствуют гидрофобные соединения ( $\lambda = 198$  нм), свободные жирные кислоты ( $\lambda = 216$  нм), соединения с сопряженными двойными связями ( $\lambda = 233$  нм) и P-содержащие органические и неорганические соединения ( $\lambda > 300$  нм).

В табл. 3 представлены основные максимумы полос поглощения в УФ-спектрах исследованных образцов природной воды. Сопоставление данных табл. 2 и 3 свидетельствует о том, что максимумы гауссиан и природа компонентов образцов воды соответствуют содержанию в них гидрохимических показателей. Следовательно, анализ УФ-спектров и их математическая обработка по методу Гаусса могут быть предложены в качестве экспресс-метода оценки состава природной воды.



**Рис. 1.** УФ-спектр природной воды р. Ока (проба № 1) и его гауссианы: кривые 1 и 7 — исходный и расчетный спектры, кривая 2 — 195 нм, кривая 3 — 199.6 нм, кривая 4 — 231.0 нм, кривая 5 — 257.4 нм, кривая 6 — 333.0 нм.



**Рис. 2.** УФ-спектр природной воды р. Воймега (проба № 4) и его гауссианы: кривые 1 и 8 — исходный и расчетный спектры, кривая 2 — 196.7 нм, кривая 3 — 215.5 нм, кривая 4 — 232.9 нм, кривая 5 — 263 нм, кривая 6 — 308.9 нм, 7 — кривая 358.3 нм.

**Таблица 3.** Оптическая плотность и длина волны максимумов полос поглощения УФ-спектров исследованных образцов природной воды

Образец	Оптическая плотность/длина волны, нм
№ 1	0.136/199.6
	0.012/231.0
	0.043/257.4
	0.007/333.
№ 2	0.232/195.3
	0.088/206.4
	0.072/216.7
	0.014/256.4
№ 3	0.030/263.2
	1.534/193.8
	0.861/210.1
	0.847/226.9
№ 4	0.677/254.8
	0.110/357.5
	2.09/196.7
	1.074/215.5
№ 5	1.071/232.9
	0.878/263.2
	0.516/308.9
	0.115/358.3
№ 5	0.694/192.8
	0.097/212.6
	0.031/227.7
	0.046/249.6
	0.045/268.8

В работах [15, 16] было экспериментально показано, что соевый лецитин является адекватной модельной системой для оценки как влияния компонентов водной среды на биологические объекты, так и качества природной воды. Однако высокая лабильность липидного компонента любых природных объектов обуславливает необходимость контролировать состав липидов конкретного образца. Количественное соотношение фракций ФЛ в использованном образце лецитина приведено в табл. 4.

При спонтанной агрегации в дистиллированной воде данная партия лецитина образует основную фракцию частиц ( $82.2 \pm 0.8\%$ ) со средним диаметром  $780 \pm 40$  нм, в то время как  $17.6 \pm 1.0\%$  частиц имеют средний диаметр  $130 \pm 13$  нм. При-

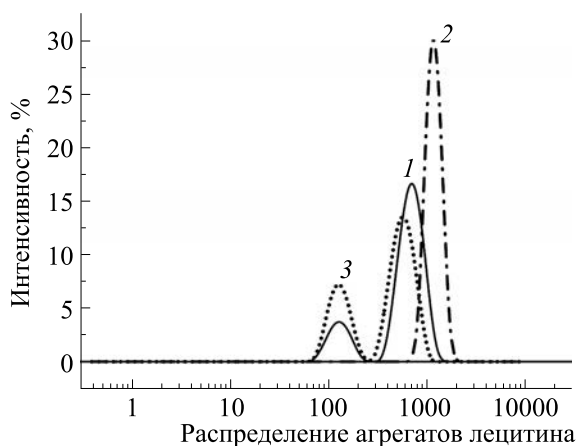
родная вода оказывает существенное влияние на спонтанную агрегацию лецитина. Так, в присутствии образцов воды № 1, № 2 и № 5 лецитин образует практически одну фракцию частиц, доля которой варьирует от  $91.4 \pm 1.5\%$  до  $100\%$ , а средний диаметр – от  $1125 \pm 40$  нм до  $1245 \pm 65$  нм. В присутствии же проб из р. Пра (образец № 3) и р. Воймега (образец № 4), в воде которых практически отсутствуют нитриты и обнаружено наиболее высокое содержание аммонийного азота (табл. 2), выявлено резкое уменьшение доли основной фракции агрегатов лецитина до  $64.3 - 65.7\%$ , средний диаметр которых составляет  $610 \pm 40$  нм и  $595 \pm 90$  нм соответственно. Типичные кривые распределения размера агрегатов лецитина в водной среде представлены на рис. 3.

Наиболее существенное влияние природная вода оказывает на электрофоретические свойства агрегатов лецитина, вызывая значительное уменьшение отрицательного значения его  $\xi$ -потенциала. Так, выявлен рост отрицательной величины  $\xi$ -потенциала от  $-11.0 \pm 0.5$  мВ (образец № 2) до  $-18.9 \pm 0.5$  мВ (образец № 4) с увеличением содержания гидрофобных соединений в пробах природной воды (рис. 4), в то время как у агрегатов данной партии лецитина аналогичное значение составляет  $-26.5 \pm 0.6$  мВ.

Помимо влияния на структурное состояние биологических мембран, компоненты природной воды вызывают изменение интенсивности окислительных процессов. Доля ФЛ в данном образце лецитина составляла  $83.1 \pm 3.0\%$  ( $n = 7$ ), а способность его липидов к окислению  $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ} = 0.025 \pm 0.001$  ( $n = 5$ ). Поскольку именно ФЛ являются основным субстратом ПОЛ в биологических объектах, то закономерно, что данная партия лецитина характеризуется высокой интенсивностью окисления ( $\{\text{ТБК-АП}\} = 12.3 \pm 0.6$  нмоль·мл<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>), а его липиды – достаточно высокой окисляемостью. Обнаружено, что все исследованные образцы природной воды вызывают достоверное уменьшение интенсивности ПОЛ низкотемпературного автоокисления лецитина (табл. 5), наиболее выраженное в присутствии воды рек Ока, Верда и Дубна (образцы № 1, № 2 и № 5). Именно эти образцы природной воды характеризуются низкими значениями ХПК (табл. 2) и, следовательно, содержат более низкие концентрации неорганических и органических восстановителей, чем пробы воды № 3 и № 4.

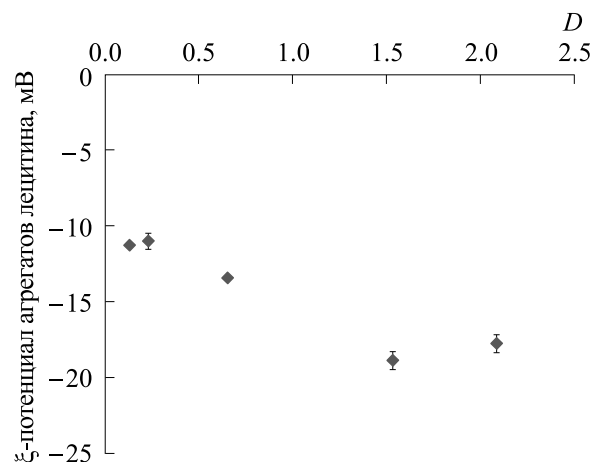
**Таблица 4.** Количественное соотношение фракций в составе фосфолипидов лецитина

Фракция ФЛ	ЛФХ	СЛ	ФХ	ФИ + ФС	ФЭ	КЛ + ФК
%Р	$5.50 \pm 0.55$	$5.80 \pm 0.85$	$86.25 \pm 0.85$	$1.38 \pm 0.13$	$0.82 \pm 0.07$	$0.24 \pm 0.03$



**Рис. 3.** Кривые распределения агрегатов лецитина в дистиллированной воде (кривая 1) и в природной воде р. Дубна (кривая 2, проба № 5) и р. Пра, (кривая 3, проба № 3) по интенсивности рассеяния. Концентрация лецитина  $4.3 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

Для выявления влияния компонентов природной воды на мембранные и внутриклеточные процессы в биологических системах были использованы методы биотестирования. Как полагают, тест-реакция с препаратом «ЭКОЛЮМ» при экспозиции в течение 5 мин обусловлена влиянием исследуемого образца водной среды на мембранную систему биообъекта. Показано наличие прямой корреляции между интенсивностью биолюминесценции и накоплением ТБК-АП при инициации ПОЛ  $Fe^{2+}$  [21]. Сравнительный анализ данных табл. 2 и 5 свидетельствует о том, что низкой интенсивности автоокисления лецитина в присутствии проб воды № 1 и № 2 соответствует и уменьшение интенсивности биолюминесценции препарата «ЭКОЛЮМ» при экспозиции в течение 5 мин практически в два раза. Однако вода р. Дубна (проба № 5), содержание



**Рис. 4.** Зависимость величины  $\xi$ -потенциала агрегатов лецитина от содержания гидрофобных соединений (оптическая плотность максимумов полос поглощения при  $\lambda = 195.6 \pm 1.2$  нм) в пробах природной воды.

нитритов и фосфатов в которой значительно выше, чем в пробах № 1 и № 2, практически не оказывает влияние на интенсивность препарата «ЭКОЛЮМ» при экспозиции в течение 5 мин (табл. 5). Очевидно, при автоокислении лецитина взаимосвязь между интенсивностью биолюминесценции и накоплением продуктов ПОЛ имеет более сложный характер. Это предположение подтверждают уменьшение в два-два с половиной раза содержания ТБК-АП при автоокислении лецитина в присутствии проб воды № 3 и № 4 с высоким содержанием N- и P-содержащих веществ и практически отсутствие их влияния на интенсивность биолюминесценции при экспозиции в течение 5 мин (табл. 2 и 5).

О влиянии проб природной воды на внутриклеточные процессы свидетельствуют и резкое уменьшение интенсивности биолюминесценции

**Таблица 5.** Влияние проб природной воды на интенсивность окисления лецитина и показатели биотестов

Показатель	р. Ока (проба № 1)	р. Верда (проба № 2)	р. Пра (проба № 3)	р. Воймега (проба № 4)	р. Дубна (проба № 5)
[ТБК-АП], Опыт/контр.	$0.147 \pm 0.009$	$0.128 \pm 0.008$	$0.403 \pm 0.024$	$0.495 \pm 0.030$	$0.147 \pm 0.009$
«ЭКОЛЮМ», 5 мин, Т, %	45.5	55.3	2.4	2.8	-5.8
«ЭКОЛЮМ», 30 мин, Т, %	89.3	92.7	28.4	45.9	-13.7
<i>Tetrahymena pyriformis</i> , К, %	0.55	0.49	0.34	0.85	0.31

ции препарата «ЭКОЛИУМ» при экспозиции в течение 30 мин (образцы № 1, № 2 № 3), и существенное уменьшение прироста клеток *Tetrahymena pyriformis* в опытных образцах № 1, № 2, № 3 и № 5 (табл. 5). Отсутствие прямой корреляции между параметрами  $T$  и  $K$ , характеризующими степень токсичности проб, позволяет предположить участие проб природной воды на разных стадиях регуляции внутриклеточных процессов в зависимости от состава и физико-химических свойств ее компонентов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, совокупность полученных данных и анализ литературы последних лет свидетельствуют о перспективности использования показателей системы регуляции окислительных процессов для оценки взаимосвязей в системе «природная вода – биологический объект» вследствие их высокой чувствительности к наличию компонентов в природной воде даже в малых дозах. Так, содержание N- и P-содержащих соединений в образцах природной воды ингибирует процессы автоокисления лецитина и интенсивность люминесценции светящихся бактерий, оказывает существенное влияние на спонтанную агрегацию лецитина, а рост содержания гидрофобных соединений увеличивает отрицательное значение  $\xi$ -потенциала его частиц. Регистрация УФ-спектров проб природной воды с последующей их математической обработкой по методу Гаусса может быть рекомендована в качестве экспресс-метода оценки гидрохимического состава проб воды, а их влияние на спонтанную агрегацию лецитина и величину  $\xi$ -потенциала агрегатов позволяет оценить воздействие проб воды на структурное состояние и электрофоретические свойства мембран биообъектов. Влияние компонентов природной воды на состояние мембран биологических объектов и внутриклеточные процессы подтверждено использованием методов биотестирования.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля (44.4 гос. № темы 0084-2019-0014) и частично поддержана Договором №111-22 с Институтом географии РАН.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eistnberg D. S. and Kauzmann W, *Structure and Properties of Water.*(Oxford University Press, New York, 1969).
2. Зенин С. В. Исследование структуры воды методом протонного магнитного резонанса. *Докл. РАН.* **332** (3), 328–329 (1993).
3. Schindler T, Berg C., Niedner-Schatterburg G., and Bondybey V. E. Reactions of water clusters  $H+(H_2O)_n= 3-75$ , with diethyl ether. *Chem. Phys.* **201** (2–3), 491–496 (1995). DOI: 10.1016/0301-0104(95)00288X
4. Смирнов А. Н., Савин А. В. и Сигов А. С., Структурные превращения в жидкой воде. *Биофизика*, **65** (2), 408–411 (2020). DOI: 10/31867/S0006302920010258
5. Коновалов А. И. и Рыжкина И.С. Образование наноассоциатов – ключ к пониманию физико-химических и биологических свойств высокоразбавленных водных растворов. *Изв. АН. Сер. химическая*, № 1, 1–14 (2014).
6. Konovalov A. I., Mal'tseva E. L., Ryzkina I. S., Mur-tazina L. I., Kiseleva Yu. V., Kasparov V. V., Pal'mina N. P. Formation of nanoassociates is a factor determining physicochemical and biological properties of highly diluted solutions. *Dokl. Phys. Chem.*, **456** (2), 86–89 (2014). DOI: 10.1134/S00125012516114060050
7. Kononov L. Chemical tractivity and solution structure: on the way to a paradigm shift? *RSC Adv.*, **5**, 46718–46734 (2015).
8. Росс. хим. журн., **58** (5) (1999). (Номер посвящен эффектам, закономерностям и механизмам действия биологически активных веществ в сверхмалых дозах и физических факторов низкой интенсивности.)
9. Урнышева В. В. и Шишкина Л. Н. Влияние химических токсикантов в широком диапазоне концентраций на характеристики липидов эритроцитов крови мышей. *Биофизика*, **49** (3), 565–571 (2004).
10. Zhernovkov V. E., Roshchina I. A., Zubareva G. M., Shmatov G. P., Lokshin B. N., and Pal'mina N. P. The study of thyrotropin-releasing hormone effect in a wide concentration range on the aquifer system by IR-spectroscopy method. *Water*, **27**, 58–68 (2010).
11. Belov V. V., Belyaeva I. A., Shmatov G. P., Zubareva G. M., and Pal'mina N. P. *Dokl. Phys. Chem.*, **439** (1), 123–126 (2011). DOI: 10.1134/S0012401611070013

12. *Chemical and Biological Kinetics. New Horizons*. Vol. 2. *Biological Kinetics*. Ed. by E. B. Burlakova and S. D. Varfolomeev (VSP, Leden-Boston, 2005).
13. Shtamm E. V., Shvydkiy V. O., Skurlatov Yu. I., and Semenyak L. V. Role of water-soluble compounds of reduced sulfur in the toxic properties of the aquatic environment. In: *Antioxidants in systems of varying complexity. Chemical, biochemical and biological aspects*. Ed. by L. N. Shishkina, A. N. Goloshchapov, and L. I. Weisfeld (AAP, Toronto, 2020), pp. 119–138.
14. Кудяшева А. Г., Загорская Н. Г., Раскоша О. В. и Шишкина Л. Н. Регуляция окислительных процессов в органах мышей при действии химических и физических факторов в малых дозах. *Биофизика*, **66** (4), 741–749 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921040141
15. Шишкина Л. Н., Козлов М. В., Повх А. Ю. и Швыдкий В. О. Роль перекисного окисления липидов в оценке последствий воздействия химических токсикантов на биообъекты. *Хим. физика*, **40** (9), 57–63 (2021). DOI: 10.31857/S0207401X21090089
16. Shvydkiy V., Dolgov S., Dubovik A., Kozlov M., Povkh A., Shishkina L., and Duca G. New Aspects for the Estimation of the State of the Natural Water. *Chem. J. Moldova*, **17** (2), 35–42 (2022). DOI: org/1019261/cjm.2022.973
17. *Биологические мембраны: методы*. Под ред. Дж. Б. С. Финдлея и В. Х. Эванза (Мир, М., 1990).
18. Шишкина Л. Н., Кушнирева Е. В. и Смотряева М. А. Новые подходы к оценке биолгических последствий1 воздействия радиации в малых дозах. *Радиаци. биология. Радиоэкология*, **44** (3), 289–295 (2004).
19. Asakawa T. and Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detesting lipid hydroperoxides. *Lipids*, **15** (3), 137–140 (1980).
20. Брин Э. Ф. и Травин С. О. Моделирование механизма химических реакций. *Хим. физика*, **10** (6), 830–837 (1991).
21. Берия Л. В., Исмаилов А. Д. и Данилов В. С. Стимуляция биолюминесцентной активности бактериальной люциферазы продуктами Fe<sup>2+</sup>-индуцированного перекисного окисления липидов. *Биохимия*, **56** (3), 477–485 (1991).

## Interrelation between Composition of Natural Water and a State of Lipid Peroxidation Processes in Biological Objects

L.N. Shishkina\*, A.S. Dubovik\*, V.O. Shvydkiy\*, M.V. Kozlov\*,  
E.V. Shtamm\*\*, and A.G. Georgiadi\*\*\*

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

\*\*N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

\*\*\*Institute of Geography, Russian Academy of Sciences, Staromonetny per. 29, Moscow, 119017 Russia

The interrelation between the composition of components of five samples of natural water and state indices for the lipid peroxidation regulatory system in a model system based on the natural phospholipids was explored and involvement of natural phospholipids in the formation of the toxicity of the natural water was also studied. It is shown that the presence of N- and P-containing compounds in natural water samples leads to inhibition of the processes relevant to lecithin autooxidation and luminescence intensity of luminous bacteria, has a significant effect on the spontaneous aggregation of lecithin, while an increase in the content of hydrophobic compounds results in a higher negative value of the  $\xi$  potential of its particles. High sensitivity of the lipid peroxidation regulatory system to the presence of components even at low concentrations in the natural water makes it a promising tool to test the effect of natural water on biological objects. Mathematical processing of UV spectra of the natural water samples with the Gauss method can be used as an express test for the analysis of its hydrochemical composition. The effects of natural water components on the state of membranes of biological objects and intracellular processes are confirmed by means of biotesting methods.

*Keywords: natural water, hydrochemical parameters, lipid peroxidation, regulation, lecithin, UV spectrometry, Gauss method, biotesting*



## СОХРАНЕНИЕ ГИПОТЕНЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ У ЛИОФИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОМ («ОКСАКОМА»), ХРАНИВШИХСЯ В ТЕЧЕНИЕ 15 ЛЕТ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

© 2024 г. А.Ф. Ванин<sup>\*,#</sup>, А.А. Абрамов<sup>\*\*</sup>, А.А. Тимошин<sup>\*\*</sup>, В.Л. Лакомкин<sup>\*\*</sup>, Н.А. Ткачев<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,  
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

<sup>\*\*</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. Е.И. Чазова Минздрава РФ,  
ул. Академика Чазова, 15а, Москва, 121552, Россия

<sup>#</sup>E-mail: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.

После доработки 20.12.2023 г.

Принята к публикации 10.01.2024 г.

Продемонстрировано полное сохранение у препарата «Оксаком» гипотензивной активности, обусловленной наличием у этого препарата биядерной формы динитрозильного комплекса железа с глутатионом, при хранении этого лиофильно высушенного препарата в откачанной от воздуха ампуле в течение 15 лет при комнатной температуре. Предполагается, что окисление лигандов глутатиона в составе динитрозильных комплексов железа постепенно проникавшем в препарат воздухом, которое могло бы привести к распаду этих комплексов, предотвращалось значительным количеством имевшегося в этом препарате свободного (не включенного в динитрозильные комплексы железа) глутатиона.

*Ключевые слова:* оксид азота, динитрозильные комплексы железа, глутатион, гипотензия.

DOI: 10.31857/S0006302924020174, EDN: OTQFQM

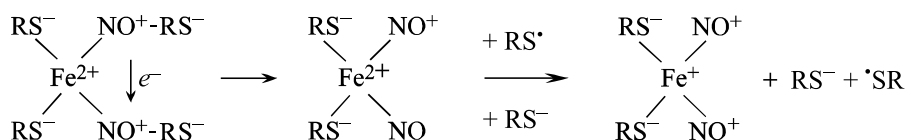
В 2008–2010 гг. в Российском Кардиологическом научно-производственном комплексе Минздрава РФ (РКНПК, Москва, Россия) на основе биядерного динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ) с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) был создан препарат, названный «Оксакомом», характеризующийся высокой вазодилаторной и гипотензивной активностью [1]. Присутствующий в нем Б-ДНКЖ-GSH был получен в реакции S-нитрозоглутатиона (GS-NO), двухвалентного железа ( $Fe^{2+}$ ) и глутатиона (GSH). На первой стадии этого процесса при смешивании указанных реагентов в растворе в соответствии со схемой 1 возникали моноядерные ДНКЖ с глутатионом (М-ДНКЖ-GSH) с последующим образованием из них Б-ДНКЖ-GSH в соответствии со схемой 2.

М-ДНКЖ-GSH возникали в результате реакции диспропорционирования (взаимного одно-

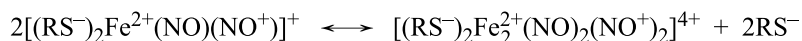
электронного окисления-восстановления) двух молекул GS-NO, попарно связанных с ионом  $Fe^{2+}$ . В результате этой реакции возникали неустойчивые окисленная и восстановленная формы GS-NO –  $NO^+GS^*$  и  $NO-GS^-$ , распадавшиеся с высвобождением из лигандного окружения железа тиильного радикала ( $GS^*$ ) и ионизованного  $GS^-$  при сохранении в этом окружении катиона нитрозония ( $NO^+$ ) и молекулы NO, что и приводило к образованию М-ДНКЖ-GSH с резонансной структурой  $[(GS^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$ . Такая же резонансная структура железо-динитрозильного фрагмента оставалась характерной для Б-ДНКЖ-GSH [2, 5].

Характерное для железо-динитрозильного фрагмента одинаковое наличие молекулы NO и катиона нитрозония делает возможным для М- и Б-ДНКЖ в соответствии с химическим равновесием между этими комплексами и составляющими их компонентами равноэффективно функционировать в качестве как доноров NO, так и доноров  $NO^+$  [5, 7].

*Сокращения:* ДНКЖ – динитрозильный комплекс железа, Б-ДНКЖ-GSH – биядерный динитрозильный комплекс железа с глутатионом, GS-NO – S-нитрозоглутатион, GSH – глутатион, М-ДНКЖ-GSH – моноядерный динитрозильный комплекс железа с глутатионом, САД – среднее артериальное давление.



**Схема 1.** Образование моноядерных ДНКЖ с глутатионом ( $\text{RS}^-$  – молекулы глутатиона, ионизованные по тиоловой группе [2–6]).



**Схема 2.** Образование биядерных ДНКЖ с глутатионом из М-ДНКЖ-GSH.

В соответствии с протоколом синтеза Б-ДНКЖ-GSH в 500 мл 19 мМ цитрат-фосфатного буфера при pH 7.4, содержащего (в пересчете на один атом железа) 5 мМ синтезированного Б-ДНКЖ-GSH, были представлены 33 мМ GSH, 5 мМ дисульфида GSH, 5 мМ GS-NO и 12.5 г декстрана (мол. масса 40 кДа). Раствор, разлитый в ампулы по 3 мл, лиофильно высушивали, после чего вакуумированные ампулы с высушенным препаратом (препаратом «Оксаком»), плотно закрывали резиновой пробкой с алюминиевым ободком для последующего хранения на воздухе при комнатной температуре [1]. Результаты проверки гипотензивного действия этого препарата через несколько месяцев после изготовления приведены в работе [1].

Цель настоящего исследования состояла в оценке гипотензивной активности и физико-химических параметров полученных таким образом препаратов «Оксакома» через 13–15 лет их хранения при комнатной температуре в темноте. Предполагалось, что это исследование позволит понять, какие факторы могут влиять на сохранение этой активности у препаратов «Оксакома» при их длительном хранении.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В экспериментах использовали синтезированные в 2008 и 2009 гг. и хранившиеся в РКНПК Минздрава РФ гипотензивные препараты «Оксакома», содержащие в качестве биологически активного компонента Б-ДНКЖ-GSH, – соответственно препараты 1 и 2 [1]. GSH, использованный в опытах на растворах «Оксакома», был приобретен на фирме Sigma (США).

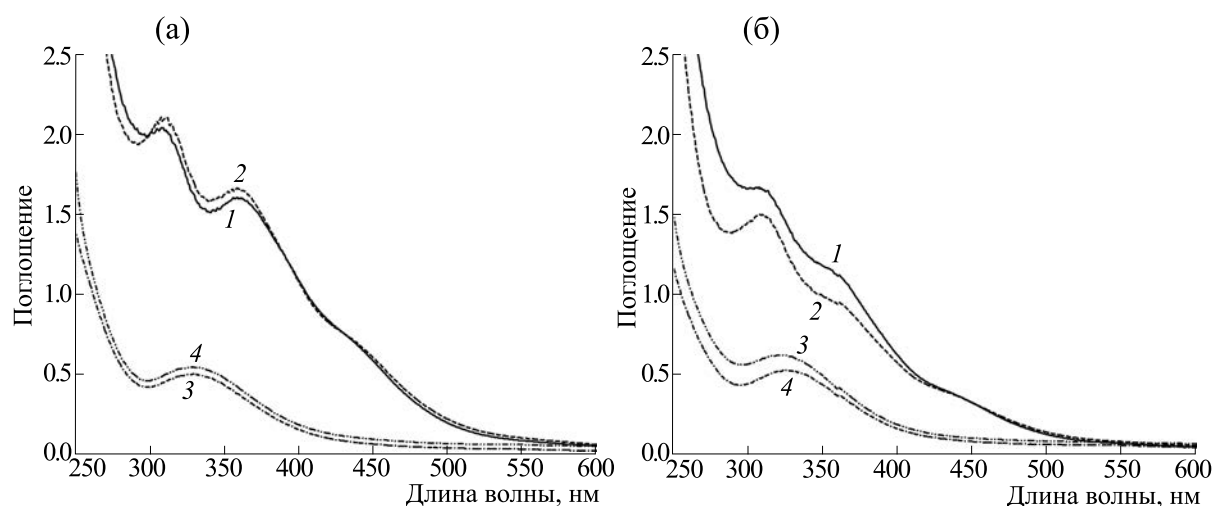
**Оптические измерения.** Оптические измерения растворов «Оксакома» проводили при комнатной температуре на спектрофотометре UF-2501PC (Shimadzu, Europa GmbH, Германия) с использованием плоской кварцевой кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Концентрацию Б-ДНКЖ-GSH в растворах препаратов «Оксакома» оценивали по интенсивности одной из полос поглощения комплекса (на 360 нм) с коэффициентом экстинкции (в пересчете на один атом железа в

Б-ДНКЖ)  $\varepsilon = 3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [5]. Оптические измерения проводили после десятикратного разбавления дистиллированной водой растворов препаратов 1 и 2, увлажненных перед этим 3 мл дистиллированной воды.

**ЭПР-измерения.** Спектры ЭПР замороженных растворов препаратов 1 регистрировали на радиоспектретре X-диапазона Varian 109E (Varian, США) при 77 К. Оценку концентрации М-ДНКЖ-GSH, ответственных за их ЭПР-сигнал, проводили методом двойного интегрирования с использованием в качестве стандарта замороженного раствора моноядерных ДНКЖ с глутатионом с известной концентрацией комплексов.

**Определение среднего артериального давления у крыс,** характерного для крови, циркулирующей в большом круге кровообращения, проводили по методике, описанной в работе [8]. Были использованы крысы-самцы стока Wistar массой 300–350 г и возрастом пять-шесть месяцев. Животных содержали в биоклинике РКНПК в клетках по пять особей со свободным доступом к сухим кормам и воде. Световой режим контролировали (12 часов освещения, 12 часов затемнения) при достаточной смене объемов воздуха и температуре 19–23°C. Под золотиловым наркозом (5–7 мг/кг) выполняли катетеризацию левого желудочка при помощи стандартного Милларовского катетера, вводимого через правую сонную артерию, и усилителя SP200 (Transonic, Канада). Использовали программное обеспечение LabChart ADInstruments 8.1.2 (Австралия) для регистрации среднего давления в аорте.

**Соблюдение этических норм при работе с животными.** В ходе работы неукоснительно соблюдались положения Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Washington D.C., 2011) и другие нормы международного права, регулирующие содержание и использование лабораторных животных с точки зрения гуманного обращения с животными и их рационального использования.



**Рис. 1.** Типичные спектры поглощения, характерные для представителей препаратов «Оксакома» из двух их наборов — препаратов 1 (а) и 2 (б), синтезированных в 2008–2009 гг.: спектры 1 — исходные препараты, растворенные в 3 мл дистиллированной воды и разбавленные ею в 10 раз; спектры 2 — те же препараты после снижения pH их растворов до 1–2; спектры 3 — подкисленные препараты 1 и 2 после 50 с прогрева на воздухе при 80°C; спектры 4 — предыдущие препараты после добавления к ним 30 мМ GSH.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

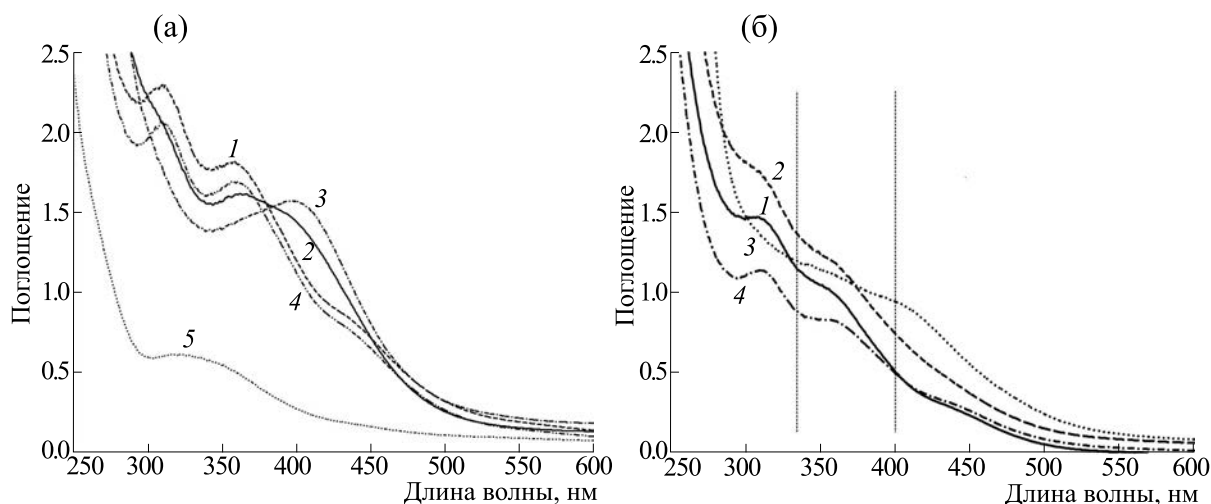
### Физико-химические параметры препаратов 1 и 2.

Регистрация оптических спектров препаратов «Оксакома» из двух их наборов, синтезированных в 2008–2009 гг., продемонстрировала существенное различие в концентрации Б-ДНКЖ-GSH в составе этих препаратов. Как следует из интенсивности полос этих спектров на 310 и 360 нм, для одного из этих наборов (препарат 1) обнаруживалось практически полное сохранение Б-ДНКЖ-GSH в препаратах ( $4.8 \pm 0.3$  мМ против исходного уровня —  $5.0 \pm 0.3$  мМ), тогда как для другого набора (препарат 2) концентрация Б-ДНКЖ-GSH составляла лишь  $3.0 \pm 0.4$  мМ (рис. 1, спектры 1).

Подкисление препаратов 1 до pH 1–2 не сказывалось на содержании в них Б-ДНКЖ-GSH (рис. 1а, спектр 2). Оно заметно снижалось при аналогичном воздействии на препараты 2 (рис. 1б, спектр 2). Прогрев этих подкисленных препаратов при 80°C на воздухе в течение не более 1 мин приводил, судя по спектрам поглощения этих препаратов, к полному исчезновению из них Б-ДНКЖ-GSH и появлению спектра поглощения, напоминающего спектр поглощения GS-NO с максимумом соответственно на 328 и 320 нм (рис. 1, спектры 3). Сдвиг этого максимума с 334 нм, характерного для GS-NO, в коротковолновую область был обусловлен наложением на спектр поглощения GS-NO полосы поглощения ионов  $Fe^{3+}$  на 302 нм, высвобождающегося из распадающихся Б-ДНКЖ-GSH [9]. Интенсивность этой полосы усиливалась в препаратах 2 после введения в раствор 30 мМ GSH, вызывавших дополнительное понижение pH.

Трансформация исходного спектра поглощения Б-ДНКЖ-GSH при прогреве препаратов 1 и 2 при 80°C в спектр, близкий по параметрам к спектру GS-NO, как было показано нами ранее, была обусловлена высвобождением из распадающихся Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония, связывающихся с GSH с образованием GS-NO. В соответствии с работами [10, 11], этот процесс мог столь быстро (в течение менее минуты) происходить при прогреве препаратов 1 и 2 при 80°C только при концентрации свободного (не включенного в Б-ДНКЖ) GSH в растворе, превышающей содержание Б-ДНКЖ не более чем в 2–3 раза. Это означает, что при длительном хранении (пятнадцатилетовом хранении лиофилизированных препаратов 1 и 2 при комнатной температуре) содержание свободного GSH в них существенно снижалось: его соотношение с уровнем Б-ДНКЖ должно было составлять 2–3 против 6.6 в исходных, только что синтезированных препаратах, очевидно, в результате контакта препаратов с воздухом, постепенно проникавшим в закрытые, откачанные ампулы, содержавшие эти препараты. Очевидно, более эффективно воздух проникал в препараты 2, что и могло приводить к более выраженному снижению количества Б-ДНКЖ-GSH. Это предположение подтверждается результатами опытов по подщелачиванию растворов препаратов 1 и 2, показанных на рис. 2, до pH 10–11.

Эта процедура приводила к изменению формы спектра поглощения препарата 1 — его смещению в длинноволновую область (рис. 2а, спектр 2), характерную для спектра оптического поглощения М-ДНКЖ-GSH. Этот спектр (без примеси спек-



**Рис. 2.** Типичное изменение спектров поглощения препаратов 1 (а) и 2 (б) при их подщелачивании: спектры 1 – исходные препараты, растворенные в 3 мл дистиллированной воды и разбавленные затем дистиллированной водой в 10 раз; спектры 2 – те же препараты после их подщелачивания до pH 10–11; спектры 3 – препараты после подщелачивания до pH 10–11 в присутствии добавленного GSH (30 мМ); спектры 4 – предыдущие препараты после их подкисления до pH 1–2. Спектр 5 на рис. (а) – препарат, характеризующийся спектром 4, прогретый при 80°C. Этот спектр был зарегистрирован только через 10 мин прогрева.

тра Б-ДНКЖ) регистрировался при pH 10–11 после добавления к 0.5 мМ раствору препарата 1 в оптической кювете 30 мМ GSH (рис. 2а, спектр 3). Подщелачивание такого же раствора препарата 2 не приводило к изменению формы спектра Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2б, спектр 2). Его оптическое поглощение начинало сдвигаться в длинноволновую область лишь после добавления в этот раствор в оптической кювете 30 мМ GSH (рис. 2б, спектр 3).

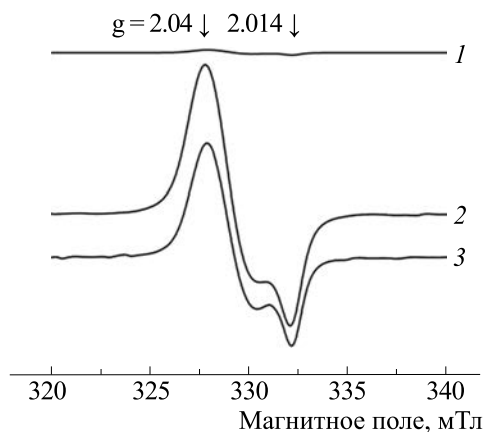
Характерно, что после подкисления препарата 1, характеризующегося спектром поглощения М-ДНКЖ-GSH (рис. 2а, спектр 3), последний трансформировался в спектр, характерный для Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2а, спектр 4). Последующий прогрев этих растворов на воздухе при 80°C приводил к трансформации спектра Б-ДНКЖ-GSH в спектр, близкий к спектру поглощения GS-NO (рис. 2б, спектр 5). Однако в этом случае для появления последнего требовалось прогревать раствор Б-ДНКЖ-GSH более 10 мин – вместо 1 минуты прогрева, что было достаточно для появления GS-NO в препарате 1 без добавления к нему 30 мМ GSH (рис. 1а, спектр 3). Это замедление было обусловлено, очевидно, стабилизирующим действием избытка GSH на Б-ДНКЖ-GSH. При снижении концентрации GSH, добавляемого к 0.5 мМ раствору препарата 1, в 10 раз (до 3.3 мМ), время его прогрева, необходимого для появления спектра GS-NO, снижалось до 5 мин (спектр не приводится).

Судя по изменениям спектров, приведенных на рис. 2, для обоих препаратов подщелачивание без добавления GSH не приводило к полному

превращению Б-ДНКЖ в М-ДНКЖ. Такое превращение имело место, особенно для препарата 1, только после подщелачивания раствора в присутствии 30 мМ GSH. Этот результат, как и приведенные выше на рис. 1 данные, свидетельствует о резком снижении уровня свободного GSH в препаратах при их длительном хранении в лиофилизованном состоянии – его становилось недостаточно для превращения в соответствии со схемой 2 Б-ДНКЖ в мономерную форму ДНКЖ.

Это превращение иллюстрируется регистрацией сигнала ЭПР при  $g_{\perp} = 2.04$  и  $g_{\parallel} = 2.014$ ,  $g_{\text{ср}} = 2.03$  (рис. 3), характерного для М-ДНКЖ-GSH [5], в препарате 1 после его подщелачивания как в отсутствие, так и в присутствии 30 мМ GSH. Как следует из рис. 3, добавление этого тиола к препарату 1 практически не сказывалось на интенсивности регистрируемого сигнала ЭПР, т. е. на концентрации М-ДНКЖ-GSH, ответственной за этот сигнал.

Как следует из сопоставления приведенных на рис. 2б спектров 2 и 3, этот ЭПР-результат не согласуется с интенсивностью оптического поглощения препарата 1, обусловленного появлением М-ДНКЖ-GSH в этом препарате при его подщелачивании в отсутствие и в присутствии 30 мМ GSH (в спектр 2 значительный вклад вносит сохранившийся Б-ДНКЖ-GSH). Это несоответствие могло быть обусловлено «эффектом высаливания» (эффектом концентрирования) молекул GSH и М-ДНКЖ-GSH при замораживании раствора препарата 1 в жидком азоте. В результате даже небольшого количества GSH в препарате 1 было достаточно, чтобы значительная часть



**Рис. 3.** Сигнал ЭПР препарата 1 до подщелачивания (сигнал 1) и после подщелачивания до pH 10–11 в отсутствии и присутствии 30 мМ GSH (соответственно сигналы 2 и 3). Сигнал 3 зарегистрирован при усилении радиоспектрометра, в 1.5 раза меньшем, чем сигналы 1 и 2.

Б-ДНКЖ, реагируя с этим концентрированным реагентом, переходила бы в парамагнитную моноядерную форму ДНКЖ. После оттаивания растворов препаратов 1 и 2 М-ДНКЖ-GSH трансформировался в исходную биядерную форму, характеризующуюся спектром поглощения, приведенным на рис. 2а, спектр 4.

**Гипотензивная активность препарата 1.** Проверка гипотензивной активности препарата 1 показала, что эта активность полностью сохранилась, и при дозе Б-ДНКЖ-GSH 0.6 микромолей/кг веса животного (крысы) она была практически идентична гипотензивной активности исходного препарата того же комплекса, при проверке этой активности в опытах на животных

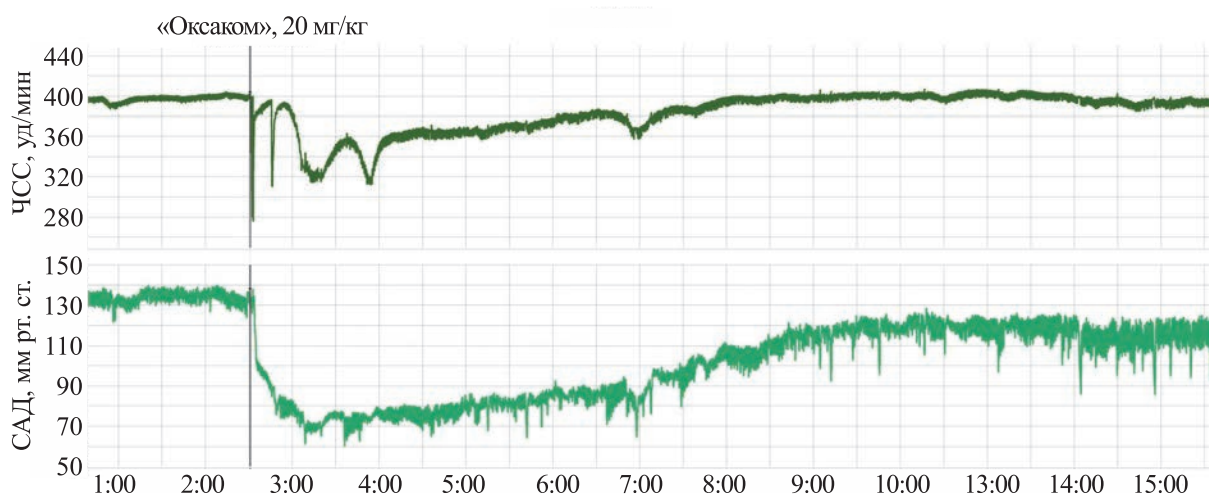
при введении им «Оксакома» в дозе Б-ДНКЖ-GSH 0.8 микромолей на кг в опытах, проведенных в 2011 г. (рис. 1 в работе [1]).

Как следует из рис. 4, при внутривенном введении препарата 1 вначале наблюдалось быстрое снижение среднего артериального давления (САД) на 60 мм рт. ст. с последующим его подъемом на 30 мм рт. ст. и последующей длительной стабилизацией САД на пониженном уровне, т. е. наблюдалась та же кинетика изменения САД, что и в аналогичных опытах, проведенных в 2011 г.

При понижении дозы препарата 1 в два раза наблюдалась аналогичная кинетика, но амплитуда снижения САД уменьшалась примерно в два раза.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Основной результат работы состоит в том, что в исходно откачанных от воздуха и лиофильно высушенных в присутствии декстрана препаратах «Оксакома», содержащих в качестве биологически активного компонента Б-ДНКЖ-GSH, содержание этого компонента может сохраняться без изменения в течение более десятка лет (и даже не менее 15 лет). В результате за это время полностью сохраняется обусловленная Б-ДНКЖ-GSH гипотензивная активность «Оксакома». Единственное, что происходит с этими препаратами при их хранении при комнатной температуре — это снижение примерно в три раза содержания в них «свободного» GSH, не включенного в Б-ДНКЖ-GSH. При концентрации комплексов ~5 мМ концентрация свободного GSH снижается не более чем до 2 мМ, о чем свидетельствует быстрый распад препарата 1 при 0.5 мМ концентрации Б-ДНКЖ-GSH в ходе прогрева подкисленного



**Рис. 4.** Влияние водного раствора препарата 1, вводимого внутривенно крысе и соответствующего дозе 0.6 микромолей/кг Б-ДНКЖ-GSH, на частоту сердечных сокращения (ЧСС, верхняя кривая) и среднее артериальное давление (САД, нижняя кривая).

раствора препарата при 80°C не более чем за 50 с. При повышении концентрации свободного GSH в этом растворе до 3.3 мМ время такого распада, сопровождавшегося появлением в растворе GS-NO, повышалось до 4.5 мин, а при повышении концентрации этого тиола в растворе препарата 1 до 30 мМ — до 12 мин.

По-видимому, снижение содержания свободного GSH в препарате 1, как и в препарате 2, было обусловлено постепенным, длительным проникновением влажного воздуха в исходно лиофилизированный, вакуумированный препарат через алюминиевую и резиновую крышки препарата, что приводило к постепенному окислению свободного GSH. В препарате 2 этот процесс мог идти быстрее, возможно, из-за более худшего, чем в препарате 1, изготовления системы изоляции препарата 2 (алюминиевой и резиновой крышек) от воздуха. Не исключено также, что в препарате 2 в ходе синтеза входящего в него Б-ДНКЖ-GSH было снижена общая исходная концентрация GSH — вместо 50 мМ было использовано не более 40–45 мМ этого тиола. В результате в препарате 2 уровень свободного GSH мог при его длительном хранении быстрее достигать низких значений, что приводило к последующему распаду Б-ДНКЖ-GSH до ~ 3 мМ. Результаты наших предыдущих исследований показали, что при снижении исходной концентрации GSH, как и других тиолов (RSH), при синтезе Б-ДНКЖ-RSH стабильность этих комплексов резко снижалась [10, 11].

Не исключено, что сохранение уровня Б-ДНКЖ-GSH в препарате 1 (и как следствие этого — сохранение гипотензивной активности этого препарата) было обусловлено высокой исходной концентрацией GSH, использованной при синтезе его биологически активного компонента — Б-ДНКЖ-GSH (50 мМ) [1]. За 15 лет хранения этого препарата содержание в нем свободного GSH в результате его постепенного окисления подошло к критическому нижнему уровню — ~2 мМ, после которого при более длительном хранении препарата 1 начался бы распад Б-ДНКЖ-GSH, а следовательно, и снижение его гипотензивной активности.

Итак, проведенные нами исследования продемонстрировали высокую стабильность препарата «Оксаком» как носителя Б-ДНКЖ-GSH, ответственного за гипотензивную активность этого препарата. Эта стабильность обеспечивалась лиофильным высушиванием водного раствора препарата с последующим его вакуумированием. Существенное значение могло иметь и повышенное содержание в препарате «Оксаком» свободного GSH, «защищавшего» от окисления поступающим в препарат воздухом молекулы этого тиола, включенного в лигандную сферу Б-ДНКЖ-GSH.

Очевидно, что обнаружение высокой (многолетней) стабильности Б-ДНКЖ-GSH в составе лиофильно высушенного препарата «Оксаком» имеет существенное значение для создания на основе ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, характеризующихся разнообразными проявлениями биологической активности, соответствующих лекарственных средств с различным терапевтическим действием [12].

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с крысами проводили в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18, III.1986). Экспериментальный протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова» МЗ РФ (регистрационный номер протокола заседания № ЛЭПС/18.07.23 от 18 июля 2023г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, V. L. Lakomkin, V. V. Gramovich, O. N. Vyborov, A. G. Dragnev, A. A. Timoshin, L. I. Buryachkovskaya, A. A. Abramov, V. P. Massenko, E. V. Arzamastsev, V. I. Kapelko, and A. F. Vanin, Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: Animal studies and clinical trials on healthy volunteers. *Nitric Oxide*, **26** (3), 148–156 (2012). DOI: 10.1016/j.niox.2012.01.008
2. Vanin A. F., Malenkova I. V., and Serezhenkov V. A. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies. *Nitric Oxide*, **1**, 191–203 (1997).
3. Costanzo S., Ménage S., Purrello R., Bonomo R. P., and Fontecave M. Re-Examination of the formation of dinitrosyl-iron complexes during reaction of S-nitrosothiols with Fe (II). *Inorg. Chim. Acta*, **318** (1–2), 1–7 (2001). DOI: 10.1016/S0020-1693(01)00402-9
4. Lo Bello M., Nuccetelli M., Cacurri A. M., Stella L., Parker M. W., Rossjohn J., McKinstry W. J., Mozzi A. F., Federici G., Polizio F., Pedersen J. Z., and Ricci G. Human glutathione transferase P1-1 and nitric oxide

- carriers. *J. Biol. Chem.* **276**, 42138–42145 (2001). DOI: 10.1074/jbc.M102344200
5. Vanin A. F., Poltorakov A. P., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., Burbaev D. S. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: Electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide*, **23** (2), 136–149 (2011). DOI: 10.1016/j.niox.2010.05.285
  6. Borodulin R. R., Kubrina L. N., Mikoyan V. D., Poltorakov A. P., Shvydkiy V. O., Burbaev D. Sh., Serezhnikov V. A., Yakhontova E. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO<sup>+</sup> donors. *Nitric Oxide*, **29**, 4–16 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2012.11.001
  7. Vanin A. F. and Burbaev D. Sh. Electronic and spatial structures of water-soluble dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands underlying their ability to act as nitric oxide and nitrosonium ion donors. *J. Biophys.*, **2011**, 878236 (2011). DOI: 10.1155/2011/878236
  8. Vanin A. F., Pekshev A. V., Vagapov A. B., Sharapov N. A., Lakomkin V. L., Abramov A. A., Timoshin A. A., and Kapelko V. I. Gaseous nitric oxide and dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as potential medicines that can relieve COVID-19. *Biophysics*, **66** (1), 155–163 (2021). DOI: 10.1134/S0006350921010218
  9. Ванин А. Ф., Микоян В. Д. и Ткачев Н. А. Высвобождение катионов нитрозония из динитрозильных комплексов железа при их распаде под действием анионов супероксида или этилендиаминтетраацетата. *Биофизика*, **67** (6), 1045–1055 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922060011
  10. Ванин А. Ф. Свободно-радикальная природа молекул монооксида азота как фактор, определяющий их превращение в живых организмах в ионы нитрозония. *Биофизика*, **65** (3), 421–438 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920030011
  11. Ванин А. Ф. и Ткачев Н. И. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как источники универсальных цитотоксинов – катионов нитрозония. *Биофизика*, **68**, 421–434 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923030018, EDN: FPGKAY
  12. Vanin A. F., *Dinitrosyl iron complexes as a “working form” of nitric oxide in living organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).

## Stability of Hypotensive Activity in Freeze-Dried Preparations of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione (“Oxacom”) throughout the Period of Storage for 15 Years at Ambient Temperature

A.F. Vanin\*, A.A. Abramov\*\*, A.A. Timoshin\*\*, V.L. Lakomkin\*\*, and N.A. Tkachev\*

\*N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

\*\*E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akademika Chazova 15a, Moscow, 121552 Russia

It has been demonstrated that “Oxacom”, a freeze-dried preparation, retains, throughout its period of storage in the ampoule in the absence of oxygen for 15 years at ambient temperature, the same hypotensive activity due to the presence of a binuclear form of dinitrosyl iron complex with glutathione. It is suggested that an oxidation reaction where glutathione ligands as constituents of dinitrosyl iron complexes react with the oxygen, the content of which gradually increase in the preparation, could lead to the degradation of these complexes, but it was prevented due to the presence of a considerable amount of free, not included in dinitrosyl iron complexes glutathione molecules in this preparation.

*Keywords: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, glutathione, hypotension*



## ВЗАИМОСВЯЗЬ ТЕМПЕРАТУРЫ В ГЛУБОКИХ СЛОЯХ СОМАТО-СЕНСОРНОЙ КОРЫ И СКОРОСТИ КРОВОТОКА В МОЗГЕ НАРКОТИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

© 2024 г. А.М. Ромшин\*, А.А. Осипов\*\*,\*\*\*, В.К. Крохалева\*,\*\*, С.Г. Журавлев\*, О.Н. Егорова\*, И.И. Власов\*, И.Ю. Попова\*,\*\*,#

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

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

\*\*\*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, ул. Бултерова, 5а, Москва, 117485, Россия

#E-mail: I-Yu-Popova@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023 г.

После доработки 13.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Несмотря на очевидную важность температуры для функционирования мозга, она остается одним из наименее изученных его параметров. Температура определяется балансом между выделением тепла в ходе метаболизма и его отведением кровотоком, который регулируется нейроваскулярным сопряжением. С помощью метода лазерной спекл-контрастной визуализации и микроалмазной термометрии нами была впервые проведена длительная одновременная регистрация скорости кровотока и температуры в мозге наркотизированных животных *in vivo*. Для анализа сопряжения между температурой и кровотоком использовали два подхода: усиление общего кровотока с помощью внутривенной инъекции адреналина и усиление активности нейронов аппликацией раствора КС1 на поверхность мозга. Полученные данные указывают на то, что температура нервной ткани имеет более сложную динамику по сравнению с кровотоком, что, по-видимому, связано с прямой или опосредованной активацией как отдельных нейронов, так и нейронных ансамблей. Исследования температурной динамики могут внести значимый вклад в понимание механизмов нейроваскулярного сопряжения.

*Ключевые слова:* мозг, температура, кровоток, динамика, адреналин, распространяющаяся деполяризация.

DOI: 10.31857/S0006302924020189, EDN: OTNMKM

Температура мозга – важнейший, но загадочный биофизический параметр, определяемый балансом между гемодинамикой и метаболическим выделением тепла. Это динамический параметр, колеблющийся в относительно больших пределах (до 4°C) при нормальном физиологическом состоянии и стабильной температуре окружающей среды [1, 2]. Наблюдается взаимосвязь изменений температуры головного мозга и различных показателей активности нейронов, проницаемости гематоэнцефалического барьера, активности глиальных клеток, ионных и водных балансов мозга, а также структурной целостности различных типов клеток головного мозга [1]. Мозг проявляет исключительную чувствительность к нарушениям температурного гомеостаза, быстро усиливая ишемические или другие неврологические повреждения [3].

Физиологическое повышение температуры головного мозга является результатом изменения активности нейронов и отличается от лихорадки, тонического повышения температуры, возникающего при вирусных и бактериальных инфекци-

ях [4, 5]. Интенсивное производство тепла, по-видимому, является важной особенностью метаболической активности мозга (потребляющего 20% кислорода и 25% глюкозы и при этом составляющего всего 2–3% от общей массы тела), поскольку вся энергия, которая образуется в клетках мозга, в конечном итоге преобразуется в тепло [6]. Было рассчитано, что термогенность метаболически активного мозга составляет приблизительно 0.66 Дж/мин/г, что в отсутствие рассеивания тепла привело бы к повышению температуры на 0.16°C/мин [7, 8]. С учетом такой высокой скорости выделения тепла клетками и почти адиабатической среды из-за изоляции, обеспечиваемой черепом и кожей головы, очевидно наличие активных механизмов охлаждения тканей головного мозга.

Основным механизмом отвода тепла от мозга является кровоток: кровеносные сосуды образуют плотную сеть, которая «собирает» избыточное тепло и доставляет его к поверхности тела [7, 9]. Это подтверждается тем, что температура нервной ткани превышает температуру артериальной

крови [8]. Измерения разницы артериальной и венозной температуры в головном мозге, определяемые с помощью термопар во внутренней яремной вене и в аорте, показали, что температура венозной крови как минимум на  $0.2^{\circ}\text{C}$  выше артериальной [10]. Также в ряде работ было показано, что температура мозга выше внутренней температуры тела, со средней разницей от  $0.39^{\circ}\text{C}$  до  $2.5^{\circ}\text{C}$  [2, 11, 12]. Таким образом, именно баланс между тепловыделением и отведением тепла кровотоком определяет температуру мозга.

Ткань головного мозга исключительно хорошо васкуляризована: на нее приходится 15–20% общего сердечного выброса [13]. В процессе эволюции кровеносная система головного мозга претерпевала различные изменения, позволяющие более эффективно охлаждать нервную ткань [7, 14, 15].

Имеющиеся в литературе данные, хотя и ограниченные по количеству и охвату, указывают на то, что изменения температуры мозга являются следствием функциональной активации нейронов, которая вызывает активацию местного кровотока посредством нейроваскулярной связи [16, 17]. Однако они не дают систематической информации о механизмах, ответственных за регуляцию температуры мозга, и о диапазоне локальных температурных изменений, сопровождающих функционирование мозга. Крайне мало известно о роли температуры в метаболизме и функционировании мозга. Можно предположить, что температура мозга как параметр не рассматривается в различных теориях функционирования мозга из-за сложности связи температуры как основного физического параметра с различными формами и проявлениями нейронной активности и скоростью кровотока.

Целью настоящего пилотного исследования было изучение взаимосвязи между двумя неразрывно связанными параметрами: локальными колебаниями температуры мозга и скоростью мозгового кровотока, которая предположительно отражает скорость отведения тепла, выделенного нервной тканью.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Экспериментальные животные.** Эксперименты выполнены на мышах BALB/c (массой 25–33 г), полученных из Лабораторного питомника животных «Столбовая» (<https://www.pitst.ru/>, Московская область, Чеховский район, пос. Столбовая). Животных содержали в клетках с неограниченным доступом к пище и воде, в помещении с контролируемой температурой ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) и 12-часовым циклом свет/темнота.

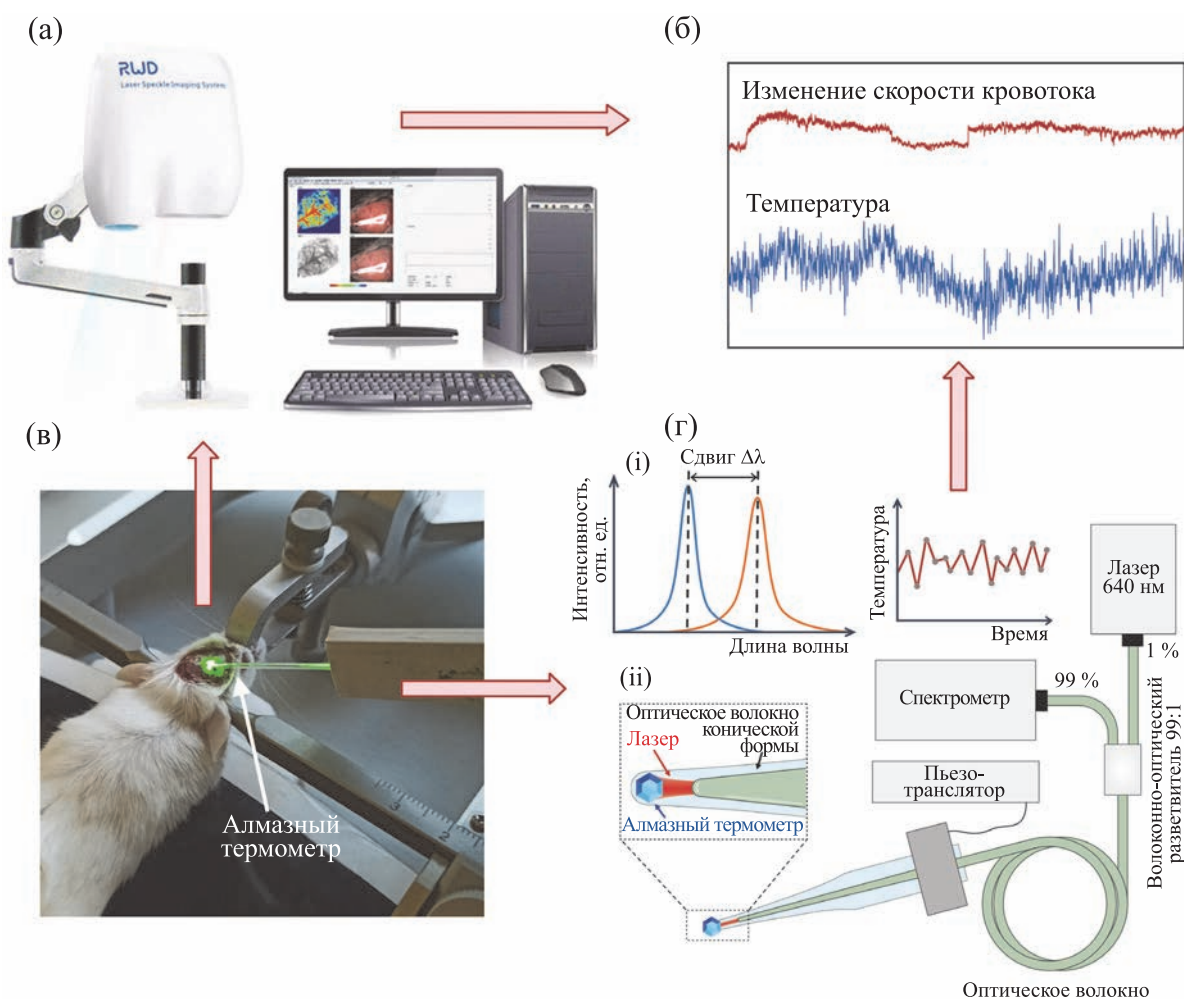
Эксперименты проводили на анестезированных животных ( $n = 4$ ). Общий наркоз создавали внутрибрюшинной инъекцией уретана ( $650 \text{ мг/кг}$ ) и ксилазина ( $50 \text{ мг/кг}$ ). Голову фиксировали в стереотакси-

се (Kopf Instruments, США), поверхность черепа тщательно очищали от кожи и соединительной ткани, высверливали отверстие в черепе для введения термометра по координатам  $AP = -0.5-1.0$ ,  $L = -1.5-2.0$  [18]. Открытую поверхность мозга защищали от пересыхания с помощью капли медицинского глицерина.

**Дизайн экспериментов.** Одновременную регистрацию температуры сомато-сенсорной коры головного мозга и скорости кровотока в сосуде, наиболее близко расположенном к месту регистрации температуры, проводили в следующих функциональных состояниях животного: 1) при комнатной температуре ( $24^{\circ}\text{C}$ ); 2) при аппликации на поверхность мозга раствора KCl (10 мкл, 1 М), активирующего нейроны в результате деполаризации; 3) при внутрибрюшинной инъекции адреналина ( $0.2 \text{ мл/мышь}$ , 1 мг/мл), существенно усиливающего мозговой кровоток. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

**Визуализация мозгового кровотока (лазерная спекл-визуализация).** Изменения мозгового кровотока в поверхностных сосудах головного мозга мышей неинвазивно регистрировали с помощью системы лазерной спекл-контрастной визуализации RFLSI Pro (RWD Life Sciences, Китай), предоставленной компанией «Азимут Фотоникс» (Москва, Россия; <https://azimp-micro.ru/>). Метод основан на размытии интерференционных картин рассеянного лазерного света потоком клеток крови для мгновенной визуализации перфузии крови в микроциркуляции [19]. Поверхность черепа освещали лазером производства компании Thorlabs (США) с длиной волны 784 нм и мощностью 32 мВт под углом  $30^{\circ}$  с расширителем луча и интенсивностью света, контролируемой поляризатором. Поток крови регистрировали камерой производства компании Basler (Германия) с разрешением до  $2048 \times 2048$  пикселей и скоростью съемки до 120 кадров в секунду с использованием специального программного обеспечения RWD Life Science. Для оценки спекл-контрастности в течение эксперимента выбирались области интереса на основании визуальной оценки расположения кровеносных сосудов. При анализе результатов экспериментов выбиралась одна область интереса, расположенная наиболее близко к термометру и с наиболее выраженными реакциями на экспериментальные воздействия. Система RFLSI Pro оценивала скорость кровотока в условных единицах PU.

**Регистрация температуры нервной ткани.** В настоящей работе задействовали алмазный термометр, конструкция которого основана на использовании одиночной алмазной микрочастицы размером 20 мкм, интегрированной во внутренний канал стеклянного микрокапилляра [20]. Термочувствительность микроалмаза обеспечивается температурной зависимостью сдвига бесфононной линии люминесценции центров окраски



**Рис. 1.** Схема экспериментальной установки для одновременной регистрации локальной температуры в структурах мозга и церебрального кровотока у наркотизированных мышей: (а) – фотография установки для неинвазивной регистрации мозгового кровотока в поверхностных сосудах головного мозга мышей методом лазерной спекл-контрастной визуализации (RFLSI Pro, RWD Life Sciences), (б) – изображение кровотока и температуры, (в) – фотография закрепленной в стереотаксисе наркотизированной мыши во время эксперимента, (г) – схематическое изображение экспериментальной установки для инвазивной регистрации локальной температуры с помощью микроалмазного термометра в мозге наркотизированных животных.

«кремний-вакансия», которые были сформированы в алмазе в процессе CVD-синтеза. Для возбуждения и считывания люминесценции в канал микрокапилляра до соприкосновения с микроалмазом вводилось оптическое волокно конической формы с углом  $\sim 3^\circ$  и сферической линзой на торце (радиус кривизны 8 мкм). С целью разделения возбуждающего и полезного сигнала мы использовали оптоволоконный разветвитель 99:1, слабо пропускающее плечо которого соединено с лазером 532 нм, а плечо с 99%-м пропусканием – со спектрометром. Сформированный термометр закрепляли на высокоточном 3D-микроманипуляторе и вводили в первичную сомато-сенсорную кору на глубину 0.8–1.1 мм. Ориентировочная область съема составляла около  $100 \text{ мкм}^3$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Соотношение локальной температуры в сомато-сенсорной коре и церебрального кровотока у наркотизированных мышей при комнатной температуре ( $24^\circ\text{C}$ ).** Под наркозом температура мозга экспериментальных животных регистрировали на уровне  $27.2 \pm 0.76^\circ\text{C}$ , что существенно ниже физиологических значений, характерных для активного бодрствования. Однако, опустившись до указанного уровня, она значительно не изменялась, превышая температуру окружающей среды на  $3.2 \pm 0.77^\circ\text{C}$ . Скорость мозгового кровотока у животных также была стабильной в ходе эксперимента и составляла  $205.75 \pm 28.25 \text{ PU}$ . Детальные данные приведены в табл. 1.

**Адреналин приводит к усилению мозгового кровотока и повышению температуры сомато-сенсор-**

**Таблица 1.** Значения локальной температуры в сомато-сенсорной коре и церебрального кровотока у наркотизированных мышей при комнатной температуре (24°C)

Номер мыши	Температура мозга, °C	$\Delta t$ мозга/окр. среды, °C	Скорость кровотока, PU
1	28.4	4.4	210
2	27.6	3.6	185
3	25.8	1.8	258
4	27.1	3.1	170
Среднее	$27.2 \pm 0.76$	$3.2 \pm 0.77$	$205.75 \pm 28.25$

**ной коры.** Для анализа влияния скорости кровотока на температуру нервной ткани использовали внутрибрюшинную инъекцию адреналина. Увеличение кровотока после инъекции адреналина составляло от 20 до 80% ( $52 \pm 18\%$ ), при этом длительность эффекта составляла  $9.75 \pm 3.13$  мин у всех животных (рис. 2а). Одновременно с увеличением кровотока наблюдалось повышение температуры на  $1.17 \pm 0.24^\circ\text{C}$ . Продолжительность влияния адреналина на температуру мозга не коррелировала с длительностью эффектов на кровоток и была гетерогенной.

**Аппликация KCl приводит к усилению кровотока и гетерогенным температурным эффектам.** Для повышения нейрональной активности мы фокально апплицировали раствор KCl на поверхность коры анестезированных мышей. Ранее было показано, что такая аппликация KCl вызывает распространяющуюся волну деполяризации нейронов [21]. Аппликация KCl во всех случаях приводила к увеличению скорости кровотока на 30–60% ( $47 \pm 11\%$ ). При этом эффекты были очень длительные – скорость кровотока не снижалась до базового уровня в течение  $18.85 \pm 5.90$  мин (рис. 2б). Изменения температуры были более неоднородные: наблюдалось как ее повышение на  $0.7^\circ\text{C}$ , так и снижение на  $0.84 \pm 0.37^\circ\text{C}$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем пилотном исследовании впервые проведены одновременные динамические измерения локальной температуры в сомато-сенсорной коре мозга наркотизированных мышей с помощью микроалмазного термометра и скорости мозгового кровотока с использованием лазерной спекл-контрастной визуализации. В настоящее время оптоволоконные термометры занимают лидирующие позиции для термометрии с высоким разрешением в живом мозге по сравнению даже с самыми точными имплантируемыми терморезисторами и термопарами [22, 23]. Сочетание оптоволоконного термометра с лазерной спекл-контрастной визуализацией является но-

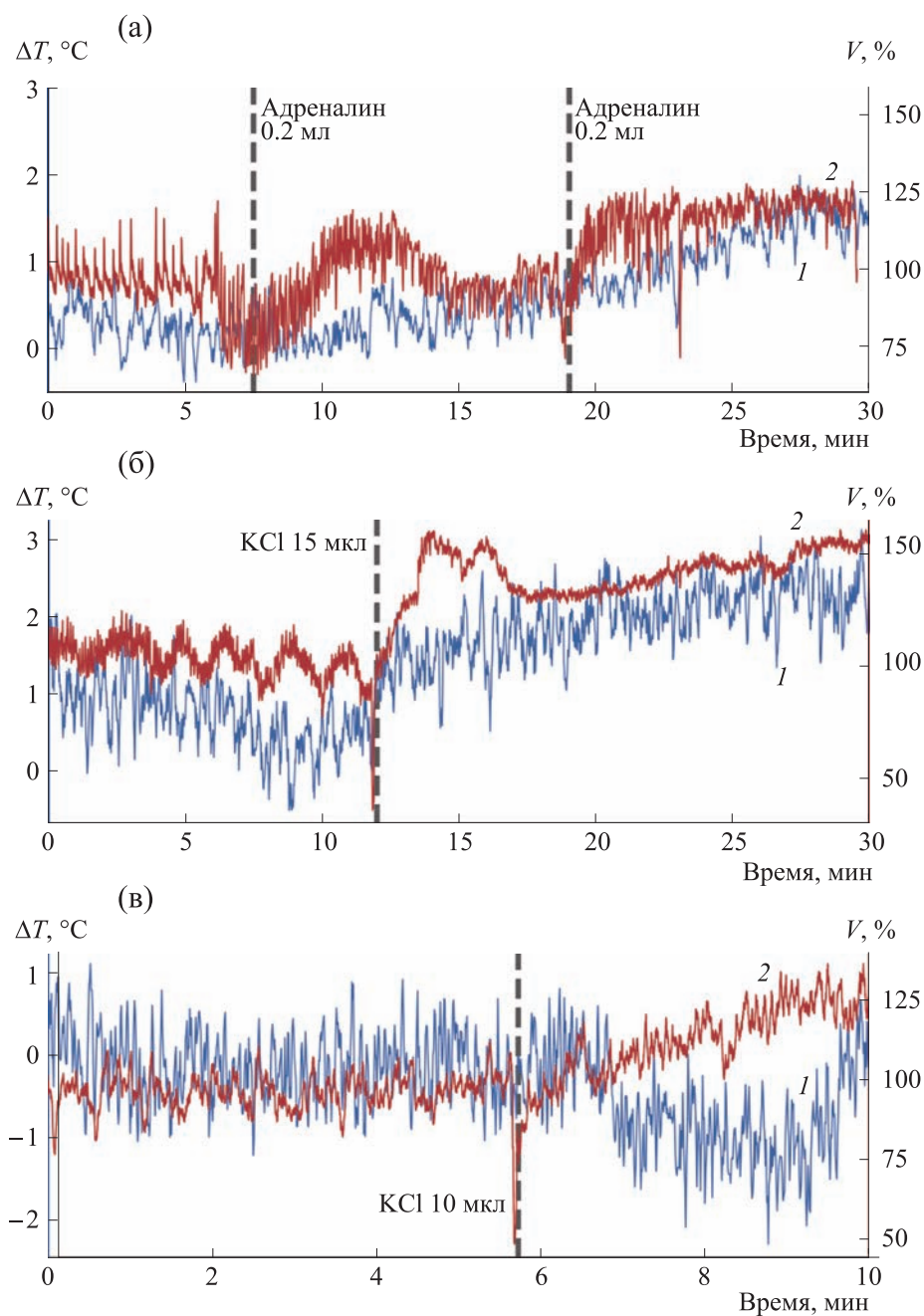
вым методическим подходом к решению вопросов о температурных характеристиках нервной ткани в разных функциональных состояниях и о сопряжении температуры со скоростью кровотока.

В работе впервые была зарегистрирована температура мозга мышей под уретановой анестезией. Значения температуры фиксировались на уровне  $27.2 \pm 0.76^\circ\text{C}$  и превышали температуру окружающей среды на  $3.2 \pm 0.77^\circ\text{C}$ . Эти значения близки к зарегистрированным в первичной моторной коре мышей под золетил-ксилазиновым наркозом ( $29.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ) [22]. Таким образом, в состоянии наркоза температура мозга снижается примерно на  $10^\circ\text{C}$  по сравнению с температурой, зарегистрированной в мозге мышей в состоянии активного бодрствования.

Для анализа сопряжения между температурой нервной ткани и мозговым кровотоком использовали два подхода: усиление общего кровотока в результате внутрибрюшинной инъекции адреналина и усиление активности нейронов в результате деполяризующего действия KCl при его прямой аппликации на поверхность мозга.

Адреналин (эпинефрин) является агонистом  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренергических рецепторов, которые были обнаружены во многих органах, включая сосуды головного мозга [24]. Эти рецепторы участвуют в модуляции активности коры головного мозга, мозгового кровотока, метаболизма глюкозы и проницаемости гематоэнцефалического барьера [25]. Периферическое введение адреналина приводит к повышению локального мозгового кровотока, увеличению потребления кислорода мозгом и скорости мозгового метаболизма у крыс, оказывая значительное влияние на определенные структуры мозга, в том числе на сомато-сенсорную кору [26–28].

В настоящем исследовании инъекция адреналина приводила к одновременному быстрому увеличению как кровотока (на  $52 \pm 18\%$ ), так и температуры (на  $1.17 \pm 0.24^\circ\text{C}$ ). Однако длительность эффектов адреналина на кровоток и температуру была различной. Если усиление кровотока



**Рис. 2.** Изменение локальной температуры и динамики кровотока в мозге при воздействии системного введения адреналина и аппликации раствора KCl: (а) – пример реакции на внутрибрюшинную инъекцию адреналина (0.2 мл/мышь, 1 мг/мл); (б) и (в) – примеры реакции на аппликацию на поверхность мозга раствора KCl (1 М, 10 мкл). Кривая 1 – изменение скорости кровотока, кривая 2 – температурный трек.

у всех экспериментальных животных длилось  $9.75 \pm 3.13$  мин, то повышение температуры было более длительным и индивидуально различалось у животных. Одинаковая продолжительность действия адреналина на кровоток может объясняться тем, что он быстро метаболизируется моноаминоксидазой и катехол-О-метилтрансферазой [29]. Однако на нервную ткань адреналин может влиять не только через усиление кровотока,

что может объяснить его более сложное действие на температуру, зависящую от нейрональной активности. Так,  $\alpha$ - и  $\beta$ - адренорецепторы обнаружены на соме или проксимальных дендритах корковых пирамидных клеток и большей доли (>36%) интернейронов, которые колокализуют парвальбумин, соматостатин или NO-синтазу [25]. Также было показано, что адреналин через  $\beta$ -адренергические рецепторы прямо регулирует активность

NMDA рецепторов и, следовательно, глутаматергическую передачу и активность нейронов [30]. Таким образом, данные, полученные в серии с адреналином, указывают на то, что активация нейронов через адренорецепторы, расположенные как на сосудах, так и на самих нервных клетках, сопряжена со сложной температурной динамикой.

Следующая экспериментальная серия моделировала увеличение возбудимости нейронов с помощью повышения концентрации внеклеточного калия. Для этого раствор KCl апплицировали на поверхность коры головного мозга анестезированных мышей, что вызывало распространяющуюся деполяризацию корковых нейронов. Распространяющаяся деполяризация или кортикальная распространяющаяся депрессия — это волны деполяризации нейронов, которые распространяются по коре и имеют сложную временную динамику [31]. В первые минуты регистрируется повышение активности, обусловленное высоким внеклеточным калием и выбросом глутамата, которое сменяется длительным (более 30 мин) периодом резкого снижения спонтанной синаптической активности [32]. Сосудистая сеть является активным участником этого процесса. Имеются данные о том, что сосудистые клетки проводят деполяризационную волну вдоль своих главных осей [33]. Помимо проведения волны, артерии головного мозга реагируют на повышенный уровень калия сужением. Стойкая вазоконстрикция наблюдается в течение часа после начала распространения деполяризации, нейроваскулярная связь при этом нарушается, но механизмы этого явления во многом остаются неясными [34].

В данной работе аппликация раствора KCl вызывала одновременное изменение скорости кровотока и температуры нервной ткани. При этом эффекты были более продолжительными и гетерогенными, чем при инъекции адреналина. Аппликация KCl приводила к продолжительному повышению скорости кровотока у всех экспериментальных животных в среднем на 47% (снижение до базового уровня не наблюдалось в течение 15–20 мин). Этот факт соответствует литературным данным, поскольку во многих исследованиях было показано значительное увеличение церебрального кровотока во время распространения корковой деполяризации в физиологических условиях у людей и многих видов животных [35, 36].

Высокая концентрация внеклеточного калия вызывала разнонаправленные изменения температуры у разных животных: наблюдалось как ее повышение (на  $0.70^{\circ}\text{C}$ ), так и снижение (на  $0.84^{\circ}\text{C}$ ). Снижение температуры может быть связано с резким снижением спонтанной синаптической активности и меньшим тепловыделением нейронов. Сочетание более низкого тепловыделения, с одной стороны, и более интенсивного теплоотведения в результате усиления кровотока,

с другой стороны, дают в результате общее снижение температуры нервной ткани. Однако в некоторых экспериментах наблюдалось повышение температуры. Известно, что при распространяющейся деполяризации происходит массивный вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки [37]. Поскольку  $\text{Ca}^{2+}$  является классическим разобщителем митохондрий, повышение его уровня в цитозоле нервных клеток может приводить к увеличению тепловыделения митохондриями. В недавних работах было показано, что при разобщении митохондрий выделение тепла может приводить к повышению их температуры до  $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$  [38, 39]. Таким образом, полученные нами данные о гетерогенной температурной динамике нервной ткани при действии KCl могут быть связаны с индивидуальными отличиями в гомеостазе экспериментальных животных, с разной удаленностью термометра от места распространения деполяризационной волны в разных экспериментах и другими факторами. Действительно, в литературе есть данные, что распространяющаяся деполяризация не является однородным процессом ни в пространстве, ни во времени. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* было показано, что вызванная KCl распространяющаяся деполяризация демонстрирует большую вариабельность [33]. Наличие различных временных масштабов внутри системы приводит к числовой нестабильности при попытках математического моделирования этих процессов [31]. Исследования температурной динамики в нервной ткани при распространяющейся деполяризации, впервые проведенные в настоящей работе, могут внести значимый вклад в понимание механизмов данного явления.

Данные, полученные в настоящей работе, указывают на то, что температура нервной ткани имеет более сложную динамику по сравнению с кровотоком, что, по-видимому, связано с прямой или опосредованной активацией как отдельных нейронов, так и нейронных ансамблей. Исследования температурной динамики могут внести значимый вклад в понимание механизмов нейроваскулярного сопряжения.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят компанию «Азимут Фотоникс» за предоставленную установку для лазерной спекл-контрастной визуализации.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00129) и в ходе выполнения государственного задания № 075-01025-23-01.



### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол экспериментов на животных одобрен Комитетом по биоэтике Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kiyatkin E. A. Brain temperature and its role in physiology and pathophysiology: Lessons from 20 years of thermorecording. *Temperature (Austin)*, **6** (4), 271–333 (2019). DOI: 10.1080/23328940.2019.1691896
- Sung D., Risk B. B., Wang K. J., Allen J. W., and Fleischer C. C. Resting-state brain temperature: dynamic fluctuations in brain temperature and the brain-body temperature gradient. *J. Magn. Reson. Imaging*, **57** (4), 1222–1228 (2023). DOI: 10.1002/jmri.28376
- Minamisawa H., Nordstrom C. H., Smith M. L., and Siesjö B. K. The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **10** (3), 365–374 (1990). DOI: 10.1038/jcbfm.1990.66
- Blatteis C. M. The onset of fever: new insights into its mechanism. *Prog. Brain Res.*, **162**, 3–14 (2007). DOI: 10.1016/S0079-6123(06)62001-3
- Moltz H. Fever: causes and consequences. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **17** (3), 237–369 (1993). DOI: 10.1016/s0149-7634(05)80009-0
- Siesjö B. K. *Brain energy metabolism* (John Wiley & Sons, New York, 1978).
- Falk D. Brain evolution in Homo: The “radiator” theory. *Behav. Brain Sci.*, **13** (2), 333–344 (1990). DOI: <https://doi.org/10.1017/S0140525X00078973>
- Dehkharghani S. and Qiu D. MR thermometry in cerebrovascular disease: physiologic basis, hemodynamic dependence, and a new frontier in stroke imaging. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, **41** (4), 555–565 (2020). DOI: 10.3174/ajnr.A6455
- Zhu M., Ackerman J. J., and Yablonskiy D. A. Body and brain temperature coupling: the critical role of cerebral blood flow. *J. Comp. Physiol. B*, **179** (6), 701–710 (2009). DOI: 10.1007/s00360-009-0352-6
- Nybo L., Secher N. H., and Nielsen B. Inadequate heat release from the human brain during prolonged exercise with hyperthermia. *J. Physiol.*, **545** (2), 697–704 (2002). DOI: 10.1113/jphysiol.2002.030023
- Yablonskiy D. A., Ackerman J. J., and Raichle M. E. Coupling between changes in human brain temperature and oxidative metabolism during prolonged visual stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (13), 7603–7608 (2000). DOI: 10.1073/pnas.97.13.7603
- McIlvoy L. Comparison of brain temperature to core temperature: A review of the literature. *J. Neurosci. Nurs.*, **36** (1), 23–31 (2004). DOI: 10.1097/01376517-200402000-00004
- Williams L. R. and Leggett R. W. Reference values for resting blood flow to organs of man. *Clin. Phys. Physiol. Meas.*, **10** (3), 187–217 (1989). DOI: 10.1088/0143-0815/10/3/001
- Baker M. A. and Chapman L. W. Rapid brain cooling in exercising dogs. *Science*, **195** (4280), 781–783 (1977). DOI: 10.1126/science.836587
- Jessen C. Selective brain cooling in mammals and birds. *Jpn. J. Physiol.*, **51** (3), 291–301 (2001). DOI: 10.2170/jjphysiol.51.291
- Drew P. J. Neurovascular coupling: motive unknown. *Trends Neurosci.*, **45** (11), 809–819. (2022). DOI: 10.1016/j.tins.2022.08.004
- Gordon G. R., Choi H. B., Rungta R. L., Ellis-Davies G. C., and MacVicar B. A. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*, **456** (7223), 745–749 (2008). DOI: 10.1038/nature07525
- Paxinos G., Franklin K. B. J., S. D.: Academic Press (2001). Paxinos G. and Franklin K. B. J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd Edition (Acad. Press, San Diego, 2001).
- Winship I. R. Laser speckle contrast imaging to measure changes in cerebral blood flow. *Methods Mol. Biol. (Clifton, NJ)*, **135**, 223–235 (2014). DOI: 10.1007/978-1-4939-0320-7\_19
- Romshin A. M., Zeeb V., Martyanov, A. K., Kudryavtsev O. S., Sedov V. S., Ralchenko V. G., Sinogeykin A. G., and Vlasov I. I. A new approach to precise mapping of local temperature fields in submicrometer aqueous volumes. *Sci Rep.*, **11**, 14228 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-93374-7
- Malkov A., Ivanov A. I., Popova I., Mukhtarov M., Gubkina O., Waseem T., Bregestovski P., and Zilberter Y. Reactive oxygen species initiate a metabolic collapse in hippocampal slices: potential trigger of cortical spreading depression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34** (9), 1540–1549 (2014). DOI: 10.1038/jcbfm.2014.121.
- Fedotov I. V., Solotenkov M. A., Pochechuev M. S., Ivashkina O. I., Kilin S. Ya., Anokhin K. V., and Zhelitikov A. M. All-optical brain thermometry in freely moving animals. *ACS Photonics*, **7**, 3353–3360 (2020). DOI: 10.1021/acsp Photonics.0c00706
- Petrini G., Tomagra G., Bernardi E., Moreva E., Traina P., Marcantoni A., Picollo F., Kvaková K., Cígler P., Degiovanni I. P., Carabelli V., and Genovesi M. Nanodiamond–quantum sensors reveal temperature variation associated to hippocampal neurons firing. *Adv. Sci.*, **9** (28), e2202014 (2022). DOI: 10.1002/advs.202202014
- Marín J. and Rivilla F. Nerve endings and pharmacological receptors in cerebral vessels. *Gen. Pharmacol.*, **13** (5), 361–368 (1982). DOI: 10.1016/0306-3623(82)90100-8
- Toussay X., Basu K., Lacoste B., and Hamel E. Locus coeruleus stimulation recruits a broad cortical neuronal network and increases cortical perfusion. *J. Neurosci.*, **33** (8), 3390–3401 (2013). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3346-12.2013X
- Abdul-Rahman A., Dahlgren N., Johansson B. B., and Siesjö B. K. Increase in local cerebral blood flow induced by circulating adrenaline: involvement of blood-brain barrier dysfunction. *Acta Physiol Scand.*, **107** (3), 227–332 (1979). DOI: 10.1111/j.1748-1716.1979.tb06467.x



27. N. Dahlgren, I. Rosen, T. Sakabe, and Siesjö B. K. Cerebral functional, metabolic and circulatory effects of intravenous infusion of adrenaline in the rat. *Brain Res.*, **184** (1), 143–152 (1980). DOI: 10.1016/0006-8993(80)90593-4
28. Sokrab T. E. and Johansson B. B. Regional cerebral blood flow in acute hypertension induced by adrenaline, noradrenaline and phenylephrine in the conscious rat. *Acta Physiol. Scand.*, **137** (1), 101–106 (1989). DOI: 10.1111/j.1748-1716.1989.tb08725.x
29. Borchardt R.T. Catechol o-methyltransferase. *Methods Enzymol.*, **77**, 267–272 (1981). DOI: 10.1016/s0076-6879(81)77036-8
30. Del Franco A. P. and Newman E. A. Astrocyte  $\beta$ -adrenergic receptor activity regulates NMDA receptor signaling of medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, **44** (2), e0990232023 (2023). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0990-23.2023
31. Reyner-Parra D., Bonet C., Seara T. M., and Huguet G. Traveling waves in a model for cortical spreading depolarization with slow–fast dynamics. *Chaos*, **33** (8), 083154 (2023). DOI: 10.1063/5.0160509
32. Sawant-Pokam P. M., Suryavanshi P., Mendez J. M., Dudek F. E., and Brennan K. C. Mechanisms of neuronal silencing after cortical spreading depression. *Cereb. Cortex.*, **27** (2), 1311–1325 (2017). DOI: 10.1093/cercor/bhv328P
33. Kaufmann D., Theriot J. J., Zyuzin J., Service C. A., Chang J. C., Tang Y. T., Bogdanov V. B., Multon S., Schoenen J., Ju Y. S., and Brennan K.C. Heterogeneous incidence and propagation of spreading depolarizations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **37** (5), 1748–1762 (2017). DOI: 10.1177/0271678X166659496D
34. Xu S., Chang J. C., Chow C. C., Brennan K. C., and Huang H. A mathematical model for persistent post-CSD vasoconstriction. *PLoS Comput. Biol.*, **16** (7), e1007996 (2020). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007996
35. Busija D. W., Bari F., Domoki F., Horiguchi T., and Shimizu K. Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of cortical spreading depression. *Prog. Neurobiol.*, **86** (4), 379–395 (2008). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.008D
36. Hsieh B. Y., Kao Y.-C., Zhou J. N., Lin Yi.-P., Mei Yu.-Y., Chu S.-Yu., and Wu D.-Ch. Vascular responses of penetrating vessels during cortical spreading depolarization with ultrasound dynamic ultrafast Doppler imaging. *Front. Neurosci.*, **16**, 1015843 (2022). DOI: 10.3389/fnins.2022.1015843
37. Wang Y., Wang Y., Yue G., and Zhao Y. Energy metabolism disturbance in migraine: From a mitochondrial point of view. *Front. Physiol.*, **14**, 1133528 (2023). DOI: 10.3389/fphys.2023.1133528Y
38. Chrétien D., Bénéit P., Ha H. H., Keipert S., El-Khoury R., Chang Y. T., Jastroch M., Jacobs H. T., Rustin P., and Rak M. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50°C. *PLoS Biol.* **16** (1), e2003992 (2018). DOI: 10.1371/journal.pbio.2003992D
39. Romshin A. M., Osypov A. A., Popova I. Y., Zeeb V. E., Sinogeykin A. G., and Vlasov I. I. Heat release by isolated mouse brain mitochondria detected with diamond thermometer. *Nanomaterials (Basel)*, **13** (1), 98 (2023). DOI: 10.3390/nano13010098

## Relationship between Temperature in the Deep Layers of the Somatosensory Cortex and Blood Flow Velocity in the Brain of Anesthetized Mice

A.M. Romshin\*, A.A. Osypov\*\*, \*\*\*, V.K. Krohaleva\*, \*\*, S.G. Zhuravlev\*, O.N. Egorova\*, I.I. Vlasov\*, and I.Yu. Popova\*, \*\*

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

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

\*\*\*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia

Despite the obvious importance of temperature in brain function, this parameter still remains insufficiently studied. Temperature is determined by the balance between the release of heat during metabolism and its removal by the bloodstream, which is regulated by neurovascular coupling. In this study, laser speckle contrast imaging and microdiamond thermometry were used for the first time to carry out a long-term simultaneous recording of blood flow velocity and temperature in the brain of anesthetized animals in vivo. To analyze the relationship between temperature and blood flow, two approaches were employed: the use of intraperitoneal adrenaline injection to increase blood flow rate and the application of KCl solution to the surface of the brain to enhance neuronal activity. The data obtained indicate that the temperature of nervous tissue has more complex dynamics when compared to that of blood flow; it is apparently due to the direct or indirect activation of individual neurons and neuronal ensembles. Studies that investigate temperature dynamics can make a significant contribution to the understanding of the mechanisms of neurovascular coupling.

*Keywords:* brain, temperature, blood flow, dynamics, adrenaline, spreading depolarization

УДК 533.6.071.3

## БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ И ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *Daphnia magna* КАК МОДЕЛЬНОГО ОРГАНИЗМА

© 2024 г. Н.Б. Савина<sup>\*,#</sup>, Д.В. Ускалова<sup>\*\*</sup>, Д.Т. Петросова<sup>\*\*</sup>, Е.И. Сарапульцева<sup>\*, \*\*</sup>

<sup>\*</sup>Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Каширское шоссе, 31, Москва, 115409, Россия

<sup>\*\*</sup>Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Студгородок, 1, Обнинск Калужской области, 249039, Россия

<sup>#</sup>E-mail: nsavina15@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.11.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Представлен обзор методов визуализации изображения и другие биофизические подходы, которые демонстрируют валидность применения высших беспозвоночных животных из подтипа ракообразных *Daphnia magna* в качестве тест-модели для биомедицинских и экотоксикологических исследований. Описаны основные характеристики животных, такие как прозрачное тело, малые размеры, фильтрующий тип питания, наличие оформленных органов, а также короткий жизненный цикл, высокая плодовитость и чувствительность к токсикантам, позволяющие использовать данный тест-организм в опытах *in vivo* как альтернативную теплокровным животным модель. Проведен анализ публикаций, в которых *D. magna* были использованы в качестве модели для визуализации накопления и распределения наноматериалов в организме, а также для анализа механизмов цитотоксичности. Описаны методы флуоресцентной визуализации, интерференционной микроскопии и спектрофотометрии.

**Ключевые слова:** *Daphnia magna*, биомедицина, экотоксикология, визуализация, спектрофотометрия, наноматериалы, биораспределение.

DOI: 10.31857/S0006302924020194, EDN: ОТКНQH

Современная тенденция использования наноматериалов в биомедицинских целях является многообещающей. Активно накапливается экспериментальный материал о биобезопасности и биосовместимости наночастиц, изучаются возможности нанорадиосенсбилизации для технологий бинарной лучевой терапии и адресной доставки биологически активных веществ в клетки векторами на основе наноматериалов. Наночастицы золота используют, например, для доставки лекарств и терапии рака из-за их высокого соотношения полезной нагрузки к носителю [1]. Квантовые точки (QDs) обладают уникальными фотоэлектрическими свойствами, благодаря чему используются в биомедицине в качестве средств визуализации и диагностики [2]. А разработка детекторов на основе нанопроволочных датчиков (NWs) стала конкурентоспособной альтернативой традиционным аналитическим системам отображения [3]. Информация о накопле-

нии, цито- и генотоксичности наноматериалов в клетках и тканях имеет решающее значение для применения в биомедицине. В то же время требуют внимания методы и модели анализа фармакокинетики, биораспределения и токсичности этих веществ для живого организма. Не следует забывать о возможности загрязнения наноматериалами окружающей среды, что может привести к нарушению функционирования пищевых сетей и снижению биоразнообразия из-за высокой активности взаимодействия наночастиц с компонентами живой природы. Поэтому задачи, которые стоят перед исследователями, включают в себя, в том числе, анализ биобезопасности наноматериалов в опытах *in vitro* и *in vivo*, изучение распределения наноматериалов в организме и количественную оценку избирательности поглощения органами и тканями.

Для визуализации накопления и распределения наноматериалов в тканях и органах используют разные биофизические методы – просвечивающую электронную микроскопию, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию,

Сокращения: QDs – квантовые точки, NWs – нанопроволочные датчики.

масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой и другие [4]. Данные методы отличаются простым, быстрым и неинвазивным подходом к визуализации. Большинство исследований, как и процитированное выше, проводятся *in vitro* и сосредоточены на взаимодействии «наночастица–клетка» в специфической и ограниченной среде. Поэтому результаты опытов *in vitro* некорректно напрямую сопоставлять и аппроксимировать на исследования *in vivo*. В этом случае используют теплокровных животных, входящих в «золотой стандарт» доклинических испытаний.

Целью данной публикации является обзор методов визуализации изображения и других биофизических подходов с применением беспозвоночных животных из подтипа ракообразные класса жабронгие *Daphnia magna* Straus, 1820 в качестве модели для биомедицинских и экотоксикологических исследований.

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИВОТНЫХ *Daphnia magna* В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Высшие беспозвоночные животные *Daphnia magna* являются доступным и широко применяемым в экотоксикологии, популяционной генетике, экофизиологии и других научных направлениях тест-организмом. *D. magna* рекомендована для проведения токсикологических исследований в «Руководствах» Организации экономического сотрудничества и развития по тестированию химических веществ (тест на острую иммобилизацию [5] и тест на размножение *D. magna* [6]). Эти беспозвоночные животные имеют органы обоняния в виде усиков, фасеточный глаз, почки, мозг, который располагается рядом с пищеводом, замкнутую систему кровообращения и двуостное сердце на спинной части прозрачного тела, покрытого тонкой хитиновой оболочкой [7]. Особым преимуществом их применения является простота культивирования, короткий жизненный цикл, многочисленное потомство, относительно небольшие, но видимые невооруженным глазом размеры тела.

По типу питания *D. magna* относится к фильтраторам [8]. Пять пар грудных конечностей со щетинками образуют фильтрационный аппарат для питания и дыхания, генерируя поток воды. Он направляет внутрь раковины животного простейших, водоросли, бактерии и органический детрит, которые затем поступают в продольный желоб и передаются к ротовому отверстию рачка, где пища подвергается механической обработке. Данный тип питания, предполагающий значительное взаимодействие организма с компонентами окружающей среды, во многом определяет высокую чувствительность и, как следствие, вы-

раженную реакцию *D. magna* на воздействие внешних факторов.

Жизненный цикл животных в оптимальных условиях лаборатории составляет около 10–11 недель [9, 10]. В лабораторных условиях *D. magna* размножаются партеногенетически, производя амеиотические яйца. Эмбриональный период длится до пяти суток. Примерно к 10-суточному возрасту у *D. magna* завершается период созревания, и самка начинает вымет молоди. В течение жизненного цикла самка каждые трое-четыре суток приносит до 40 новорожденных [9, 10]. Яйца формируются в парных яичниках, расположенных вдоль кишечника, а затем перемещаются в выводковую камеру, где происходит эмбриональное развитие. Камера прозрачна, что позволяет вести учет развивающихся яиц и эмбрионов. Новорожденная молодь имеет размеры 0.7–0.9 мм в длину. К моменту половозрелости животные достигают примерно 2.5 мм, продолжают расти с каждой линькой в течение жизни и при достаточном питании достигают более крупных размеров (до 6 мм) в старшем возрасте. К моменту наступления половой зрелости они, как правило, независимо от питания, редко превосходят 2.5–3.0 мм в длину.

*D. magna* бесцветны за счет прозрачного хитинового панциря, защищающего грудной и брюшной отделы. Данная особенность позволяет отчетливо наблюдать внутренние органы – сердце, кишечник, выводковую камеру с яйцами и эмбрионами, а также изучать физиологические процессы (поглощение и фильтрацию молекул и частиц, перистальтику кишечника) [11, 12].

Животные из рода *Daphnia* как обязательный тест-объект включены в схему установления предельно-допустимых концентраций (ПДК) веществ-загрязнителей и сточных вод в России [13, 14]. В биотестировании используют молодь *D. magna* (в возрасте не более 24 ч), которая обладает высокой чувствительностью к токсичным веществам. При наблюдении за размножением рачков в экспериментальных условиях учитывают выживаемость, время наступления половозрелости, регистрируемое по моменту откладки яиц в выводковую камеру, время рождения первого помета с учетом выхода молоди из выводковой камеры, число пометов за срок наблюдения, общее количество родившейся молоди, общее количество абортивных яиц, мертворожденной и имеющей аномальное морфологическое строение молоди. Несомненно, что именно эти показатели в конечном итоге определяют сохранность вида и имеют решающее значение при оценке токсичности воды. Для целей биомедицины спектр задач значительно расширяется и включает в себя необходимость визуализации распределения наночастиц в органах и тканях. Ниже мы

приводим обзор биофизических методов и подходов, в которых животных *D. magna* использовали в качестве модельного организма для биомедицинских и экотоксикологических исследований.

### МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Флуоресцентная визуализация является высокочувствительным неинвазивным методом, применяющимся для получения изображений биологических объектов и последующего анализа их структурно-функциональных свойств. Изображения могут быть получены с применением микроскопии, визуализирующих зондов, спектроскопии и т.п.

В последнее десятилетие появляется большое количество работ по исследованию воздействия на организм *D. magna* таких наноматериалов, как наночастицы, квантовые точки, нанопроволоки. Поскольку животные покрыты хитиновым покровом, то основным способом проникновения наноматериалов в организм *D. magna* является их фильтрация из водной среды, а в клетки – путем эндоцитоза [15].

Распределение наночастиц в организме *D. magna* изучают с помощью методов световой, электронной, конфокальной флуоресцентной микроскопии [16], а также рентгеноструктурного [17] и рентгенодисперсионного спектрометрического [16] анализов. Большинство анализируемых исследований продемонстрировали, что наночастицы накапливаются преимущественно в кишечнике ракообразных. В работе [18] был изучен эффект окислительного стресса в клетках кишечника *D. magna* после воздействия наночастицами золота. Изображение кишечника животного было получено в конфокальном режиме лазерного сканера с помощью инвертированного микроскопа при 20-кратном увеличении с возбуждением/излучением 493–556 нм для флуоресцентного красителя. Установлено, что поглощенные наночастицы золота повышали образование активных форм кислорода в кишечнике *D. magna*, на что указывала ярко-зеленая флуоресценция в цитоплазме энтероцитов после 24-часового воздействия наночастицами.

С помощью сканирующего электронного микроскопа на клетках млекопитающих было обнаружено, что цитотоксичность наночастиц  $Al_2O_3$  зависит от их кристаллических фаз [16]. В исследовании на *D. magna* показано, что октаэдрический микро/нано- $Cu_2O$  обладает более высокой поверхностной активностью и является более токсичным для *D. magna* за счет накопления большего количества растворенных ионов  $Cu$ , чем кубический микро- и наноструктурный  $Cu_2O$  [15]. В процитированном исследовании кишечник

животных был отделен от панциря и других органов, а затем проанализирован с помощью сканирующего электронного микроскопа с энергетическим рентгенодисперсионным спектрометром.

Анализ литературы показал, что наноматериалы в виде NWs не оказывают токсического эффекта на *D. magna* [19, 20]. В цитируемых работах с применением конфокальной флуоресцентной микроскопии было установлено, что NWs подвергаются фрагментации в процессе фильтрации. Обнаружено, что короткие фрагментированные NWs диаметром 40 нм интенсивнее проходят через кишечный эпителий *D. magna*, чем более длинные фрагменты NWs диаметром 80 нм.

QDs представляют собой разновидность металлических наночастиц и имеют перспективы применения в качестве флуоресцентных зондов для визуализации. В работе [21] было установлено, что QDs способны преодолевать эпителиальный слой и мигрировать из кишечника в соседние ткани и органы. Способность к миграции определялась их зарядом. С использованием методов конфокальной микроскопии, электронно-микроскопической флуоресценции и энергодисперсионной спектроскопии удалось обнаружить, что после экспозиции *D. magna* с растворенными в воде QDs, частицы с отрицательным зарядом (QDs COOH) поглощались животными в большей степени, чем положительно заряженные (QDs  $NH_2$ ). С помощью конфокального микроскопа обнаружили, что QDs накапливались преимущественно в кишечнике и в яйцах *D. magna*. Дополнительно к этому с помощью просвечивающего электронного микроскопа обнаружено накопление QDs в ворсинках кишечника [21]. QDs из амфифильного полимера (ТОPOQD, C60, SWNT) могут вызывать блокировку дыхания *D. magna* вследствие налипания частиц наноматериалов на грудные конечности в области эпиподитов [22]. С помощью рентгеновской флуоресценции и 3D-томографии не удалось обнаружить миграцию другого типа QDs (CdS, CdSe и ZnS) за пределы кишечника животных [23]. Однако при попадании в тело *D. magna* вышеперечисленные QDs начинали флуоресцировать. Учитывая это свойство, можно расширить их практическое применение в медицине, используя для визуализации и диагностики.

В работе [24] проведено сравнение эффектов воздействия QDs на беспозвоночных (ракообразные *D. magna*) и позвоночных (шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*) животных. Показано, что накопление наноматериалов в обоих случаях происходит преимущественно в кишечнике и органах дыхания, что еще раз подчеркивает возможность использования беспозвоночных животных *D. magna* в качестве модели для первичного скри-

нинга эффектов воздействия наноматериалов *in vivo*.

В публикации [25] разработан и синтезирован зонд (BD-CHO) на основе бенз-2-окса-1,3-диазольного скелета для обнаружения формальдегида (НСОН) с помощью реакции Aza–Core с высокой селективностью и большим сдвигом Стокса (около 118 нм). Зонд был применен для мониторинга изменения концентрации формальдегида в клетках аденокарциномы молочной железы и гепатоцеллюлярной карциномы человека, в почках мышей, а также у модельного организма *D. magna* в опытах *in vivo* [25]. Было обнаружено усиление флуоресценции в зеленой части спектра во всех исследуемых клетках, тканях и организмах, предварительно инкубированных в формальдегид-содержащих средах, что свидетельствовало о накоплении данного соединения.

Метод визуализации, позволивший оценить уровень свободнорадикальных процессов и активных форм кислорода, образующихся в результате окислительного стресса, описан в работе [26]. Авторы разработали митохондриально-направленный флуоресцентный зонд (NA-T), основанный на механизме нуклеофильного замещения. В присутствии супероксидного аниона исходный зонд, излучающий синий цвет, подвергался разложению с образованием продукта, излучающего зеленый цвет. Приведенные в цитируемой работе эксперименты с конфокальной флуоресцентной визуализацией на нескольких типах клеток показали, что (NA-T)-зонд ориентирован на митохондрии и может быть использован для внутрикостного мониторинга эндогенного супероксид-аниона при разных типах воздействия на организм. Для тестирования свойств зонда *in vivo* в качестве модельного организма были применены ракообразные *D. magna* [26]. Свободнорадикальные реакции индуцировали форбол 12-миристан 13-ацетат и липополисахарид. Сигналы флуоресценции фиксировали преимущественно в области кишечника *D. magna*.

В качестве примера еще одного митохондриально-направленного зонда, успешно апробированного на *D. magna*, можно привести двухфотонный ратиометрический флуоресцентный зонд (TP-SO<sub>2</sub>) [27]. Зонд разработан для мониторинга в режиме реального времени *in vivo* диоксида серы (SO<sub>2</sub>) – соединения, играющего значительную роль в разных физиологических и патологических процессах, превышение которого в организме способствует возникновению респираторных заболеваний, неврологических расстройств и сердечно-сосудистых заболеваний, а в отдельных случаях – рака легких [28].

Технология масс-спектрометрической визуализации (MSI) с матрично-вспомогательной лазерной десорбционной ионизацией (MALDI)

широко используется для биовизуализации в медицинских целях [29, 30]. С использованием *D. magna* в качестве тест-модели предложен метод масс-спектрометрической визуализации (MALDI MS), позволивший составить карту распределения липидов в отдельных органах и тканях животных (выводковой камере и внутренней поверхности панциря) за одно измерение [31]. В статье [32] показано, что нарушение липидного обмена, индуцированное действием перфторированных алкильных соединений, может вызвать снижение плодовитости у *D. magna*. Описанный выше процесс визуализации позволил обнаружить пространственное распределение молекул-мишеней липидов в организме *D. magna*.

Еще один метод масс-спектрометрической десорбционной электро-распылительной ионизации (DESI-MS) адаптирован для визуализации и анализа пространственного распределения липидов в теле *D. magna* и изменений, происходящих при химическом воздействии бисфенола-А – эндокринного супрессора, влияющего на репродуктивную функцию *D. magna* [33]. DESI-метод вызывает ионизацию окружающей среды неразрушающего действия, используя электро-распыленные ионы растворителя для десорбции, ионизации и, в конечном счете, направления анализируемых веществ к детектору MS [34]. Описанная методика позволила охарактеризовать различия в базовом липидоме отдельных анатомических областей *D. magna*, таких как яйца, глаз и кишечник животных.

## МЕТОД НИЗКОКОГЕРЕНТНОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ

Ранее нами совместно с коллегами из Московского политехнического университета был апробирован метод низкокогерентной интерференционной микроскопии для анализа частоты сердечных сокращений у *D. magna* [35–37]. Сердце *D. magna* имеет вид округлого мешка с одной парой боковых остий. Частота сердечных сокращений достигает у взрослой *D. magna* 140–180 ударов в минуту, а у новорожденной молодежи – до 250–400 ударов в минуту [7]. В наших исследованиях была подобрана область спектра, в которой регистрацию интерферограммы не осложняло диффузное рассеяние света за счет хитинового покрова рачка. Видеоряд, полученный при увеличении микроскопа 20×, составлял 100 кадров в секунду. Сегмент с сердцем занимал область около 250×250 пикселей, 12 бит. Средняя частота сердечных сокращений  $F = 7.3$  Гц и составляла 400 ударов в минуту. Точность измерения – около 0.1 Гц.

## МЕТОДЫ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Оптические методы анализа биоэффектов *in vivo* на *D. magna* широко применяются в экотоксикологических экспериментах [38, 39]. Клеточный МТТ-тест, анализирующий метаболическую активность и соотношение живых и мертвых клеток в опытах *in vitro* [40], был модифицирован нами для исследований радиационных эффектов на беспозвоночных животных в опытах *in vivo* [41]. Метод позволил оценить степень свободнорадикальных реакций в теле облученных животных с использованием иммуноферментного спектрофотометра по переходу бесцветного 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола (МТТ-реактив) в фиолетово-окрашенный формазан. Были обнаружены и проанализированы радиационные эффекты острого  $\gamma$ -облучения животных и трансгенерационные механизмы сохранения токсического эффекта в первом необлученном поколении *D. magna* [42].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе приведен обзор методов визуализации с применением альтернативной теплокровным животным лабораторной модели беспозвоночного *D. magna* для первичного скринингового исследования распределения и накопления наноматериалов в организме в опытах *in vivo*. Использование в биофизических экспериментах короткоживущих, высокочувствительных к токсикантам, лекарственных препаратам, облучению и другим факторам, партеногенетически размножающихся, легко культивируемых в лабораторных условиях мелких беспозвоночных животных *D. magna* позволит получить значительный набор данных как для анализа механизмов накопления и распределения, так и для оценки биосовместимости и биобезопасности наноматериалов для организма.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 23-24-10041 «Анализ цитотоксичности наночастиц золота и антиоксидантных свойств фумарата в опытах *in vivo* для нужд фармкластера Калужской области» (2023–2024).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии потенциальных и явных конфликтов интересов, связанных с настоящей рукописью.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящее время для экспериментов *in vivo* с беспозвоночными не требуется одобрения Комитета по этике.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kus-Liškiewicz M., Fickers P., and Ben Tahar I. Biocompatibility and cytotoxicity of gold nanoparticles: recent advances in methodologies and regulations. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (20), 10952 (2021). DOI: 10.3390/ijms222010952
2. Yun X., Zuyong X., and Jianghong R. Semiconductor quantum dots for biosensing and *in vivo* imaging. *IEEE Trans. NanoBiosci.*, **8** (1), 4–12 (2009). DOI: 10.1109/TNB.2009.2017321
3. Naumova O. V., Generalov V. M., Zaitseva E. G., Latyshev A. V., Pyankov S. A., Kolosova I. V., Ananko G. G., Agafonov A. P., Gavrilova E. V., Maksyutov R. A., and Safatov A. S. Biosensors based on SOI nanowire transistors for biomedicine and virology. *Russ. Microelectron.*, **50** (3), 137–145 (2021). DOI: 10.1134/S1063739721030069
4. Kim C. S., Li X., Jiang Y., Yan B., Tonga G. Y., Ray M., Solfield D. J., and Rotello V. M. Cellular imaging of endosome entrapped small gold nanoparticles. *MethodsX*, **2**, 306–315 (2015). DOI: 10.1016/j.mex.2015.06.001
5. OECD, 2011. *Test Guideline No. 202: Daphnia sp. Acute immobilization test* (Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France).
6. OECD, 2012. *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*, OECD Guidelines for the Testing of 510 Chemicals, Section 2 (OECD Publishing, Paris).
7. Ebert D. *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia* (National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2005). Chapter 2, Introduction to Daphnia Biology. Электронный ресурс: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/> (дата доступа 10.10.2023).
8. Smirnov N. *Physiology of the Cladocera* (Elsevier, Boston, 2017).
9. Fuller N., Lerebours A., Smith J., and Ford A. T. The biological effects of ionising radiation on Crustaceans: A review. *Aquatic Toxicol.*, **167**, 55–67 (2015). DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.07.013i
10. Сарапульцева Е. И. Биологические эффекты радиационного воздействия у низших ракообразных *Daphnia magna*. Аналитический обзор. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **57** (4), 414–428 (2017). DOI: 10.7868/S0869803117040075
11. Nkoom M., Lu G., Liu J., Dong H., and Yang H. Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. & Pollution Res.*, **26** (6), 5704–5712 (2019). DOI: 10.1007/s11356-018-04072-3
12. Bownik A. Physiological endpoints in daphnid acute toxicity tests. *Sci. Total Environ.*, **700**, 134400 (2019). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134400
13. ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06; Т 16.1:2:3.9-06. *Токсикологические методы анализа. Методика определения*

- острой токсичности питьевой воды, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний *Daphnia magna* Straus (ФБУ «ФЦАО», М., 2006, 2011).
14. Приказ Росрыболовства от 04.08.2009 N 695. «Об утверждении Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения».
  15. Fan W., Shi Z., Yang X., Cui M., Wang X., Zhang D., Liu H., and Guo L. Bioaccumulation and biomarker responses of cubic and octahedral Cu<sub>2</sub>O micro/nanocrystals in *Daphnia magna*. *Water Res.*, **46** (18), 5981–5988 (2012). DOI: 10.1016/j.watres.2012.08.019
  16. Nogueira D. J., Vaz V. P., Neto O. S., Silva M. L. N., Simioni C., Ouriques L. C., Vicentini D. S., and Matias W. G. Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessment. *Environ. Res.*, **182**, 108987 (2020). DOI: 10.1016/j.envres.2019.108987
  17. Ates M., Danabas D., Ertit Tastan B., Unal I., Cicek Cimen I. C., Aksu O., Kutlu B., and Arslan Z. Assessment of oxidative stress on *Artemia salina* and *Daphnia magna* after exposure to Zn and ZnO nanoparticles. *Bull. Environ. Contamination Toxicol.*, **104** (2), 206–214 (2020). DOI: 10.1007/s00128-019-02751-6
  18. Dominguez G. A., Lohse S. E., Torelli M. D., Murphy C. J., Hamers R. J., Orr G., and Klaper R. D. Effects of charge and surface ligand properties of nanoparticles on oxidative stress and gene expression within the gut of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol.*, **162**, 1–9 (2015). DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.02.015
  19. Prinz C. N. Interactions of nanowires with cells and tissue, in *Technical Digest of the Int. Electron Devices Meet.* (2018), pp. 26.3.1–26.3.4. DOI: 10.1109/IEDM.2017.8268463
  20. Mattsson K., Adolffson K., Ekvall M. T., Borgström M. T., Linse S., Hansson L.-A., Cedervall T., and Prinz C. N. Translocation of 40 nm diameter nanowires through the intestinal epithelium of *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* **10** (8), 1160–1167 (2016). DOI: 10.1080/17435390.2016.1189615
  21. Feswick A., Griffith R. J., Siebein K., and Barber D. S. Uptake, retention and internalization of quantum dots in *Daphnia* is influenced by particle surface functionalization. *Aquatic Toxicol.*, **130**, 210–218 (2013). DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.01.002
  22. Kwon D., Kim M. J., Park C., Park J., Choi K., and Yoon T. H. *In vivo* biodegradation of colloidal quantum dots by a freshwater invertebrate, *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol.*, **114**, 217–222 (2012). DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.02.033
  23. Jackson B. P., Pace H. E., Lanzirrotti A., Smith R., and Ranville J. F. Synchrotron X-ray 2D and 3D elemental imaging of CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles in *Daphnia magna*. *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 911–917 (2009). DOI: 10.1007/s00216-009-2768-y
  24. Galdiero E., Falanga A., Siciliano A., Maselli V., Guida M., Carotenuto R., Tussellino M., Lombardi L., Benvenuto G., and Galdiero S. *Daphnia magna* and *Xenopus laevis* as in vivo models to probe toxicity and uptake of quantum dots functionalized with gH625. *Int. J. Nanomed.*, **12**, 2717–2731 (2017). DOI: 10.2147/IJN.S127226
  25. Yang M., Fan J., Du J., Long S., Wang J., and Peng X. Imaging of formaldehyde in live cells and *Daphnia magna* via Aza-Cope reaction utilizing fluorescence probe with large Stokes shifts. *Front. Chem.*, **6** (2018). DOI: 10.3389/fchem.2018.00488
  26. Zhang Z., Fan J., Zhao Y., Kang Y., Du J., and Peng X. Mitochondria-accessing ratiometric fluorescent probe for imaging endogenous superoxide anion in live cells and *Daphnia magna*. *ACS Sensors*, **3** (3), 735–741 (2018). DOI: 10.1021/acssensors.8b00082
  27. Li H., Zhou X., Fan J., Long S., Du J., Wang J., and Peng X. Fluorescence imaging of SO<sub>2</sub> derivatives in *Daphnia magna* with a mitochondria-targeted two-photon ratiometric fluorescent probe. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **154**, 709–718 (2018). DOI: 10.1016/j.snb.2017.07.082
  28. Khalaf E. M., Mohammadi M. J., Sulistiyani S., Ramírez-Coronel A. A., Kiani F., Jalil A. T., Almulla A. F., Asban P., Farhadi M., and Derikondi M. Effects of sulfur dioxide inhalation on human health: a review. *Rev. Environ. Health* (2022). DOI: 10.1515/reveh-2022-0237
  29. Singhal R., Carrigan J. B., Wei W., Taniere P., Hejmadi R., Forde C., Ludwig C., Griffiths R. L., Johnson P. J., Tucker O., Alderson D., Günther U. L., and Ward D. G. MALDI profiles of proteins and lipids for the rapid characterisation of upper GI-tract cancers. *J. Proteomics*, **80**, 207–215 (2015). DOI: 10.1016/j.jprot.2013.01.016
  30. Ščupáková K., Soons Z., Ertaylan G., Pierzchalski K. A., Eijkel G. B., Ellis S. R., Greve J. W., Driessen A., Verheij J., De Kok T. M., Olde Damink S. W. M., Rensen S. S., and Heeren R. M. A. Spatial systems lipidomics reveals nonalcoholic fatty liver disease heterogeneity. *Anal. Chem.*, **90** (8), 5130–5138 (2018). DOI: 10.1021/acs.analchem.7b05215
  31. Schirmer E., Ritschar S., Ochs M., Laforsch C., Schuster S., and Römpf A. MALDI mass-spectrometry imaging workflow for the aquatic model organisms *Danio rerio* and *Daphnia magna*. *Sci. Reports*, **12** (1), 72–88 (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-09659-y
  32. Seyoum A., Pradhan A., Jass J., and Olsson P.-E. Perfluorinated alkyl substances impede growth, reproduction, lipid metabolism and lifespan in *Daphnia magna*. *Sci. Total Environ.*, **737**, 139682 (2020). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139682
  33. Smith M. J., Weber R. J. M., and Viant M. R. Spatially mapping the baseline and bisphenol-a exposed *Daphnia magna* lipidome using desorption electrospray ionization—mass spectrometry. *Metabolites*, **12** (1), 33 (2022). DOI: 10.3390/metabol12010033
  34. Takáts Z., Wiseman J. M., Gologan B., and Cooks R. G. Mass-spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, **306** (5695), 471–473 (2004). DOI: 10.1126/science.1104404
  35. Каленков С. Г., Каленков Г. С. и Штанько А. Е. Пространственно-спектральная цифровая голография



- микрообъектов в низкокогерентном свете. *Радиотехника и электроника*, **58** (12), 1243 (2013). DOI: 10.7868/S0033849413120097
36. Сарапульцева Е. И., Каленков Г. С., Заалишвили Н. Ю., Ускалова Д. В. и Устенко К. В. Новый подход к оценке радиэкологических последствий облучения, в кн. *Будущее атомной энергетики – AtomFuture 2019* (Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск, 2020), сс. 46–47.
37. Сарапульцева Е. И., Морозова А. О., Колесникова Н. И., Савина Н. Б., Ускалова Д. В. и Устенко К. В. Анализ сердечного ритма у модельного тест-организма *Daphnia magna* в качестве нового подхода к оценке радиэкологических последствий облучения. *Изв. ВУЗов: ядерная энергетика*, **2**, 146–155 (2020). DOI: 10.26583/npe.2020.2.13
38. Paul R. J., Colmorgen M., Hüller T., Tyroller F., and Zinkler D. Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods. *J. Comp. Physiol. B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, **167** (6), 399–408 (1997). DOI: 10.1007/s003600050089
39. Barata C., Varo I., Navarro J. C., Arun S., and Porte C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicology & Pharmacology* **140** (2), 175–186 (2005). DOI: 10.1016/j.cca.2005.01.013
40. Nikš M. and Otto M. Towards an optimized MTT-assay. *J. Comp. Physiol. B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, **130** (1), 149–151 (1990). DOI: 10.1007/s003600050089
41. Сарапульцева Е. И., Рябченко Н. И., Иголкина Ю. В. и Иванник Б. П. Использование метилтетразолий бромид (МТТ) для биотестирования низкодозового радиационного воздействия на организменном уровне. *Радиаци. биология. Радиэкология*, **53** (6), 634–638 (2013). DOI: 10.7868/S0869803113060131
42. Савина Н. Б., Ускалова Д. В. и Сарапульцева Е. И. Использование МТТ-теста для изучения отдаленных эффектов острого  $\gamma$ -облучения у ракообразных *Daphnia magna*. *Радиация и риск*, **27** (1), 86–94 (2018). DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-1-86-93

## Biophysical Methods for Testing Nanomaterials in Terms of Biomedical and Ecotoxicological Purposes Using *Daphnia magna* as a Model Organism

N.B. Savina\*, D.V. Uskalova\*\*, D.T. Petrosova\*\*, and E.I. Sarapultseva\*. \*\*

\*National Research Nuclear University “MEPhI”, Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409 Russia

\*\*Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering – a Branch of National Research Nuclear University “MEPhI”, Studgorodok, 1, Obninsk, Kaluga Region, 249039 Russia

The paper presents an overview of image visualization techniques and other biophysical approaches that demonstrate a validity of using higher invertebrate animals that include the crustacean *Daphnia magna*, a member of the subphylum Crustacea as a test model for biomedical and ecotoxicological studies. The authors describe the main characteristics of animals, such as a transparent body, small size, filter feeding mechanism, the presence of the formed organs, as well as a short life cycle, high fertility and sensitivity to toxicants, which allow the use of this test organism in experiments *in vivo* as an alternative model to warm-blooded animals. An analysis of the existing literature on the use of *D. magna* as a model for visualizing the accumulation and distribution of nanomaterials in the body, as well as for analyzing the mechanisms of cytotoxicity is carried out. Methods for fluorescence imaging, interference microscopy and spectrophotometry are described.

**Keywords:** *Daphnia magna*, biomedicine, ecotoxicology, visualization, spectrophotometry, nanomaterials, biodistribution

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА ПОВСЕДНЕВНОГО ОСВЕЩЕНИЯ В РАЗВИТИИ ДЕТСКОЙ БЛИЗОРУКОСТИ

© 2024 г. Н.Н. Трофимова<sup>\*,#</sup>, Ю.С. Петронюк<sup>\*</sup>, Е.А. Храмцова<sup>\*</sup>, В.В. Соколова<sup>\*,\*\*</sup>, К.Г. Антипова<sup>\*\*\*</sup>, Т.С. Гурьева<sup>\*\*\*\*</sup>, Е.И. Медникова<sup>\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

<sup>\*\*</sup>Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Ленинский просп., 53, Москва, 119991, Россия

<sup>\*\*\*</sup>НИЦ «Курчатовский институт», пл. Академика Курчатова, 1, Москва, 123182, Россия

<sup>\*\*\*\*</sup>Институт медико-биологических проблем РАН, Хорошевское шоссе, 76а, Москва, 123007, Россия

<sup>#</sup>E-mail: ntrofimova@mail.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 14.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Настоящее исследование является попыткой экспериментально создать условия для возникновения детской близорукости у лабораторных животных. Измерения проводили ультразвуковым методом для разных возрастных групп перепела японского *Coturnix japonica dom.* – птенцов (10, 25, 45 суток) и вплоть до полной половой зрелости птицы (65 суток) в условиях *in situ*. Для моделирования процессов миопизации применяли источники повседневного освещения с узким спектром – синим ( $450 \pm 10$  нм), красным ( $630 \pm 10$  нм) и наиболее комфортным для глаз желтым фильтром ( $550 \pm 20$  нм). Высокочастотный сфокусированный ультразвук (30–80 МГц) и режим *B/Z*-сканирования обеспечивали высокое качество визуализации тонкой структуры глаза птенцов и точность измерения геометрических параметров в его сагиттальной плоскости. Полученные данные о размерах глазного яблока, толщине хрусталика и склерально-роговичной оболочки, стекловидного тела и хориоретинального комплекса позволили проследить возрастные изменения глаза в онтогенезе животного. Приведены предварительные данные об упругости склеры глаза перепела.

*Ключевые слова:* подростковая близорукость, повседневное освещение, ультразвук, склера, модуль упругости, перепел японский.

DOI: 10.31857/S0006302924020202, EDN: OTJRBA

С увеличением распространения дисплейных устройств рост детской близорукости грозит перерасти в эпидемию [1, 2]. Территориально это страны, где гаджеты получили широкое применение в быту и глубоко вошли в повседневную жизнь, став неотъемлемой приметой времени. Существенный вклад вносит и влияние спектрального состава повседневного искусственного освещения. Источники искусственного освещения в большей степени, по сравнению с естественным светом, сопровождают человека в течение всей жизни, что не может не сказаться на процессе эмметропизации. Принципиально важно, что неправильно подобранное искусственное освещение наибольший вред приносит именно подросткам. Ребенок, идя в школу, зачастую проводит весь свой световой день в помещении, сопровождаемый искусственным светом. Таким об-

разом, время активного формирования зрительного анализатора происходит в неестественных для него условиях. Формирующийся глаз подростка подстраивается, принимая эти условия за норму. В результате такой подстройки и возникают миопические изменения. Проблема усугубляется образовательным процессом, требующим напряженной зрительной работы, контроля над осанкой и расстоянием до книги, ограниченным пребыванием на свежем воздухе и открытых пространствах.

Глаз дошкольника имеет укороченный размер по центральной оптической оси и является дальнорезким [3]. Далее глазное яблоко удлиняется, и в подростковом возрасте (10–14 лет) рост глаз достигает нормальной сферической формы и останавливается в росте. В отличных от нормы условиях происходит дальнейшее удлинение центральной оси глаза и развивается близорукость (миопия). Был выдвинут ряд гипотез о влиянии

Сокращения: ПЗО – переднезадняя ось глаза.

стимуляции красно- и синечувствительных фоторецепторов сетчатки на миопический рост глаза вдоль его переднезадней оси [4, 5]. Колбочки центральной зоны сетчатки, обеспечивающие максимальную остроту зрения, имеют максимум поглощения света на длине волны 550 нм. Если спектр повседневного освещения смещается в «синюю» (400–500 нм) или «красную» (>625 нм) область, это может вызвать изменения в развитии глаза [6].

Предполагается, что процесс близорукости начинается с аккомодационной перестройки оптики глаза за счет его мышечного каркаса. Ресничные мышцы изменяют кривизну роговицы и хрусталика, геометрию передней камеры для комфортной работы зрительного анализатора. В норме эластичность мышц позволяет сохранить обратимость аккомодации. Однако длительное воздействие мышечного напряжения является неблагоприятным для глаза, особенно в процессе его развития. Спектральный состав повседневного освещения также влияет на этот процесс [7]. В работах [8, 9] показано, что саморегуляция роста переднезадней оси (ПЗО) глазного яблока состоит из двух компонентов: активной не визуальной регуляции, как это происходит при развитии других органов, а также специфического для глаза визуально управляемого роста.

В нашей публикации представлены результаты экспериментального исследования, которые подтверждают риск формирования близорукости в раннем возрасте при повседневном освещении, спектральные характеристики которого отличны от естественного света. На лабораторных животных (перепел японский *Coturnix japonica dom.*) в условиях *in situ* были измерены продольный и поперечный размеры глазного яблока, толщина хрусталика и склерально-роговичной оболочки, стекловидного тела и хориоретинального комплекса. Для регистрации изменений использовали ультразвуковой метод, который широко применяется в офтальмологии для визуализации и диагностики ряда проблем [10]. Научный интерес представляет также возможность проследить возрастные изменения структур глаза в онтогенезе животного.

## ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Возможность экспериментально стимулировать развитие близорукости в ускоренной шкале времени может быть реализована при использовании в эксперименте перепела японского (*Coturnix japonica dom.*) [4, 5]. Перепел – успешная биологическая модель для экспериментального изучения процессов и изменений, происходящих в человеческом глазу, поскольку сетчатка перепела

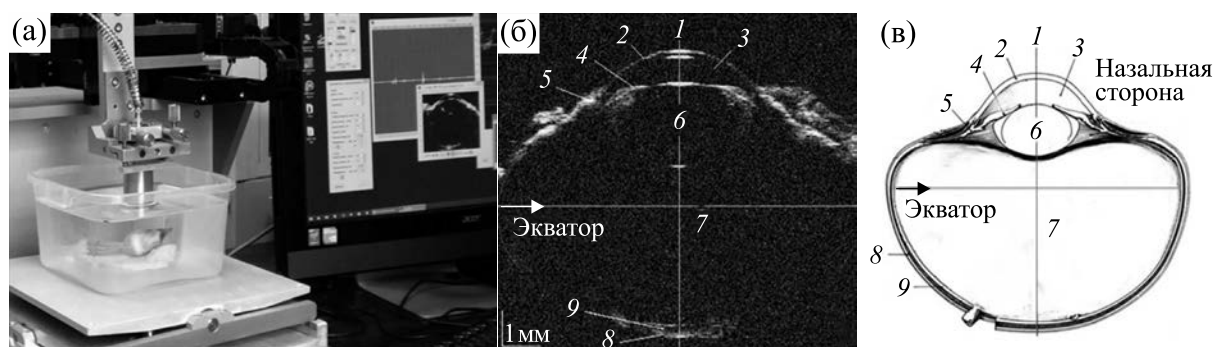
содержат фоторецепторы и оксикаротиноидную защиту, аналогичную нашей защите [12, 13]. Японский перепел достигает половой зрелости в течение полутора месяцев и является распространенным объектом моделирования различных глазных нарушений [6, 14, 15].

Был создан методический комплекс, предназначенный для моделирования светозависимой детской близорукости и ее профилактики на птенцах японского перепела. Исследования выполняли на цыплятах от суточного до полуторамесячного возраста, что соответствует приблизительно диапазону 0–18 лет возраста человека. Выведение цыплят и контроль их жизнеобеспечения осуществляли в ИМБП РАН в рамках Договора о научно-техническом сотрудничестве. Повседневное освещение осуществляли светодиодными источниками с красным, желтым и синим светофильтрами. Спектр синего освещения (450 нм) соответствовал полосе восприятия преимущественно синечувствительных колбочек, желтого света (570–590 нм) – зеленочувствительным и красночувствительным колбочкам, красного освещения (630 нм) – красночувствительным колбочкам.

Суточный режим освещения состоял из 16 ч дневного освещения и 8 ч ночной темноты. Все источники освещения были откалиброваны по количеству милливатт световой энергии в максимуме спектра. Калибровку осветителей проводили с использованием спектрометра МК-350. Создаваемая освещенность находилась в физиологических пределах, соответствовала стандартной и была достаточной для уверенного нахождения птицами корма и поилок. Использовали корм ПК2-3 – специализированный стандартный корм для цыплят перепелов.

## МЕТОДЫ

Для диагностики в офтальмологии используются ультразвуковые методы [10, 16–19] и оптическая когерентная томография [20]. Экспериментальные исследования структур глаза лабораторного животного требуют визуализации высокого разрешения, желателно неинвазивной и безопасной методики для работы с тканями без фиксации и окрашивания, позволяющей набрать необходимую статистику в короткий срок онтогенеза. Перечисленными достоинствами обладает метод акустической микроскопии. Для исследования размеров и конфигурации глаз в процессе роста использовали акустический микроскоп СИАМ-2018 (рис. 1), разработанный в ИБХФ РАН [21–23]. В процессе сканирования короткий ультразвуковой фокусированный импульс (30–



**Рис. 1.** Ультразвуковая микроскопия энуклеированного глаза перепела *Coturnix japonica*: (а) – акустический микроскоп СИАМ-2018; (б) – акустическое  $B/Z$ -сечение глаза в сагиттальной плоскости; (в) – схематичное изображение структур глаза: 1 – переднезадняя ось глаза, 2 – роговица, 3 – передняя камера, 4 – радужка, 5 – ресничное тело, 6 – хрусталик, 7 – стекловидное тело, 8 – склера, 9 – хориоретинальный комплекс.

80 МГц) с полной угловой апертурой  $22^\circ$  распространялся в иммерсионной жидкости. Ультразвуковой сигнал частично отражался от поверхности глаза, частично распространялся вглубь, достигая дна склеральной оболочки. Амплитуда эхо-сигналов с разной глубины регистрировалась и отображалась градиациями серого цвета шаг за шагом (25 мкм) при перемещении акустической линзы в плоскости  $XZ$  ( $B/Z$ -сканирование, рис. 1а). Получаемые акустические изображения соответствовали сагиттальному сечению глаза (рис. 1б). ПЗО аккуратно позиционировалась вдоль оси  $Z$ . Эхо-импульсным методом измеряли продольный и поперечный размеры глазного яблока, толщину хрусталика и склерально-роговичной оболочки, стекловидного тела и хориоретинального комплекса. Для расчета толщины использовали значения скорости звука в тканях глаз, измеренные ранее и приведенные в литературе [24]. Ультразвуковое сканирование выполняли в условиях *in situ* при нативном положении глаз в глазной орбите и *in vitro* на энуклеированных глазах.

На испытательной машине Instron 5965 исследовали упругие характеристики склеры глаз. Образцы склеры в виде полосок размером  $3.5 \times 20$  мм подвергали одноосному растяжению. Рабочая часть образца составляла  $3.5 \times 6.0$  мм. Скорость испытания – 6 мм/мин.

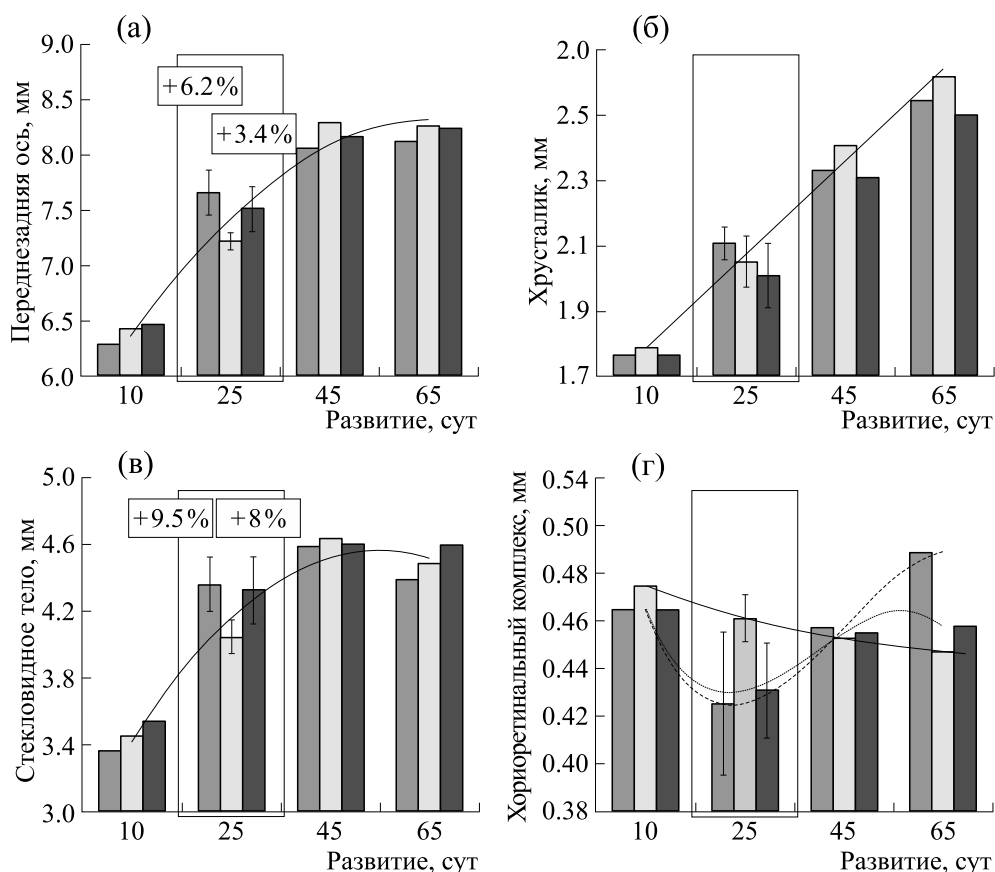
Статистическую обработку данных измерений проводили с помощью программы Microsoft Excel. Данные были проверены на соответствие нормальному закону распределения. В каждом наборе были определены медианные значения величин вместе с соответствующими доверительными интервалами. На диаграммах приведены медианные значения величин, и их среднеквад-

ратичное отклонение внутри выборки по возрасту.

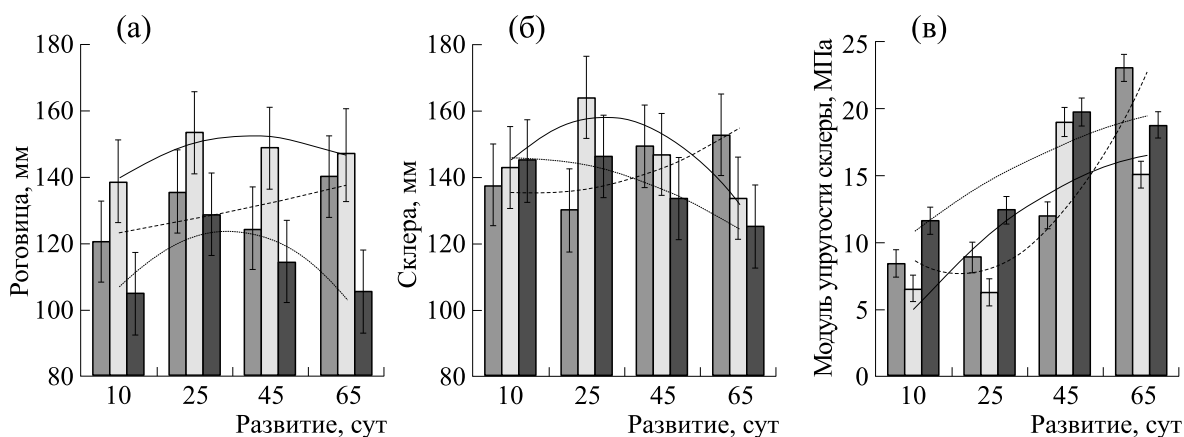
#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основной характеристикой для диагностики миопических изменений глаза является длина ПЗО. Для птиц возрастом 10, 25, 45 и 65 суток были измерены ПЗО глаза, толщина хрусталика, размер стекловидного тела и толщина хориоретинального комплекса. Значения этих показателей поступательно росли согласно взрослению и развитию животного, как было показано нами в предшествующих работах для птиц, содержащихся при нормальных условиях [25]. Новые данные показывают, что глаза птиц, содержащихся при синем и красном повседневном освещении, имели более высокие значения ПЗО – на 6.2% и 3.4% соответственно по сравнению с птицами, содержащимися при желтом светодиодном светильнике (рис. 2). Это отклонение от нормы было выявлено на 25 сутки развития – для птенцов, находящихся в группе риска переходного возраста. Помимо роста ПЗО, в этом возрасте была выявлена тенденция к утолщению хрусталика на 2.4% для группы «синего» освещения по сравнению с группой «желтого» освещения (рис. 2). Также в подростковом возрасте по мере увеличения размеров глаза (ПЗО) более раннему увеличению размера подвергается стекловидное тело в группах «красного» и «синего» повседневного освещения, увеличиваясь вдоль оптической оси на 9.5% и 8% соответственно.

Методом ультразвуковой микроскопии были измерены толщина роговицы и склеры (рис. 3). По результатам можно отметить, что при развитии глаза в условиях «синего» и «красного» повседневного освещения толщина склерально-роговичной оболочки уменьшается по сравнению с



**Рис. 2.** Структурные изменения глаза перепела, полученные методом ультразвуковой микроскопии в интервале 10–65 суток развития. Рамкой выделена группа, соответствующая подростковому возрасту. Светлые столбики соответствуют группе физиологического «желтого» освещения, серые – «синего» освещения, черные – «красного» освещения.



**Рис. 3.** Толщина роговицы (а) и склеры (б) глаза перепела; (в) – модуль упругости склеры в зависимости от возраста и спектра повседневного освещения: белые столбики – группа «желтого» света, серые – группа «синего» света, черные – группа «красного» света. Линии тренда – результат полиномиальной аппроксимации второй степени.

группой физиологически комфортного «желтого» света и эти показатели варьируются для разных возрастов.

На рис. 3в приведены значения модуля упругости склеральной оболочки, которая обеспечивает целостность глаза и, предположительно, меняется в условиях интенсивного роста в подростковом возрасте. Результаты испытаний показывают, что с возрастом модуль упругости растет, и при измененных световых условиях этот рост начинается в более раннем возрасте.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изучения влияния спектра повседневного освещения на развитие зрения человека были проведены эксперименты на животной модели (перепел японский) в условиях *in vivo* и *in situ*. Методом акустической микроскопии получены значения размеров структур глазного яблока — толщина передней камеры, хрусталика, склеры, роговицы и стекловидного тела. Измерения проводились на птенцах разного возраста от 10 до 65 суток. Модель японского перепела позволила выявить закономерности в динамике развития этих структур, подтвердить предположение о провоцировании близорукости в раннем возрасте при наличии неблагоприятных условий повседневной освещенности. Эксперименты показывают, что развитие глаз чувствительно к присутствию в спектре света преобладающих «синих» и «красных» компонентов и может приводить к аномалиям развития глаз, миопизации. Особенно это выражено для пубертатного возраста.

Показано, что на сегодняшний день предложенная методика и подход в исследовании данной проблемы имеют большой потенциал.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (темы № 1201253306 и № 001201253314), договора о научно-техническом сотрудничестве № 59-23 между ИБХФ РАН и ИМБП РАН.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание птиц и их вывод из эксперимента декапитацией выполняли согласно «Правилам надлежащей лабораторной практики», утвержденным Приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года № 199н.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holden B. A., Fricke T. R., Wilson D. A., Jong M., Naidoo K. S., Sankaridurg P., Wong T. Y., Naduvilath T. J., and Resnikoff S. Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology*, **123** (5), 1036–1042 (2016). DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.01.006
2. Smith E. L. 3rd and Hung L. F. Form-deprivation myopia in monkeys is a graded phenomenon. *Vision Res.*, **40** (4), 371–381 (2000). DOI: 10.1016/s0042-6989(99)00184-4
3. Апрасюхина Н. И. *Основы анатомии и физиологии детей раннего и дошкольного возраста* (ПГУ, Новополюк, 2015).
4. Foulds W., Barathi V., and Luu D. Progressive myopia or hyperopia can be induced in chicks and reversed by manipulation of the chromaticity of ambient light. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **54**, 8004–8012 (2013). DOI:10.1167/iovs.13-12476
5. Пигирева М. Д. и Афанасьев Г. Д. *Перепеловодство* (Росагропромиздат, М., 1989).
6. Rucker F. Monochromatic and white light and the regulation of eye growth. *Exp. Eye Res.*, **184**, 172–182 (2019). DOI: 10.1016/j.exer.2019.04.020
7. Mc Brien N. A., Moghaddam H. O., New R., and Williams L. R. Experimental myopia in a diurnal mammal (*Sciurus carolinensis*) with no accommodative ability. *J. Physiol.*, **469**, 427–441 (1993). DOI: 10.1113/jphysiol.1993.sp019821
8. Schaeffel F. and Howland H. C. Properties of the feedback loops controlling eye growth and refractive state in the chicken. *Vision Res.*, **31**, 717–734 (1991). DOI: 10.1016/0042-6989(91)90011-S
9. Wallman J. and Winawer J. Homeostasis of eye growth and the question of myopia. *Neuron*, **43**, 447–468 (2004). DOI: 10.1016/j.neuron.2004.08.008
10. *Ультразвуковые исследования в офтальмологии: Руководство для врачей*. Под ред. В. В. Нероева и Т. Н. Киселевой («ИКАР», М., 2019).
11. Troilo D., Smith E. L. 3rd, Nickla D. L., Ashby R., Tkatchenko A. V., Ostrin L. A., Gawne T. J., Pardue M. T., Summers J. A., Kee C., Schroedl F., Wahl S., and Jones L. IMI – Report on experimental models of emmetropization and myopia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **60**, M31–M88 (2019). DOI: 10.1167/iovs.18-25967
12. Wisely C. E., Sayed J. A., Tamez H., Zelinka C., Abdel-Rahman M. H., Fischer A. J., and Cebulla C. M. The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *Prog. Retin. Eye Res.*, **61**, 72–97 (2017). DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.06.004
13. Nickla D. Ocular diurnal rhythms and eye growth regulation: Where we are 50 years after Lauber. *Exp. Eye Res.*, **114**, 25–34 (2013). DOI: 10.1016/j.exer.2012.12.013
14. Ostrin L. A. Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure. *Clin. Exp. Optom.*, **102**, 99–108 (2019). DOI: 10.1111/cxo.12824

15. Mizutani M. Establishment of inbred strains of chicken and Japanese quail and their potential as animal models. *Exp. Anim.*, **51**, 417–29 (2002). DOI: 10.1538/expanim.51.417
16. Coleman D., Silverman R. H., Chabi A., Rondeau M. J., Shung K., Cannata J., and Lincoff H. High-resolution ultrasonic imaging of the posterior segment. *Ophthalmology*, **111**, 1344–1351 (2004). DOI: 10.1016/j.ophtha.2003.10.029
17. Foster F. S., Zhang M. Y., Duckett A. S., Cucevic V., and Pavlin C. J. *In vivo* imaging of embryonic development in the mouse eye by ultrasound biomicroscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 2361–2366 (2003). DOI: 10.1167/iovs.02-0911
18. Pavlin C., Easterbrook M., Hurwitz J., Harasiewicz K., and Foster F. S. Ultrasound biomicroscopy in the assessment of anterior scleral disease. *Am. J. Ophthalmol.*, **116**, 854–857 (1993). DOI: 10.1016/S0002-9394(14)73207-6
19. Nakamura Y., Kusano K., Nakamura K., Kobayashi K., Hozumi N., Saijo Y., and Ohe T. A new diagnostic feasibility for cardiomyopathy utilizing acoustic microscopy. *World J. Cardiovasc. Dis.*, **3**, 22–30 (2013). DOI: 10.4236/wjcd.2013.31006
20. Xie R., Qiu B., Chhablani J., and Zhang X. Evaluation of choroidal thickness using optical coherent tomography: A Review. *Front. Med. (Lausanne)*, **3**, 783519 (2021). DOI: 10.3389/fmed.2021.783519
21. Zakutailov K. V., Levin V. M., and Petronyuk Y. S. High-resolution ultrasonic ultrasound methods: Microstructure visualization and diagnostics of elastic properties of modern materials (Review). *Inorg. Mater.* **46**, 1655–1661 (2010). DOI: 10.1134/S0020168510150100
22. Петронюк Ю. С., Храмова Е. А., Левин В. М., Бонарцев А. П., Воинова В. В., Бонарцева Г. А., Мураев А. А., Асфаров Т. Ф. и Гусейнов Н. А. Развитие методов акустической микроскопии для наблюдения процессов остеогенеза в регенеративной медицине. *Изв. РАН. Сер. физ.*, **84** (6), 799–802 (2020). DOI: 10.31857/S0367676520060204
23. Петронюк Ю. С., Трофимова Н. Н., Зак П. П., Храмова Е. А., Андрюхина О. М., Андрюхина А. С., Рябцева А. А., Гурьева Т. С., Медникова Е. И., Титов С. А. и Левин В. М. Исследование глазных патологий на биомодели японского перепела *Coturnix japonica*. *Хим. физика*, **41** (2), 27–33 (2022). DOI: 10.31857/S0207401X22020078
24. Хилл К., Тер Хаар Г. и Бэмбер Дж. *Ультразвук в медицине*. Под ред. О. А. Сапожникова и др. (Физматлит., М., 2008).
25. Трофимова Н. Н., Петронюк Ю. С., Гурьева Т. С., Медникова Е. И. и Зак П. П. Влияние спектральной составляющей повседневного освещения на формирование структур глаза японского перепела *Coturnix japonica*. *Сенсорные системы*, **36** (3), 226–233 (2022). DOI: 10.31857/S0235009222030088

## Investigating the Physiological Role of Spectral Composition of Daily Light Exposure in the Development of Childhood Myopia

N.N. Trofimova\*, Y.S. Petronyuk\*, E.A. Khramtsova\*, V.V. Sokolova\*, \*\*, K.G. Antipova\*\*\*, T.S. Gurieva\*\*\*\*, and E.I. Mednikova\*\*\*\*

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

\*\*P.N. Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 53, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*National Research Centre “Kurchatov Institute”, pl. Akademika Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

\*\*\*\*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76a, Moscow, 123007 Russia

The present study is an attempt to experimentally create conditions for the development of childhood myopia in laboratory animals. The measurements were taken using ultrasound technique for different age groups of the Japanese quail *Coturnix japonica dom.* — chicks (10, 25, and 45 days) and mature birds (65 days) in *in situ* conditions. To simulate the processes of myopization, sources of narrow-spectrum blue ( $450 \pm 50$  nm), red ( $600 \pm 50$  nm) and yellow ( $550 \pm 50$  nm), the most comfortable for the eye, light were used. High-frequency focused ultrasound (30–80 MHz) and the *B/Z* scanning mode were applied for the high-quality visualization of the fine structure of the chicks' eye in the sagittal plane. The obtained data on the eyeball size, the lens and scleral-cornea, vitreous body and the chorioretinal complex revealed the age-related changes in the animal eye development. Preliminary data on the sclera elasticity of the quail's eye are presented.

*Keywords:* adolescent myopia, daily light exposure, ultrasound, sclera, elastic modulus, Japanese quail



УДК 502.313

## СВЯЗЬ ГЕОФИЗИЧЕСКИХ РИТМОВ С АРТЕРИАЛЬНЫМ ДАВЛЕНИЕМ И ЧАСТОТОЙ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ ЧЕЛОВЕКА. ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЬНОГО СЛУЧАЯ

© 2024 г. П.Д. Ковалев, Д.П. Ковалев

*Институт морской геологии и геофизики ДВО РАН, ул. Науки, 1Б, Южно-Сахалинск, 693022, Россия*

*E-mail: p.kovalev@imgg.ru*

Поступила в редакцию 26.05.2023 г.

После доработки 27.06.2023 г.

Принята к публикации 19.07.2023 г.

Рассмотрены результаты анализа пятилетних временных рядов наблюдений за геофизическими (экологическими) ритмами – атмосферного давления и геомагнитной активности и оценено их влияние на артериальное давление и частоту сердечных сокращений человека для временных периодов колебаний более суточных. Обнаружено, что в периоды времени продолжительностью около 15 суток, когда атмосферное давление изменяется плавно и незначительно, наблюдается более спокойный сердечный ритм и колебания артериального давления. Такие «спокойные» периоды времени наблюдаются преимущественно в летние месяцы с июля по август, обычно только один раз за сезон. Сравнение графиков колебаний систолического давления и индекса геомагнитной активности показали наличие корреляции между ними в три раза превышающую значение корреляции между систолическим давлением и атмосферным давлением. Это означает, что геомагнитное поле с индексом активности более 2 в большей степени влияет на повышение систолического давления у человека. Проведенный анализ также показал, что периоды пиков в спектрах атмосферного давления хорошо согласуются с периодами ритмов частоты сердечных сокращений. Результат указывает на то, что на эти ритмы у людей могут оказывать влияние проходящие через регион синоптические процессы в атмосфере типа циклонов и антициклонов и, в конечном итоге, от них может зависеть самочувствие пожилых и больных людей. Данное исследование с учетом публикуемой гидрометеорологическими службами вариабельности геофизических параметров позволяет прогнозировать состояние здоровья человека.

*Ключевые слова: геофизические и биологические ритмы, артериальное давление, ЧСС, атмосферное давление, геомагнитная активность.*

DOI: 10.31857/S0006302924020215, EDN: OTFSCV

В настоящее время складывается комплексный, многосторонний подход к изучению организма человека и взаимодействию его биологических ритмов с геофизическими (экологическими) ритмами окружающей среды. При этом, с одной стороны, это традиционные исследования биологических ритмов, таких как вариабельность сердечного ритма [1, 2], систолического и диастолического артериального давления [3–5], которые, как хорошо известно, являются методами оценки состояния механизмов регуляции физиологических функций в организме человека, в частности, общей активности регуляторных механизмов, нейрогуморальной регуляции сердца, соотношения между симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы [6]. Ре-

зультатам изучения вариабельности посвящено большое количество публикаций, в том числе и с применением методов спектрального и спектрально-временного анализа [2, 7, 8]. При этом использование спектрального анализа позволяет исследовать взаимосвязь биологических и геофизических ритмов, например, изменений артериального давления и геомагнитной активности, а также вариабельность этих процессов с течением времени.

С другой стороны, такой подход заключается в изучении взаимодействия человека с окружающей средой и связан с исследованиями влияния окружающей среды и ее ритмов на состояние здоровья человека или возникновение нарушений его адаптивных механизмов. При этом необходим анализ разномасштабных по времени воздействий на организм. Отметим, что в настоящее

*Сокращение: ЧСС – частота сердечных сокращений.*

время для наблюдений в основном используется суточный мониторинг параметров организма человека и изучаются ритмы с периодами до единиц минут или до десятков минут [9]. Такие исследования не позволяют проследить связь биоритмов человека с изменением параметров окружающей среды – геофизическими ритмами, поскольку последние имеют более медленные периоды повторений.

В настоящей работе рассматриваются связи между геофизическими (экологическими) и биологическими ритмами человека, которые являются периодическим повторением некоторого процесса в биологической системе через более или менее регулярные промежутки времени. При этом биоритм – это не просто повторяющийся, а и самоподдерживающийся и самовоспроизводящийся процесс. Биологические ритмы характеризуются периодом, частотой, фазой и амплитудой колебаний [10].

Отметим также, что в работе рассматривается связь геофизических ритмов окружающей среды с периодами колебаний процессов с биоритмами человека с периодами более 24 ч, которые, в соответствии с часто используемой классификацией биоритмов [11], относятся к инфрадианным ритмам, т. е. к процессам с периодами более 28 ч.

Биологические ритмы, совпадающие по кратности с геофизическими ритмами, называются адаптивными. К ним относят суточные, приливные, лунные и сезонные ритмы. В биологии адаптивные ритмы рассматриваются с позиций общей адаптации организмов к среде обитания, а в физиологии – с точки зрения выявления внутренних механизмов такой адаптации и изучения динамики функционального состояния организмов на протяжении длительного периода времени [12].

Хорошо известно, что основными параметрами окружающей среды, оказывающими влияние на биологические ритмы человеческого организма, являются колебания атмосферного давления и геомагнитного поля. При этом в метеорологии обычно используется понятие геомагнитной активности, под которым понимают возмущения геомагнитного поля, вызванные изменением электрических токов в магнитосфере и ионосфере Земли. Основная причина таких изменений – поток возмущенного солнечного ветра, который взаимодействует с магнитным полем Земли и приносит дополнительную энергию к существующей токовой системе [13]. Изменения температуры наружного воздуха обычно происходят не ритмично, за исключением суточных и сезонных колебаний, но авторы включили в анализ этот параметр с целью установления возможного влияния на медленные биологические ритмы.

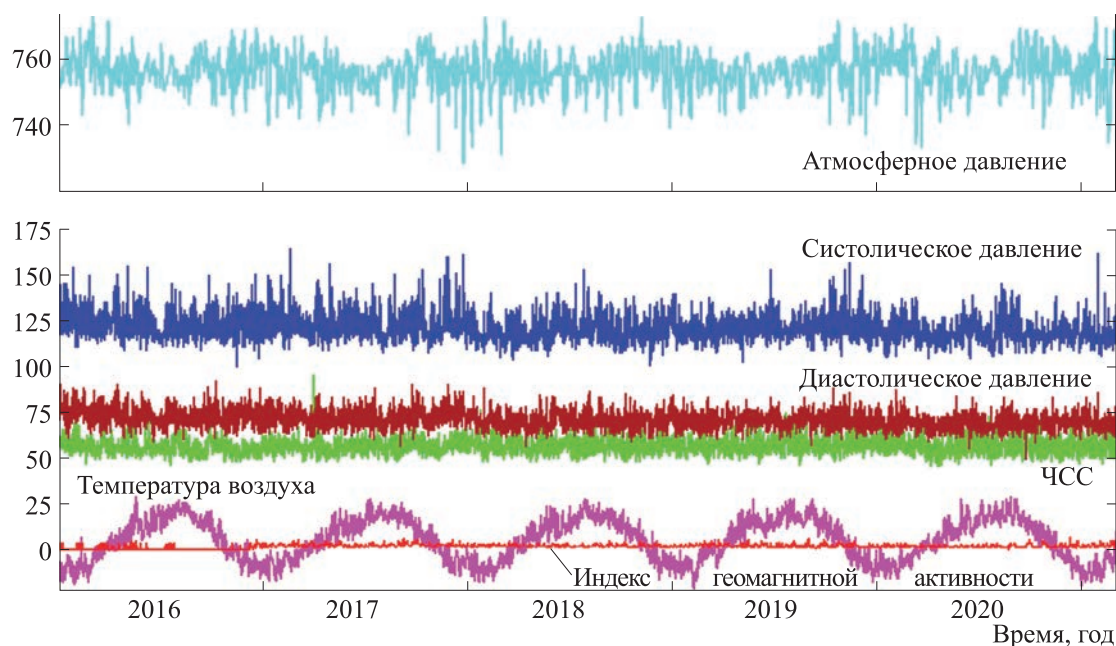
Отметим также, что для оценки взаимосвязи между периодами (ритмами) изменения артериального давления, сердечного ритма и параметрами окружающей среды, оказывающими воздействие на биологические ритмы, авторы пользуются хорошо известным в математике и физике спектральным анализом [14, 15]. Однако воспользоваться функцией когерентности для установления связи между биологическими и геофизическими ритмами не представляется возможным из-за того, что значения когерентности оказались меньше доверительного уровня.

Учитывая вышеизложенное, авторы провели длительный, пятилетний мониторинг вариабельности сердечного ритма и артериального давления синхронно с изменением атмосферного давления и температуры, геомагнитной активностью. Очевидно, что для большей убедительности необходимо было бы провести исследование для некоторой выборки участников, однако из-за сложности организации проведения регулярных, в течение многих лет, наблюдений за артериальным давлением дважды в сутки, эксперимент даже с небольшой выборкой оказался невозможным. И несмотря на то что изначально группа участников была сформирована, только с одним участником удалось провести эксперимент в течение всего намеченного срока. При этом использование коротких или фрагментарных наблюдений других участников для анализа многосуточных ритмов невозможно с позиции спектральной и корреляционной обработки временных рядов.

Основной целью исследований было установление связи биологических и геофизических ритмов с использованием методов спектрального анализа. Следует отметить, что поскольку организм каждого человека очень индивидуален, то по проведенному исследованию нельзя сделать заключения по воздействию рассматриваемых факторов окружающей среды на человеческую популяцию, однако для первоначального взгляда на проблему некоторые выводы по воздействию окружающей среды на организм можно считать допустимыми. В то же время учет возможного влияния на человеческий организм в перспективе на определенных длинных ритмах позволит спрогнозировать наступление возможных обострений при развитии заболеваний.

## НАБЛЮДЕНИЯ И АНАЛИЗ

Наблюдения начали проводиться 3 января 2016 года. Артериальное давление измерялось дважды в сутки в 8 и 20 часов цифровым тонометром с погрешностью 1 мм рт. ст. Атмосферное давление, температура наружного воздуха и индекс геомагнитной активности фиксировались по официальным данным, публикуемым на откры-



**Рис. 1.** Временные серии наблюдений за артериальным давлением, ЧСС, атмосферным давлением и температурой, индексом геомагнитной активности. Шкала для первых трех параметров в мм рт. столба. Температура воздуха в градусах Цельсия, индекс геомагнитной активности – в баллах.

том сайте GISMETEO. Участнику эксперимента мужского пола, у которого проводили измерение артериального давления, на момент начала измерений исполнилось полных 69 лет. Его вес 90 кг и рост 184 см. Хронические заболевания в анамнезе отсутствуют. Зарегистрированные данные регулярно вводились в компьютер. Спектральную обработку рядов наблюдений проводили с помощью программы Кута [16]. Полученные временные ряды наблюдений приведены на рис. 1.

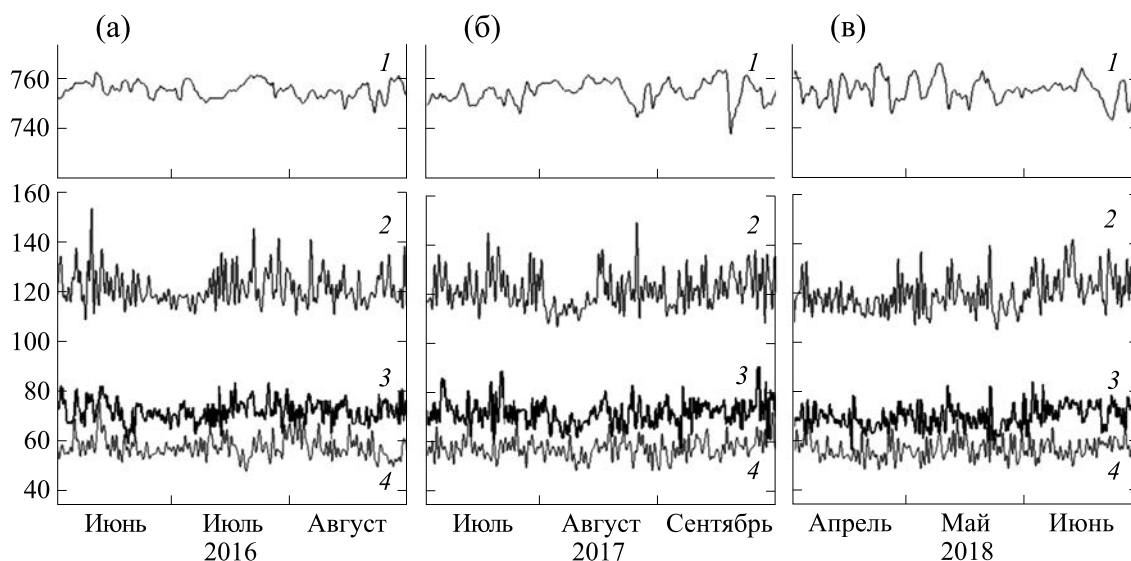
По временному ряду частоты сердечных сокращений (ЧСС) хорошо видно (рис. 1), что в течение пяти лет ширина линии (разница между утренней и вечерней ЧСС) постепенно увеличивалась. Возможно, что это связано с влиянием на частоту сокращений вегетативной нервной системы с возрастом.

Временные ряды, показанные на рис. 1, позволяют увидеть только общие закономерности. Поэтому для исходных рядов наблюдений с использованием средств программы Кута [16] был увеличен масштаб по оси времени и проведен более детальный анализ. Было установлено, что в периоды времени, когда атмосферное давление изменяется плавно и незначительно, в эти же периоды времени, достигающие по длительности 15 суток, наблюдается более спокойный сердечный ритм и колебания артериального давления (рис. 2а,б). Такие «спокойные» периоды времени бывают в летние месяцы с июля по август, обычно только один раз за сезон, и наблюдались, кроме

приведенных на рис. 2, еще в августе 2018 г. и июле 2019 г. Также отметим, что относительно стабильное атмосферное давление не означает стабилизации артериального давления (рис. 2в), когда оно происходит в другие месяцы.

Для установления причин повышения артериального давления в зависимости от окружающей среды с использованием программы MS Excel были отобраны все случаи, когда систолическое давление превышало 140 мм рт. ст., для этих случаев были построены графики диастолического давления, ЧСС, атмосферного давления и температуры, индекса геомагнитной активности. При этом кривые диастолического давления и ЧСС не содержали значительных колебаний. Так, диастолическое давление изменялось в пределах 76–90 мм рт. ст., а ЧСС – в диапазоне от 50 до 63. Поэтому полученную кривую систолического давления сравнивали только с кривыми атмосферного давления и индексом геомагнитной активности. Кривая атмосферного давления для рассматриваемых случаев превышения систолического давления практически не коррелировала с кривой самого систолического давления, коэффициент корреляции равен 0.058.

В то же время кривые систолического давления и индекса геомагнитной активности имели в три раза большую величину коэффициента корреляции, равную 0.184. Эти кривые приведены на рис. 3. Возможно, что коэффициент корреляции был бы значительно выше, поскольку до декабря



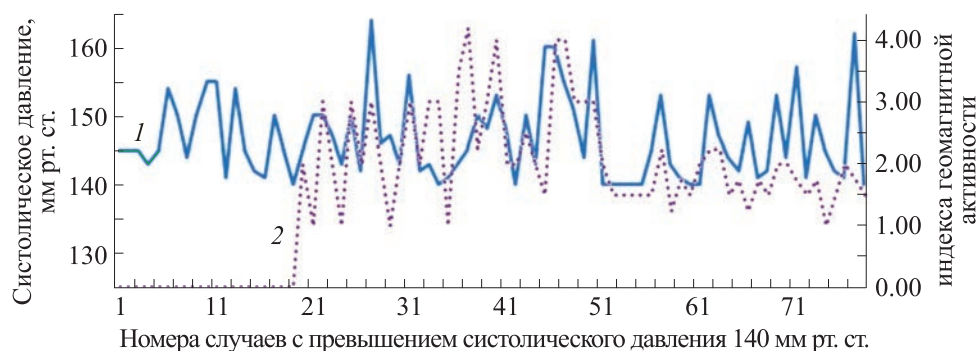
**Рис. 2.** Фрагменты временных рядов за время наблюдения: кривая 1 – атмосферное давление, кривая 2 – систолическое давление, кривая 3 – диастолическое давление, кривая 4 – ЧСС. Вертикальная шкала для давления приведена в мм рт. столба.

2016 г. фиксировались только значения индекса геомагнитной активности для величин более 4, и это отсутствие сплошного временного ряда видно на рис. 3 для кривой (б). На нем также хорошо видно, что пики систолического давления и индекса геомагнитной активности в большинстве случаев совпадают. Исходя из этого можно уверенно заключить, что геомагнитное поле с индексом активности более 2 влияет на повышение систолического давления у человека.

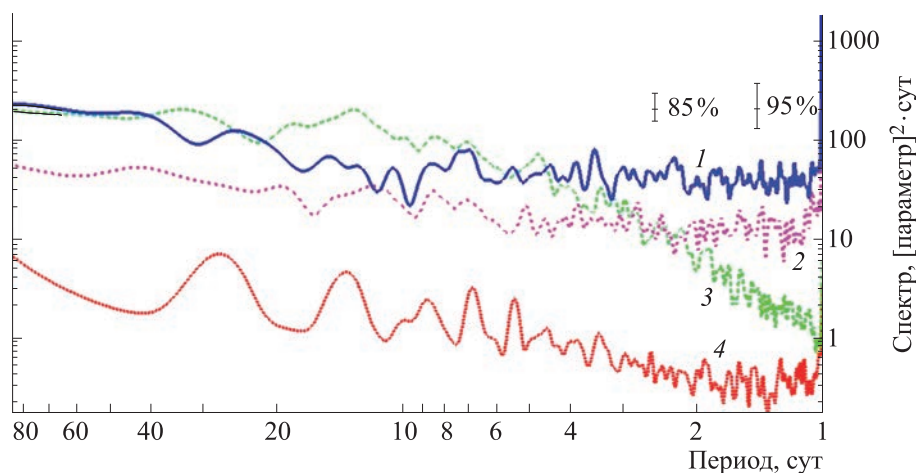
Перейдем к спектральному анализу по всей длине рядов. На рис. 4 приведены спектры колебаний систолического давления (спектр 1), ЧСС (спектр 2), атмосферного давления (спектр 3) и индекса геомагнитной активности (спектр 4), вычисленные по всей пятилетней длине временных

рядов наблюдений. На всех спектрах хорошо видны пики на периодах в одни сутки. Для систолического давления этот период соответствует так называемым циркадным ритмам [11, 17], которые являются главными биоритмами организма, характерными как для него в целом, так и для деятельности практически всех его органов и систем. В настоящее время у человека установлено более 1000 физиологических функций, имеющих циркадную ритмичность [17].

На спектральной кривой систолического давления также хорошо выделяется пик с периодом около 6.8 суток. Ритмы с таким периодом относят к циркасептаным, они являются ритмами метаболических процессов и выработки эндокринных гормонов [17]. Авторы этой работы полагают, что



**Рис. 3.** Кривые систолического давления (кривая 1) и индекса геомагнитной активности (кривая 2). Шкала давления в мм рт. столба, шкала индекса геомагнитной активности – в баллах. По оси абсцисс даны номера случаев с превышением систолического давления 140 мм рт. ст. и для этих случаев приведены значения индекса геомагнитной активности.



**Рис. 4.** Колебания систолического давления (спектр 1), ЧСС (спектр 2), атмосферного давления (спектр 3) и индекса геомагнитной активности (спектр 4), вычисленные по всей пятилетней длине временных рядов наблюдений.

недельные биологические ритмы сопоставимы с околонеделными ритмами солнечной активности.

Наблюдаемые колебания атмосферного давления имеют периодический характер суточного хода за счет приливных волн в атмосфере, усиливаемых резонансом с ее собственными колебаниями. Суточный ход давления хорошо выражен в тропиках, где его амплитуда может достигать в среднем 3–4 гПа. От тропиков к полюсам амплитуда суточных колебаний убывает [18]. В спектре колебаний атмосферного давления видны также пики величиной несколько меньше 95%-го доверительного интервала, но превышающими 85%-й интервал.

Колебания индекса геомагнитной активности, в том числе и с суточным периодом, определяются, как уже отмечалось выше, возмущением магнитного поля Земли потоком возмущенного солнечного ветра. Как следует из рис. 4, спектр зарегистрированных колебаний индекса геомагнитной активности содержит много пиков, превышающих 95%-й доверительный интервал, т.е. реальные колебания, которые могут оказывать влияние на разные по длительности биологические ритмы.

Наличие такого числа пиков связано с тем, что напряженность общего магнитного поля Земли складывается из нескольких частей [19]:

$$B = M + m + D + N + S + L,$$

где  $M$  – главное поле, обусловленное внутренними источниками;  $m$  – вековая вариация;  $D$  – регулярная или нерегулярная часть поля возмущений, связанная с внешними источниками;  $N$  – нециклическая вариация в спокойные периоды от внешних источников. Поле  $S$  является перио-

дическим и обусловлено влиянием Солнца. Поле  $L$  – также периодическое, возникает под влиянием Луны [20]. Также геомагнитные индексы показывают существование 27-суточных циклов геомагнитной активности солнечного происхождения [20], пик которых хорошо виден на рис. 4 в спектре 4.

Имеющиеся на приведенных на рис. 4 спектрах пики с доверительным интервалом более 85% занесены в табл. 1. Для сравнения приведены периоды вариаций геомагнитного поля согласно работе [20]. Таблица построена с целью сравнения ритмов и установления возможного влияния геомагнитного поля и атмосферного давления на систолическое давление и ЧСС. Определить это влияние с использованием функции когерентности не представляется возможным, поскольку, как показали вычисления, ее значения располагаются ниже доверительного уровня. Суточные ритмы и ритмы с более короткими периодами достаточно хорошо изучены и ниже не рассматриваются.

В табл. 1 жирным шрифтом выделены совпадающие или близкие периоды ритмов систолического давления и индекса геомагнитной активности, а жирным курсивом – совпадающие периоды ритмов ЧСС и атмосферного давления. Анализ таблицы показывает, что ритмы систолического давления хорошо согласуются с ритмами геомагнитной активности, а ритмы ЧСС – с ритмами атмосферного давления.

Появляющиеся в спектрах ритмы систолического давления с периодом 24.8 суток отличаются от 27-суточного периода вариаций геомагнитного поля [20] на 8.5%. Этот геомагнитный ритм связан с солнечным источником, о чем свидетельствует близость этого периода к среднему перио-



**Таблица 1.** Ритмы (периоды) систолического давления, индекса геомагнитной активности, атмосферного давления и ЧСС

Систолическое давление	Индекс геомагнитной активности	Атмосферное давление	ЧСС	Периоды вариаций геомагнитного поля [11]
44.5			43.3	32.6
		33.3		29.5
24.8	27.1			27
15		<b>18.5</b>	<b>19.0</b>	14.8
12.8	13.6	13	11.5	13.7
10.5				9.6
<b>8.6</b>	<b>8.8</b>	<b>8.4</b>	<b>8.4</b>	9
<b>6.8</b>	<b>6.8</b>		7.1	
<b>5.5</b>	<b>5.5</b>	<b>4.8</b>	<b>5.1</b>	6
<b>3.5</b>	<b>3.4</b>			
1	1	1	1	1

Примечание. Значения приведены в сутках, значения периодов вариаций геомагнитного поля округлены до одной цифры после запятой.

ду дифференциального вращения Солнца [20], варьирующемуся от 25 суток на солнечном экваторе до 30 суток на полюсах. Поэтому вполне возможно, что эти рассматриваемые ритмы связаны.

На периодах 4–10 суток – циркасептантных ритмов – в табл. 1 видно хорошее совпадение ритмов систолического давления и магнитной активности. Авторы работы [17] считают, что ритмы с этими периодами относятся к метаболическим процессам и выработке эндокринных гормонов. Они также полагают, что околонеделные ритмы характерны и для ряда патологических процессов, а именно критических дней после начала заболевания.

На периодах циркасептантных ритмов, как видно из табл. 1., проявляется связь между ритмами ЧСС и периодами колебаний атмосферного давления. И эти периоды значительно отличаются от периодов ритмов систолического давления и геомагнитной активности. Для пояснения ситуации обратимся к анализу возможных причин появления пиков в спектрах атмосферного давления.

Согласно многочисленным опубликованным исследованиям по динамике атмосферы, например [21], в атмосфере наблюдается большое разнообразие волновых и вихревых движений, что обусловлено влиянием сил различного происхождения. В свете рассматриваемых здесь ритмов интерес представляют атмосферные про-

цессы синоптического масштаба и связанные с ними синоптические волны и вихри (синоптический масштаб в атмосфере соответствует системам движения, имеющим горизонтальные размеры порядка  $10^3$  км и характерное время существования в несколько суток). Такие синоптические процессы в атмосфере – циклоны и антициклоны – играют первостепенную роль в формировании погодных условий на больших территориях.

Также отметим, что результаты исследований, приведенных в работе [22], показали, что при средних условиях спектры мощности атмосферного давления демонстрируют универсальные характеристики, согласующиеся с литературными данными, включая амплитуду энергии и наклон спектра  $-5/3$  в мезомасштабном диапазоне, переходящий в наклон  $-3$  для синоптического и планетарного масштабов. При этом практически нет разницы в годовых спектрах от разных мест за один и тот же год, а по данным за несколько лет они различаются только переходом наклона на частоте около  $10^{-4.5}$  Гц, т.е. на периодах меньше суточных, которые здесь не рассматриваются.

В работе [23] автор рассматривает два варианта формирования спектров колебания атмосферного давления. Первый из них предложен (см. работы [24, 25]) и объясняется существованием внут-

ренных гравитационных волн. Согласно этой гипотезе, длинные гравитационные волны распадаются на более короткие волны в непрерывной цепи, что приводит к положительному потоку энергии от больших до малых масштабов.

Во втором варианте, согласно гипотезе, изложенной в работе [26], спектр атмосферного давления является спектром двумерной турбулентности с отрицательным потоком энергии, т. е. поток от малых до больших масштабов, в соответствии с теорией двумерной турбулентности [27, 28].

Авторы настоящей работы полагают, что наличие пиков в спектрах атмосферного давления с периодами от 5 до 19 суток связаны с синоптическими процессами в атмосфере и их трансформацией в более короткие или длинные волны, что и определяет наличие нескольких пиков в спектре атмосферного давления. Периоды некоторых из этих пиков, как показывает табл. 1, совпадают с периодами ритмов ЧСС. Таким образом, можно заключить, что на ритмы ЧСС людей могут оказывать влияние проходящие через регион синоптические процессы в атмосфере типа циклонов и антициклонов и, в конечном итоге, влиять на самочувствие людей.

## ВЫВОДЫ

Проведены длительные пятилетние наблюдения (мониторирование) геофизических (экологических) ритмов – атмосферного давления, геомагнитной активности и биологических ритмов человека – артериального давления, ЧСС, для периодов колебаний и ритмов более суточных.

Установлено, что в периоды времени, когда атмосферное давление изменяется плавно и незначительно, в эти же периоды времени, достигающие по длительности 15 суток, наблюдается более спокойный сердечный ритм и колебания артериального давления. Такие «спокойные» периоды времени наблюдаются преимущественно в летние месяцы с июля по август, обычно только один раз за сезон. В то же время относительно стабильное атмосферное давление не способствует стабилизации артериального давления, когда оно происходит в другие месяцы.

Сравнение кривых колебаний систолического давления и индекса геомагнитной активности показали наличие корреляции между ними на уровне 0.184, в три раза превышающую значение корреляции между систолическим давлением и атмосферным давлением. Показано, что геомагнитное поле с индексом активности более 2 влияет на повышение систолического давления у человека.

Установлено хорошее совпадение ритмов систолического давления и магнитной активности

на периодах 4–10 суток – циркасептанных ритмов, которые, как считают авторы работы [17], относятся к метаболическим процессам и выработке эндокринных гормонов. Они также полагают, что околонедельные ритмы характерны и для ряда патологических процессов, а именно критических дней после начала заболевания.

Установлено, что периоды ритмов систолического давления совпадают с периодами ритмов геомагнитной активности, а периоды ритмов ЧСС – с периодами ритмов атмосферного давления. Это позволяет сделать вывод о различном и раздельном влиянии геофизических ритмов на разные биологические ритмы – ЧСС и систолическое давление.

Рассмотрены атмосферные процессы с ритмами синоптического диапазона, имеющие периоды в несколько суток, которые обусловлены циклонами и антициклонами. Показано, что периоды пиков в спектрах атмосферного давления согласуются с периодами ритмов ЧСС. Это позволяет сделать заключение, что на ритмы ЧСС людей могут оказывать влияние проходящие через регион синоптические процессы в атмосфере типа циклонов и антициклонов и, в конечном итоге, они могут влиять на самочувствие людей и больных в клиниках.

Поскольку гидрометеорологические службы публикуют прогнозные оценки вариаций атмосферного давления и индекса геомагнитной активности, в частности на сайте GISMETEO, результаты данного исследования могут быть использованы для прогнозирования состояния здоровья человека с возможностью своевременного принятия корректирующих мероприятий.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы-геофизики благодарят врача функциональной диагностики Т.Н. Шмараеву и терапевта онкологического диспансера А.Е. Мариченко за помощь в интерпретации результатов анализа.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья испытуемого в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Участник исследования дал доб-



ровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о характере предстоящего исследования.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Наумова В. В., Земцова Е. С., Щелев Д. Г. и Пиливский С. О. Вариабельность параметров кровообращения в зрелом возрасте. *Вестн. Санкт-Петербургского университета. Сер. 11*, № 3, 154–163 (2008).
2. Pagani M., Lombardi F., Guzzetti S., Rimoldi O., Furlan R., Pizzinelli P., Sandrone G., Malfatto G., Dell'Orto S., and Piccaluga E. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res.*, **59** (2), 178–193 (1986). DOI: 10.1161/01.res.59.2.178
3. Артемова Н. М., Везенова И. В. и Соколов А. В. *Суточное мониторирование артериального давления в клинической практике: учебно-методическое пособие для ординаторов по специальности «Функциональная диагностика»* (Рязанский гос. мед. университет, Рязань, 2012).
4. Бородин А. С. *Вариации системного артериального давления человека: учебно-методическое пособие* (Томский государственный университет, Томск, 2011).
5. Остроумова О. Д., Гусева Т. Ф., Абакумов Ю. Г. и Батутина А. М. Вариабельность систолического и диастолического артериального давления при артериальной гипертензии: клиническая значимость, возможные патогенетические механизмы. *Кардиоваск. терапия и профилактика*, № 2, 91–94 (2003).
6. Баевский Р. М. и Иванов Г. Г. Вариабельность сердечного ритма: теоретические аспекты и возможности клинического применения. *Ультразвуковая и функциональная диагностика*, № 3, 108–127 (2001).
7. Сергейчик О. И. *Модели и алгоритмы спектрального анализа обработки кардиологических временных рядов*. Автореф. дис. ... канд. техн. наук (Тюмень, 2007).
8. Хаяутин В. М. и Лукошкова Е. В. Колебания частоты сердцебиений: спектральный анализ. *Вестн. аритмологии*, № 26, 10–21 (2002).
9. Steinmeier R., Bauhuf C., Hübner U., Bauer R. D., Fahlbusch R., Laumer R., and Bondar I. Slow rhythmic oscillations of blood pressure, intracranial pressure, microcirculation, and cerebral oxygenation. Dynamic interrelation and time course in humans. *Stroke*, **27** (12), 2236–2243 (1996). DOI: 10.1161/01.str.27.12.2236
10. Григорьев А. И. *Экология человека: учебник для вузов* (ГЭОТАР-Медиа, М., 2013).
11. Хильдебрандт Г., Мозер М. и Лехофер М. *Хронобиология и хрономедицина. Биологические ритмы и медицинское применение* (Арнебия, М., 2006).
12. Агулова Л. П. *Хронобиология: учеб. пособие* (Томск: Томский государственный университет, 2013).
13. Крылов В. В. Биологические эффекты геомагнитной активности: наблюдения, эксперименты и возможные механизмы. *Труды ИБВВ РАН*, № 84 (87), 7–38 (2018).
14. Jenkins G. M. and Watts D. G. *Spectral analysis and its applications* (Holden-Day, San Francisco, 1969).
15. Marple S. L. *Digital Spectral Analysis, with Applications* (Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1987).
16. Ковалев Д. П. Программа для ЭВМ Кума. *Федеральная служба по интеллектуальной собственности*, Свидетельство 2018618778 от 19.07.2018.
17. Чибисов С. М., Благоднаров М. Л. и Фролов В. А. *Телеметрическое мониторирование в патофизиологии сердца и хронокардиологии. Учеб. пособие* (РУДН, М., 2008).
18. Зубашенко Е. М., Шмыков В. И., Немыкин А. Я. и Полякова Н. В. *Региональная физическая география. Климаты Земли: учебно-методическое пособие. Часть 1.* (ВГПУ, Воронеж, 2007).
19. *Солнечная и земная физика. Справочник. 2002–2012* (Сервер «СиЗиФ»), <http://www.kosmofizika.ru/spravka.htm>.
20. Рябова С. А. *Геомагнитные вариации и синхронные с ними вариации уровня подземных вод и микросейсмического фона в условиях средних широт*. Дис. ... канд. физ.-мат. наук (М., 2018).
21. Солдатенко С. А. Синоптические вихри в атмосфере и океане. *Соровский образоват. журн.*, № 2, 78–84. (1999).
22. Larsén X. G., Vincent C. L., and Larsen S. E. Spectral structure of mesoscale winds over the water. *Quart. J. Roy. Meteorolog. Soc.*, **139** (672), 685–700 (2013).
23. Lindborg E. Can the atmospheric kinetic energy spectrum be explained by two-dimensional turbulence? *J. Fluid Mech.*, **388**, 259–288 (1999).
24. Dewan E. M. Stratospheric spectra resembling turbulence. *Science*, **204**, 832–835 (1979).
25. Van Zandt T. E. A universal spectrum of buoyancy waves in the atmosphere. *Geophys. Res. Lett.*, **9**, 575–578 (1982).
26. Gage K. S. Evidence for a  $k^{-5/3}$  law inertial range in mesoscale two-dimensional turbulence. *J. Atmos. Sci.*, **36**, 1950–1954 (1979).
27. Kraichnan R. H. Inertial ranges in two-dimensional turbulence. *Phys. Fluids*, **10**, 1417–1423 (1967).
28. Kraichnan R. H. Inertial-range transfer in two- and three-dimensional turbulence. *J. Fluid Mech.*, **47**, 525–535 (1970).

## Relationship of Geophysical Rhythms with Human Blood Pressure and Heart Rate. Case Study

P.D. Kovalev\* and D.P. Kovalev\*

*\*Institute of Marine Geology and Geophysics, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,  
ul. Nauki 1B, Yuzhno-Sakhalinsk, 693022 Russia*

This paper considers time series data collected over a five year interval of time on geophysical (environmental) rhythms of atmospheric pressure and geomagnetic activity and their impact on human biorhythms - blood pressure and frequency of heart rate over a longer time step than one day was evaluated. It was found that during the periods that last around 15 days, when atmospheric pressure changes smoothly and slightly, the heart beats quietly and minor fluctuations in blood pressure are observed. These "quiet" periods are mainly expected during summer months from July to August, usually only once a year. A comparison of the graphs of systolic blood pressure fluctuations with the graph of geomagnetic activity index showed that correlation coefficients between systolic blood pressure fluctuations and geomagnetic activity index were three times greater than those between systolic blood pressure and atmospheric pressure. Thus, the results obtained demonstrate that the geomagnetic field with an activity index of greater than 2 has a greater effect on elevation of systolic blood pressure in people. The analysis also showed that the intervals of the spectral peaks in spectra of atmospheric pressure are well consistent with the intervals between each heartbeat. This indicates that the heart rate of people can be influenced by synoptic processes passing through the region in the atmosphere such as cyclones and anticyclones, and, ultimately, they can affect the well-being of elderly and ill individuals. The results obtained during this study in combination with geophysical data from hydrometeorological centers can help forecast the state of human health.

*Keywords: geophysical and biological rhythms, blood pressure, heart rate, atmospheric pressure, geomagnetic activity*

УДК 615.277.3

## СОЕДИНЕНИЯ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ

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

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

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

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

#E mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Представлены обобщенные результаты исследования противоопухолевой активности, цитотоксического эффекта и механизма действия полиакрилатов золота (аурумакрила) и серебра (аргакрила) в контексте современных представлений о перспективах возможного применения золото- и серебросодержащих соединений в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов на основе их экспериментального изучения.

*Ключевые слова:* полиакрилаты серебра (аргакрил) и золота (аурумакрил), противоопухолевая активность, цитотоксический эффект, перевиваемые опухоли животных, культуры клеток опухолей человека.

DOI: 10.31857/S0006302924020221, EDN: OTFKZY

### КОМПЛЕКСНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА

Среди химических соединений, изучаемых в последнее время в качестве возможных противоопухолевых агентов, особый интерес представляют металлоорганические соединения, в том числе вещества, содержащие благородные металлы, в первую очередь — золото и серебро. Как показали исследования последних десятилетий, золото- и серебросодержащие соединения обладают значительной биологической, в том числе, антибактериальной, гемостатической, цитотоксической и противоопухолевой активностью [1].

Высокая биологическая активность соединений, включающих ионы золота и серебра, явилась серьезным стимулом для развития интенсивных исследований, направленных на выявление их противоопухолевых свойств.

**Золотосодержащие соединения.** Попытки медицинского применения золота и его соединений имеют очень давнюю историю. Первые упоминания об использовании в Китае золота в качестве лекарственного средства датируют 2500 годом до нашей эры. Имеются свидетельства о попытках

применения золота для лечения сифилиса и психических заболеваний.

Возникновение современного интереса к медицинскому применению соединений золота связывают с именем Р. Коха, который в 1890 г. сообщил об ингибировании роста туберкулезной палочки под влиянием цианида золота. В 1925–1935 гг. внутривенные инфузии тиолатных солей одновалентного золота применялись для лечения туберкулеза, несмотря на отсутствие экспериментальных данных, подтверждающих эффективность препаратов при туберкулезе.

Тогда же был случайно отмечен симптоматический эффект в виде уменьшения суставных болей при применении этих веществ, что побудило исследовать их эффективность при ревматоидном артрите.

В 1960-х годах в крупных клинических исследованиях была доказана эффективность внутривенного введения препаратов золота при ревматоидном артрите, а в 1970-х годах была выявлена активность фосфинового соединения, содержащего одновалентное золото (ауранофин) при пероральном применении. Начиная с 1985 г. по настоящее время ауранофин (торговое название

Ridaura®) с разрешения FDA США применяется в качестве лекарственного средства для лечения ревматоидного артрита [2].

К этому следует добавить, что в 2012 г. FDA США одобрило клиническое применение ауранофина для лечения амебиоза, вызванного *Entamoeba histolytica* [3, 4].

Ведутся клинические испытания эффективности ауранофина при лечении пациентов с ВИЧ-инфекцией [5].

Интерес к исследованиям противоопухолевых свойств комплексных соединений золота был стимулирован случайным обнаружением в конце 1960-х годов высокой противоопухолевой активности цис-дихлордиаминоплатины (цисплатина) и последующим, в конце 1970-х годов, быстрым внедрением ее в клиническую практику, где препарат стал применяться при лечении широкого спектра солидных опухолей.

После создания цисплатина были синтезированы и изучены сотни его производных, но в клиническую практику успешно внедрены только два препарата второго и третьего поколения — карбоплатин ((циклобутан-1,1-дикарбоксилато)диаминплатина (II)) и оксалиплатин (комплекс иона платины с оксалатом и 1,2-диаминоциклогексаном).

Цисплатин и его производные занимают важное место в современной противоопухолевой химиотерапии, однако ряд особенностей действия снижает эффективность их использования в практической онкологии [6, 7].

Все это явилось стимулом для синтеза и изучения противоопухолевых свойств соединений, содержащих другие переходные металлы, которые обладали бы более высокой противоопухолевой активностью при меньшей токсичности, чем соединения платины.

Существенное место в этих исследованиях занимают золотосодержащие комплексные соединения, которые рассматриваются как многообещающие экспериментальные агенты для лечения злокачественных опухолей.

Характерные химические свойства этих соединений, обусловленные наличием атома золота, определяет их особый фармакологический профиль и механизмы действия.

Для целого ряда подобных соединений показана высокая цитотоксическая активность *in vitro* в отношении различных культур клеток опухолей человека, а также значимая противоопухолевая активность на опухолевых моделях *in vivo* [4].

Исследованные соединения различаются по химическому строению, но общим для них является наличие одно- или трехвалентного иона золота, что дало основание многим исследователям полагать, что цитотоксическое действие этих со-

единений во многом обусловлено наличием этого иона.

В то же время накопленные данные указывают на важную роль лигандов, образующих золотосодержащие комплексы, в выраженности противоопухолевой и цитотоксической активности этих соединений [8, 9].

При рассмотрении механизма действия золотосодержащих соединений отметим, что индуцируемая этими соединениями гибель клеток, по мнению большинства исследователей, происходит преимущественно путем апоптоза, который является следствием взаимодействия изучаемых веществ с различными внутриклеточными молекулами — мишенями [1].

Полагают, что противоопухолевое действие золотосодержащих комплексов обусловлено в основном индукцией оксидативного стресса, который развивается в опухолевых клетках в результате возрастания в них уровня активных форм кислорода под влиянием препаратов [10].

При этом особая роль придается взаимодействию золотосодержащих комплексов с системой «тиоредоксин — тиоредоксин редуктаза», которая, будучи одним из ключевых элементов внутриклеточной антиоксидантной защиты, участвует во многих физиологических процессах — от восстановления нуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды до детоксикации организма от ксенобиотиков, оксидантов, свободных радикалов.

В подавляющем большинстве исследований показано, что тиоредоксин редуктаза является одной из основных мишеней для реализации цитотоксического эффекта золотосодержащих комплексов [1, 11].

Такой механизм цитотоксического действия золотосодержащих комплексов позволяет считать их представителями нового направления в противоопухолевой химиотерапии — индукции в опухолевых клетках оксидативного стресса [10].

Вместе с тем в ряде исследований получены данные, указывающие и на другие возможные мишени цитотоксического действия золотосодержащих комплексов (протеосома 26S, белки внутриклеточных сигнальных систем, рецептор эпидермального фактора роста, фактор роста эндотелия сосудов и другие) [12, 13].

Анализ имеющихся данных о мишенях и механизмах действия золотосодержащих соединений дает основания считать их мультитаргентными противоопухолевыми агентами, во многом отличающимися от современных стандартных противоопухолевых препаратов [1].

Продолжающиеся интенсивные исследования по синтезу, оценке противоопухолевых свойств и механизмов действия разнообразных золотосодержащих комплексов пока не привели к отбору

наиболее перспективных для клинического изучения соединений, что, возможно, объясняется существованием значительных различий в чувствительности к подобным комплексам разных типов экспериментальных опухолевых моделей.

**Серебросодержащие соединения.** Серебро и серебросодержащие соединения обладают, как хорошо известно, уникальным фармакологическим свойством – антимикробной активностью.

Предметы из серебра использовались для предохранения от порчи воды, пищевых продуктов и вина еще в Античной Греции и Древнем Риме. В течение сотен лет серебро и его соединения применялись в медицине в качестве антисептических средств при лечении ран, язв, ожогов. До введения в медицинскую практику антибиотиков серебросодержащие соединения были самыми мощными антимикробными агентами.

Наиболее известные препараты серебра – азотнокислое серебро (нитрат серебра, ляпис), сульфодиазин серебра (Dermaxine) и сульфатиазол серебра (Argosulfan). Широко применяются также препараты коллоидального серебра (колларгол и протаргол). Лечебные свойства всех этих средств определяются специфической биологической активностью ионов одновалентного серебра  $Ag(I)$ , которые образуются в результате распада этих соединений [14].

Первым серебросодержащим лекарственным средством является нитрат серебра ( $AgNO_3$ ) – не встречающееся в природе соединение, впервые полученное немецким ученым Альбертом фон Больштедтом в XIII веке и примененное в качестве лекарственного средства в 1620-х годах голландскими физиологами Й. ван Гельмонтом и Ф. Сильвием для обеззараживания глаз новорожденных, чьи матери страдали от гонореи. Тогда же этому средству было дано название лунный (луной называли серебро), адский или ляписный камень (в переводе с латинского «ляпис» – камень) за его выжигающую способность [15].

Противовоспалительное действие нитрата серебра связывают с денатурацией белков вследствие взаимодействия ионов серебра с карбоксильными и сульфгидрильными группами белковых молекул.

Ионы серебра, как показали результаты многочисленных современных исследований, проведенных с нитратом серебра, способны оказывать цитотоксическое действие на опухолевые и нормальные клетки. При этом отмечается дозозависимый характер гибели клеток под влиянием препарата, а также зависимость цитотоксического эффекта нитрата серебра от типа опухолевых клеток.

Цитотоксический эффект нитрата серебра связывают в первую очередь с образованием иона

серебра ( $Ag^+$ ), генерирующего активные формы кислорода и индуцирующего оксидативный стресс, что ведет к повреждениям, вызывающим клеточную гибель [16–18].

Уникальность физико-химических свойств серебра, так же как и золота, создает обособанные предпосылки для исследования биологической и, в частности, противоопухолевой активности веществ, содержащих этот благородный металл.

Серебро, будучи переходным металлом, способно образовывать комплексные соединения.

Как правило, в таких соединениях в качестве комплексообразователя (металлоцентра) выступает ион одновалентного серебра  $Ag^+$ . С этим ионом могут связываться различные лиганды, что приводит к образованию внутренней сферы комплексного соединения (комплексная частица), к которой, в свою очередь, также могут присоединяться с помощью различного типа межмолекулярных связей разнообразные лиганды с образованием внешней сферы комплексного соединения.

Все это открывает большие возможности для синтеза разнообразных серебросодержащих комплексных соединений, обладающих разносторонней биологической активностью.

Направленный синтез и исследование биологических эффектов подобных веществ интенсивно развиваются в течение последних десятилетий. В частности, в этих исследованиях была обнаружена значительная цитотоксичность различных серебросодержащих комплексных соединений, что стимулировало их исследование в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

Считается, что цитотоксический эффект препаратов серебра обусловлен воздействием выделяющихся из них ионов серебра на различные интрацеллюлярные органеллы и молекулярные структуры. Направленность и интенсивность этих эффектов во многом определяются лигандами, образующими комплексное соединение.

Мишенями для действия ионов серебра могут служить тиолсодержащие белки и молекулы в цитоплазме, плазматическая, митохондриальные, лизосомные мембраны, а также ДНК. Ионы серебра вызывают пероксидацию липидов мембран, приводящую к повышению их проницаемости. Повреждение плазматической мембраны вызывает выход из клетки содержимого цитозоля и некротическую гибель клетки. Повреждение мембраны лизосом приводит к выделению катепсина и индукции аутофагии. Повреждение митохондрий сопровождается нарушением транспорта электронов, ингибированием синтеза АТФ, увеличением активных форм кислорода, генерацией оксидативного стресса. Ионы серебра способны индуцировать также различные поврежде-

ния ДНК. Все эти процессы ведут к апоптотической гибели клетки.

В то же время показано, что активность таких соединений во многом зависит от природы лиганда, входящего в структуру этих веществ. При этом особое значение придается использованию лигандов, обладающих собственной биологической активностью. Предполагается, что сочетание в одном соединении двух биологически активных компонентов — ионов серебра и лиганда — способно обеспечить достижение эффекта синергизма при действии препарата [19, 20].

Изучено несколько десятков комплексных соединений, в которых ионы серебра  $Ag^+$  были координированы с лигандами, представляющими химические соединения разных классов, такие как серебросодержащие фосфины, карбен-, кумарин- и гидразонсодержащие соединения серебра [1].

Цитотоксический эффект этих соединений связывают с интрацеллюлярным выделением из них ионов серебра, в то время как лиганды рассматриваются в качестве структур, обеспечивающих доставку серебра в клетки.

Предполагается, что эффект комплексных соединений серебра зависит от таких важных характеристик препарата, как стабильность и соотношение его гидрофильно-липофильных свойств, которые в значительной степени обусловлены природой имеющегося в структуре вещества лиганда [21].

Особо следует отметить, что при исследовании противоопухолевых и цитотоксических свойств серебросодержащих соединений большое внимание уделяется синтезу и изучению комплексных соединений серебра, имеющих в своей структуре в качестве лигандов вещества, которые уже используются в медицинской практике как лекарственные препараты.

Проводится синтез и изучение цитотоксичности комплексных соединений серебра, содержащих в своей структуре в качестве лигандов производные имидазола, в частности метронидазол, который применяется при лечении бактериальных и протозойных инфекций, а также производные пиридина, имеющие широкое медицинское применение [17].

Установлена высокая цитотоксичность комплексов  $Ag(I)$  с известными нестероидными противовоспалительными препаратами — диклофенаком и нифлуминовой кислотой в отношении ряда линий клеток опухолей человека [22, 23].

Обнаружен цитотоксический эффект серебросодержащих комплексов с глицином и никотинамидом в отношении ряда клеточных линий опухолей животных [24].

Важно отметить, что цитотоксический эффект многих серебросодержащих комплексов сопоставим с активностью цисплатина, а также экспериментально установленный факт отсутствия перекрестной резистентности между рядом серебросодержащих соединений и цисплатином [25, 26].

Анализ имеющихся данных о цитотоксичности серебросодержащих соединений, различающихся характером присутствующих в их структуре лигандов, указывает на несомненную способность таких веществ вызывать гибель опухолевых клеток в условиях *in vitro*.

Однако экспериментальное изучение противоопухолевой эффективности серебросодержащих веществ в отношении широкого спектра перерываемых опухолей животных и ксенографтов опухолей человека *in vivo* пока не проводилось.

По-видимому, именно с этим обстоятельством связан тот факт, что к настоящему времени не выделена структура на основе серебра, наиболее перспективная для дальнейшей разработки в качестве потенциального лекарственного средства для лечения злокачественных опухолей.

## ПОЛИАКРИЛАТЫ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА

Среди многообразия изученных в последние годы металлоорганических соединений особый интерес представляют металлопроизводные полиакриловой кислоты (полиакрилаты), синтезированные под руководством академика М.Г. Воронкова в Иркутском институте химии имени А.Е. Фаворского СО РАН и относящиеся к новой для онкологии группе соединений, ранее в этом направлении не изучавшихся — металлосодержащие полимеры.

В результате исследований, проведенных нами в Институте биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, из этой группы соединений для дальнейшего углубленного изучения в качестве потенциальных цитостатиков были отобраны полиакрилаты, содержащие золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил). В этих исследованиях впервые было показано, что золото- и серебросодержащие полимеры могут обладать значимой цитостатической и противоопухолевой активностью [27–29].

Необходимо отметить, что аурумакрил и аргакрил являются первыми и пока единственными полимерными соединениями среди изученных золото- и серебросодержащих веществ, способных в определенных условиях формировать наноразмерные частицы драгоценных металлов в полимерной матрице, что, вероятно, вносит свой вклад в особенности метаболизма этих препаратов в физиологических условиях [30].

Согласно существующим представлениям полимерные комплексы, которые содержат в своем

**Таблица 1.** Противоопухолевая активность полиакрилатов золота и серебра на моделях солидных опухолей мышей

Штамм опухоли	Доза (мг/кг/сутки) и режим введения	Время оценки эффекта (сутки)	Средняя масса опухоли, г		Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %)
			леченые животные	контрольные животные	
Аргакрил					
Карцинома Льюис	2 (1 – 5 сутки)	15	0.7 ± 0.1	6.5 ± 0.4	90
Акатол	2 (1 – 5 сутки)	27	2.1 ± 0.2	4.7 ± 0.6	55
Ca-755	6 (1 – 9 сутки)	21	3.8 ± 0.3	1.2 ± 0.2	70
Аурумакрил					
Карцинома Льюис	20 (1 – 5 сутки)	21	0.8 ± 0.1	3.8 ± 0.5	80
Акатол	20 (1 – 5 сутки)	27	0.5 ± 0.1	4.7 ± 0.6	90
Ca-755	20 (1 – 5 сутки)	15	1.2 ± 0.2	5.2 ± 0.5	77

составе ионогенные группы и наночастицы металла, способны к комплементарным конформационным превращениям и кооперативному связыванию, а также к невалентным взаимодействиям с биологическими объектами. Эти свойства определяют возможный широкий спектр фармакологической активности полимерных композитов, содержащих наночастицы благородных металлов, в том числе в качестве потенциальных лекарственных препаратов [1, 30].

Проведенные нами доклинические исследования полиакрилатов золота и серебра включают исследование противоопухолевой и цитотоксической активности препаратов на моделях солидных опухолей животных *in vivo* и клеточных линиях опухолей человека *in vitro*, а также изучение определенных аспектов механизма действия этих соединений.

Исследовавшиеся препараты представляют собой неполные металлические соли полиакриловой кислоты, содержащие ионы благородных металлов (8 масс. %).

Аурумакрил представляет собою неполную золотую соль полиакриловой кислоты:  $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAg}-)_m$ , аргакрил – неполная серебряная соль полиакриловой кислоты:  $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAg}-)_m$ , где  $n = 12000-35000$ ,  $m = 1650-6650$ . Молекулярная масса полимеров составляет 100–300 кДа. ИК-Спектры препаратов содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570  $\text{см}^{-1}$  соответственно.

Субстанции препаратов представляют собой стекловидные пластинки золотистого (аурумак-

рил) и серебристого (аргакрил) цвета, хорошо растворимые в воде [30–32].

#### ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИАКРИЛАТОВ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА *in vivo*

Противоопухолевая активность аурумакрила и аргакрила установлена на моделях солидных опухолей мышей – карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Ca-755 при ежедневном многократном внутривнутрибрюшинном введении препаратов [33].

Отметим, что аурумакрил применялся в суточной дозе 20 мг/кг, в то время как аргакрил использовался в большинстве опытов в дозе 2 мг/кг, что объясняется значительно более высокой токсичностью препарата, содержащего серебро, по сравнению с препаратом золота.

Аурумакрил тормозит на 80–90% развитие всех трех изученных солидных опухолей мышей – карциномы легких Льюис, аденокарциномы Акатол и аденокарциномы Ca-755 (табл. 1, рис. 1).

Аргакрил эффективно тормозит развитие карциномы легких Льюис (90%) и аденокарциномы Ca-755 (70%), проявляя несколько меньшую активность в отношении опухоли Акатол (55%) (табл. 1, рис. 2).

При этом средняя продолжительность жизни животных под влиянием аргакрила увеличивается на 46% (карцинома легких Льюис), а под влиянием аурумакрила – на 31% (аденокарцинома Ca-755) по сравнению с контролем.

Представленные результаты свидетельствуют о несомненной противоопухолевой активности



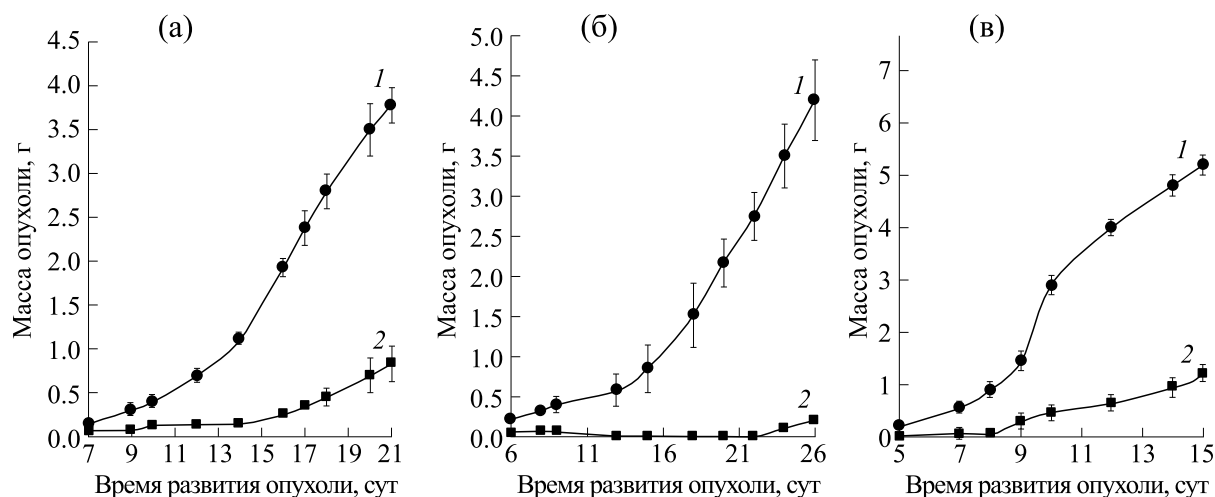


Рис. 1. Противоопухолевая активность аурумакрила на моделях карциномы легких Льюис (а), аденокарциномы Акатол (б), аденокарциномы Са-755 (в): кривая 1 – контроль; кривая 2 – аурумакрил, 20 мг/кг/сутки, внутрибрюшинно, с первых по пятые сутки после перевивки опухоли.

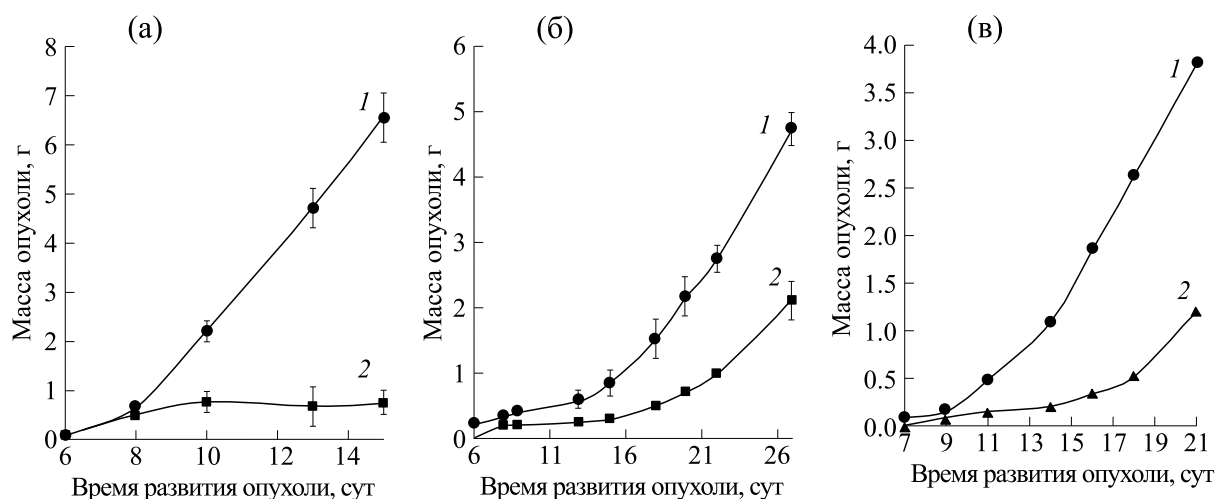


Рис. 2. Противоопухолевая активность аргакрила на моделях карциномы легких Льюис (а), аденокарциномы Акатол (б) и аденокарциномы Са-755 (в): кривая 1 – контроль; кривая 2 – аргакрил, 2 мг/кг/сутки, внутрибрюшинно, с первых по пятые сутки после перевивки опухоли (Са-755 – 6 мг/кг/сутки, с первых по девятые сутки).

полиакрилатов золота и серебра, вызывающих торможение развития солидных опухолей мышей на 55–90%. При этом, однако, следует отметить несколько более широкий спектр действия аурумакрила, вызывающего ингибирование роста всех трех опухолей (карциномы Льюис, аденокарциномы Акатол, аденокарциномы Са-755) на 80–90% по сравнению с контролем, в то время как аргакрил проявляет эффективность на уровне 70–90% в отношении двух опухолей (карцинома Льюис, аденокарцинома Са-755).

В дополнение к приведенным данным отметим, что препараты обладают некоторым антитабастатическим действием. Так, применение аурумакрила и аргакрила приводит к торможению об-

разования колоний опухолевых клеток в легких на 50% и 26% соответственно по сравнению с контролем при оценке эффекта на 23-и сутки развития карцинома легких Льюис [1].

Весьма существенным представляется также тот факт, что аурумакрил, как показало специальное сравнительное исследование, проведенное на моделях солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис и аденокарцинома Акатол), проявляет противоопухолевую активность, сопоставимую с эффектом цитостатиков различного механизма действия (цисплатина, циклофосфана, 5-фторурацила, доксорубина) [34].

**Таблица 2.** Значения показателя  $IC_{50}$  аурумакрила и аргакрила для ряда опухолевых клеток человека, культивируемых *in vitro*

Культура клеток	Аурумакрил	Аргакрил
	$IC_{50}$ , мкг/мл	
Рак молочной железы MCF-7	100 (8.0)	25 (2.0)
Рак легкого A549	50 (4.0)	80 (6.4)
Меланома Mel Me	62 (4.9)	180 (14.4)
Рак толстой кишки HCT116	65 (5.2)	180 (14.4)

Примечание. Курсивом в скобках указаны значения концентраций  $IC_{50}$  для препаратов аурумакрил и аргакрил в пересчете на содержание золота и серебра соответственно.

### ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПОЛИАКРИЛАТОВ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА *in vitro*

Аурумакрил и аргакрил, как показали эксперименты с использованием стандартного МТТ-теста для оценки гибели клеток, проявляют значительную цитотоксическую активность в отношении ряда клеточных культур опухолей человека различного генеза – рака легкого A549, рака толстой кишки HCT116, меланомы Mel Me, рецептор-положительной карциномы молочной железы MCF-7 (табл. 2) [35].

Наибольшей чувствительностью к препаратам обладают опухолевые клетки карциномы молочной железы MCF-7 [36, 37].

Влияние аргакрила и аурумакрила на выживаемость клеток MCF-7 в зависимости от концентрации препаратов характеризуют данные, представленные на рис. 3.

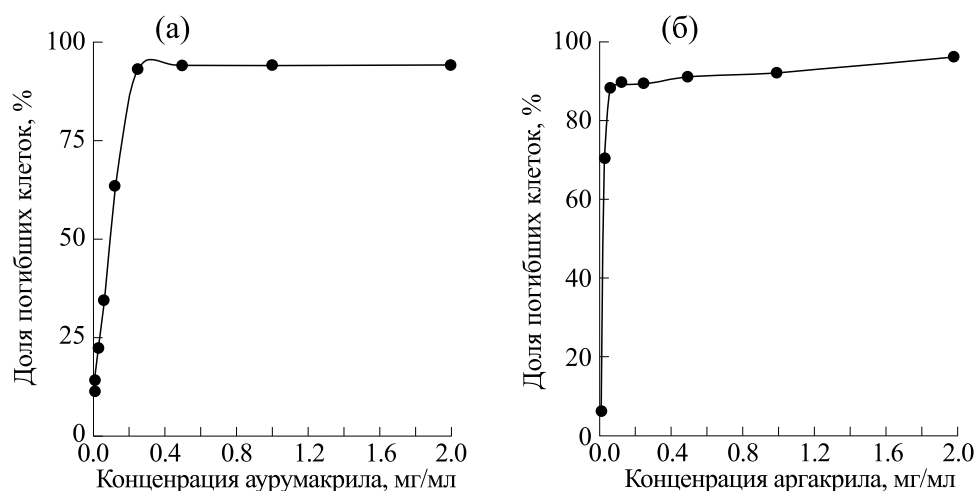
Как видно из представленных данных, оба изученных препарата – аргакрил и аурумакрил – обладают дозозависимым цитотоксическим дей-

ствием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации препарата и природы металла, содержащегося в полимере.

Аргакрил и аурумакрил вызывают практически полную гибель опухолевых клеток (94–96%) при воздействии в максимальной концентрации 2 мг/мл (рис. 3).

Учитывая, что аурумакрил и аргакрил являются полимерами на основе полиакриловой кислоты с массовым содержанием металлов в количестве 8%, а противоопухолевый эффект этих соединений связывают в основном с действием образующихся наночастиц благородных металлов, представляется уместным характеризовать цитотоксическую активность этих препаратов соответствующими показателями в пересчете на содержание золота и серебра соответственно [38].

Значения показателя цитотоксичности  $IC_{50}$  (концентрации вещества, вызывающей гибель 50% опухолевых клеток) составляют 8 мкг/мл и 2 мкг/мл для аурумакрила и аргакрила (в пересче-



**Рис. 3.** Изменение доли погибших клеток MCF-7 в зависимости от концентрации препаратов аурумакрила (а) и аргакрила (б).

**Таблица 3.** Значения показателя  $IC_{50}$  аурумакрила, аргакрила (в пересчете на содержание металла), цисплатины и доксорубицина в отношении чувствительных (MCF-7) и резистентных (MCF-7/CP, MCF-7/ADR) клеток культуры рака молочной железы человека

Препарат	Культура клеток		
	MCF-7	MCF-7/CP	MCF-7/ADR
	$IC_{50}$ , мкг/мл		
Аурумакрил	10.0	9.6	6.0
Аргакрил	4.0	3.2	3.2
Доксорубицин	0.12	5.0	5.0
Цисплатина	2.0	20.0	7.0

те на содержание золота и серебра соответственно).

Таким образом, очевидно, что оба изученных препарата обладают выраженной способностью оказывать летальное действие на клетки опухолей человека, причем цитотоксический эффект аргакрила в четыре раза превосходит активность аурумакрила.

Как было отмечено ранее, принципиальные отличия в химической структуре золото- и серебросодержащих полимеров на основе полиакриловой кислоты от других широко исследуемых металло-комплексов дают основания полагать, что мишени и механизмы реализации противоопухолевого эффекта аурумакрила и аргакрила, возможно, иные, чем у ряда известных, клинически апробированных лекарственных средств [7].

В этой связи особый интерес представляет оценка наличия перекрестной резистентности между металлополиакрилатами (аурумакрил и аргакрил) и широко применяемыми в клинической практике противоопухолевыми препаратами, такими, в частности, как цисплатин и доксорубицин.

С этой целью нами было проведено изучение цитотоксической активности металлополиакрилатов, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил), на чувствительном (MCF-7) и резистентных к цисплатину (MCF-7/CP) и доксорубицину (MCF-7/ADR) вариантах культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7 с параллельной оценкой цитотоксичности для этих линий клеток препаратов цисплатина и доксорубицина [39].

Рассматривая действие аурумакрила и аргакрила, необходимо отметить как принципиально важный результат, полученный в данном исследовании, сохранение практически одинаковой цитотоксической активности полиакрилатов в отношении чувствительных и резистентных к действию цисплатина и доксорубицина клеток.

Сопоставление активности препаратов в соответствии со значениями критерия оценки цито-

токсического эффекта  $IC_{50}$  в отношении изученных моделей чувствительных и резистентных опухолевых клеток позволяет сделать следующие выводы (табл. 3).

Цитотоксичность аурумакрила в отношении чувствительной (MCF-7) и резистентной к цисплатину (MCF-7/CP) линий клеток сохраняется практически на одном уровне –  $IC_{50}$  составляет 10.0 и 9.6 мкг/мл соответственно, увеличиваясь по отношению к клеткам, резистентным к доксорубицину (MCF-7/ADR), для которых  $IC_{50}$  равен 6 мкг/мл.

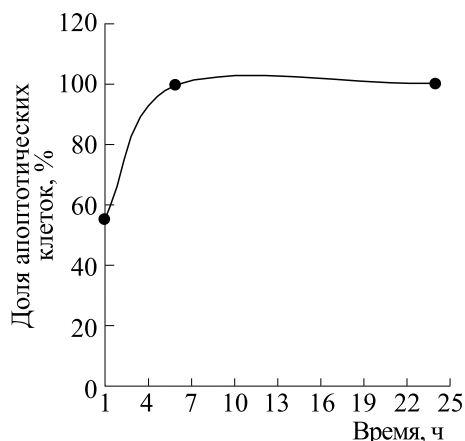
Цитотоксичность аргакрила для всех трех линий клеток, как чувствительных, так и резистентных к цисплатину и доксорубицину, находится примерно на одном уровне –  $IC_{50}$  имеет значения, равные 4.0 и 3.2 мкг/мл соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что резистентные к цисплатину и доксорубицину клетки рака молочной железы человека сохраняют в полной мере чувствительность к цитотоксическому действию полиакрилатов – аурумакрила и, особенно, аргакрила (табл. 3).

Иными словами, в результате проведенных исследований обнаружено отсутствие перекрестной резистентности у препаратов полиакрилатов (аурумакрил и аргакрил) с цисплатином и с доксорубицином на модели культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7.

Обнаруженное в проведенном исследовании сохранение чувствительности к цитотоксическому действию полиакрилатов благородных металлов у клеток, обладающих резистентностью к цисплатину и доксорубицину, может рассматриваться в качестве свидетельства, подтверждающего предположение о наличии определенных особенностей в механизме противоопухолевого эффекта этих соединений.

**Механизм действия полиакрилатов золота и серебра.** Исследование механизма действия полиакрилатов включает такие аспекты, как изучение



**Рис. 4.** Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аурумакрила (500 мкг/мл). По оси абсцисс – время инкубирования клеток с аурумакрилом, ч; по оси ординат – доля апоптотических клеток, %.

механизма гибели клеток и влияние соединений на структуру ДНК опухолевых клеток.

**Механизм гибели опухолевых клеток.** Соединения, содержащие золото и серебро, подобно другим противоопухолевым препаратам, способны вызывать как некротическую, так и апоптотическую гибель клеток.

Задача проведенных нами исследований состояла в оценке роли апоптоза в индуцируемом аурумакрилом и аргакрилом процессе гибели опухолевых клеток.

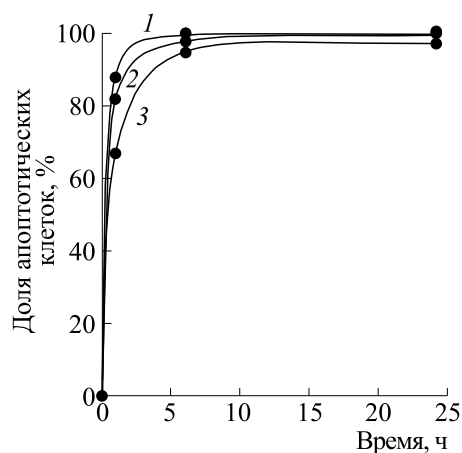
Оценка доли клеток на ранней стадии апоптоза проведена с использованием коммерческого набора Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4 с флуоресцентными красителями YO-PRO-1 и йодистым пропидием (Invitrogen, США) [40].

Проведенное исследование позволило установить, что апоптоз является доминирующим механизмом в индуцируемой аурумакрилом и аргакрилом гибели опухолевых клеток (рис. 4 и 5).

#### ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛОПОЛИАКРИЛАТОВ НА СТРУКТУРУ ДНК ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Одной из ключевых внутриклеточных мишеней, воздействие на которую может приводить к гибели опухолевых клеток, является ДНК, что подтверждает многолетний клинический опыт использования алкилирующих противоопухолевых препаратов, до сих пор входящих в арсенал основных лекарственных средств, применяемых для лечения разнообразных опухолей [7].

Известно, что в результате структурных повреждений ДНК могут возникать одно- и двунитевые разрывы ДНК, а также ДНК-сшивки, кото-



**Рис. 5.** Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аргакрила в различных концентрациях: кривая 1 – 500 мкг/мл, кривая 2 – 250 мкг/мл, кривая 3 – 100 мкг/мл. По оси абсцисс – время инкубирования клеток с аргакрилом, ч; по оси ординат – доля апоптотических клеток, %.

рые в случае отсутствия или дефектности репарации этих повреждений ведут к гибели клетки.

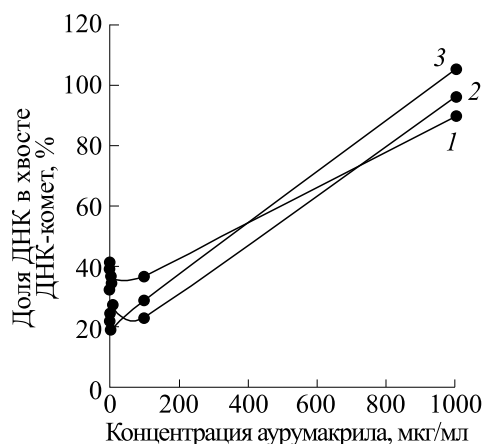
Предпринятое нами исследование было направлено на изучение способности аурумакрила и аргакрила индуцировать одностранные и двунитевые разрывы ДНК и образование ДНК-сшивок (в том числе сшивок «ДНК–белок») в опухолевых клетках (культура клеток карциномы молочной железы человека MCF-7).

Анализ одностранных разрывов ДНК, индуцированных аурумакрилом и аргакрилом, проведен с использованием метода электрофореза единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет).

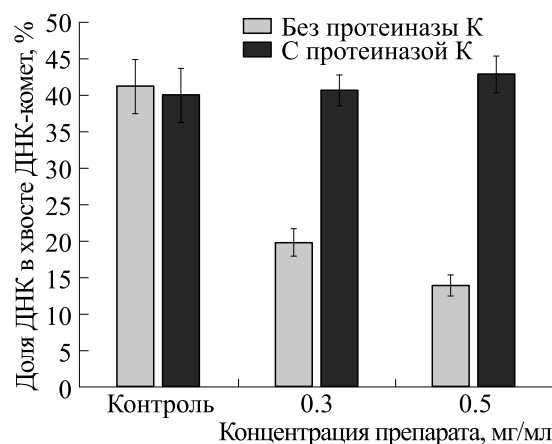
Для выяснения способности аурумакрила и аргакрила индуцировать двунитевые разрывы ДНК применен иммуноцитохимический метод определения в клетках фокусов фосфорилированного гистона H2AX ( $\gamma$ H2AX), детектирующего двунитевой разрыв ДНК.

Оценка способности препаратов индуцировать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток линии MCF-7 проведена с использованием модифицированного метода ДНК-комет в щелочных условиях. При этом для дифференциации природы сшивок «ДНК–ДНК» и «ДНК–белок» определялась доля ДНК в хвосте ДНК-комет в присутствии протеиназы К, которая, избирательно взаимодействуя с белком, позволяет регистрировать сшивки типа «ДНК–белок».

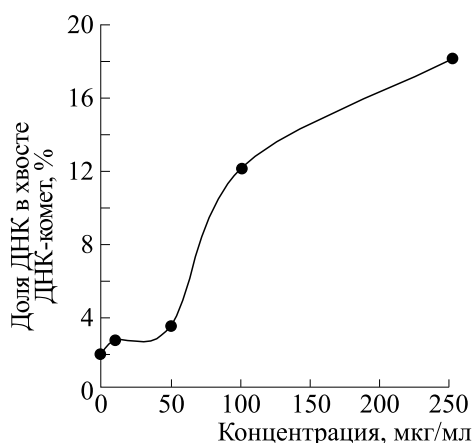
Проведенное исследование позволило выявить определенные различия в механизме влияния препаратов, содержащих золото и серебро, на структуру ДНК опухолевых клеток [41, 42].



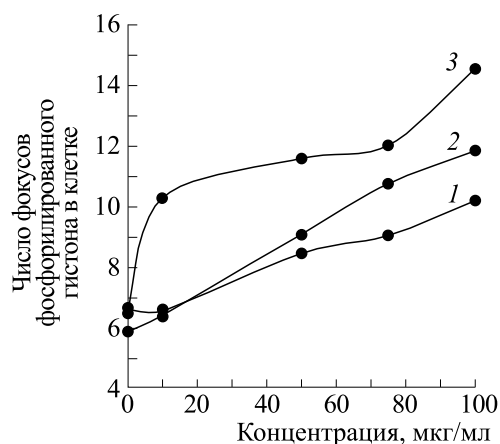
**Рис. 6.** Влияние аурумакрила на образование односторонних разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аурумакрила при различных сроках инкубации (кривая 1 – 1 ч, кривая 2 – 6 ч, кривая 3 – 24 ч).



**Рис. 7.** Индукция аурумакрилом сшивок «ДНК–белок» в молекуле ДНК опухолевых клеток линии MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аурумакрила без воздействия протеиназы К и в ее присутствии.



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



**Рис. 9.** Влияние аргакрилла на образование двусторонних разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение числа фокусов фосфорилированного гистона H2AX в зависимости от концентрации аргакрилла при инкубации клеток в течение 1 ч (кривая 1), 6 ч (кривая 2) и 24 ч (кривая 3).

Механизм действия аурумакрилла реализуется через образование односторонних разрывов ДНК (рис. 6), трансформирующихся в сшивки типа «ДНК–белок» (рис. 7).

Механизм действия аргакрилла связан с индукцией односторонних и двусторонних разрывов ДНК, число которых в два раза превосходит контрольный (спонтанный) уровень этих показателей, при отсутствии образования под влиянием препарата сшивок в молекуле ДНК (рис. 8 и 9).

Анализ данных, характеризующих влияние полиакрилатов золота и серебра на структуру ДНК опухолевых клеток (линия MCF-7), позволяет, как нам представляется, предложить следующую трактовку полученных результатов:

– механизм действия аурумакрилла реализуется через образование односторонних разрывов ДНК, трансформирующихся в сшивки типа «ДНК–белок», что, возможно, объясняет снижение спонтанного уровня двусторонних разрывов ДНК в клетках под влиянием препарата;

– механизм действия аргакрилла связан с индукцией односторонних и двусторонних разрывов ДНК, число которых в два раза превосходит контрольный (спонтанный) уровень этих показателей, при отсутствии образования под влиянием препарата сшивок в молекуле ДНК.

Эти результаты указывают на возможные различия в механизме цитотоксического действия аурумакрилла и аргакрилла, которые, вероятно,

определяются природой металлов, содержащихся в исследуемых полиакрилатах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о существенной цитотоксической, антипролиферативной и противоопухолевой активности большого числа разнообразных золото- и серебросодержащих соединений. Эти данные получены на большом числе различных экспериментальных моделей *in vitro* и *in vivo*, стандартных для современной экспериментальной противоопухолевой химиотерапии.

Исследованные соединения различаются по химическому строению, но общим для всех этих веществ является наличие в их молекулах ионов золота или серебра, что дало основание многим исследователям полагать, что цитотоксическое действие этих соединений во многом обусловлено наличием этого иона. В то же время важное значение для реализации цитотоксической и противоопухолевой активности этих соединений имеет характер лигандов, образующих с этими ионами комплексные соединения.

Среди золото- и серебросодержащих соединений, исследованных к настоящему времени в качестве потенциальных противоопухолевых агентов, следует особо выделить комплексы этих металлов с полимерами. Единственными представителями этой группы соединений пока являются золото- и серебросодержащие полиакрилаты – препараты с условными названиями аурумакрил и аргакрил.

В отличие от других изученных соединений, содержащих эти благородные металлы и представляющих собой «малые» молекулы («минимоллекулы»), полиакрилаты золота и серебра являются «макромолекулами», то есть существенно отличаются по химической структуре. Принципиальные различия в химической структуре дают основания полагать, что, возможно, аурумакрил и аргакрил имеют иные мишени и механизмы реализации противоопухолевого действия по сравнению с другими золото- серебросодержащими соединениями.

Проведенные нами доклинические исследования, выполненные на различных опухолевых моделях, показывают, что оба препарата обладают значительной цитотоксической, антипролиферативной и противоопухолевой активностью.

Вместе с тем следует отметить, что обнаружены различия в чувствительности к аурумакрилу и аргакрилу клеток опухолей животных *in vivo* и клеток опухолей человека *in vitro*, а также отличия в механизме действия препаратов, которые, веро-

ятно, определяются природой металлов, содержащихся в исследуемых полиакрилатах.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего доклинического изучения полиакрилатов, содержащих как золото, так и серебро, в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальные работы, проводимые с привлечением лабораторных животных, выполнялись в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, которые регламентированы специальными правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и научных целей (“European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS, 123)”, Strasbourg, 1986), а также биоэтическими нормативами, приводимыми в руководствах “Guide for care and use of laboratory animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press)”, “Anti-cancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval”, Second ed. (Edt. by V.A. Teicher and P.A. Andrews) // Humana Press, Totowa, New Jersey, 2004, p.450, и согласованными с Этическим комитетом при ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (правила № 51 СП 2.2.1.3218-14 от 29.08.2014).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Островская Л. А. и Корман Д. Б. *Золото и серебро в экспериментальной терапии опухолей* («Практическая медицина», М., 2023).
2. Berners-Price J. and Filipovska A. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics*, **3**, 863–873 (2011). DOI: 10.1039/c1mt00062d
3. Abdalbari F. Y. and Telleria C. M. The gold complex auranofin: New perspectives for cancer therapy. *Discov. Oncol.*, **12**, 42 (2021). DOI: 10.1007/s12672-021-00439-0
4. Massai L., Grguric-Sipka S., Liu W., Bertrand B., and Pratesi A. Editorial: The golden future in medicinal chemistry: perspectives and resources from old and new gold-based drug candidates. *Front. Chem.*, **9**, 665244 (2021). DOI: 10.3389/fchem.2021.66244
5. Diaz R. S., Shytaj I. L., Giron L. B., Obermaier B., Della Libera E. Jr., Galinskas J., Dias D., Hunter J., Janini M., Gosuen G., Ferreira P. A., Sucupira M. C., Maricato J., Fackler O., Lusic M., and Savarino A. SPARC Working Group. Potential impact of the anti-rheumatic agent auranofin on proviral HIV-1 DNA in individuals under intensified antiretroviral therapy: Re-

- sults from a randomised clinical trial. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **54** (5), 592–600 (2019). DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2019.08.001
6. Корман Д. Б. *Основы противоопухолевой химиотерапии* («Практическая медицина», М., 2006).
  7. Корман Д. Б. *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* («Практическая медицина», М., 2014).
  8. De Almeida A. M., de Oliveira B. A., de Castro P. P., de Mendonça C. C., Furtado R. A., Nicolella H. D., da Silva V. L., Diniz C. G., Tavares D. C., Silva H., and de Almeida M. V. Lipophilic gold(I) complexes with 1,3,4-oxadiazol-2-thione or 1,3-thiazolidine-2-thione moieties: synthesis and their cytotoxic and antimicrobial activities. *Biomaterials*, **30** (6), 841–857 (2017). DOI: 10.1007/s10534-017-0046-6
  9. Zhang J., Li Y., Fang E., Wei W., Wang Y., Jin J., Yang F., and Chen J. Organometallic gold (I) and gold (III) complexes for lung cancer treatment. *Front. Pharmacol.*, **13**, 979951 (2022). DOI: 10.3389/fphar.2022.979951
  10. Корман Д. Б., Островская Л. А. и Кузьмин В. А. Индукция оксидативного стресса в опухолевых клетках—новый подход к лекарственному лечению злокачественных опухолей. *Биофизика*, **64** (3), 552–561 (2019). DOI: 10.1134/s0006350919030102
  11. Quintana M., Rodriguez-Rius A., Vellé A., Vives S., Sanz Miguel P. J., and Triola G. Dinuclear silver and gold bisNHC complexes as drug candidates for cancer therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **67**, 116814 (2022). DOI: 10.1016/j.bmc.2022.116814
  12. Zhang X., Frezza M., Milacic V., Ronconi L., Fan Y., Bi C., and Dou Q. P. Inhibition of tumor proteasome activity by gold-dithiocarbamate complexes via both redox-dependent and -independent processes. *J. Cell. Biochem.*, **109** (1), 162–172 (2010). DOI: 10.1002/jcb.22394
  13. Li H., Hu J., Wu S., Wang L., Cao X., Zhang X., Dai B., Cao M., Shao R., Zhang R., Majidi M., Ji L., Heymach J. V., Wang M., Pan S., Minna J., Mehran R. J., Swisher S. G., Roth J. A., and Fang B. Auranofin-mediated inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis and anticancer activity in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*, **7** (3), 3548–3558 (2016). DOI: 10.18632/oncotarget.6516
  14. Chen X., Yang Q., Chen J., Zhang P., Huang Q., Zhang X., Yang L., Xu D., Zhao C., Wang X., and Liu J. Inhibition of proteasomal deubiquitinase by silver complex induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cell Physiol. Biochem.* **49** (2), 780–797 (2018). DOI: 10.1159/000493041
  15. Foldbjerg R., Dang D. A., and Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line A549. *Arch. Toxicol.*, **85** (7), 743–750 (2011). DOI: 10.1007/s00204-010-0545-5
  16. Medvetz D. A., Hindi K. M., Panzner M. J., Ditto A. J., Yun Y. H., and Youngs W. J. Anticancer activity of Ag(I) N-heterocyclic carbene complexes derived from 4,5-dichloro-1H-imidazole. *Metal-Based Drugs*, 2008 (1), Article ID 384010 (2008). DOI: 10.1155/2008/384010
  17. Radko L., Stypula-Treba S. S., Posyniak A., Zyro D. and Ochocki J. Silver(I) complexes of the pharmaceutical agents metronidazole and 4-hydroxymethylpyridine: comparison of cytotoxic profile for potential clinical application. *Molecules*, **24** (10), 1949 (2019). DOI: 10.3390/molecules24101949
  18. Miura N. and Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390** (3), 733–737 (2009). DOI: 10.106/j.bbrc.2009.10.039
  19. Žyro D., Śliwińska A., Szymczak-Pajor I., Stręk M., and Ochocki J. Light stability, pro-apoptotic and genotoxic properties of silver (I) complexes of metronidazole and 4-hydroxymethylpyridine against pancreatic cancer cells *in vitro*. *Cancers (Basel)*, **12** (12), 3848 (2020). DOI: 10.3390/cancers12123848
  20. Ferreira E., Munyaneza A., Omondi B., Meijboom R., and Cronjé M. J. The effect of 1:2 Ag(I) thiocyanate complexes in MCF-7 breast cancer cells. *Biomaterials*, **28** (4), 765–781 (2015). DOI: 10.1007/s10534-015-9865-5
  21. Banti C. N. and Hadjikakou S. K. Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver(I) compounds. *Metalomics*, **5** (6), 569–596 (2013). DOI: 10.1039/c3mt00046j
  22. Корман Д. Б., Островская Л. А., Блюхтерова Н. В., Рыкова В. А. и Фомина М. М. Цитотоксичность соединений серебра. *Биофизика*, **67** (4), 707–714 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922040093, EDN: ITMGRO
  23. Altay A., Caglar S., and Caglar B. Silver(I) complexes containing diclofenac and niflumic acid induce apoptosis in human-derived cancer cell lines. *Arch. Physiol. Biochem.*, **128** (1), 69–79 (2022). DOI: 10.1080/13813455.2019.1662454
  24. Rendesova M., Vargova Z., Kocher J., Sabolova D., Levoča Š., Kudláčková J., Paulíková H., Hudecová D., Helebrandtová V., Almáši M., Vilková M., Dušek M., and Bobáfová D. New silver complexes with bioactive glycine and nicotinamide molecules—Characterization, DNA binding, antimicrobial and anticancer evaluation. *J. Inorg. Biochem.*, **168**, 1–12 (2017). DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2016.12.003
  25. Human-Engelbrecht Z., Meijboom R., and Cronje M. J. Apoptosis-inducing ability of silver(I) cyanide-phosphines useful for anti-cancer studies. *Cytothechnology*, **69** (4), 591–600 (2017). DOI: 10.1007/s10616-017-0070-y
  26. Chen C., Zhou L., Xie B., Wang Y., Ren L., Chen X., Cen B., Lv H., and Wang H. Novel fast-acting pyrazole/pyridine-functionalized N-heterocyclic carbene silver complexes assembled with nanoparticles show enhanced safety and efficacy as anticancer therapeutics. *Dalton Trans.* **49** (8), 2505–2516 (2020). DOI: 10.1039/c9dt04751d
  27. Островская Л. А., Воронков М. Г., Корман Д. Б., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А., Абзаева К. А. и Жилицкая Л. В. Полиакрилаты благородных металлов как потенциальные противоопухолевые препараты. *Биофизика*, **59** (4), 785–789 (2014).
  28. Ostrovskaya L. A., Korman D. B., Bluhterova N. V., Fomina M. M., Rikova V. A., Abzaeva K. A., Zhilitskaya L. V., and Yarosh N. O. Antitumor Activity of Polyacrylates of Noble Metals in Experiment. *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **4** (4), 816–819 (2014).
  29. Островская Л. А., Корман Д. Б., Грехова А. К., Осипов А. Н., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А. и Абзаева К. А. Экспериментальное исследование противоопухолевого эффекта пре-



- парата аурумакрила. Изв. РАН. Сер. хим., **66** (12), 2333–2338 (2017). DOI: 10.1007/s11172-017-2025-z
30. Абзаева К. А., Жилицкая Л. В., Белозерская Г. Г. и Островская Л. А. Влияние природы металла на гемостатическую активность водорастворимых нанокompозитов серебра и золота. Изв. РАН. Сер. хим., **66** (12), 2314–2316 (2017). DOI: 10.1007/s11172-017-2021-3
  31. Воронков М. Г., Абзаева К. А., Жилицкая Л. В., Островская Л. А., Корман Д. Б., Фомина М. М., Блюхтерова Н. В. и Рыкова В. А. *Противоопухолевый препарат, относящийся к группе металлоорганических производных полиакриловой кислоты*. Патент РФ № 2372091 от 2009 г. Бюл. изобретений, **31** (2009).
  32. Островская Л. А., Воронков М. Г., Корман Д. Б., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А., Абзаева К. А. и Жилицкая Л. В. Полиакрилаты благородных металлов как потенциальные противоопухолевые препараты. *Биофизика*, **59** (4), 785–789 (2014).
  33. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А., Хоченкова Ю. А. и Абзаева К. А. Противоопухолевый и цитотоксический эффект полиакрилатов благородных металлов. *Биофизика*, **66** (5), 978–984 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
  34. Островская Л. А., Корман Д. Б., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А. и Абзаева К. А. Сравнительное экспериментальное изучение противоопухолевой активности аурумакрила и цитостатиков различного механизма действия. *Биофизика*, **65** (2), 360–366 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920020192
  35. Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Островская Л. А., Рябая О. О., Блюхтерова Н. В. и Абзаева К. А. Чувствительность клеток опухолей человека к цитотоксическому действию полиакрилата золота (аурумакрил). *Биофизика*, **64** (6), 1138–1145 (2019). DOI: 10.1134/S0006350919060125
  36. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Блюхтерова Н. В., Фомина М. М., Рыкова В. А., Хоченкова Ю. А. и Абзаева К. А. Противоопухолевый и цитотоксический эффект полиакрилатов благородных металлов. *Биофизика*, **66** (5), 978–984 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
  37. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Блюхтерова Н. В., Хоченкова Ю. А. и Абзаева К. А. Чувствительность опухолевых и нормальных клеток человека к полиакрилатам благородных металлов. *Биофизика*, **67** (1), 82–87 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
  38. Абзаева К. А., Воронков М. Г., Жилицкая Л. В., Островская Л. А., Фомина М. М., Блюхтерова Н. В., Рыкова В. А. Противоопухолевый эффект полиметаллоакрилатов – гемостатиков нового поколения. *Хим.-фармацевтич. журн.*, **46** (4), 11–15 (2012).
  39. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Хоченкова Ю. А., Блюхтерова Н. В. и Абзаева К. А. Полиакрилаты благородных металлов – цитотоксичность в отношении резистентных к цисплатине и доксорубину опухолевых клеток. *Биофизика*, **67** (5), 951–959 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050118, EDN: JIVQBD.
  40. Чигасова А. К., Островская Л. А. и Корман Д. Б. Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на опухолевые клетки. *Биофизика*, **67** (6), 1185–1191 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922060151, EDN: LKVLQG.
  41. Чигасова А. К., Островская Л. А. и Корман Д. Б. Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на лимфоциты крови человека. *Биофизика*, **67** (6), 1158–1162 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922060126, EDN: LKICKI.
  42. Чигасова А. К., Островская Л. А., Корман Д. Б. и Блюхтерова Н. В. Механизм цитотоксического действия полиакрилатов благородных металлов на опухолевые клетки. *Биофизика*, **68** (6), 1187–1199 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923060108, EDN: RORUYD.

## Gold and Silver Compounds as Potential Antitumor Drugs

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

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

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

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

The article presents the generalized results from studies on antitumor activity, cytotoxic effects and mechanisms of action of gold (aurumacryl) and silver (argacryl) polyacrylates in the context of modern ideas about perspectives on the possible use of gold and silver-containing compounds as potential antitumor drugs that showed promising results in experimental studies.

**Keywords:** silver polyacrylates (argacryl), gold polyacrylate (aurumacryl), antitumor activity, cytotoxic effect, transplantable animal tumors, human tumor cell cultures of human tumors

## О РОЛИ ПРАЙМИНГА В РАЗВИТИИ СОВРЕМЕННЫХ РЕАБИЛИТАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

© 2024 г. А.И. Федотчев\*, #

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

#E-mail: fedotchev@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 10.01.2024 г.

Принята к публикации 17.01.2024 г.

Проанализированы исследования последних лет, использующие прайминг, или эффект предшествования, при восстановлении нарушенных функций и когнитивной реабилитации пациентов неврологической клиники. Рассмотрены различные виды прайминга, включая транскраниальную магнитную и электрическую стимуляцию, а также предварительное предъявление акустических и зрительных стимулов. Представленные данные показывают, что диапазон условий и конкретных видов успешного применения прайминга в клинике достаточно широк, а число предпринятых исследований ежегодно возрастает. Считается, что в основе позитивных эффектов прайминга при лечении многих неврологических и психогенных расстройств лежит активация механизмов нейропластичности. На примере собственных исследований автора подчеркиваются достоинства зрительного прайминга в виде резонансного сканирования, или светодиодной фотостимуляции с градуально возрастающей частотой в пределах основных ритмов электроэнцефалограммы.

*Ключевые слова: неинвазивная стимуляция мозга, восстановление нарушенных функций, когнитивная реабилитация, индукция механизмов нейропластичности, резонансное сканирование, ЭЭГ-управляемая адаптивная нейростимуляция.*

DOI: 10.31857/S0006302924020231, EDN: OTFDFL

Прайминг, или эффект предшествования, заключается в использовании предшествующего неинвазивного воздействия, которое через механизмы возбудимости и нейропластичности модулирует эффект последующей стимуляции. В качестве прайминга может выступать тот же или другой протокол стимуляции мозга, а также любой вариант активности – когнитивная нагрузка, физические упражнения и т.п. [1]. Использование различных вариантов прайминга основано на концепции метапластичности, согласно которой порог для индукции нейропластических изменений является динамичным и существенно зависит от предшествующей активности [2, 3].

До сих пор значительное влияние прайминга на эффекты неинвазивной стимуляции мозга продемонстрировано главным образом в многочисленных исследованиях на здоровых людях [4–6]. Однако в последние годы прайминг-эффекты начинают активно использоваться при восстановлении нарушенных функций и когнитивной реабилита-

ции пациентов неврологической клиники. Цель представленной работы заключается в анализе недавних публикаций и выявлении перспектив дальнейшего развития данной линии клинических исследований.

Судя по литературным данным, наиболее активно в качестве прайминга используются транскраниальные магнитные и электрические воздействия. Показано, что предварительная ритмическая транскраниальная магнитная стимуляция с частотой альфа-ритма электроэнцефалограммы (ЭЭГ) оказывает всего за один сеанс специфический нейромодулирующий эффект у пациентов с устойчивой к медикаментозной терапии депрессией [7]. Успешная индукция нервной возбудимости и нейропластичности достигалась при сочетании транскраниальной электростимуляции переменным током с транскраниальной магнитной стимуляцией [8], а также при предварительном воздействии ритмической транскраниальной магнитной стимуляции тета-вспышками [9].

Прайминг в виде транскраниальной электрической стимуляции постоянным током вызывает

Сокращение: ЭЭГ – электроэнцефалограмма.

долговременную пластичность, сходную с потенциацией, и это приводит к восстановлению нарушенной синаптической пластичности у пациентов с психическими расстройствами, включая депрессию и шизофрению [10]. При лечении расстройств аутистического спектра, черепно-мозговых травм, болезни Альцгеймера и диабета оказалось эффективным использование прайминга в виде предварительного предъявления ритмической транскраниальной магнитной стимуляции с частотой тета-ритма ЭЭГ [11]. Периодические воздействия транскраниальной магнитной стимуляции тета-вспышками, повышающими восприимчивость мозга к последующей стимуляции, оказались успешными и при восстановлении двигательных функций после инсульта [12]. Авторы считают, что такой прайминг создает состояние повышенной возбудимости, которое позволяет использовать методы лечения, индуцирующие нейропластичность и восстановление двигательных навыков.

Акустический прайминг может эффективно использоваться как средство индукции пластичности для восстановления функций после различных повреждений и травм. С этой целью были успешно использованы сочетания громкого звука с транскраниальной магнитной стимуляцией, что вызывало долгосрочные изменения в связях между корой и стволом мозга [13]. Данный подход был реализован авторами в носимом устройстве, сочетающем громкие акустические сигналы со стимуляцией двуглавой мышцы и предназначенном для использования в условиях повседневной жизни пациентами с нарушениями ретикулоспинального тракта [14]. Показано также, что акустический прайминг (тон 40 Гц) в сочетании с транскраниальной электрической стимуляцией переменным током приводит к улучшению когнитивных функций у пациентов с болезнью Альцгеймера [15].

Зрительный прайминг использован в недавнем исследовании для выявления особенностей детей с расстройствами аутистического спектра [16]. Здоровым и больным детям предъявляли целевые стимулы в виде решеток, состоящих из горизонтальных и вертикальных линий, а праймом служили вертикальные решетки, предъявляемые с небольшим опережением. Показано, что по сравнению с нормально развивающимися детьми у детей с расстройствами аутистического спектра изменяется временной характер взаимодействия прайма с целевыми стимулами.

С целью индукции нейропластичности предложен прием сенсорной тетанизации, который заключается в предъявлении последовательности быстро повторяющихся слуховых или зрительных стимулов [17]. Считается, что такой прайминг может служить диагностическим и лечебным ин-

струментом в клинических условиях. Для выявления динамических особенностей чувствительности зрительной коры при мигрени успешно использован зрительный прайминг («чирповая» стимуляция) в виде воздействия коротких серий ритмических световых импульсов в широком диапазоне частот [18]. Установлено, что усиленная реакция на такие воздействия наблюдается за 48 ч до начала приступа мигрени, но оптимальную периодичность применения зрительного прайминга в лечении мигрени еще предстоит установить.

Ранее в наших исследованиях для оценки зрелости корковой ритмики у младших школьников был применен прием резонансного сканирования, заключающийся в анализе ЭЭГ при светодиодной фотостимуляции с градуально возрастающей частотой в пределах основных ритмов ЭЭГ [19]. Было показано, что резонансное сканирование «высвечивает» посредством резонанса тонкую структуру индивидуального спектра ЭЭГ, выявляет потенциальные резонансно-активные осцилляторы мозга и может служить приемом стимуляции механизмов нейропластичности и повышения восприимчивости мозга к последующей стимуляции. Эти данные позволили предположить, что резонансное сканирование может успешно использоваться в качестве зрительного прайминга при проведении процедур подавления экзаменационного стресса и когнитивной реабилитации студентов университета с помощью ЭЭГ-управляемой адаптивной нейростимуляции с обратной связью [20]. Это предположение подтвердилось в строго контролируемых исследованиях, где было показано, что только в условиях предварительного резонансного сканирования у студентов регистрируются значимые позитивные сдвиги когнитивных функций и показателей функционального состояния, а также снижение уровня стресса [21]. О перспективности предложенного подхода свидетельствует тот факт, что благодаря оптимизации параметров предварительного резонансного сканирования может достигаться увеличенная эффективность лечебных воздействий [22].

Таким образом, рассмотренные данные показывают, что диапазон условий успешного применения прайминга в клинике достаточно широк, как и конкретные его характеристики (табл. 1). Вместе с тем на таблице можно отметить, что количество предпринятых исследований в последние годы экспоненциально увеличивается, что свидетельствует о перспективности этой линии исследований.

В заключение важно подчеркнуть, что рассмотренные примеры демонстрируют важную роль прайминга в развитии современных реабилитационных технологий. Судя по хронологии

**Таблица 1.** Динамика развития неинвазивных реабилитационных технологий, использующих прайминг

Цель/условие исследования	Вид прайминга	Предъявляемые стимулы	Ссылка
Лечение неврологических заболеваний	Транскраниальная электростимуляция переменным током	Электрическая/ магнитная стимуляция	Goldsworthy et al., 2016 [7]
Лечение неврологических заболеваний	Транскраниальная магнитная стимуляция тета-вспышками	Ритмическая магнитная стимуляция с частотой 3–5 Гц	Hordacre et al., 2017 [8]
Коррекция обучения и памяти при шизофрении	Сенсорная тетанизация	Быстро повторяющиеся слуховые или зрительные стимулы	Sanders et al., 2018 [17]
Лечение депрессии	Транскраниальная магнитная стимуляция	Ритмическая магнитная стимуляция с частотой 8–13 Гц	Zrenner et al., 2020 [9]
Лечение мигрени	Зрительный прайминг	Короткие серии ритмических световых импульсов разной частоты	Perenboom et al., 2020 [18]
Лечение двигательных нарушений	Акустический прайминг	Громкие акустические сигналы	Germann, Baker, 2021 [14]
Лечение психических расстройств	Транскраниальная электростимуляция постоянным током	Электрические+ ритмические световые стимулы	Frase et al., 2021 [10]
Восстановление двигательных функций после инсульта	Транскраниальная магнитная стимуляция тета вспышками	Ритмическая магнитная стимуляция с частотой 3–5 Гц	Zhang et al., 2022 [12]
Диагностика аутизма	Зрительный прайминг	Вертикальные/ горизонтальные решетки	Черенкова, Соколова, 2022 [16]
Определение зрелости корковой ритмики у школьников	Резонансное сканирование	Фотостимуляция с пошагово возрастающей частотой от 5 до 15 Гц	Савчук и др., 2022 [19]
Коррекция стресс-индуцированных состояний	Резонансное сканирование как зрительный прайминг	Фотостимуляция с пошагово возрастающей частотой	Fedotchev et al., 2023 [20]
Лечение болезни Альцгеймера	Акустический прайминг	Громкий тон 40 Гц+ транскраниальная электростимуляция переменным током	Liu et al., 2023 [15]
Лечение неврологических и психиатрических заболеваний	Транскраниальная магнитная стимуляция тета вспышками	Ритмическая магнитная стимуляция с частотой 3–5 Гц	Jannati et al., 2023 [11]
Двигательная реабилитация	Акустический прайминг	Звуковые щелчки+ электростимуляция	Germann et al., 2023 [13]
Когнитивная реабилитация студентов университета	Резонансное сканирование как зрительный прайминг	Фотостимуляция с пошагово возрастающей частотой	Полевая и др., 2023 [21]
Оптимизация параметров зрительного прайминга	Резонансное сканирование как зрительный прайминг	Фотостимуляция с пошагово возрастающей частотой	Федотчев и др., 2023 [22]

публикаций, эта роль со временем возрастает. Наряду с магнитными и электрическими воздействиями широкие клинические перспективы открываются в связи с использованием акустического и зрительного прайминга. Перспективным представляется применение в качестве прайминга резонансного сканирования за счет таких его достоинств, как динамичность, программно-управляемые цифровые параметры стимуляции и возможность вовлечения центральных регуляторных механизмов мозга в лечебный процесс.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-18-20075).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакулин И. С., Пойдашева А. Г., Лагода Д. Ю., Супонева Н. А. и Пирадов М. А. Перспективы развития терапевтической транскраниальной магнитной стимуляции. *Нервные болезни*, **4**, 3–10 (2021).
- Keller C. J., Huang Y., Herrero J. L., Fini M. E., Du V., Lado F. A., Honey Ch. J., and Mehta A. D. Induction and quantification of excitability changes in human cortical networks. *J. Neurosci.*, **38** (23), 5384–5398 (2018). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1088-17.2018
- Бакулин И. С., Пойдашева А. Г., Забирова А. Х., Супонева Н. А. и Пирадов М. А. Метапластичность и неинвазивная стимуляция мозга: поиск новых биомаркеров и направлений терапевтической нейромодуляции. *Анналы клинич. эксперим. неврологии*, **16** (3), 74–82 (2022). DOI: 10.54101/ACEN.2022.3.9
- Hassanzahraee M., Zoghi M., and Jaberzadeh S. How different priming stimulations affect the corticospinal excitability induced by noninvasive brain stimulation techniques: a systematic review and meta-analysis. *Rev. Neurosci.*, **29** (8), 883–899 (2018). DOI: 10.1515/revneuro-2017-0111
- Haslacher D., Nasr K., Robinson S. E., Braun Ch., and Soekadar S. R. A set of electroencephalographic (EEG) data recorded during amplitude-modulated transcranial alternating current stimulation (AM-tACS) targeting 10-Hz steady-state visually evoked potentials (SSVEP). *Data Brief*, **36**, 107011 (2021). DOI: 10.1016/j.dib.2021.107011
- Liu B., Yan X., Chen X., Wang Y. and Gao X. tACS facilitates flickering driving by boosting steady-state visual evoked potentials. *J. Neural Eng.* **18** (6), 066042 (2021). DOI: 10.1088/1741-2552/ac3ef3
- Goldsworthy M. R., Vallence A. M., Yang R., Pitcher J. B., and Ridding M. C. Combined transcranial alternating current stimulation and continuous theta burst stimulation: a novel approach for neuroplasticity induction. *Eur. J. Neurosci.*, **43** (4), 572–579 (2016).
- Hordacre B., Goldsworthy M. R., Vallence A. M., Darvishi S., Moezzi B., Hamada M., Rothwell J. C., and Ridding M. C. Variability in neural excitability and plasticity induction in the human cortex: A brain stimulation study. *Brain Stimul.*, **10**, 588–595 (2017). DOI: 10.1016/j.brs.2016.12.001
- Zrenner B., Zrenner C., Gordon P. C., Belardinelli P., McDermott E. J., Soekadar S. R., Fallgatter A. J., Ziemann U., and Müller-Dahlhaus F. Brain oscillation-synchronized stimulation of the left dorsolateral prefrontal cortex in depression using real-time EEG-triggered TMS. *Brain Stimul.*, **13** (1), 197–220 (2020). DOI: 10.1016/j.brs.2019.10.007
- Frase L., Mertens L., Krahl A., Bhatia K., Feige B., Heinrich S. P., Vestring S., Nissen Ch., Domschke K., Bach M., and Normann C. Transcranial direct current stimulation induces long-term potentiation-like plasticity in the human visual cortex. *Transl. Psychiatry*, **11** (1), 17 (2021). DOI: 10.1038/s41398-020-01134-4
- Jannati A., Oberman L. M., Rotenberg A., and Pascual-Leone A. Assessing the mechanisms of brain plasticity by transcranial magnetic stimulation. *Neuropsychopharmacology*, **48** (1), 191–208 (2023). DOI: 10.1038/s41386-022-01453-8
- Zhang J. J., Bai Z., and Fong K. N. Priming intermittent theta burst stimulation for hemiparetic upper limb after stroke: A randomized controlled trial. *Stroke*, **53** (7), 2171–2181 (2022). DOI: 10.1161/STROKEAHA.121.037870
- Germann M., Maffitt N. J., Poll A., Raditya M., Ting J. S. K., and Baker S. N. Pairing transcranial magnetic stimulation and loud sounds produces plastic changes in motor output. *J. Neurosci.*, **43** (14), 2469–2481 (2023). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0228-21.2022
- Germann M. and Baker S. N. Evidence for Subcortical Plasticity after Paired Stimulation from a Wearable Device. *J. Neurosci.* **41** (7), 1418–1428 (2021). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1554-20.2020
- Liu Y., Liu S., Tang C., Tang K., Liu D., Chen M., Mao Z., and Xia X. Transcranial alternating current stimulation combined with sound stimulation improves cognitive function in patients with Alzheimer's disease: Study protocol for a randomized controlled trial. *Front. Aging Neurosci.*, **14**, 1068175 (2023). DOI: 10.3389/fnagi.2022.1068175
- Черенкова Л. В. и Соколова Л. В. Зрительный прайминг у детей с расстройствами аутистического спектра. *Клиническая и специальная психология*,

- 11** (2), 192–209 (2022). DOI: 10.17759/cpse.2022110109
17. Sanders P. J., Thompson B., Corballis P. M., Maslin M., and Searchfield G. D. A review of plasticity induced by auditory and visual tetanic stimulation in humans. *Eur. J. Neurosci.*, **48** (4), 2084–2097 (2018). DOI: 10.1111/ejn.14080
18. Perenboom M. J. L., van de Ruit M., Zielman R., van den Maagdenberg A. M. J. M., Ferrari M. D., Carpay J. A., and Tolner E. A. Enhanced pre-ictal cortical responsivity in migraine patients assessed by visual chirp stimulation. *Cephalalgia*, **40**, 913–923 (2020). DOI: 10.1177/0333102420912
19. Савчук Л. В., Полевая С. А., Парин С. Б., Бондарь А. Т. и Федотчев А. И. Резонансное сканирование и анализ электроэнцефалограммы при определении зрелости корковой ритмики у младших школьников. *Биофизика*, **67** (2), 354–361 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922020181
20. Fedotchev A., Parin S., and Polevaya S. Resonance Scanning as an Efficiency Enhancer for EEG-Guided Adaptive Neurostimulation *Life*, **13** (3), 620 (2023). DOI: 10.3390/life13030620
21. Полевая С. А., Парин С. Б. и Федотчев А. И. Сочетание ЭЭГ-управляемой адаптивной нейростимуляции с резонансным сканированием в коррекции стрессиндуцированных состояний и когнитивной реабилитации студентов университета. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **175** (6), 710–714 (2023). DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-6-710-714
22. Федотчев А. И., Полевая С. А. и Парин С. Б. Эффективность ЭЭГ-управляемой адаптивной нейростимуляции увеличивается при оптимизации параметров предшествующего резонансного сканирования. *Физиология человека*, **49** (5), 17–24 (2023). DOI: 10.31857/S0131164623600039

## On the Role of Priming in the Development of Modern Rehabilitation Technologies

A.I. Fedotchev\*

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

Research studies conducted over the last years relating to the use of priming or the precedence effect while restoring impaired functions and cognitive rehabilitation of patients in a neurological clinic are analyzed. This paper is about the wide variety of priming, including transcranial magnetic and electrical stimulation, as well as preliminary presentation of acoustic and visual stimuli. The data presented show a wide range of conditions under which specific types of priming can be successfully used in the clinic, taking into account that the number of studies is growing every year. It is thought that the activation of neuroplasticity mechanisms underlies the positive effects of priming in the treatment of various neurological and psychogenic disorders. Based on the results obtained, the present research demonstrates that visual object priming is effective through the procedure of resonance scanning, or LED photostimulation with the frequency gradually increasing in the range of main EEG rhythms.

*Keywords: non-invasive brain stimulation, restoration of impaired functions, cognitive rehabilitation, induction of neuroplasticity mechanisms, resonance scanning, EEG-guided adaptive neurostimulation*

## К ИСТОРИИ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ В ИНСТИТУТЕ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© 2024 г. А.И. Бурдыгин\*, К.Б. Иванов\*.,# , С.М. Коротков\*, К.В. Соболев\*, И.В. Шемарова\*

\*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
просп. Тореза, 44, Санкт-Петербург, 194223, Россия

#E-mail: kbivanov@iephb.ru

Поступила в редакцию 03.11.2023 г.

После доработки 14.02.2024 г.

Принята к публикации 06.03.2024 г.

Данной работой группа научных сотрудников, отражая чувства многочисленных коллег бывшей Лаборатории функциональной биохимии мышц (Лаборатория № 18) Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, решила поздравить Владимира Петровича Нестерова с 90-летним юбилеем и выразить ему, как своему недавнему руководителю, искреннюю благодарность за годы совместной и дружной творческой работы, а также пожелать здоровья, семейного счастья и новых достижений в Науке.

*Ключевые слова:* Институт эволюционной физиологии и биохимии, история исследований, биологическая подвижность.

DOI: 10.31857/S0006302924020243, EDN: OTCXMU

21 января 2024 года исполнилось 90 лет главному научному сотруднику Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (ИЭФБ РАН), доктору биологических наук Владимиру Петровичу Нестерову. Шестьдесят шесть лет он проработал в этом институте и большую часть своей жизни – 48 лет – заведовал Лабораторией функциональной биохимии мышц (Лаборатория № 18). За эти годы в ИЭФБ сформировался целый ряд самостоятельных творческих направлений, развивающих научное наследие основателя ИЭФБ РАН – академика Леона Абгаровича Орбели. Одним из создателей нового научного направления исследований участия и роли распространенных в биосфере физиологически активных неорганических катионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и др.) в формировании и обеспечении сократительной функции мышц в процессе эволюции животных и человека стал В.П. Нестеров. Близость этой тематики с проблемами, изучаемыми в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), который обеспечивает в нашей стране координацию исследований по научному направлению «Биологическая подвижность», неразрывно связывает работы коллективов наших институтов. Представляет интерес рассмотреть историю развития указанного направления исследований в ИЭФБ

РАН на примере конкретных фактов и событий, которые сопровождали на этом пути В.П. Нестерова.

Для лучшего понимания исходной обстановки, в которой зарождалось и формировалось это научное направление под руководством В.П. Нестерова, стоит также рассмотреть некоторые более ранние страницы общей истории биологической науки в нашей стране. Советская биология, находившаяся на высоком мировом уровне до Великой Отечественной войны 1941–1945 гг., в 50-е годы XX столетия была разгромлена. Две основные научные сессии – сессия ВАСХНИЛ в 1948 г. и, особенно, «Павловская» сессия в 1950 г., организованные Сталинским режимом для подчинения ученых идеологическому контролю, нанесли такой удар, от которого советская биология долгое время не могла полностью оправиться. К 1950 г. уже не стало академика И.П. Павлова, лично спасавшего арестованных ученых, но оставался Л.А. Орбели, который становится преемником И.П. Павлова на постах профессора, начальника кафедры физиологии ВМА, а в 1943–1950 гг. – и начальника Военно-медицинской академии. Однако И.В. Сталин не смог простить Леону Абгаровичу отказ в поддержке Лысенко, и в октябре 1949 г. он пишет Ю.А. Жданову: «... чем скорее будет разоблачен Орбели и чем основательнее будет



ликвидирована его монополия, — тем лучше...» В результате в 1950 г. Леон Абгарович был лишен всех занимаемых им должностей. Но время идет, и многое меняется. В СССР в 1956 г. был разоблачен культ личности И.В. Сталина, в этом же году в Ленинграде создается новый Институт эволюционной физиологии им. И.М. Сеченова АН СССР, директором которого назначается недавно реабилитированный академик Л.А. Орбели.

В 1952 г. Владимир Нестеров со своим приятелем Вадимом Глазуновым закончили среднюю школу № 308 и поступили на химический факультет Ленинградского государственного университета им. Ю.А. Жданова. По словам Владимира Петровича, ими, пережившими Великую Отечественную войну и блокаду Ленинграда, руководило желание выучиться и участвовать в научных разработках, связанных с укреплением обороноспособности нашей страны, в частности, с созданием ответной атомной бомбы. Еще не до конца представляя свой путь в науке, молодые люди с энтузиазмом окунулись в новую для них университетскую учебную среду. В 1957 г. они получили дипломы «Химика-исследователя» по специальности «Радиохимия».

Дипломную работу В.П. Нестеров выполнил в лаборатории чл.-корр. АН СССР, д.х.н. Иосифа Евсеевича Старика в Радиовом институте АН СССР (РИАН), где тот был зам. директора по научной работе, а также по совместительству исполнял обязанности заведующего кафедрой радиохимии на химфаке ЛГУ.

Осенью 1957 г. по инициативе Л.А. Орбели и рекомендации И.Е. Старика трое радиохимиков, выпускников химфака ЛГУ, — В.В. Глазунов, В.Г. Леонтьев и В.П. Нестеров — были зачислены в Группу естественной радиоактивности («Группа ЕР») Института эволюционной физиологии (ИЭФ) АН СССР, которой руководил к. вет. н. Л.Г. Шахиджанян. Свершилась мечта молодых людей — они были приняты на работу в Институт, которым руководил всемирно известный ученый с безупречной репутацией, академик, генерал-полковник медицинской службы Л.А. Орбели, а их научным куратором оставался чл.-корр. АН СССР И.Е. Старик, лауреат трех Сталинских премий первой степени, что говорило о многом!

#### НАУЧНО-ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ЗАДАЧИ «ГРУППЫ ЕР»

Введение «Группы ЕР» в состав научных подразделений ИЭФ АН СССР было связано с пониманием того, что в мире в результате проведения интенсивных испытаний ядерного оружия возникла новая весьма актуальная проблема — в биосфере стали активно накапливаться осколочные радиоактивные изотопы ( $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{90}\text{Sr}$  и др.), что

требовало глубокого и всестороннего изучения. Применительно к формируемому новому Институту это было мотивировано еще и тем, что в 1949 г. неожиданно в возрасте всего 33 лет умирает дочь Л.А. Орбели — Мария Леоновна, ученый-физик, которая трудилась в Радиовом институте, где и заработала острую лучевую болезнь. Личное горе объединило этих двух выдающихся российских ученых, которые решили, что в Мире появился новый опасный биосферный фактор в виде возрастающей радиации, который может повлиять на естественные процессы эволюции человека и животных, и что его необходимо тщательно исследовать. Именно с этой целью, опираясь на высочайший научный авторитет Л.А. Орбели и И.Е. Старика, и была создана «Группа ЕР» в новом Институте. Научной задачей ее коллектива стало изучение накопления радионуклидов в объектах биосферы и, в первую очередь, в органах и тканях человека и животных разного уровня эволюционного развития. На первом этапе были разработаны и внедрены в лабораторную практику самые надежные способы первичной обработки биоматериала и наиболее чувствительные и точные методы анализа содержания катионов в тканях, а также способы оценки уровней их естественной радиоактивности [1, 2].

#### ПРИМЕРЫ ВНЕДРЕНИЯ НАУЧНЫХ НАРАБОТОК В ПРАКТИЧЕСКУЮ ЖИЗНЬ СТРАНЫ

Первым профессиональным испытанием для сотрудников «Группы ЕР» в 1959 г. стала работа в экспедиции по приглашению Министерства здравоохранения Киргизии с целью определения возможности безопасной работы и проживания персонала рудника в районе, где над цистернами (с «хвостами» после извлечения солей урана) прошел сель. Последующий (в Ленинграде, в ИЭФ АН СССР) радиохимический анализ собранного биоматериала — образцов растений и тканей животных (отбор на мясокомбинате) и человека (извлечение образцов от свежих трупов в морге) — не выявил опасных уровней загрязнений.

Другой интересной ранней работой была оценка радиоактивности годовых колец деревьев в районе падения известного Тунгусского метеорита в 1908 г. Удалось выявить лишь небольшое увеличение естественной радиоактивности колец 1909–1910 гг., обусловленное повышенным накоплением в древесной ткани этих колец природного калия (попавшего в землю в виде удобрения после лесных пожаров вокруг), в котором радиоактивные изотопы ( $^{40}\text{K}$ ) являются постоянной составляющей. Никакие прочие радиоактивные изотопы не были обнаружены.

## НАЧАЛО СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЛАБОРАТОРИИ

После завершения радиохимических анализов образцов, собранных в специальных условиях экспедиций, В.П. Нестеров продолжил лабораторное изучение вопросов, определяющих причинную обусловленность специфического природного накопления и распределения основных неорганических катионов биосферы в тканях и клетках разных животных и человека, чтобы понять и предвидеть возможные пути и специфичность значительного накопления новых для биосферы осколочных радиоизотопов, например,  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$ , в их организмах. Проведенное в «Группе ЕР» сравнительное изучение радиоактивности разных тканей человека и животных выявило существенное различие в накоплении радиоизотопов цезия в тканях головного мозга и в скелетных мышцах. Активность излучения  $^{137}\text{Cs}$  на 1 г высушенной ткани мышц в несколько раз превышала таковую в ткани мозга. Появилось сомнительное предположение о возможной роли гематоэнцефалического барьера в дискриминации накопления  $^{137}\text{Cs}$  для защиты мозга от облучения. Для экспериментальной проверки этой гипотезы биофизики Д.Г. Флейшман и И.В. Буровина, а также радиохимик В.П. Нестеров разработали масс-спектрометрическую методику изотопного разбавления для определения природных микроконцентраций рубидия и цезия в тканях животных и человека. Было установлено, что разные ткани проявляют химическую специфичность при естественном накоплении природного цезия, но при этом сохраняют неизменным его изотопный состав, что отвергло упомянутую гипотезу [3, 4]. Накопление результатов анализа тканевого и клеточного содержания и распределения основных неорганических катионов биосферы, а также их радиоактивных изотопов в тканях и органах человека и животных выдвинуло задачу систематизации полученных данных и выявления взаимосвязей между распределением радионуклидов и их физико-химическими макроаналогами. Затрудняла решение этой задачи еще существовавшая в те годы неопределенность представлений среди ученых, исследующих фундаментальные закономерности накопления и трансмембранного распределения ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в живых клетках. Еще шла борьба между сторонниками мембранной и сорбционной теорий распределения этих катионов, описанная, например, в монографии известного американского биофизика Г.Н. Линга (G.N. Ling, 1962) [5]. Эти исследования выполнялись в «Группе ЕР», переименованной позднее в Лабораторию сравнительной биохимии неорганических ионов (Лабора-

тория № 23), как часть исследований мышечной ткани по научно-технической проблеме 0.74.05 (Раздел 19, «Биологическая подвижность»). Целью и главным результатом работы В.П. Нестерова стало выявление закономерностей и факторов, определяющих формирование содержания и распределения основных физиологически значимых неорганических катионов биосферы ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ) в изолированных мышечных тканях и клетках животных разного уровня развития и экологии. Проводилось по возможности сочетанное изучение параметров внутритканевого распределения катионов и функциональных (сократительных) свойств этих же мышц для установления связи между этими характеристиками.

Согласно планам НИР у В.П. Нестерова основными объектами исследования стали мышечные ткани животных, обитающих как на суше, так и в морских водоемах. При этом большое внимание уделялось именно морским животным, так как среди них встречались представители всех основных филогенетических типов, обитающих в относительно постоянных условиях общей жидкой среды, что способствовало более точному выявлению факторов формирования специфического внутриклеточного накопления и внутритканевого распределения катионов в системах мышечная клетка/внеклеточная среда. В.П. Нестеров для повышения эффективности работы в экспедициях на побережьях морей закончил на базе Института биологии южных морей АН УССР (ИНБЮМ) в Севастополе в 1962 г. школу аквалангистов и получил официальное право (удостоверение) на подводную работу с аквалангом. Можно считать, что в эти годы завершилась специализация радиохимиков бывшей «Группы ЕР» по профессиональным интересам. В.В. Глазунов продолжил работу с радиоизотопами в группе Д.Г. Флейшмана, В.Г. Леонтьев проявил больший интерес к работе с тканями мозга, а В.П. Нестеров продолжил работу с мышечными тканями, что соответствовало проблеме «Биологическая подвижность». В эти же годы изменилось и руководство научного подразделения. После увольнения Л.Г. Шахиджаняна временно исполняющим обязанности заведующего «Группой ЕР» был назначен ст.н.с., к. ф.-м. н. Д.Г. Флейшман. В качестве возможного будущего заведующего лабораторией № 23 был приглашен из РИАН СССР радиохимик, к. х. н. И.А. Скульский, тогда еще младший научный сотрудник.

В новых условиях работы В.П. Нестеров склеил себе резиновый костюм-скафандр по лекалам клуба подводников-любителей Петроградской стороны и во время второй экспедиции в Дальние Зеленцы (Мурманская обл.) в 1963 г., лично опускаясь с аквалангом на дно во время отлива, со-

брал большое количество придонных животных, обитающих в прибрежных водах Баренцева моря. Живых рыб и некоторых беспозвоночных Черно-го, Баренцева и Японского морей он получал во время экспедиций от местных профессиональных рыбаков. Во всех экспедициях с помощниками он проводил предварительную обработку материала для последующих анализов в ИЭФ АН СССР. В качестве наиболее информативных показателей были выбраны коэффициенты клеточного и/или тканевого накопления катионов:  $P_K = [K^+]_{in}/[K^+]_o$ , где  $[K^+]_{in}$  – (мг-экв/кг влажного веса ткани или клеточной массы) и  $[K^+]_o$  – (мг-экв/л внеклеточной жидкой среды), а также коэффициенты относительной клеточной или тканевой избирательности к катионам:  $S_{K/Na} = P_K/P_{Na}$  ( по возможности для оценки внутриклеточных концентраций катионов определяли межклеточный объем ткани, используя расчетное «инулиновое» пространство).

В.П. Нестеровым были выполнены многочисленные сравнительные исследования, которые показали, что для мышечной ткани разных сравнимых животных, независимо от их таксономического ранга, наибольшие положительные отклонения средних значений  $S_{K/Na}$  наблюдались в том случае, когда основной функциональный признак данной ткани (для мышц – скорость сокращения) был развит в наибольшей степени, а мышца находилась в хорошем физиологическом состоянии. Сопоставление параметров распределения катионов в тканях более чем 50 видов организмов исследованных многоклеточных животных показало, что тканевое содержание и значения параметров распределения катионов  $K^+$  и  $Na^+$  не могут быть классификационными признаками, свидетельствующими о принадлежности данного животного к тому или иному таксону, т.е. они не отражают этапы эволюционного процесса, а являются функционально обусловленными показателями, характеризующими уровни развития сократительной функции мышечных тканей [10–12].

Выявление функциональной обусловленности характера распределения щелочных ионов в мышечных тканях привлекло внимание сотрудников «Группы ЕР» к новым сведениям, содержащимся в публикации Анны Тидьи-Шебеш (А. Tigyí-Sebes, 1962) [6] из Института биофизики в Венгрии (г. Печ), где она под руководством академика Э. Эрнста (Е. Ernst) показала, что микроозоление при 380–400°C изолированных миофибрилл пчелы после их предварительной обработки раствором кобальтинитрата натрия ( $Na_3Co(NO_2)_6$ ) и промывки дистиллированной водой образует регулярно расположенные по миофибрилле поперечные полоски, отражаю-

щие, видимо, локализацию нерастворимого в воде осадка ( $K_3Co(NO_2)_6$ ), а значит и ионов  $K^+$ . В.П. Нестеров списался с А. Тидьи-Шебеш и получил от АН СССР финансовую поддержку на выезд в конце 1963 г. в научную командировку в Венгрию в Институт биофизики с целью ознакомления и совместной работы с А. Тидьи-Шебеш на миофибриллах пчелы *Apis mellifica*. После приезда в г. Печ и обсуждения проблем с акад. Э. Эрнстом и докт. А. Тидьи-Шебеш В.П. Нестеров приступил к совместной с ними работе.

Подробно ознакомившись и овладев навыками работы с этими миофибриллами, В.П. Нестеров предложил А. Тидьи-Шебеш попробовать испытать другое вещество – тетрафенилборат натрия ( $NaB(C_6H_5)_4$ ), также образующее с ионами калия нерастворимый в воде, но бо́льший по массе осадок, т.к. тетрафенилборат натрия был основным реагентом, а кобальтинитрит – трехосновным. В Венгрии в это время тетрафенилбората натрия не оказалось, и В.П. Нестеров написал письмо с просьбой найти и прислать ему, если возможно, небольшое количество этого вещества (производимого в Чехословакии) своему коллеге по ИЭФ Юрию Викторовичу Наточину, который в это время также находился в научной командировке, но в Чехословакии. Наточин прислал Нестерову это вещество, что дало возможность выполнить задуманную работу в положенный командировкой срок, за что В.П. Нестеров до сих пор очень благодарен Ю.В. Наточину. С помощью интерференционного микроскопа был определен вес сухих масс промытых дистиллированной водой и высушенных миофибрилл пчелы, обработанных  $NaB(C_6H_5)_4$ , но без их микроозоления. Новый способ анализа показал, что около 60% внутриклеточного содержания  $K^+$  было аккумуляровано в анизотропных А-дисках, примерно такое же содержание  $K^+$  (по оптической плотности) наблюдалось в Z-полосках изотропных I-дисков, а в центре А-дисков, куда не доходили актиновые филаменты, сохранялась осветленная Н-полоска, что свидетельствовало об отсутствии там накопления  $K^+$ . Такая картина говорила о специфической микролокализации связанных ионов калия в уплотненном пространстве, заполненном мостиками между миозиновыми и актиновыми филаментами. Был сделан вывод, что одной из основных функций ионов калия внутри миоцитов фазно сокращающихся мышц является нейтрализация фиксированных отрицательных зарядов белковых полиэлектролитов, образованных триадными комплексами, включающими миозиновые толстые филаменты + актиновые тонкие филаменты + мостики, соединяющие их. Практически дегидратированные ионы калия

могли, видимо, проходить между этими мостиками и создавать специфическую ионную среду, в которой они, накапливаясь, образовывали лабильные ассоциаты и, таким образом, обеспечивали циклические перемещения актиновых филаментов относительно миозиновых. Подобная аккумуляция сильно гидратированных ионов  $\text{Na}^+$  или  $\text{Li}^+$  в межмостиковом пространстве была, по-видимому, невозможной. Тем самым проявилась главная причина значительного накопления ионов  $\text{K}^+$ , а значит, и радиоактивных изотопов  $^{137}\text{Cs}$  в фазных мышечных волокнах человека и животных.

Результаты этой работы были опубликованы впервые в СССР в 1964 г. в журнале «Цитология» как отчет о проделанной В.П. Нестеровым работе [7], а переведенный на английский язык вариант текста статьи был опубликован в 1965 г. в Венгерской народной республике в журнале “Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.” [8]. Эта работа с миофибриллами пчел была очень интересной для В.П. Нестерова, а доброжелательное общение с академиком Э. Эрнстом и его сотрудниками было полезным и надолго запоминающимся. Данная работа привязала В.П. Нестерова на всю жизнь к исследованию мышечных тканей. Ко времени завершения данного исследования стало ясно, что полученные результаты будут активно обсуждаться и перепроверяться научным сообществом, как весьма важные для развития общего понимания роли и механизмов селективного внутриклеточного накопления ионов  $\text{K}^+$  в произвольных мышечных тканях животных и человека. Ведь выявлялись новые знания, имеющие отношение к исследованию физико-химических основ возникновения жизни на Земле и изучению закономерностей формирования сократительной ткани в эволюции структурно-химической организации живых организмов на нашей планете!

#### ОФИЦИАЛЬНОЕ ПРИЗНАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Докт. Г.Н. Линг (G.N. Ling) в своей монографии «In search of the physical basis of life» (1984 г., глава 8.2) сделал акцент на том, что В.П. Нестеров с А. Тидьи-Шебеш в 1964–1965 гг. в Институте биофизики под руководством академика Э. Эрнста (г. Печ, Венгрия) впервые количественно оценили характер селективного накопления ионов  $\text{K}^+$  в миоцитах произвольных мышц на примере изолированных миофибрилл крыловой мышцы медоносной пчелы *Apis mellifica* («In another paper from the same laboratory, Nesterov and Tigyí-Sebes (1965) exposed isolated myofibrils to another  $\text{K}^+$  reagent, tetraphenylborate, followed by washing. Using

an interferometer, they recorded the dry matter distribution in the myofibrils...») [9].

Время шло, и появились исследователи, которые старались применить новые технические устройства и способы для получения результатов, которые могли бы достоверно подтвердить или отвергнуть полученные В.П. Нестеровым и А. Тидьи-Шебеш данные. Г. Линг и М. Ошсенфельд (М.М. Ochsenfeld) в 1966 г. представили доказательства того, что  $\text{Cs}^+$  и  $\text{Tl}^+$  могут стехиометрически конкурировать за те же сайты, которые адсорбируют  $\text{K}^+$  в мышцах. Эти тяжелые катионы обладают повышенной электронной плотностью и имеют большие атомные массы – 132.9 и 204.4 соответственно, значительно превышающие массу  $\text{K}^+$ . Поэтому они позволяют непосредственно визуализировать катионы, используя их плотность в пучке электронного микроскопа. Л. Эдельман (Ludwig Edelmann, 1977) развил этот метод и применил метод freeze-drying и другие способы первичной обработки, сохраняющие нативную структуру мышечного препарата. Многочисленные работы Эдельмана и других специалистов в последующие годы, использовавших метод электронной микроскопии, подтвердили, что большая часть  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Tl}^+$  и  $\text{K}^+$  локализована в А-дисках, и их концентрация там в три раза больше, чем в I-дисках. Таким образом, стало возможно уверенно утверждать, что В.П. Нестеров и А. Тидьи-Шебеш в своей совместной работе 1964–1965 гг. впервые в мире получили подтвержденные количественные результаты, характеризующие реальную микролокализацию  $\text{K}^+$  в структурах саркомеров миофибрилл пчелы. Эти новые знания отражали принципиальный характер внутриклеточного распределения и селективного накопления щелочных катионов семейства слабо гидратированных ионов калия ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) в фазных скелетных и сердечных мышцах высших животных и человека.

В качестве зримого знака дополнительного подтверждения результатов, полученных В.П. Нестеровым и А. Тидьи-Шебеш в 1964 г., стоит кратко рассказать историю, которая произошла с В.П. Нестеровым в декабре 1967 г. в Лондоне. В это время он находился в научной командировке в Лондонском университете и работал в лаборатории докт. Э.Дж. Харрис (E.J. Harris), изучая особенности обращенного транспорта  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через поверхностную мембрану «теней» (ghosts) эритроцитов человека. Однажды В.П. Нестеров рассказал ему о своей работе в Венгрии с А. Тидьи-Шебеш. Через несколько дней Э. Харрис неожиданно передал В.П. Нестерову приглашение встретиться с сопредседателями предстоящей Зимней Лондонской международной конференции по биофизике мышечного сокращения

(Winter Meeting of British Biophysical Society on «Muscular contraction», 18–20th December of 1967). В назначенный день и час В.П. Нестеров пришел в соответствующий кабинет и познакомился с профессорами Хью Хаксли и Д.Р. Уилки (H.E. Huxley and D.R. Wilkie), которые с интересом выслушали его рассказ об исследовании микролокализации ионов  $K^+$  в структурах миофибрилл пчелы и предложили ему выступить с устным докладом на тему: «Some aspects of intracellular distribution of  $K^+$  ions» на пленарном заседании конференции. Как оказалось, в первый же день после ее открытия были запланированы доклады и В.П. Нестерова (утром), и директора Института биофизики АН СССР академика Г.М. Франка (вечером). Когда они встретились в холле, В.П. Нестеров подошел к хорошо знакомому с ним Глебу Михайловичу, чтобы поздороваться, но тот, услышав русскую речь, сильно взволновался и быстро куда-то исчез, не узнав своего знакомого. В.П. Нестеров выступил с докладом на утреннем заседании и во второй половине дня уже сидел в зале в ожидании начала вечерней сессии. Неожиданно к нему подошел Глеб Михайлович и, извинившись, что утром из-за волнения не узнал хорошо знакомого ему Владимира Нестерова, объяснил ему свое необычное поведение. Оказалось, что Г.М. Франк, уверенный в том, что он единственный ученый из СССР, командированный на эту конференцию, испугался, что другой русскоговорящий человек на конференции может быть кем-то из белоэмигрантской среды, что, как его предупреждали в Москве, может спровоцировать международный инцидент. Поэтому Г.М. Франк позвонил в советское посольство и сообщил об инциденте. В посольстве ему подтвердили участие еще одного советского специалиста в данной конференции. Рассказав эту историю, Глеб Михайлович по-дружески обнял В.П. Нестерова, и они вместе повеселились над происшедшим. Реакция участников заседания на конференции подтвердила их интерес к проблеме и значимость представленных результатов по изучению микролокализации ионов калия в миофибриллах мышц пчелы.

Последующая работа В.П. Нестерова в СССР выполнялась снова в Лаборатории сравнительной биохимии неорганических ионов (Лаборатория № 23, бывшая «Группа ЕР») как часть плановых исследований по научно-технической проблеме 0.74.05 (Раздел 19, «Биологическая подвижность»). Целью и главным результатом работы В.П. Нестерова стало дополнительное подтверждение связи между формированием повышенного содержания ионов калия в разных произвольных мышечных тканях животных и уровнем специализации этих мышц для выполнения быстрых фазных сократительных актов.

Выявление этой взаимосвязи при различных воздействиях на животных дало В.П. Нестерову возможность предложить и обосновать использование данных о распределении  $Na^+$  и  $K^+$  в изолированных мышцах при их извлечении из животного в опытах *in vitro* в качестве диагностического теста («ионное тестирование») оценки состояния сократительных тканей при воздействии на их организмы экстремальных факторов окружающей среды, например, при гипербарии, гипоксии и длительной микрогравитации.

В начале 1970 г. директор ИЭФБ АН СССР академик Е.М. Крепс предложил В.П. Нестерову перейти работать в Дирекцию Ученым секретарем Института. В новой должности В.П. Нестерову пришлось научиться сочетать административную работу с более интенсивной научной деятельностью по уже традиционному направлению «Биологическая подвижность». В это же время В.П. Нестерову удалось установить контакт с руководством Института медико-биологических проблем (ИМБП) МЗ СССР и стать ответственным исполнителем заданий по теме диагностики состояния мышечных тканей крыс, совершивших полет на биоспутниках, путем использования «ионного тестирования» в соответствии с Международной программой «Интеркосмос». В.П. Нестеров лично участвовал в проведении многих полетных экспериментов на крысах (с 1970 по 1979 г.), которые летом и зимой начинались с установки лабораторных палаток в степях Казахстана сразу после приземления спутников для ускоренного первичного отбора материала от животных. Затем обработка материала продолжалась в Москве в лабораторных условиях ИМБП и заканчивалась анализами образцов в ИЭФБ. Одним из наиболее заметных результатов работы было выявление того, что из скелетных мышечных тканей белых крыс, перенесших более трех недель полета, наиболее подверженными влиянию силовой разгрузки в условиях невесомости оказались мышцы, специализированные на выполнении позно-тонической антигравитационной функции (например, *m. soleus*). Продолжительное понижение уровня функциональной активности таких мышц приводило к значительному уменьшению коэффициентов тканевой избирательности к  $K^+$  относительно  $Na^+$  ( $S_{K/Na^+}$ ). Вместе с тем было установлено, что такие изменения являются отражением адаптационных реакций на «функциональное выключение» двигательного аппарата, и они проходят в процессе реадaptации к наземной гравитации [13]. Эти результаты были учтены при модернизации костюмов космонавтов на Международной космической станции (МКС).

В 1975 г., перед уходом Е.М. Крепса с поста директора ИЭФБ, по его инициативе, а также ново-

го директора Института — чл.-корр. АН СССР В.А. Говырина, В.П. Нестеров был назначен заведующим «Лабораторией сравнительной биохимии мышечных белков», позднее переименованной в «Лабораторию функциональной биохимии мышц» (№18). Ученый Совет Института единогласно утвердил его избрание, и он руководил этой Лабораторией до июля 2021 года. Следует сказать, что В.П. Нестеров постоянно привлекал к участию в программе «Интеркосмос» и других сотрудников своей лаборатории, что расширяло рамки его исследований [14].

### НЕОЖИДАННЫЙ ВИЗИТ НОБЕЛЕВСКОГО ЛАУРЕАТА Э.Ф. ХАКСЛИ

Продолжая последовательно рассматривать историю изучения в ИЭФБ АН СССР проблемы «Биологическая подвижность», стоит вспомнить такое событие, как неожиданный приезд в 1988 г. в Лабораторию № 18 лауреата Нобелевской премии сэра Эндрю Ф. Хаксли (Andrew Fielding Huxley). Он приехал специально, чтобы встретиться с В.П. Нестеровым и пригласить его принять участие в качестве докладчика на XVIII Европейской Конференции по мышцам и подвижности, которая должна была состояться в Голландии (г. Лунтерен). Э. Ф. Хаксли, как выяснилось позднее, отобрал и затем лично пригласил пятерых ученых из разных городов СССР — из Москвы (2), Ленинграда (1), Свердловска (1) и Киева (1), работы которых были ему наиболее интересны, и он хотел обсудить их на Конференции. В.П. Нестеров участвовал в этой Конференции с докладом «Inorganic cations and muscle contractility» [15] и был очень благодарен профессору Э. Ф. Хаксли и Оргкомитету Конференции за приглашение и финансовую поддержку этой командировки.

В последние годы XX века все большее место среди работ В.П. Нестерова стали занимать вопросы изучения общей стратегии отбора и использования основных неорганических катионов биосферы для обеспечения подвижности животных, а также триггерной роли  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в процессах электромеханического сопряжения в миокарде и скелетных мышцах. В 1990 г. В. П. Нестеров был приглашен проф. Дж.Б. Франком (J.V. Frank) в Университет г. Эдмонта в Канаде для выполнения совместной работы. Ее целью было проведение экспериментального исследования, чтобы убедиться в возможности участия не только  $\text{Na}^+$ , но и  $\text{Li}^+$ -тока в трансмембранной исходной передаче активирующего сигнала, высвобождающего  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикула. В лаборатории проф. Дж.Б. Франка были выполнены эксперименты, аналогичные тем, которые проводил В.П. Нестеров у себя в ИЭФБ в Ленинграде. Были получены результаты,

подтверждающие созданные ранее представления о разных фундаментальных функциях ионов натриевого и калиевого семейств в мышцах животных. В 1991 г. В.П. Нестеров был снова приглашен в Канаду, где выступил с устным докладом «The significance of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in E.-C. Coupling in muscle» на III Международном симпозиуме по электромеханическому сопряжению в скелетных, сердечной и гладких мышцах (Banff, Canada) [16].

Наступили тяжелые 90-е годы. Становилось ясно, что уходят в прошлое морские экспедиции и активная работа с животными на биоспутниках. В Лаборатории № 18 ИЭФБ РАН продолжалось изучение физико-химических механизмов функционирования внутриклеточных катион-зависимых структур, обеспечивающих запуск и регуляцию [17–19], а также энергообеспечение [20–22] мышечного сокращения у животных. В то же время накопленный опыт исследований *in vitro* сократительных характеристик и свойств изолированных мышц разнообразных животных мотивировал расширение диапазона исследований в лаборатории и возбуждал естественный интерес к изучению *in vivo* мышечных структур на экспериментальных моделях у человека. Для В.П. Нестерова был необходим качественный разворот в его научной деятельности, который вывел бы его на новый уровень *неинвазивных* исследований функционирования мышц у человека. Анализ соответствующих литературных данных показал перспективность разработки для этого новой версии метода дифференциальной сфигмографии, использующей современные пьезодатчики, а также компьютерные технологии и алгоритмы. Такую возможность могла предоставить работа с мышечными эффекторами сердечно-сосудистой системы у пациентов — кардиомиоцитами левого желудочка сердца. Об их сократительных свойствах можно было бы судить неинвазивно по характеристикам пульсовых волн артериального давления крови, циклично выбрасываемой из левого желудочка в аорту. В результате В.П. Нестеров увлек этой идеей молодых людей — инженера-программиста А.И. Бурдыгина и студента медицинского факультета ЛГУ С.В. Нестерова, что позволило разработать и создать новый способ неинвазивного исследования функционирования мышечных эффекторов ССС у человека. Первые основные результаты их напряженной работы удалось представить в докладе В.П. Нестерова в июне 1997 г. на Первом Петербургском международном экономическом форуме. Было показано, что данный метод не только оценивает динамику изменения пульсового артериального давления крови, но и количественно определяет сократительные свойства мышечных эффекторов и характер их регуляции, используя параметры волн пульсового артериального давления крови.

Выявление новых возможностей неинвазивной диагностики сердечных сокращений у человека было замечено, начались контакты с российскими венчурными компаниями, что подтвердило актуальность данной разработки. Такие представления легли в основу создания нового, информативного и точного аналитического неинвазивного метода оценки сократительных параметров мышечных эффекторов левого желудочка сердца, характеризующих функциональное состояние сердечно-сосудистой системы и особенности ее автономной регуляции у человека. Был создан современный двухканальный компьютерный комплекс и разработан метод неинвазивного дифференциального анализа показателей динамики волн пульсового давления крови (pulse blood pressure – DPP) по скорости изменения пульсового артериального давления крови  $V_{pp}$  от времени  $t$  ( $V_{pp} = dPP/dt$ ), который отражал и характер нейроэндокринной регуляции инотропной функции сердечно-сосудистой системы у человека (Патенты РФ на изобретения 2006–2023 гг.). Опытные образцы этого комплекса прошли клинические испытания в НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, а также в Санкт-Петербургской клинической больнице РАН. Испытания показали, что данный метод достоверно и неинвазивно оценивает параметры пульсовых волн DPP у человека и не оказывает негативного воздействия на его организм. Такой проект в 2004–2007 гг. был поддержан грантами РФФИ, Президиума РАН, а также Фонда содействия развитию малых форм предприятий в науч-но-технической сфере. По условиям этого Фонда для дальнейшей разработки предложенного метода диагностики сердечно-сосудистой системы у человека было создано малое предприятие ООО «ВАСА-Пульс», а группа В.П. Нестерова должна была найти внебюджетного инвестора для дальнейшего развития этого проекта. К сожалению, коллегам не удалось встретить подходящего инвестора. Тем не менее в медицинской практике данная разработка была использована в кардиологии и впервые применена на Международной космической станции в соответствии с «Протоколом медико-биологического исследования на МКС», заключенным в 1999 г. с ГНЦ РФ – ИМБП на выполнение «Компьютерного контроля состояния сердечно-сосудистой системы человека в условиях невесомости» (руководители – д.м.н. Р.М. Баевский и д.б.н. В.П. Нестеров) [23], а также в Институте кардиологии МЗ РФ (ныне НМИЦ им. В.А. Алмазова) в Санкт-Петербурге в 2001 г. [24]. В 2012 г. на Международной технической выставке в Санкт-Петербурге работа «Артериальный пьезопульсометр для экспресс-диагностики сердечно-сосудистой системы у человека» была признана «Лучшим инновационным проек-

том в области медицины» и получила золотую медаль.

Реформирование РАН привело к изменению научных приоритетов, и с 2009 г. проект лишился официальной финансовой поддержки РАН, превратившись для авторов в хобби. Однако разрабатываемый метод продолжал жить и развиваться за счет личных средств разработчиков и нашел применение в Лаборатории № 18 ИЭФБ РАН при обследованиях функционирования сердечно-сосудистой системы у пациентов, проводимых студентами старших курсов университетских биомедфакультетов в процессе подготовки ими выпускных дипломных работ, а также аспирантами, врачами и научными сотрудниками – соискателями ученой степени кандидата наук, работа которых была связана с изучением проблем кардиологии в клиниках Минздрава России и РАН. Разработка была применена при исследовании функционального состояния сердечно-сосудистой системы и характера автономной регуляции сердечных сокращений при воздействии на испытуемых добровольцев острой экспериментальной гипоксической дыхательной газовой смеси [25], при инсульте [26], при болевом синдроме, вызванном физической травмой [27], и других заболеваниях, а также при изучении возрастных изменений периферических механизмов автономной регуляции пульсового давления крови при старении организма человека [28]. Несмотря на сохраняющиеся затруднения, В.П. Нестеров продолжает активно трудиться, о чем свидетельствуют его научные работы, список которых насчитывает более 350 публикаций.

Заканчивая описание наиболее значимых этапов истории развития исследований в рамках научной проблемы «Биологическая подвижность» в ИЭФБ РАН, стоит заметить, что, несмотря на определенные успехи сотрудников Лаборатории № 18 в их профессиональной деятельности, иногда на их жизнь и работу оказывалось негативное воздействие со стороны недоброжелателей, которые негласно и анонимно создавали препятствия на пути естественного роста и утверждения научной компетенции активных коллег. Например, В.П. Нестеров написал и представил в 1978 г. в защитный ученый совет ИЭФБ АН СССР свою докторскую диссертацию, но защитить ее удалось (единогласно) только в 1988 г. И эта задержка произошла, несмотря на официальную поддержку его диссертационной работы такими известными в нашей стране учеными, как О.Г. Газенко, П.Г. Костюк, Г.М. Франк, Б.Ф. Поглазов, Р.С. Орлов, М.М. Заалишвили, М.Д. Курский и другие. Тем не менее стоит отметить, что коллектив Института, несмотря на все сложности своей деятельности сумел создать и сохранить положительную внутреннюю креативную среду, способствующую зарождению и развитию новых идей и



знаний у регулярно приходящих в его состав на протяжении уже длительного периода времени многих молодых специалистов — наших будущих ученых. В виде своеобразной эстафетной палочки для них мы прикладываем ссылку на нашу последнюю публикацию 2023 г. по научному направлению «Биологическая подвижность» [29].

В заключение мы от имени всех многочисленных сотрудников бывшей Лаборатории функциональной биохимии мышц (Лаборатории № 18) ИЭФБ РАН, включая группы, возглавляемые профессорами М.Н. Перцевой и В.И. Розенгартом, которые в течение ряда лет входили в состав Лаборатории № 18, поздравляем Владимира Петровича с 90-летним юбилеем и желаем ему здоровья, семейного счастья и новых достижений на творческом пути в Науке.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Шахиджян Л. Г., Флейшман Д. Г., Глазунов В. В., Леонтьев В. Г. и Нестеров В. П. Измерение естественной радиоактивности в органах человека. *ДАН СССР*, **125** (1), 208–209 (1959).
- Шахиджян Л. Г., Старик А. С., Флейшман Д. Г., Глазунов В. В., Леонтьев В. Г. и Нестеров В. П. Распределение радиоактивного цезия и стронция в органах человека и животных. *Изв. АН СССР, сер. биол.*, **3**, 442–448 (1962).
- Буровина И. В., Флейшман Д. Г. и Нестеров В. П. Масс-спектрометрический метод определения микрочислительности цезия. *Радиохимия*, **5** (2), 272–276 (1963).
- Burovina I. V., Flayshman D. G., Shmitko M. N., Nesterov V. P., and Skulsky I. A. Concentration of common caesium in animal and human muscles. *Nature*, **205** (976), 1116–1117 (1965).
- Ling G. N. *A Physical Theory of the Living State (the Association – Induction Hypothesis)* (Blaisdell Publ. Comp., New York–London, 1962).
- A. Tigyí-Sebes, Localization of potassium in the myofibril. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **22** (3–4), 243–247 (1962).
- В.П. Нестеров. Исследование микролокализации калия в миофибрилле с помощью тетрафенибората натрия и интерференционного микроскопа. *Цитология* **6**, 754–759 (1964).
- Nesterov V. P. and Tigyí-Sebes A. Localization of myofibrillar potassium with sodium tetraphenylborate. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **28**, 97–104 (1965).
- Ling G. N. In *Search of the Physical Basis of Life* (Plenum Press, New York–London, 1984). DOI: 10.1007/978-1-4613-2667-0
- Скульский И. А. и Нестеров В. П. Сравнительное исследование распределения  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  и  $\text{Cs}^+$  в мышечной ткани морских животных. *Журн. эвол. биохимии и физиологии*, **1** (2), 151–157 (1965).
- Нестеров В. П. О связи между сократительными параметрами и распределением ионов натрия и калия в скелетных мышцах позвоночных животных. *Физиол. журн. СССР*, **60** (8), 1186–1192 (1974).
- Нестеров В. П. О взаимосвязи между параметрами распределения ионов натрия и калия и сократительными свойствами мышц. *Журн. эвол. биохимии и физиологии*, **20** (5), 453–459 (1984).
- Григорьев Ю. Г., Егоров И. А. и Нестеров В. П. Физиологический эксперимент на биоспутнике «Космос-605». В *Сб. матер. Междунар. симп. по космич. биологии и медицине по программе «Интеркосмос»* (Будапешт, 1976), сб. 9, с. 82.
- Nesterov V. P., Zheludkova Z. P., and Kuznetsova L. A. Effects of prolonged space flight on rat skeletal muscle. *Acta Astronautica*, **6**, 1305–1311 (1979).
- Nesterov V. P. Inorganic cations and muscle contractility. In *Proc. XVIII Eur. Conf. on Muscle and Motility* (The Hague, 1989), 1 page.
- Нестеров В. П., Демина И. Н., Франк Дж. Б. и Нестеров С. В. Механизмы внутриклеточной передачи пускового сигнала в мышцах: стратегия преобразования в эволюции сократительной функции. *Журн. эволюц. биохим. и физиол.*, **36** (3), 268–272 (2000).
- Пахомова Е. А., Гроховский Л. П., Нестеров В. П. и Демина И. Н. О клеточных механизмах нарушения локомоторной функции мышц при церебральном спастическом параличе у детей. *Физиология человека*, **12** (5), 124–132 (1986).
- Михайлова М. В., Сафарян Э. Х. и Нестеров В. П. Локализация  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы в мембранах скелетных мышц и миокарда лягушки. *Журн. эвол. биохимии и физиологии*, **23** (2), 180–185 (1987).
- Шмелев В. К., Серебrenикова Т. П. и Нестеров В. П. Роль киназы гликогенфосфоорилазы в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулула лягушки *Rana temporaria*. *Журн. эвол. биохимии и физиологии*, **40** (1), 82–84 (2004).
- Shemarova I. V., Sobol K. V., Korotkov S. M., and Nesterov V. P. Effect of yttrium on calcium-dependent processes in vertebrate myocardium. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **50** (3), 221–226 (2014).
- Korotkov S. M., *Mitochondria as a Key Intracellular Target of Thallium Toxicity* (Elsevier Inc., 2022). DOI: 10.1016/C2021-0-03341-1
- Korotkov S. M. Mitochondrial Oxidative Stress Is the General Reason for Apoptosis Induced by Different-Valence Heavy Metals in Cells and Mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (19), 14459 (2023). DOI: 10.3390/ijms241914459
- Протокол медико-биологического исследования на МКС на выполнение «Компьютерного контроля состояния сердечно-сосудистой системы человека в условиях невесомости» (ГНЦ – ИМБП, М., 1999).
- Нестеров В. П., Хирманов В. Н., Нестеров С. В., Тюрина Т. В. и Бурдыгин А. И. Пульсометрическое изучение функционального состояния сердечно-сосудистой системы в условиях, провоцирующих развитие нейрогенных обмороков. *Бюлл. экпер. биологии и медицины*, **132** (9), 310 (2001).

25. Nesterov S. V. Autonomic regulation of the heart rate in humans under conditions of acute experimental hypoxia. *Human Physiol.*, **31** (1), 70–74 (2005).
26. Нестеров В. П., Баллюзек М. Ф., Конради А. О., Бурдыгин А. И., Коротков С. М., Шемарова И. В., Цыгвинцев С. Н. и Нестеров С. В. Осложненная инсультом кардиогемодинамика в пожилом возрасте. *Усп. геронтологии*, **29** (1), 107–115 (2016).
27. Nesterov V., Burdygin A., Ivanov K., Nesterov S., and Soroko S. I. Piezopulsometric analysis of autonomous regulation of the cardiovascular system in an elderly person under stress. *Adv. Gerontol.*, **12** (2), 149–156 (2022). DOI: 10.1134/S207905702202014X
28. Нестеров В. П., Бурдыгин А. И., Иванов К. Б., Коротков С. М., Шемарова И. В. и Нестеров С. В. Особенности автономной регуляции сердечно-сосудистой системы в позднем онтогенезе у человека. *Усп. геронтологии*, **33** (1), 74–81 (2020). DOI: 10.34922/AE.2020.33.1.009
29. Нестеров В. П., Бурдыгин А. И., Иванов К. Б., Соболев К. В. и Шемарова И. В. Пьезопульсометрический анализ функционального состояния сердечно-сосудистой системы у человека. *Биофизика*, **68** (6) 1280–1291 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923060194

## On the History of Studying of Biological Motility at the Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences

A.I. Burdygin\*, K.B. Ivanov\*, S.M. Korotkov\*, K.V. Sobol\*, and I.V. Shemarova\*

*\*I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Thoreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

On the occasion of the 90th birthday of Vladimir Petrovich Nesterov, a group of research scientists and a brigade of colleagues who have worked with him in the past in the laboratory of functional biochemistry of muscles (known as Laboratory № 18) at I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences who extend with this paper felicitations and congratulations on this special day and send heartfelt thanks for the marvelous memories of cooperation with him and work experience that was good as every team member was friendly and creative wishing him good health, the happiness that he is able to share with his family members and new achievements in Science.

*Keywords: Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, history of research, biological mobility.*

УДК 577.3

## ИБХФ РАН 30 ЛЕТ

DOI: 10.31857/S0006302924020256, EDN: OSYQAE

Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН) создан Постановлением Президиума РАН № 227 от 13 декабря 1994 года при реорганизации Института пищевых веществ РАН и на базе Отделов кинетики химических и биологических процессов, электроники органических материалов и Центра химического материаловедения Института химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН. Становление и развитие Института связано с именами таких выдающихся ученых, как академики Н. Н. Семёнов, Н. М. Эмануэль и А. Е. Шилов, профессора Е. Б. Бурлакова и М. Н. Манакон, чл.-корр. РАН А. А. Овчинников. Современное развитие Института во многом определяется блестящими работами и достижениями членов Российской академии наук М. А. Островского, С. Д. Варфоломеева, Е. Н. Николаева.

Сегодня Институту 30 лет. За это время вместе с Институтом сформировалось и развивается новое научное направление и научная специализация – «*биохимическая физика*». Биохимическая физика – в высшей степени междисциплинарная область науки, включающая физические, химические, биологические аспекты рассмотрения сложных биохимических и более сложных, чем простые молекулы, химических систем. Сейчас биохимическая физика оформилась как самостоятельное, целостное и хорошо структурированное направление со своими концепциями и отличительными особенностями, которые открываются из-за взаимообогащения и «перекрестного опыления» химии, биологии, физики. Как сказал знаменитый химик, лауреат Нобелевской премии Жан Мари Лен: «Выделение понятий и создание для них терминов играет очень важную роль не только в оформлении новой области науки, но и в активизации творческого воображения исследователя. Для полета воображения бывает достаточно одного «волшебного», удачно подобранного слова. Удачный термин сам стимулирует развитие понятия». Все сказанное, безусловно, приложимо к *биохимической физике*. Заложенный таким образом основателями Института потенциал развития удачно реализуется и определяет успех и прорывной характер многих достижений ИБХФ РАН.

К настоящему времени в Институте развиваются семь важнейших направлений современной биохимической физики:

- биокаталитические технологии;
- новые ресурсосберегающие и природоподобные технологии для энергетики;
- новые композиционные материалы на основе полимеров, биомакромолекул, наноматериалов, методы исследования и компьютерное моделирование их свойств;
- биохимическая фотоника;
- физическая химия высокочувствительных биоаналитических процессов и новые сенсорные материалы;
- медико-биологические технологии;
- полифункциональные композиции для пищевых продуктов.

*Развитие биокаталитических технологий* включает в себя следующие работы:

- разработку новых биокатализаторов и биокаталитических систем, в том числе в виде иммобилизованных клеток микроорганизмов и водорослей, для технологий получения органических соединений из биомасс, а также для нейтрализации токсических веществ;
- компьютерное моделирование сложных ферментативных реакций и функционирования полиферментных систем, необходимых для создания новых биотехнологических процессов, в этой части особое место занимают работы по применению методов квантовой химии для моделирования биокаталитических и рецепторных систем.

Исследования по направлению *новые ресурсосберегающие и природоподобные технологии для энергетики* сконцентрированы на целом ряде направлений. Среди них можно выделить следующие:

- создание фундаментальных основ новых биокаталитических процессов получения биотоплив из возобновляемого сырья и комплексной переработки биомассы в газообразное и жидкое топливо;
- разработка методов получения высокооктановых биодобавок к топливам, в том числе на основе использования магнитоуправляемых нанокатализаторов;
- фундаментальные исследования в области фотовольтаики, создание технологий инновационного производства высокоэффективных фото-

вольтаических преобразователей солнечной энергии нового поколения на основе металлооксидных и перовскитных солнечных элементов;

– солнечно-водородные системы для получения зеленого водорода под действием солнечного излучения;

– накопители энергии на основе графена.

Важнейшей областью современного материаловедения является *создание новых композиционных материалов на основе полимеров, биомакромолекул, наноразмерных материалов, методы исследования и компьютерное моделирование их свойств*. Работы в этом направлении сосредоточены на получении, исследовании и моделировании:

– композиций природных и синтетических полимеров с высокой степенью биоразлагаемости и антибактериальными свойствами;

– огнезащитных покрытий, созданных на основе окисленных производных природных полисахаридов;

– электрофизических свойств органических материалов, наноструктур;

– материалов для радиоэлектроники, мультиспектральных средств снижения заметности, тепло- и звукоизоляции, обеспечения электромагнитной безопасности и защиты информации.

Кроме того, активно развиваются методы неразрушающего контроля микромеханических разрушений армированных композитов и процессов прижизненной деградации полимерных имплантов методами акустической микроскопии и рентгеновской микротомографии.

В целях развития работ в области материаловедения с использованием современных вычислительных методов, таких как квантово-химические методы, эволюционные алгоритмы, методы машинного обучения и искусственного интеллекта, в Институте создан Центр компьютерного моделирования неорганических и композитных наноразмерных материалов.

*Биохимическая фотоника* охватывает приведенные ниже направления:

– исследование процессов в биологических и биологически важных химических системах, протекающих с участием электронно-возбужденных состояний;

– фотофизика и фотохимия биомакромолекул и биологических структур;

– изучение физико-химических основ фотобиологических процессов, включая молекулярные механизмы зрительной рецепции;

– разработка фото-, хеми- и биолюминесцентных методов исследования биологически активных соединений.

Изучение *физической химии высокочувствительных биоаналитических процессов и создание новых сенсорных материалов* сфокусировано на:

– исследовании и создании новых нанокomпозитных метаматериалов, реализующих эффект гигантского комбинационного рассеяния, для биоаналитических целей;

– исследовании возможностей новых высокочувствительных биоэлектродокаталитических и оптических систем для биосенсоров;

– поиске новых принципов и создание систем неинвазивного зондирования жизненно важных функций и патологических состояний организма;

– исследование механизмов биоаналитических процессов и создание на этой основе сенсорных систем и материалов, ориентированные на высокочувствительное, экспрессное и мультиплексное определение и мониторинг концентраций биомакромолекул, метаболитов, ксенобиотиков, биологических агентов и загрязняющих веществ в организме человека и животных, окружающей среде, пищевых продуктах и сырье;

– разработке высокоточных методов определения массовых, химических, структурных, оптических и каталитических характеристик отдельных биологически важных молекул;

– разработке алгоритмов многопараметрического анализа аналитической информации и построении прогностических моделей.

Развитие *медико-биологических технологий* включает в себя следующие направления работ:

– исследования структуры, свойств, функционирования и молекулярного полиморфизма биомакромолекул современными физическими методами и методами математического и квантово-механического моделирования биопроцессов с применением современных суперкомпьютеров;

– исследование молекулярных основ интеллекта;

– исследование молекулярных и клеточных механизмов патогенеза, мутагенеза и канцерогенеза, включая развитие окислительного стресса в живых системах, как универсального источника патологий;

– изучение механизмов и эффектов действия низкоинтенсивных физических и химических факторов на живые организмы (ионизирующая радиация, биологически активные вещества, экотоксиканты и др.);

– комплексное изучение биоантиоксидантов и создание антиоксидантной фармакотерапии;

– разработка новых лекарственных средств: противоопухолевых, противовоспалительных, для офтальмологии и фотодинамической терапии;

– разработка новых наноструктурированных форм противоопухолевых препаратов. Создание новых методов клинической диагностики;

– анализ метаболических процессов головного мозга в норме и патологии методами магнитно-резонансной спектроскопии и молекулярного моделирования;

– тканевая инженерия.

Направление *полифункциональные композиции для пищевых продуктов* связано со следующими исследованиями:

– изучение структурных, термодинамических и кинетических аспектов взаимодействий в полифункциональных многокомпонентных системах биополимеров, разработка физико-химических и ферментативных подходов к рациональному фракционированию растительного сырья для получения ингредиентов функционального и лечебного питания;

– создание научных основ для разработки широкой гаммы природных эмульгаторов и стабилизаторов нового поколения, а также систем доставки с легко варьлируемыми составом и структу-

рой на основе пищевых белков для пищевой и фармацевтической промышленности;

– разработка методов получения высокорасстворимых композиционных ингредиентов на основе пищевых биополимеров и растительных антиоксидантов для обогащения продуктов питания незаменимыми полиненасыщенными жирными кислотами (омега-3 и омега-6);

– создание методологии исследования нативных крахмалов различной полиморфной структуры и прогнозирование использования крахмалов в разнообразных пищевых системах;

– изучение поведения биополимерных систем доставки липосомальных форм нутрицевтиков в желудочно-кишечном тракте в системах *in vitro*;

– изучение природы химических изменений в пищевых продуктах при их хранении и технологической обработке.

Работы сотрудников Института, отражающие разнообразие проводимых в нем исследований, представлены в данном выпуске журнала «Биофизика».

Директор ИБХФ РАН,  
д.х.н., проф. И.Н. Курочкин

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
№ 0110172 от 4 февраля 1993 г., выдано Министерством печати и информации Российской Федерации

---

Подписано к печати	Дата выхода в свет	Формат 60×88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>	Усл. печ. л.	Уч.-изд. л.
	Тираж экз. Зак.	Цена договорная		

---

Учредители:  
Российская академия наук,  
Институт биофизики клетки РАН

---

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский пр., 14  
Исполнитель по контракту № 4У-ЕП-039-24: ФГБУ «Издательство «Наука»  
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.  
Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»  
121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1

16+

**Журналы РАН, выходящие в свет на русском языке**

Автоматика и телемеханика  
 Агрохимия  
 Азия и Африка сегодня  
 Акустический журнал  
 Астрономический вестник. Исследования солнечной системы  
 Астрономический журнал  
 Биологические мембраны  
 Биология внутренних вод  
 Биология моря  
 Биоорганическая химия  
 Биофизика  
 Биохимия  
 Ботанический журнал  
 Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук  
 Вестник древней истории  
 Вестник Российской академии наук  
 Вестник российской сельскохозяйственной науки  
 Водные ресурсы  
 Вопросы истории естествознания и техники  
 Вопросы ихтиологии  
 Вопросы языкознания  
 Вулканология и сейсмология  
 Высокомолекулярные соединения. Серия А  
 Высокомолекулярные соединения. Серия Б  
 Высокомолекулярные соединения. Серия С  
 Генетика  
 Геология рудных месторождений  
 Геомагнетизм и аэрономия  
 Геоморфология и палеогеография  
 Геотектоника  
 Геохимия  
 Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геоэкология  
 Государство и право  
 Дефектоскопия  
 Дифференциальные уравнения  
 Доклады Российской академии наук. Математика, информатика, процессы управления  
 Доклады Российской академии наук. Науки о жизни  
 Доклады Российской академии наук. Науки о Земле  
 Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки  
 Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах  
 Журнал аналитической химии  
 Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова  
 Журнал вычислительной математики и математической физики  
 Журнал неорганической химии  
 Журнал общей биологии  
 Журнал общей химии  
 Журнал органической химии  
 Журнал прикладной химии  
 Журнал физической химии  
 Журнал эволюционной биохимии и физиологии  
 Журнал экспериментальной и теоретической физики  
 Записки Российского минералогического общества  
 Зоологический журнал  
 Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа  
 Известия Российской академии наук. Механика твердого тела  
 Известия Российской академии наук. Серия биологическая  
 Известия Российской академии наук. Серия географическая  
 Известия Российской академии наук. Серия литературы и языка  
 Известия Российской академии наук. Серия физическая  
 Известия Российской академии наук. Теория и системы управления  
 Известия Российской академии наук. Физика атмосферы и океана  
 Известия Российской академии наук. Энергетика  
 Известия Русского географического общества  
 Исследование Земли из Космоса  
 Кинетика и катализ  
 Коллоидный журнал  
 Координационная химия  
 Космические исследования  
 Кристаллография  
 Латинская Америка  
 Лёд и Снег  
 Лесоведение  
 Литология и полезные ископаемые  
 Мембраны и мембранные технологии  
 Металлы  
 Микология и фитопатология  
 Микробиология  
 Микроэлектроника  
 Молекулярная биология  
 Нейрохимия  
 Неорганические материалы  
 Нефтехимия  
 Новая и новейшая история  
 Общественные науки и современность  
 Общество и экономика  
 Океанология  
 Онтогенез  
 Палеонтологический журнал  
 Паразитология  
 Петрология  
 Письма в Астрономический журнал  
 Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики  
 Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования  
 Почвоведение  
 Приборы и техника эксперимента  
 Прикладная биохимия и микробиология  
 Прикладная математика и механика  
 Проблемы Дальнего Востока  
 Проблемы машиностроения и надежности машин  
 Проблемы передачи информации  
 Программирование  
 Психологический журнал  
 Радиационная биология. Радиоэкология  
 Радиотехника и электроника  
 Радиохимия  
 Расплавы  
 Растительные ресурсы  
 Российская археология  
 Российская история  
 Российская сельскохозяйственная наука  
 Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова  
 Русская литература  
 Русская речь  
 Сенсорные системы  
 Славяноведение  
 Современная Европа  
 Социологические исследования  
 Стратиграфия. Геологическая корреляция  
 США и Канада: экономика, политика, культура  
 Теоретические основы химической технологии  
 Теплофизика высоких температур  
 Успехи современной биологии  
 Успехи физиологических наук  
 Физика Земли  
 Физика и химия стекла  
 Физика металлов и металловедение  
 Физика плазмы  
 Физикохимия поверхности и защита материалов  
 Физиология растений  
 Физиология человека  
 Химическая физика  
 Химия высоких энергий  
 Химия твердого топлива  
 Цитология  
 Человек  
 Экология  
 Экономика и математические методы  
 Электрохимия  
 Энтомологическое обозрение  
 Этнографическое обозрение  
 Ядерная физика