

ISSN 0006-3029

Том 69, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2024



БИОФИЗИКА



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 69, номер 6, 2024

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

- Формирование сложной пространственной структуры днк в процессе синтеза *ab initio*
Н.В. Зырина, О.М. Селиванова, Е.В. Шевченко, В.Н. Антипова 1147
- Влияние способа закрепления на характеристики растяжения ДНК
М.А. Дидин 1153
- Анализ редактирования рнк в консервативных участках последовательности гена RPS12 трипаносоматид
Е.С. Герасимов, Ю.А. Руденская, Е.А. Брюшкова, О.А. Коржавина, А.А. Колесников 1167

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

- Транспорт глицерина через мембрану сперматозоида человека при криоконсервации
А.А. Иванова, И.И. Леонов, Е.С. Гнилозуб-Волобуева, М.А. Овчинников, С.А. Яковенко, Е.Ю. Симоненко 1175
- Цитопротекторное и антиоксидантное действие ресвератрола на лимфоциты человека, модифицированные пероксидом водорода и УФ-светом
М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов, Е.Н. Чурсанова, О.В. Мячина, Е.И. Корпусова, А.Ю. Деенкова, В.А. Шестых 1185
- Изучение функционального состояния митохондрий сердца инбредных мышей при сахарном диабете 2 типа
Ю.Л. Бабурина, И.В. Одинокова, Р.Р. Крестинин, А.И. Звягина, Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина 1195
- Применение фосфолипидов с полиненасыщенными жирными кислотами в хвостовых группах позволяет предотвратить снижение подвижности сперматозоидов плодовой мушки *Drosophila melanogaster* в ранний период реадaptации после космического полета
И.В. Огнева, К.К. Гогичаева, Ю.С. Жданкина, О.В. Котов 1206
- Роль двух изоформ белка теплового шока Hsp90 в обеспечении устойчивости клеток фибросаркомы человека HT1080 к ингибиторам Hsp90 и цитотоксическим препаратам
В.С. Петренко, О.С. Моренков, Ю.Ю. Скарга, М.А. Жмурина, В.В. Врублевская 1214
- Цитотоксичность полиакрилатов золота и серебра для опухолевых клеток
Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, Н.В. Блюхтерова, Ю.А. Хоченкова, К.А. Абзаева 1224
- Управление активностью мобильных элементов в раковых клетках как стратегия для противораковой терапии
С.Р. Павлов, В.В. Гурский, М.Г. Самсонова, А.А. Канапин, А.А. Самсонова 1231
- Механизмы радиорезистентности раковых клеток: современные тенденции и перспективы исследований
М.Г. Шаратов, Е.Е. Карманова, С.В. Гудков 1235

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

- Использование метода PIVmrMLM для подтверждения и поиска новых геномных ассоциаций у культурного нута
М.А. Дук, А.А. Канапин, М.П. Банкин, М.Г. Самсонова 1263

Морфологические и функциональные характеристики мускулатуры трематоды <i>Fasciola hepatica</i>	1279
<i>Н.Д. Крещенко</i>	
Морфологические особенности и временные характеристики процесса регенерации мышечной ткани у планарий <i>Polycelis tenuis</i> (Platyhelminthes)	1291
<i>Г.В. Кузнецов, Н.Д. Крещенко</i>	
Влияние бромистого этидия на пуринергическую модуляцию мионевральной передачи и сокращения скелетной мышцы	1300
<i>А.Н. Горшунцова, А.Ю. Теплов, С.Н. Гришин, Р.Д. Мухамедзянов, А.Е. Хайруллин</i>	
Комплексная оценка функционального состояния микроциркуляторного русла коры головного мозга на разных этапах старения	1306
<i>О.П. Горшкова, И.Б. Соколова</i>	
Противовирусное действие в отношении SARS-CoV-2 растворов динитрозильных комплексов железа при ингаляции сирийским хомячкам в «nose-only»-камере	1318
<i>А.В. Шиповалов, А.Ф. Ванин, Н.А. Ткачев, О.В. Пьянков, Н.Б. Асанбаева, С.В. Аньков, Е.Г. Багрянская, А.М. Бакланов, С.В. Валиулин, М.Е. Стеклёнова</i>	
Действие динитрозильных комплексов железа с лигандом на основе <i>N</i> -ацетил-L-цистеина при ингаляционном введении этих комплексов в организм крыс	1329
<i>А.А. Тимошин, К.Б. Шумаев, В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, Э.К. Рууге</i>	
Радиозащитный эффект экзогенного пероксиредоксина 6 при тотальном облучении мышей ионизирующим излучением различной мощности	1335
<i>Е.Е. Карманова, Р.Г. Гончаров, В.И. Брусков, В.И. Новоселов, М.Г. Шаронов</i>	
Защитное действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот на экспериментальной модели дисбактериоза кишечника у лабораторных крыс	1344
<i>А.Б. Ганеев, Т.П. Кулагина, Е.С. Жукова, А.В. Ариповский, М.А. Позднякова</i>	
Гибридные модели трансформаций эпидемических волн	1353
<i>А.Ю. Переварюха</i>	

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

Полисахарид из <i>Solanum tuberosum</i> L. как потенциальный противоязвенный препарат	1376
<i>Л.В. Генералова, К.А. Крицкая, Д.П. Ларюшкин, Е.А. Генералов</i>	
Катион нитрозония как противоопухолевый компонент динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами	1382
<i>А.Ф. Ванин, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, В.А. Рыкова, Н.В. Блюхтерова, М.М. Фомина, В.Д. Микоян, Н.А. Ткачев</i>	
Использование комплексов включения холестерина на основе произвольно метилированных бета-циклодекстринов для повышения криотолерантности сперматозоидов человека	1390
<i>А.Г. Миронова, С.И. Афанасьева, С.А. Яковенко, А.Н. Тихонов, Е.Ю. Симоненко</i>	

ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

Генетический анализ арктических популяций белого медведя с использованием исторических образцов	1402
<i>А.А. Канапин, А.А. Самсонова, А.В. Абрамов, М.В. Саблин, В.В. Платонов, Х.Х. Мустафин, С.А. Чекрыгин, Д. Хирата</i>	

Contents

Vol. 69, No. 6, 2024

Molecular Biophysics

Formation of Complex Spatial Structure of DNA in the Process of <i>ab initio</i> Synthesis	
<i>N.V. Zyrina, O.M. Selivanova, E.V. Shevchenko, and V.N. Antipova</i>	1147
Impact of Immobilization Method on DNA Stretching Characteristics	
<i>M.A. Didin</i>	1153
Analysis of RNA Editing in Conserved Sequence Blocks of the Trypanosomatid RPS12 Gene	
<i>E.S. Gerasimov, Y.A. Rudenskaya, E.A. Bryushkova, O.A. Korzhavina, and A.A. Kolesnikov</i>	1167

Cell Biophysics

Transport of Glycerol Through the Human Sperm Membrane during Cryopreservation	
<i>A.A. Ivanova, I.I. Leonov, E.S. Gnizub-Volobueva, M.A. Ovchinnikov, S.A. Yakovenko, and E.Yu. Simonenko</i>	1175
Cytoprotective and Antioxidant Effect of Resveratrol on Human Lymphocytes Modified with Hydrogen Peroxide and UV Light	
<i>M.A. Nakvasina, V.G. Artyukhov, E.N. Chursanova, O.V. Myachina, E.I. Korpusova, A.Yu. Deenkova, and V.A. Shestikh</i>	1185
Investigation of the Functional State of Heart Mitochondria in Inbred Mice with Type 2 Diabetes Mellitus	
<i>Y.L. Baburina, I.V. Odinkova, R.R. Krestinin, A.I. Zvyagina, L.D. Sotnikova, and O.V. Krestinina</i>	1195
The Administration of Phospholipids with Polyunsaturated Fatty Acids in the Tail Groups Makes It Possible to Prevent the Decrease of Sperm Motility of the Fruit Fly <i>Drosophila melanogaster</i> in the Early Period of Readaptation after Space Flight	
<i>I.V. Ogneva, K.K. Gogichaeva, Yu.S. Zhdankina, and O.V. Kotov</i>	1206
The Role of Two Isoforms of Heat Shock Protein Hsp90 in Resistance of Human Fibrosarcoma Cells HT1080 to Hsp90 Inhibitors and Cytotoxic Drugs	
<i>V.S. Petrenko, O.S. Morenkov, Y.Y. Skarga, M.A. Zhmurina, and V.V. Vrublevskaya</i>	1214
Cytotoxicity of Gold and Silver Polyacrylates for Tumor Cells	
<i>L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, E.I. Nekrasova, N.V. Bluhterova, U.A. Hochenkova, and K.A. Abzaeva</i>	1224
Control of the Activity of Mobile Elements in Cancer Cells as a Strategy for Anticancer Therapy	
<i>S.R. Pavlov, V.V. Gursky, M.G. Samsonova, A.A. Kanapin, and A.A. Samsonova</i>	1231
Mechanisms of Cancer Cell Radioresistance: Modern Trends and Research Prospects	
<i>M.G. Sharapov, E.E. Karmanova, and S.V. Gudkov</i>	1235

Complex Systems Biophysics

Using the IIIVmrMLM Method to Confirm and Search New Genome-Wide Associations in Chickpea	
<i>M.A. Duk, A.A. Kanapin, M.P. Bankin, and M.G. Samsonova</i>	1263
Morphological and Functional Characteristics of the Trematode <i>Fasciola hepatica</i> Musculature	
<i>N.D. Kreshchenko</i>	1279

Morphological Features and Temporary Characteristics of the Process of Muscle Tissue Regeneration in Planaria <i>Polycelis tenuis</i> (Platyhelminthes)	
<i>G.V. Kuznetsov and N. D. Kreshchenko</i>	1291
The Effect of Ethidium Bromide on Purinergic Modulation of Myoneural Transmission and Skeletal Muscle Contraction	
<i>A.N. Gorshunova, A.Yu. Teplov, S.N. Grishin, R.D. Mukhamedzyanov, and A.E. Khairullin</i>	1300
Comprehensive Assessment of the Functional State of the Cerebral Cortex Microcirculatory Bed at Different Stages of Aging	
<i>O.P. Gorshkova and I.B. Sokolova</i>	1306
Antiviral Activity of the Solutions of Dinitrosyl Iron Complex Delivered to SARS-CoV-2-Infected Syrian Hamsters Placed in a Nose-Only Inhalation Exposure Chamber	
<i>A.V. Shipovalov, A.F. Vanin, N.A. Tkachev, O.V. Pyankov, N.B. Asanbaeva, S.V. An'kov, E.G. Bagryanskaya, A.M. Baklanov, S.V. Valiulin, and M.E. Stekleneva</i>	1318
The Action of Dinitrosyl Iron Complexes with a Ligand Based on <i>N</i> -acetyl-L-cysteine upon Inhalation Delivery of These Complexes to Rats	
<i>A.A. Timoshin, K.B. Shumakov, V.L. Lakomkin, A.A. Abramov, and E.K. Ruuge</i>	1329
Radioprotective Effect of Exogenous Peroxiredoxin 6 in Mice Exposed to Different Doses of Whole-Body Ionizing Radiation	
<i>E.E. Karmanova, R.G. Goncharov, V.I. Bruskov, V.I. Novoselov, and M.G. Sharapov</i>	1335
Protective Effect of Low-Intensity Extremely High-Frequency Electromagnetic Radiation on an Experimental Model of Intestinal Dysbacteriosis in Laboratory Rats	
<i>A.B. Gapeyev, T.P. Kulagina, E.S. Zhukova, A.V. Aripovsky, and M.A. Pozdnyakova</i>	1344
Hybrid Models of Transformations of Epidemic Waves	
<i>A.Yu. Perevaryukha</i>	1353

Medical Biophysics

Polysaccharide from <i>Solanum tuberosum</i> L. as a Potential Antiulcer Drug	
<i>L.V. Generalova, K.A. Kritskaya, D.P. Laryushkin, and E.A. Generalov</i>	1376
Nitrosonium Cation as an Antitumor Component of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands	
<i>A.F. Vanin, L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, V.A. Rykova, N.V. Bluhterova, M.M. Fomina, V.D. Mikoyan, and N.A. Tkachev</i>	1382
The Use of Cholesterol/Randomly Methylated β -Cyclodextrin (RAMEB) Inclusion Complexes to Improve Human Spermatozoa Cryosurvival	
<i>A.G. Mironova, S.I. Afanasyeva, S.A. Yakovenko, A.N. Tikhonov, and E.Yu. Simonenko</i>	1390

Letters to Editorial

Genetic Analysis of Arctic Polar Bear Populations using Historical Samples	
<i>A.A. Kanapin, A.A. Samsonova, A.V. Abramov, M.V. Sablin, V.V. Platonov, H.H. Mustafin, S.A. Chekrygin, and D. Hirata</i>	1402

ФОРМИРОВАНИЕ СЛОЖНОЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ДНК В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА *ab initio*

© 2024 г. Н.В. Зырина*, **, О.М. Селиванова***, Е.В. Шевченко****, В.Н. Антипова*.,#

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

**Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН,
Институтская ул., 7, Пущино Московской области, 142290, Россия

***Институт белка РАН, Институтская ул., 4, Пущино Московской области, 142290, Россия

****Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники
Санкт-Петербургского государственного университета,
Ульяновская ул., 1, Петергоф, Санкт-Петербург, 198504, Россия

#E-mail: valery_a@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.04.2024 г.

После доработки 27.04.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

В процессе синтеза *ab initio* большим фрагментом Bst ДНК-полимеразы образуются продукты со сложной пространственной организацией. Анализ методом атомно-силовой микроскопии продуктов синтеза, полученных с добавлением минимального количества никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I, позволил описать структуры, сформированные в результате этого синтеза, и предположить, что их формирование происходит по механизму репликации, зависимой от рекомбинации.

Ключевые слова: синтез ДНК *ab initio*, большой фрагмент ДНК-полимеразы Bst, атомно-силовая микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302924060016, EDN: LGUEHW

Синтез ДНК *ab initio* – это неканонический синтез ДНК термofilными ДНК-полимеразами прокариот из dNTP в отсутствие какой-либо добавленной ДНК [1]. Реакция является изотермической и при определенных условиях может отличаться крайне высоким выходом продукта. Эффективность реакции значительно увеличивается при добавлении ферментов, гидролизующих ДНК.

Последовательности ДНК, синтезированные *ab initio* состоят из коротких АТ-богатых повторов палиндромной или непалиндромной структуры. Первые сведения о структуре этих молекул были представлены в работах [2, 3]. Эксперименты с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ), электрофореза и нуклеаз показали, что ДНК, полученная в ходе синтеза *ab initio* большим фрагментом ДНК-полимеразы Bst, как в присутствии никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I (далее никаза), так и без этого фермента, состоит из разветвленных нитей разной длины, часть из которых образует сетевидные структуры [4].

Для выяснения причины формирования сложной пространственной организации продуктов синтеза *ab initio* в этом исследовании мы сфокусировались на детальном анализе изображений, полученных с помощью АСМ. Исследовали изображения высокомолекулярной ДНК, синтезированной с добавлением минимального количества никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I и без нее, описали структуры, сформированные в результате синтеза, который не направляется матрицей, и предположили, какой механизм синтеза в этом задействован.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез ДНК *ab initio* большим фрагментом Bst полимеразы. Реакционная смесь (20 мкл) состоящая из 2 U большого фрагмента Bst полимеразы, 0.2 mM dNTPs в реакционном буфере ThermoPol (20 mM Трис–HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Тритона X-100) и 10 mM MgCl₂ была инкубирована 24 ч при 55°C. Реакционная смесь с добавленной никующей эндонуклеазой Nt.BspD6I (0.2 U) была инкубирована в течение 1 ч при 55°C. Реакцию останавливали добавлени-

Сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия.

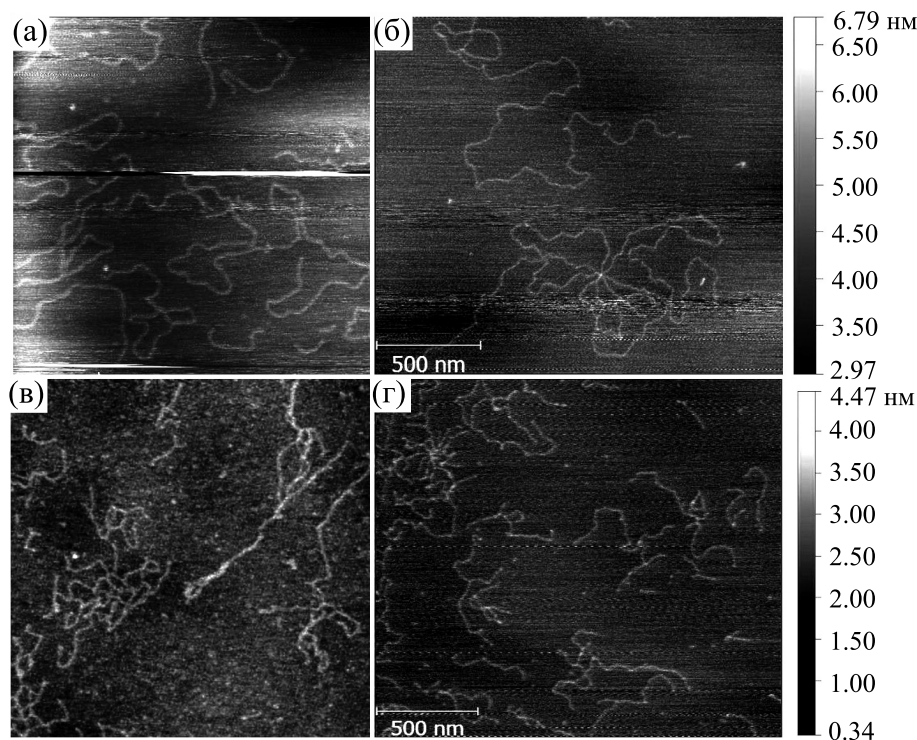


Рис. 1. Изображения, полученные методом АСМ: (а) — геномная ДНК *Bacillus stearothermophilus*, выделенная с помощью набора «ДНК-Экстран EX-512» (НПК ООО «Синтол», Москва, Россия); (б) — ДНК фага лямбда, 48502 п. о. (ООО «СибЭнзайм», Новосибирск, Россия); (в) — ДНК, полученная в процессе синтеза *ab initio* Bst-полимеразой в течение 24 ч; (г) — ДНК, полученная в процессе синтеза *ab initio* Bst-полимеразой с добавлением минимального количества (0.2 U) никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I в течение 1 ч. Буфер для нанесения на слоду: 2 mM трис-HCl (pH 7.6) и 10 mM MgCl₂. 20 мкл раствора ДНК с концентрацией 1 нг/мкл. Шкала 500 нм. Примечание: образование сложных пространственных структур ДНК, синтезированной *ab initio*, не связано с какими-либо условиями АСМ (например, концентрацией MgCl₂ или концентрацией ДНК), поскольку природные ДНК в тех же условиях представлены плавно изогнутыми линейными молекулами.

ем 10 mM ЭДТА. Продукты синтеза *ab initio* очищали, определяли концентрацию и анализировали в 1% агарозном геле, как описано в работе [4].

Атомно-силовая микроскопия. Сканирование продуктов синтеза *ab initio* было выполнено в ресурсном центре «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» Научного парка СПбГУ на исследовательском комплексе люминесцентной и рамановской микроспектрометрии «Интегра Спектра» («НТ-МДТ», Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме, как описано ранее [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

АСМ позволила выявить значительные отличия продуктов синтеза *ab initio* Bst полимеразой от природных высокомолекулярных ДНК бактериофага лямбда и геномной ДНК *Bacillus stearothermophilus* (рис. 1). Природные ДНК представлены в основном линейными плавно изогнутыми двухцепочечными молекулами. Синтезированная *ab initio* ДНК, без добавления никующей эндо-

нуклеазы Nt.BstD6I, состоит из линейных участков, объединенных в сетевидную структуру. Некоторые участки ДНК резко изогнуты, местами скручены, с ответвлениями. В целом такая ДНК выглядит как РНК с развитой вторичной структурой, подобно тРНК, а также РНК различных вирусов [5–8].

Для выяснения причины формирования сложной структуры продуктов синтеза *ab initio*, первоначально были исследованы продукты синтеза, полученные с добавлением минимального количества (0.2 U) никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I (никазы). Этот фермент «узнает» в двухцепочечной ДНК последовательность (сайт) 5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3' и расщепляет верхнюю цепь на расстоянии четырех пар нуклеотидов от сайта в направлении 3'-конца [9]. Если два противоположно ориентированных сайта расположены на небольшом расстоянии друг от друга, никаза расщепит ДНК на фрагменты. Ранее было показано, что продукты синтеза с добавлением 0.2 U никазы имеют почти такую же длину, как продукты синтеза без ее добавления [4], но мор-

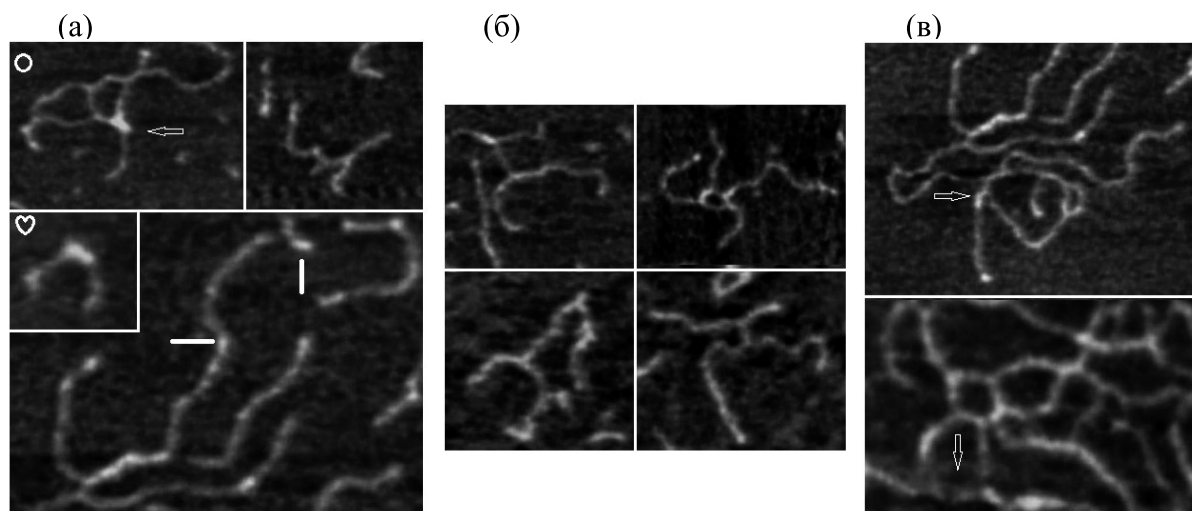


Рис. 2. Галерея АСМ-изображений продуктов синтеза *ab initio* с добавлением никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I. (а) – D-петля (показана стрелкой) на блоке с кружком, “kissing loop” – на блоке с сердечком, Y-разветвления. Небольшие утолщения на концах молекул отмечены линиями. (б) – X-разветвления. (в) – Фрагменты сложной структуры: вверху – D-кольцо с внедренными одноцепочечными участками, указаны стрелкой; внизу – D-кольцо и сложная структура, стрелкой показан одноцепочечный участок. Шкала 500 нм. Часть структур описана по аналогии с описанием в работе [12].

фология молекул менее изогнутая, они выглядят более «расслабленными» и менее «спутанными» (рис. 1г). Молекулы содержат структуры, похожие на: X- или Y-образные разветвления, петли и кольца, кольца с ответвлениями. Некоторые молекулы имеют утолщения, похожие на D-петли или R-петли [10, 11] (рис. 2). В целом оказалось, что структуры, синтезированные *ab initio* в присутствии никазы, похожи на такие же структуры (петли, кольца, разветвления), подробно охарактеризованные в работе [12]. Вероятно, эти структуры являются промежуточными продуктами репликации и рекомбинации.

Структура, представленная на рис. 2а, была идентифицирована как D-петля, по аналогии с описанием в работах [10, 11]. Возможно, концы синтезированной *ab initio* ДНК формируют D-петли, подобные тем, которые наблюдали на теломерах хромосом [13]. Похожие на D-петли структуры были идентифицированы как на концах молекул, в том числе и коротких, так и в середине молекул. Наличие петель можно объяснить резкую изогнутость некоторых участков молекул. Видимо они, как и R-петли, накладывают локальные физические ограничения на близлежащую ДНК, приводя к формированию углов/изломов [11].

Также были идентифицированы разветвленные молекулы Y-образной формы и удвоенной Y-образной формы (рис. 2а). Такие структуры могут возникнуть из больших кольцеобразных структур с разветвлениями во время репликации с двумя репликационными вилками [12]. X-об-

разные структуры на рис. 2б указывают на наличие промежуточных продуктов репликации, структур Холлидея. Для образования таких сложных структур (соединенные кольца с ответвлениями, D-кольца), как на рис. 2в, необходимы палиндромные последовательности, множественные репликационные вилки и/или рекомбинационные соединения, а также внедрения одноцепочечных концов ДНК в другой фрагмент своей же или соседней молекулы [12]. Места внедрения концов ДНК выглядят как треугольные структуры.

Интересно отметить наличие образования, похожего на “kissing loop” РНК [5] (рис. 2а), когда две разные молекулы взаимодействуют через палиндромные участки петель шпильчатых структур. Небольшие утолщения на концах молекул и по «ходу» нитей ДНК на участках с резким изгибом (рис. 2а, нижний блок) можно интерпретировать как участки с двумя-тремя нуклеотидными неспаренными основаниями. Подобные структуры отмечали на повторяющихся последовательностях при образовании шпильчатых петель и участках со сдвигом одной цепи относительно другой [14, 15].

Перечисленные выше структуры были идентифицированы и в продуктах синтеза *ab initio* без добавления никазы. Но последние содержат больше резко изогнутых участков, больше одноцепочечных участков и больше сильно разветвленных D-колец (рис. 1). Наличие одноцепочечной ДНК подтвердилось ранее в эксперименте с

использованием нуклеазы золотистой фасоли (Mung Bean) [4].

Точный механизм начала синтеза *ab initio* неизвестен. Предполагается, что в отсутствие праймера и матрицы ДНК полимеразы должна связаться как минимум с двумя dNTP и катализировать неспецифическое образование динуклеотидов. Они могут служить праймерами для неспецифической элонгации случайных тримеров или тетрамеров, из которых собираются короткие олигонуклеотиды [16]. Из олигонуклеотидов со случайной последовательностью дальнейшей амплификации подвергаются те, которые могут формировать шпильчатые структуры, способствующие их дальнейшей репликации. Олигонуклеотиды могут частично гибридизоваться друг с другом, выступая матрицами и праймерами и способствуя амплификации более длинных повторяющихся нуклеотидных последовательностей [17, 18]. Возможно, что шпильчатые структуры могут образовывать димеры через взаимодействие петлями, образуя, подобно РНК, структуры типа “kissing loop”. У РНК такой димер считается временной промежуточной структурой, в дальнейшем преобразующейся в дуплекс [5].

Наличие таких структур, как D-петли, позволяет предположить, что часть продуктов синтеза *ab initio* образовалась в результате репликации, зависимой от рекомбинации [19]. Такой механизм репликации свойственен не только бактериофагу Т4, но и, например, митохондриальной ДНК растений [20], вирусу герпеса [21], и даже теломерам [22, 23]. Поэтому возможно, что дуплексы, состоящие из повторяющихся последовательностей и содержащие одноцепочечный выступ на 3'-конце, состоящий из таких же последовательностей, способны образовывать структуру D-петли, подобную T-петле теломер [23] или R-петле [10]. Одноцепочечный 3'-конец внедряется в гомологичную двухцепочечную ДНК в месте соединения петли, иницируя обмен цепей ДНК и становится праймером с 3'-концом доступным для дальнейшего синтеза ДНК от 5' до 3' ДНК-полимеразой. Способность Bst-полимеразы ремоделировать линейную дцДНК в структуру, похожую на D-петлю показана в работе [24]. Фермент может переключать матрицы во время синтеза, переходя от одной цепи к другой ([25], цитируется по обзору [26]). По аналогии с моделями, предложенными для объяснения альтернативной формы удлинения теломер [23, 27, 28] можно предположить, что за счет обмена цепей внутри D-петель образуются D-кольца, которые могут служить матрицей для образования промежуточных продуктов репликации по типу катящегося круга, включая σ -форму «хвостатых колец» и одноцепочечные петли ДНК с двухцепочечными участками, с последующим освобождением одноцепочечной ДНК. ОдДНК могут внедряться в го-

мологичные участки линейных или кольцевых двухцепочечных молекул ДНК [28] и приводить к образованию новых D-петель. Как Bst-полимераза частично разделяет дуплекс, остается неизвестным [26]. В живых клетках промежуточные продукты репликации расщепляются нуклеазами (например, резольвазой RuvC HJ *Escherichia coli*) [29]. При синтезе *ab initio*, *in vitro* разделения/расщепления не происходит, и в итоге образуется крупная сеть реплицирующихся молекул ДНК, удерживаемых вместе благодаря многочисленным разветвлениям Y-образной формы из промежуточных продуктов репликации.

ВЫВОДЫ

Наличие перечисленных структур согласуется с существующей гипотезой о формировании ДНК-полимеразой на начальных этапах синтеза *ab initio* пула случайных олигонуклеотидов и дальнейшей амплификации повторов преимущественно палиндромной структуры [17, 30]. Повторяющиеся нуклеотидные последовательности могут формировать не только шпильчатые структуры. Они также могут участвовать в формировании структур, подобных D-петле, что запускает репликацию, зависимую от рекомбинации. Это способствует формированию сложной пространственной организации продуктов синтеза *ab initio*.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственных заданий № 075-00224-24-01 и № АААА-А19-119091190094-6 (исследования методом атомно-силовой микроскопии выполнено в ресурсном центре «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» Научного парка СПбГУ).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zyrina N. V., Antipova V. N., and Zheleznyaya L. A. *Ab initio* synthesis by DNA polymerases. *FEMS Microbiol. Lett.*, **351** (1), 1 (2014). DOI: 10.1111/1574-6968.12326
2. Zyrina N. V., Zheleznyaya L. A., Dvoretzky E. V., Vasiliev V. D., Chernov A., and Matvienko N. I.

- N.BspD6I DNA nickase strongly stimulates template-independent synthesis of non-palindromic repetitive DNA by Bst DNA polymerase. *Biol. Chem.*, **388** (4), 367–372 (2007). DOI: 10.1515/BC.2007.043
3. Cheng D. W. and Calderón-Urrea A. Nontemplate polymerization of free nucleotides into genetic elements by thermophilic DNA polymerase in vitro. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids*, **30** (11), 979–990 (2011). DOI: 10.1080/15257770.2011.628637
4. Antipova V. N., Reveguk Z. V., Kraynyukov E. S., and Zyrina N. V. Structure of DNA obtained during the *ab initio* synthesis by Bst DNA polymerase in the presence of the nicking endonuclease from *Bacillus stearothermophilus* (Nt.BstNBI). *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **37** (13), 3314–3321 (2019). DOI: 10.1080/07391102.2018.1515662
5. Andersen E. S., Contera S. A., Knudsen B., Damgaard C. K., Besenbacher F., and Kjems J. Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA. *J. Biol. Chem.*, **279** (21), 22243 (2004). DOI: 10.1074/jbc.M314326200
6. Ma H., Jia X., Zhang K., and Su Z. Cryo-EM advances in RNA structure determination. *Signal. Transduct. Target Ther.*, **7** (1), 58 (2022). DOI: 10.1038/s41392-022-00916-0
7. Pierce P. G. and Hancock R. L. Electron microscopy of negatively stained tRNA. *Nature*, **241**, 529–530 (1973). DOI: 10.1038/241529a0
8. Meyer J. *Electron microscopy of viral RNA* (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1981)
9. Железная Л. А., Качалова Г. С., Артюх Р. И., Юнусова А. К., Перевязова Т. А. и Матвиенко Н. И. Никующие эндонуклеазы. *Успехи биол. химии*, **49**, 107–128 (2009)
10. Klinov D. V., Lagutina I. V., Prokhorov V. V., Neretina T., Khil P. P., Lebedev Y. B., Cherny D. I., Demin V. V., and Sverdlov E. D. High resolution mapping DNAs by R-loop atomic force microscopy. *Nucl. Acids Res.*, **26** (20), 4603–4610 (1998). DOI: 10.1093/nar/26.20.4603
11. Carrasco-Salas Y., Malapert A., Sulthana S., Molcrette B., Chazot-Franguiadakis L., Bernard P., Chédin F., Faivre-Moskalenko C., and Vanoosthuyse V. The extruded non-template strand determines the architecture of R-loops. *Nucl. Acids Res.*, **47** (13), 6783–6795 (2019). DOI: 10.1093/nar/gkz341
12. Backert S. R-loop-dependent rolling-circle replication and a new model for DNA concatemer resolution by mitochondrial plasmid mp1. *EMBO J.*, **21** (12), 3128–3136 (2002). DOI: 10.1093/emboj/cdf311
13. Greider C. W. Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell*, **97** (4), 419–422 (1999). DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80750-3
14. Axford M. M., Wang Y. H., Nakamori M., Zannis-Hadjopoulos M., Thornton C. A., and Pearson C. E. Detection of slipped-DNAs at the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy type I disease locus in patient tissues. *PLoS Genet.*, **9** (12), e1003866 (2013). DOI: 10.1371/journal.pgen.1003866
15. Sinden R. R., Potaman V. N., Oussatcheva E. A., Pearson C. E., Lyubchenko Y. L., and Shlyakhtenko L. S. Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. *J. Biosci.*, **27**, 53–65 (2002). DOI: 10.1007/BF02703683
16. Zhang S., Tang L., Zhang J., Sun W., Liu D., Chen J., Hu B., and Huang Z. Single-atom-directed inhibition of *de Novo* DNA synthesis in isothermal amplifications. *Anal. Chem.*, **94** (45), 15763–15771 (2022). DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03489
17. Ogata N. and Miura T. Genetic information 'created' by archaeobacterial DNA polymerase. *Biochem. J.*, **324** (Pt 2), 667–671 (1997). DOI: 10.1042/bj3240667
18. Ogata N. and Morino H. Elongation of repetitive DNA by DNA polymerase from a hyperthermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *Nucl. Acids Res.*, **28** (20), 3999–4004 (2000). DOI: 10.1093/nar/28.20.3999
19. Mosig G. Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annu. Rev. Genetics*, **32**, 379–413 (1998). DOI: 10.1146/annurev.genet.32.1.379
20. Cheng N., Lo Y. S., Ansari M. I., Ho K. C., Jeng S. T., Lin N. S., and Dai H. Correlation between mtDNA complexity and mtDNA replication mode in developing cotyledon mitochondria during mung bean seed germination. *New Phytologist*, **213** (2), 751–763 (2017). DOI: 10.1111/nph.14158
21. Severini A., Scraba D. G., and Tyrrell D. L. Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J. Virology*, **70** (5), 3169–3175 (1996). DOI: 10.1128/JVI.70.5.3169-3175.1996
22. Tomaska L., Nosek J., Kar A., Willcox S., and Griffith J. D. A new view of the T-loop junction: implications for self-primed telomere extension, expansion of disease-related nucleotide repeat blocks, and telomere evolution. *Front. Genetics*, **10**, 792 (2019). DOI: 10.3389/fgene.2019.00792
23. Nabetani A. and Ishikawa F. Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells. *Mol. Cell. Biol.*, **29** (3), 703–713 (2009). DOI: 10.1128/MCB.00603-08
24. Wang G., Ding X., Hu J., Wu W., Sun J., and Mu Y. Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities. *Sci. Rep.*, **7** (1), 13928 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-13324-0

25. Tsai C. H., Chen J., and Szostak J. W. Enzymatic synthesis of DNA on glycerol nucleic acid templates without stable duplex formation between product and template. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **104** (37), 14598–14603 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0704211104
26. Ostorbin I. and Filipenko M. Bst polymerase — a humble relative of Taq polymerase. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **21**, 4519–4535 (2023). DOI: 10.1016/j.csbj.2023.09.008
27. Tomaska L., Nosek J., Kar A., Willcox S. and Griffith J. D. A new view of the t-loop junction: implications for self-primed telomere extension, expansion of disease-related nucleotide repeat blocks, and telomere evolution. *Front. Genetics*, **10**, 792 (2019). DOI: 10.3389/fgene.2019.00792
28. Hou K., Yu Y., Li D., Zhang Y., Zhang K., Tong J., Yang K., and Jia S. Alternative lengthening of telomeres and mediated telomere synthesis. *Cancers*, **14** (9), 2194 (2022). DOI: 10.3390/cancers14092194
29. West S. C. Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genetics*, **31**, 213–244 (1997). DOI: 10.1146/annurev.genet.31.1.213
30. Liang X., Jensen, K., and Frank-Kamenetskii M. D. Very efficient template/primer-independent DNA synthesis by thermophilic DNA polymerase in the presence of a thermophilic restriction endonuclease. *Biochemistry*, **43** (42), 13459–13466 (2004). DOI: 10.1021/bi0489614

Formation of Complex Spatial Structure of DNA in the Process of *ab initio* Synthesis

N.V. Zyrina*, **, O.M. Selivanova***, E.V. Shevchenko****, and V.N. Antipova**

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

**Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 7, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

****The Saint Petersburg State University Centre for Diagnostics of Functional Materials for Medicine,
Pharmacology and Nanoelectronics, Ulianovskaya ul. 1, Peterhof, St. Petersburg, 198504 Russia

Products with a complex spatial organization are formed during the *ab initio* synthesis under the action of Bst DNA polymerase, large fragment. Using the analysis of AFM images of the products obtained with the addition of a minimal amount of the nicking endonuclease Nt. BspD6I during this synthesis, it became possible to describe the structures formed as a result of this synthesis and suggest that their formation occurs by the mechanism of replication-dependent recombination

Keywords: *ab initio* DNA synthesis, large fragment of Bst DNA polymerase, atomic force microscopy

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ЗАКРЕПЛЕНИЯ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЯЖЕНИЯ ДНК

© 2024 г. М.А. Дидин*,#

*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Институтский пер., 9, Долгопрудный, Московская область, 141701, Россия

#E-mail: didin.maxim@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.12.2023 г.

После доработки 12.02.2024 г.

Принята к публикации 21.02.2024 г.

Рассматривается задача растяжения гибкой полимерной молекулы с заданными условиями на концах, под действием фиксированной силы. Построена математическая модель для различных энергетических функций, описывающих упругость полимера, и различных способов закрепления. Показано, что зависимость растяжения от длины полимера линейна. Приведены результаты численных расчетов. Полученные результаты позволяют улучшить анализ экспериментальных данных по растяжению полимеров. Теория дает несколько верифицируемых предсказаний, в том числе предлагаются экспериментальные методы, позволяющие повысить точность измерений.

Ключевые слова: персистентная длина, ДНК, растяжение, способ закрепления.

DOI: 10.31857/S0006302924060021, EDN: NLYXZB

Упругие свойства полимеров важны для химии и биологии. Один из наиболее прямых методов их исследования — эксперимент по растяжению закрепленной полимерной молекулы малой силой. Такие эксперименты проводятся, начиная с 1990-х годов [1], с тех пор, как появилась возможность закреплять отдельные молекулы полимеров (в первую очередь, ДНК) и прикладывать к их концам регулирующую силу. Тем не менее, точность полученных результатов до сих пор низкая [2]. Зависимость растяжения от силы давно исследовалась теоретически [1]. Если приложенная сила F мала, полимерная нить образует клубок. С увеличением силы клубок постепенно растягивается в прямую нить. При растяжении нити энтропия цепи уменьшается. Энтропия определяется разнообразием конформаций. На больших масштабах нить выглядит как траектория случайного блуждания в пространстве, тогда как на малых масштабах возможности изгиба ограничены упругостью нити.

ИСПОЛЬЗУЕМАЯ МОДЕЛЬ ДНК

Поскольку все эксперименты с ДНК проводят в водно-солевом растворе, электростатическое

поле экранируется ионами. Поэтому взаимодействием удаленных в пространстве частей системы будем пренебрегать. Удаленные (вдоль нити) участки могут взаимодействовать, сближаясь в пространстве. В работе [1] показано, что этот эффект заметен только при малых силах F , и найдена верхняя граница $F_{\min} = 0.1$ пН для двухцепочечной ДНК. Будем считать, что удаленные от мест прикрепления участки нити взаимодействуют лишь с соседними такими же участками.

Полагаем также, что локальные упругие свойства нити описываются зависимостью энергии малого участка нити от деформации изгиба. Чем больше жесткость на изгиб, тем меньше разнообразие конформаций нити, и тем меньше будет сила при данном растяжении [3]. Зависимость жесткости на изгиб от направления изгиба и от последовательности ДНК не учитывается.

Относительная деформация растяжения при малых силах невелика. Например, ДНК при $F < 10$ пН обычно моделируют как нерастяжимую нить [4]. Более общая модель описана в работе [5]. Деформация кручения также невелика, если один из концов нити может свободно прокручиваться вокруг своей оси. Далее растяжение и кручение нити не учитываются.

Полимерную молекулу можно моделировать как непрерывную нить [6] или как дискретную цепочку звеньев [7, 8]. Ниже используется дис-

Сокращения: WLC — модель “worm-like-chain”, ECH — модель “energy convex hull”, SEQ — модель “subelastic chain”, FWLC — модель “finite worm-like chain”.

кретная модель — цепочка недеформируемых звеньев, связанных шарнирами. Упругая энергия деформации E есть некоторая функция от угла α изгиба. Шарниры считаются независимыми, а их энергии суммируются. В работе [6] изучалась модель Кратки—Порода — частный случай, когда длина l звена мала, а зависимость $E(\alpha)$ — квадратичная (модель WLC, сокращение от «Worm-like chain»):

$$E = \frac{L_p}{2 \cdot l} \alpha^2 k_B T. \quad (1)$$

В этом случае, макроскопические свойства нити не зависят от длины l единичного звена. Единственный описывающий их параметр — персистентная длина L_p . Если конец A длинной нити зафиксировать, а конец B не фиксировать, то среднее (по ансамблю конфигураций) положение конца B будет находиться на расстоянии L_p от точки A [6]. Для двухцепочечной ДНК $L_p \approx 50$ нм.

Эксперименты по циклизации коротких (100–200 нм) фрагментов ДНК показали, что сильные изгибы появляются гораздо чаще, чем предсказывает модель WLC [11]. Это означает более медленный рост энергетической функции $E(\alpha)$, чем квадратичный. Теоретическое описание таких моделей (модели ECH, сокращение от «Energy Convex Hull») есть в работе [12]. В модели ECH функция $E(\alpha)$ гладкая и состоит из двух участков: квадратичного при $\alpha < \alpha_1$ и линейного при $\alpha > \alpha_1$.

Физический смысл модели ECH виден при малых значениях длины l и температуры T . Тогда ненагруженная цепь прямая. Если приложить к ней небольшую нагрузку на изгиб, она станет дугой окружности с кривизной не более $k_1 = \alpha_1/l$. При увеличении нагрузки возникнут изломы [13]. В пределе $\alpha_1 \rightarrow 0$ получается линейная функция $E(\alpha)$ (модель SEQ — «subelastic chain», [9]). В пределе $\alpha_1 \rightarrow \infty$ получается модель WLC. В работе [12] значение $k_1 = \alpha_1/l$ было рассчитано двумя способами (ECH1 и ECH2) и получены значения $k_1 = 0.12/\text{нм}$ и $k_1 = 0.08/\text{нм}$ соответственно.

Представляемая нами ниже теория работает для произвольной непрерывной функции $E(\alpha)$. Такая модель ДНК рассматривалась теоретически в работе [9]. Мы назовем ее «модель Виггинса» в честь автора этой статьи. В частности, в работе [9] получена зависимость растяжения нити от силы F для очень длинной ДНК.

Для наглядного описания модели одним параметром и сравнения разных моделей мы будем использовать персистентную длину L_p . В общем виде она равна

$$L_p = \frac{l}{1 - \langle \cos \alpha \rangle}, \quad (2)$$

где среднее значение $\langle \cos \alpha \rangle$ вычисляется по распределению Гиббса [6].

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО РАСТЯЖЕНИЮ ДНК

Опишем схему типичного эксперимента. Чтобы растянуть нить ДНК, необходимо закрепить ее концы. Простейший вариант — крепление одного конца к плоской поверхности. Обычно для того, чтобы приложить к молекуле регулируемую силу, второй конец крепят к большому (по сравнению с $L_p \approx 50$ нм) шару, к которому уже прикладывают силу при помощи оптической ловушки [4] или магнитного поля [2].

Простейшая математическая модель такого эксперимента [1] описывает длинную нить. Всеми граничными эффектами пренебрегают, а растяжение x получается пропорциональным длине L . Но такой подход работает только при $L \gg 1$ мкм для ДНК. Поэтому в работе [4] для описания ДНК длиной в сотни нанометров построена модель FWLC («finite worm-like chain»), учитывающая способ закрепления концов нити. В отличие от WLC, это не модель нити ДНК, а математическая модель эксперимента по растяжению ДНК.

Простые способы закрепления. Поскольку в работе [4] была использована непрерывная модель нити, поддающаяся вычислениям математической модели FWLC получалась только в случае, когда ограничения наложены лишь на наклон конца нити к оси x . Мы назовем такие способы закрепления простыми. В работе [4] выделены изотропный способ закрепления, когда на конец нити не наложено никаких ограничений, полуизотропный способ закрепления, когда угол между концом нити и приложенной к нему силой F острый, и нормальный способ закрепления, когда конец нити жестко зафиксирован и сонаправлен силе F . Мы рассмотрим также касательный способ закрепления, когда конец нити зафиксирован перпендикулярно силе F . Различные виды простых способов закрепления (в модели Виггинса [9]) изображены на рис. 1а.

Еще один тип простых способов закрепления, рассмотренный в работе [4], моделирует крепление ДНК к твердому большому шару, к центру которого приложена сила. В работе [4] предполагалось, что направление конца на стыке с шаром может быть произвольным, но не пересекающим шар (полуизотропный способ закрепления). Мы рассмотрим также касательные и нормальные условия на стыке с шаром.

Тем не менее, простые способы закрепления неточно описывают даже простейший вариант крепления нити — стык с бесконечной плоскостью. Основная проблема модели FWLC в том, что участок существенной длины, близкий к кон-

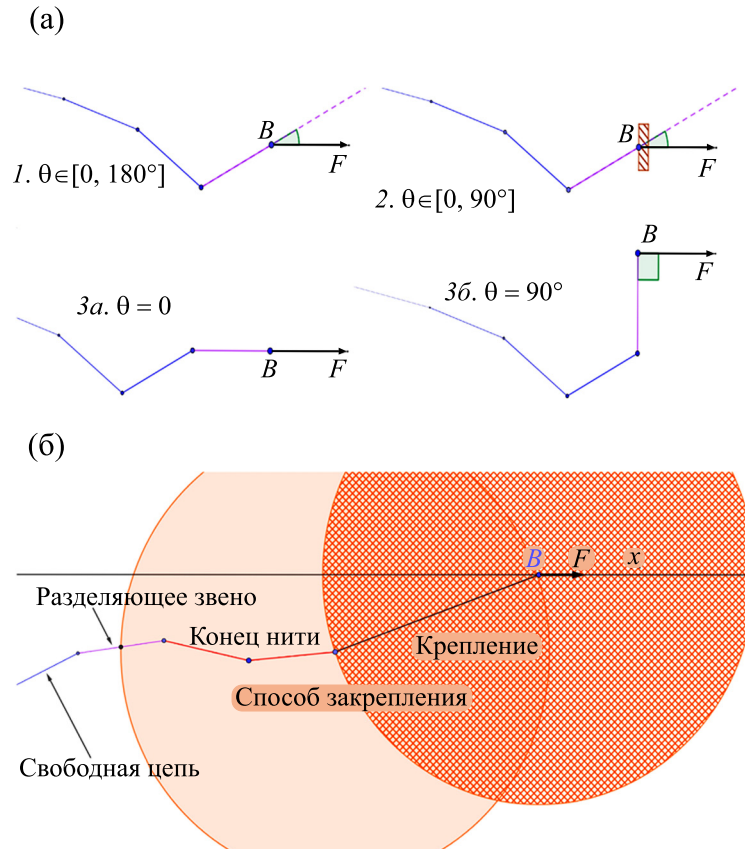


Рис. 1. Обозначения для различных способов закрепления. (а) — Простые способы закрепления содержат лишь первое или последнее звено цепи (фиолетовый цвет). Его направление задается углом θ к силе F . Рассматриваются частные случаи: изотропный способ закрепления (1), полуизотропный способ закрепления (2), нормальный способ закрепления (3а) и касательный способ закрепления (3б). Все простые способы закрепления совместимы как с дискретной [8], так и с непрерывной [4] моделью нити. (б) — Сложный способ закрепления состоит из крепления (оранжевое тело), к точке B которого приложена сила F , и конца нити (красный цвет), который взаимодействует с креплением. Способ закрепления отделен от свободной цепи разделяющим звеном.

цу нити, тоже взаимодействует с креплением. Кроме того, он может быть химически модифицирован (например, ковалентно связан с биотином [4]).

Структура способа закрепления. Чтобы получить возможности преодолеть вышеописанные проблемы, мы введем максимально широкое определение способа закрепления. Назовем креплением часть экспериментальной установки, взаимодействующую с нитью, а концом нити — концевой участок, взаимодействующий с креплением. Назовем разделяющими 2 звена, соседние с концами, а участок между разделяющими звеньями, содержащий n шарниров, назовем свободной цепью (рис. 1б). Крепление может иметь сложную структуру (например, содержать молекулы белка, химически взаимодействующие между собой и с нитью ДНК). Назовем объединение крепления и взаимодействующего с ним конца способом закрепления.

Условия на способ закрепления. Нам понадобятся следующие условия на способ закрепления:

1. Крепления не взаимодействуют между собой.
2. Свободная цепь длинная, $n \cdot l \gg L_p$.
3. Способ закрепления при каждом значении силы F из диапазона измерений имеет определенное множество конформаций, не зависящее от предыстории. Все конформации из данного множества могут приниматься за время измерений. Этот факт позволяет нам использовать распределение Гиббса.
4. Хотя бы один из двух способов закрепления предусматривает возможность вращения вокруг оси нити. Это позволяет избежать существенной нагрузки на кручение.
5. Хотя бы один из двух способов закрепления подвижен. Энергия каждой из его конформаций не меняется при параллельном переносе. Предполагается, что сила F приложена к подвижному

креплению и постоянна на масштабе его тепловых флуктуаций.

6. Хотя бы один из двух способов закрепления осесимметричен. Энергия каждой из его конформаций не меняется при повороте вокруг силы \mathbf{F} .

Класс способов закрепления, удовлетворяющих вышеописанным условиям, широк по сравнению с изученными в литературе [4] простыми способами закрепления.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В этой статье мы покажем, что при выполнении условий 1–6 на способ закрепления среднее по ансамблю конформаций растяжение x разбивается на три слагаемых:

$$x = \Delta x_1 + \Delta x_2 + Lp, \quad (3)$$

где L — длина нити, Δx_1 и Δx_2 определяются способом закрепления и силой F , а p — только силой F . Таким образом, вклад свободной цепи описывается одной безразмерной функцией $p(F)$, а вклад каждого способа закрепления описывается одной функцией $\Delta x_1(F)$ (вклад Δx_2 описывается той же самой функцией $\Delta x_1(F)$, зависящей от способа закрепления на другом конце).

Идея разделения x на отдельные слагаемые согласно уравнению (3) не встречалась ранее в тематической литературе [10], что затрудняло анализ экспериментальных данных [4]. Функция $p(F)$ изучалась еще в первых статьях по растяжению ДНК [1], поскольку она описывает относительное растяжение длинной нити. Кроме того, $p(F)$ изучалась и в общем случае модели Виггинса. Разработаны алгоритмы вычисления $p(F)$ и приведены расчеты для одной из энергетических функций, отличных от WLC (модель SEQ) [9].

Тем не менее, с момента выхода работы [9] появились новые экспериментальные данные и теоретические модели. Поэтому, после теоретического расчета p , в статье построены графики для различных энергетических функций. Они сравниваются с экспериментальными данными [4].

Анализ функции $\Delta x_1(F)$ сложнее. Эта функция ранее в литературе не использовалась. Физический смысл $\Delta x_1(F)$ — разность проекций конца и участка свободной цепи такой же длины на ось x . Поскольку эта разность не зависит ни от L , ни от выбора разделяющего звена, именно $\Delta x_1(F)$ представляет из себя естественный метод описания сложных и разнообразных способов закрепления, встречающихся в экспериментах. Но в данной статье мы ограничимся вычислением $\Delta x_1(F)$ для простых способов закрепления.

Вывод формулы для $x(F)$. Основная цель данной работы — вычисление $x(F)$ в виде уравнения (3). Попутно мы получим численные алго-

ритмы вычисления $\Delta x_1(F)$ и $p(F)$. Чтобы не упустить применение приближений, мы выведем все используемые формулы, даже если они известны.

В каждый момент времени система находится в определенной конформации C из множества S всевозможных доступных конформаций. Положение системы случайно, вероятности описываются распределением Гиббса и пропорциональны $\exp(W_C/k_B T)$, где k_B — постоянная Больцмана, T — температура, а W — энергия конформации C .

В модели, где к каким-то двум точкам A и B системы приложены постоянные внешние силы \mathbf{F} и $-\mathbf{F}$, энергия складывается из двух частей: слагаемого W_{C0} , не связанного с силой \mathbf{F} , и потенциальной энергии, зависящей от \mathbf{AB} и \mathbf{F} , в поле силы \mathbf{F} . Для удобства направим ось x вдоль силы \mathbf{F} и обозначим x_C проекцию \mathbf{AB} на ось x в конформации C . Тогда энергия вычисляется как

$$W_C = W_{C0} - Fx_C. \quad (4)$$

В эксперименте измеряется среднее значение x_C по всем конформациям. Оно вычисляется как $x = X/Z$, где

$$Z = \int \exp\left(-\frac{W_C}{k_B T}\right), \quad (5)$$

$$X = \int x_C \exp\left(-\frac{W_C}{k_B T}\right), \quad (6)$$

а интегралы берутся по всему множеству конформаций S . Из формул (4), (5) и (6) несложно выразить X через производную от Z :

$$X = k_B T \frac{dZ}{dF}. \quad (7)$$

Таким образом, x вычисляется как

$$x = k_B T \frac{d(\ln Z)}{dF}. \quad (8)$$

Формула (8) хорошо известна в литературе [4]. Единственное приближение, используемое при ее выводе — независимость силы \mathbf{F} от конформации C . Но при вычислении статистической суммы $Z(F)$ нам потребуется еще несколько приближений.

Статистическая сумма является кратным интегралом по множеству S всех доступных конформаций системы. Важно понимать разницу между S и пространством всевозможных конформаций S_0 .

Если крепления на обоих концах велики по сравнению с $k_B T/F$ (что верно для большинства экспериментов), то пространство S ограничено топологией нити. Так, прямая нить и нить с узлом не могут быть переведены друг в друга и, следовательно, не могут входить в одну и ту же статистическую сумму. Точный учет топологии сложен, и

в литературе вместо S используют пространство S_0 всевозможных конформаций. Это приближение работает при больших (>0.1 пН для двуцепочечной ДНК) силах, когда вероятность случайного сближения удаленных участков нити мала [1], и только для случая нити без узлов.

Еще одно ограничение на пространство S связано с вращением нити вокруг своей оси. Чтобы обойти это ограничение, нить обычно (см. работу [4]) одним концом крепят к шару, позволяя шару свободно вращаться вокруг прикрепленного к нему конца (условие 4 на способ закрепления). Далее мы считаем, что пространство S совпадает с S_0 .

Конформация всей системы определяется конформацией способов закрепления $C3_A$ и $C3_B$

и направлениями $n-1$ звена свободной цепи, а также двух разделяющих звеньев. Взаимодействием удаленных друг от друга участков цепи пренебрегаем. Энергию W_{c0} цепи равна

$$W_{c0} = W_{b1} + W_{b2} + \sum_{i=1}^n W_i, \quad (9)$$

где W_{b1} и W_{b2} — энергия способов закрепления $C3_A$ и $C3_B$, а W_i — энергия i -го шарнира свободной цепи.

Пусть

$$u(\alpha) = e^{-E(\alpha)/k_B T}. \quad (10)$$

Тогда статистическая сумма Z — это интеграл от

$$Y = \exp\left(-\frac{W_C}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{W_{b1}}{k_B T}\right) \exp\left(-\frac{W_{b2}}{k_B T}\right) \exp\left(\frac{F \cdot x_C}{k_B T}\right) \prod_{i=1}^n u_i(\alpha_i) \quad (11)$$

по всевозможным конформациям C . Кратный интеграл от (11) берется по всем направлениям каждого из n звеньев свободной цепи и по всевозможным конформациям $C3_A$ и $C3_B$.

Вычисление $x(F)$. Сократим количество параметров, описывающих способ закрепления. Зафиксируем одно из разделяющих звеньев $C_A D_A$, чтобы разбить формулу (11) на произведение двух независимых множителей и интегрировать эти множители по отдельности. Для более аккуратного разбиения экспоненты $\exp\left(\frac{F \cdot x_C}{k_B T}\right)$, отнесем к

$C3_A$, кроме m_A первых звеньев, половину $C_A M_A$ разделяющего звена $C_A D_A$. Кратный интеграл по всевозможным конформациям $C3_A$

$$Z_A(C_A, D_A) = \int \exp\left(-\frac{W_{b1}}{k_B T}\right) \exp\left(\frac{(F, A M_A)}{k_B T}\right) d\mathbf{p} \quad (12)$$

берется по всевозможным параметрам p , описывающим $C3_A$. Аналогично зафиксируем второе разделяющее звено $C_B D_B$ и возьмем кратный интеграл по конформациям $C3_B$.

Теперь статистическая сумма Z является $(2n+5)$ -кратным интегралом от

$$Y_1 = Z_A(C_A, D_A) \cdot Z_B(C_B, D_B) \cdot \exp\left(\frac{(F, M_A M_B)}{k_B T}\right) \prod_{i=1}^n u_i(\alpha_i). \quad (13)$$

Параметры, по которым интегрируется формула (13) — направления $n-1$ звена свободной цепи и 2 разделяющих звеньев, а также координата начала C_A одного из разделяющих звеньев.

Упростим множитель $Z_A(C_A, D_A)$, описывающий статистическую сумму по $C3_A$, используя условие подвижности одного из способов закрепления, не умаляя общности, $C3_B$. Это условие означает, что статистическая сумма $Z_B(C_B, D_B)$ по

$C3_B$ зависит лишь от вектора $D_B C_B$. Таким образом, множитель $Z_A(C_A, D_A)$ — единственный зависящий от координат точки C_A в формуле (13). Проинтегрируем $Z_A(C_A, D_A)$, по всевозможным положениям C_A , вынеся все остальное за знак интеграла. Статистическая сумма по каждому из двух способов закрепления становится функцией от вектора соответствующего разделяющего звена, а статистическая сумма Z становится $(2n+2)$ -кратным интегралом от

$$Y_2 = Z_A(C_A D_A) \cdot Z_B(D_B C_B) \cdot \exp\left(\frac{(F, M_A M_B)}{k_B T}\right) \prod_{i=1}^n u_i(\alpha_i). \quad (14)$$

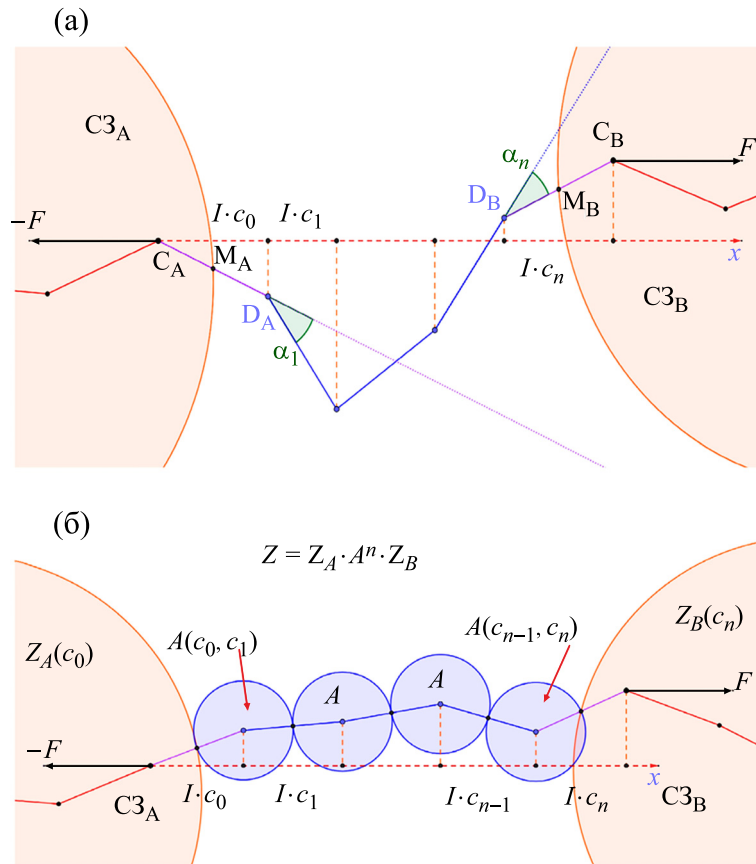


Рис. 2. Вычисление статистической суммы. (а) — Цепь состоит из концов, входящих в $C3_A$ и $C3_B$ (красный цвет), и свободной цепи $M_A M_B$ (синий цвет). Разделяющие звенья $C_A D_A$, $C_B D_B$ (фиолетовый цвет) взаимодействуют и с концами, и со свободной цепью. Зададим свободную цепь как проекции $l \cdot c_0, \dots, l \cdot c_n$ звеньев на ось x и углы $\varphi_1, \dots, \varphi_n$ между проекциями соседних звеньев на плоскость yz . Потенциальная энергия свободной цепи определяется суммой проекций $l \cdot c_i$ звеньев на ось x . Упругая энергия свободной цепи определяется углами $\alpha_i (c_{i-1}, c_i, \varphi_i)$ в шарнирах. (б) — Упрощенная модель цепи: концы, входящие в $C3_A$ и $C3_B$, а также n одинаковых фрагментов, образующих свободную цепь. Статистические суммы по $C3_A$ и $C3_B$ — функции $Z_A(c_0)$ и $Z_B(c_n)$ одной переменной, статистическая сумма по каждому из фрагментов — симметричная функция двух переменных $A(c_{i-1}, c_i)$. Статистическая сумма по всей системе — $(n+1)$ -кратный интеграл от произведения статистических сумм по ее частям (формула (22)). Дискретизация позволяет рассматривать этот интеграл как матричное произведение (формула (24)).

Интеграл от (14) берется по направлениям $n-1$ звена свободной цепи и 2 разделяющих звеньев.

Чтобы еще упростить формулу (14), воспользуемся осевой симметрией одного из способов закрепления, не умаляя общности, $C3_B$. Для этого зададим направления всех $n+1$ звеньев с помощью цилиндрических координат. Пусть c_i — косинус угла между (ориентированным) i -м звеном свободной цепи и осью x , а c_0, c_n — косинусы углов между (ориентированными) разделяющими звеньями и осью x (рис. 2а). Тогда проекцию свободной цепи на ось x считаем как

$$(e_x, M_A M_B) = \frac{l}{2} \sum_{i=1}^n (c_{i-1} + c_i) \quad (15)$$

Второй параметр, описывающий φ -направление i -го звена свободной цепи, — (ориентированный) угол φ_i между проекциями i -го и $(i-1)$ -го звеньев на плоскость yz . Последнее разделяющее звено аналогично описывается углом φ_n , а первое разделяющее звено описывается углом φ между его проекцией на ось x и осью y . Из осевой симметрии $C3_B$, статистическая сумма Z_B по $C3_B$ зависит только от c_n . Таким образом, статистическая сумма Z_A по $C3_A$ является единственным множителем в формуле (14), зависящим от φ . Поэтому можно проинтегрировать $Z_A(C_A, D_A)$ по φ , сведя выражение (14) к $(2n+1)$ -кратному интегралу от выражения

$$Y_3 = Z_A(c_0) \cdot Z_B(c_n) \cdot \exp \frac{(F, M_A M_B)}{k_B T} \cdot \prod_{i=1}^n u_i(\alpha_i). \quad (16)$$

Формулу (16) нужно проинтегрировать по всем $c_i \in [-1, 1]$, $i \in \{0, \dots, n\}$ и по всем $\varphi_i \in (-\pi, \pi]$, $i \in \{1, \dots, n\}$.

Заметим, что каждый из углов φ_i влияет на единственный множитель $u_i(\alpha_i)$ в формуле (16), причем

$$\cos \alpha_i = c_{i-1} \cdot c_i + (1 - c_{i-1}^2)^{\frac{1}{2}} (1 - c_i^2)^{\frac{1}{2}} \cdot \cos \varphi_i. \quad (17)$$

Это позволяет вычислить интегралы по каждому из углов φ_i как

$$f(c_{i-1}, c_i) = \int_{-\pi}^{\pi} u_i(\alpha_i(c_{i-1}, c_i, \varphi_i)) d\varphi_i. \quad (18)$$

Поскольку все звенья свободной цепи одинаковы, получим одну и ту же симметричную поло-

жительную функцию f от двух переменных. Интеграл (18) не берется аналитически даже для квадратичной энергетической функции (1), но мы будем численно вычислять f по функции E из модели Виггинса.

Итак, статистическая сумма Z — это $(n+1)$ -кратный интеграл от

$$Y_4 = Z_A(c_0) * Z_B(c_n) * \exp \frac{(F, M_A M_B)}{k_B T} * \prod_{i=1}^n f(c_{i-1}, c_i). \quad (19)$$

Параметры интегрирования в выражении (19) — все $c_i \in [-1, 1]$, $i \in \{0, \dots, n\}$.

Подставляем выражение (15) в (19) и получаем

$$Y_4 = Z_A(c_0) \cdot Z_B(c_n) \cdot \prod_{i=1}^n f(c_{i-1}, c_i) \cdot \exp \frac{F \cdot l \cdot (c_{i-1} + c_i)}{2k_B T}. \quad (20)$$

Делаем замену

$$A(c_{i-1}, c_i) = f(c_{i-1}, c_i) \cdot \exp \frac{F \cdot l \cdot (c_{i-1} + c_i)}{2k_B T}. \quad (21)$$

Получаем выражение:

$$Y_4 = Z_A(c_0) \cdot Z_B(c_n) \cdot \prod_{i=1}^n A(c_{i-1}, c_i). \quad (22)$$

Физический смысл формулы (21) для функции A — статистическая сумма по фрагменту, состоящему из шарнира номер i и двух соединенных с ним половинок ребер. Таким образом, свободная цепь разбивается на n одинаковых фрагментов (рис. 2б). Картинка не только наглядно показывает смысл формулы (22), но и дает представление о том, как учитывать зависимость жесткости ДНК от последовательности и другие неоднородности (например, одноцепочечные разрывы). Построить модель, состоящую из разных (в том числе, по размеру) фрагментов несложно, но ее численные расчеты выходят за рамки данной статьи.

Интегралы типа (22) изучались в литературе, в том числе, по растяжению ДНК [5]. Для их вычисления, используют дискретизацию параметров c_i , переводя задачу вычисления статистической суммы Z на язык линейной алгебры.

Множество значений каждого из параметров c_i — отрезок $[-1, 1]$. Разобьем его на k равных частей. Считаем, что переменные c_i пробегает множество C , состоящее из k значений, соответствующих серединам этих отрезков

$$C = \left\{ -1 + \frac{1}{k}, -1 + \frac{3}{k}, \dots, 1 - \frac{1}{k} \right\}. \quad (23)$$

Функции Z_A и Z_B , определенные на отрезке $[-1, 1]$, описываются k -мерными векторами. Аналогично, функция A , определенная на квадрате $[-1, 1] \times [-1, 1]$, описывается как матрица $k \times k$. Интеграл от непрерывной функции $g(c)$ по отрезку $[-1, 1]$ вычисляется приближенно как сумма координат вектора g , а множитель $2/k$, равный шагу интегрирования, выносится за скобку.

Такая формула численного интегрирования известна как средняя сумма Римана.

Кратный интеграл (22) можно рассматривать [5] как матричное произведение:

$$Z = \frac{2^{n+1}}{k^{n+1}} Z_A \cdot A^n \cdot Z_B. \quad (24)$$

Следующий шаг – применение приближенной формулы для степени симметричной матрицы A из неотрицательных элементов. Пусть $\lambda_1 > 0$ – наибольшее собственное число, а v^- – соответствующий ему единичный собственный вектор. Тогда

$$A^n = \lambda_1^n v^- \cdot v^-, \quad (25)$$

где произведение векторов дает матрицу.

Погрешность формулы (25) пропорциональна $(\lambda_2/\lambda_1)^n$, где λ_2 – второе по абсолютной величине собственное число. Далее мы получим численные оценки на n при заданных силе F и энергетической функции. Но общий вывод в том, что погрешность падает экспоненциально с ростом n .

Подставляя формулу (25) в (24), получаем итоговое выражение для статистической суммы

$$Z = \frac{2^{n+1}}{k^{n+1}} \lambda_1^n (Z_A, \bar{v}) \cdot (Z_B, \bar{v}). \quad (26)$$

Чтобы найти x , подставим формулу (26) для Z в формулу (8).

$$x = k_B T \frac{d(\ln Z)}{dF} = k_B T \frac{d}{dF} (n \ln \lambda_1 + \ln(Z_A, \bar{v}) + \ln(Z_B, \bar{v})). \quad (27)$$

Приведем формулу (27) к виду (3). Мы доказали линейность $x(L)$, откуда видно выражение для p :

$$p = \frac{k_B T}{l} \frac{d(\ln \lambda_1)}{dF}. \quad (28)$$

Разность равна

$$x - Lp = k_B T \frac{d}{dF} (\ln(Z_A, \bar{v}) + \ln(Z_B, \bar{v}) - (m_A + m_B + 1) \ln \lambda_1). \quad (29)$$

Она разбивается на 2 слагаемых одного вида:

$$\Delta x_1 = k_B T \frac{d}{dF} (\ln(Z_A, \bar{v}) - (m_A + \frac{1}{2}) \ln \lambda_1), \quad (30)$$

$$\Delta x_2 = k_B T \frac{d}{dF} (\ln(Z_B, \bar{v}) - (m_B + \frac{1}{2}) \ln \lambda_1). \quad (31)$$

Физический смысл первого слагаемого в формуле (30) – проекция отрезка AM_A , соединяющего конец CZ_A с точкой A приложения силы, на ось x . Физический смысл второго слагаемого – проекция участка свободной цепи такой же длины как конец цепи, входящий в CZ_A , на ось x . Поэтому Δx_1 окажется независимым от большого m_A .

Формула (26) позволяет численно вычислить p во всех случаях, а Δx_1 – для простых способов закрепления и в других случаях, когда вычислена функция $Z_A(c_0)$. Для этого, написана программа на языке python. Приведенный выше алгоритм и написанная на его основе программа были тщательно проверены на арифметические ошибки и погрешности численных вычислений.

ЧИСЛЕННЫЕ РАСЧЕТЫ

Ниже мы оценим минимальный размер свободной цепи L_{\min} , начиная с которого примени-

ма формула (3), а также вычислим $p(F)$ для различных энергетических функций и $\Delta x_1(F)$ для различных простых способов закрепления.

Нижняя граница применимости теории. Размер L_{\min} определяется погрешностью, связанной с применением формулы (25) для степени симметричной матрицы. Поскольку эта погрешность падает экспоненциально с ростом L , а показатель экспоненты не зависит от способа закрепления, полученная нами оценка применима для всех сложных способов закрепления. Для численной оценки L_{\min} , посчитаем $x(F)$ как с использованием формулы (25), так и без использования этой формулы. Разность Δx этих результатов построим на рис. 3. При $L > 300$ нм эта разность ничтожно мала. Тем не менее, в работе [4] описаны эксперименты со 172-нм ДНК, а в работе [2] – с 67-нм ДНК. Погрешность этих экспериментов колоссальна, но в будущих более точных экспериментах условие $L > L_{\min}$ может оказаться важным.

Вычисление $p(F)$ и сравнение с экспериментом. Чтобы исследовать влияние энергетической функции $E(\alpha)$ на вклад $p(F)$ свободной цепи, построим графики (рис. 4). Мы рассмотрим квадратичную зависимость энергии от угла (1) (модель WLC [6]), линейную зависимость из статьи [9] (модель SEQ) и энергетические функции из работ [12] (ECH1, ECH2). Для моделей ECH выберем

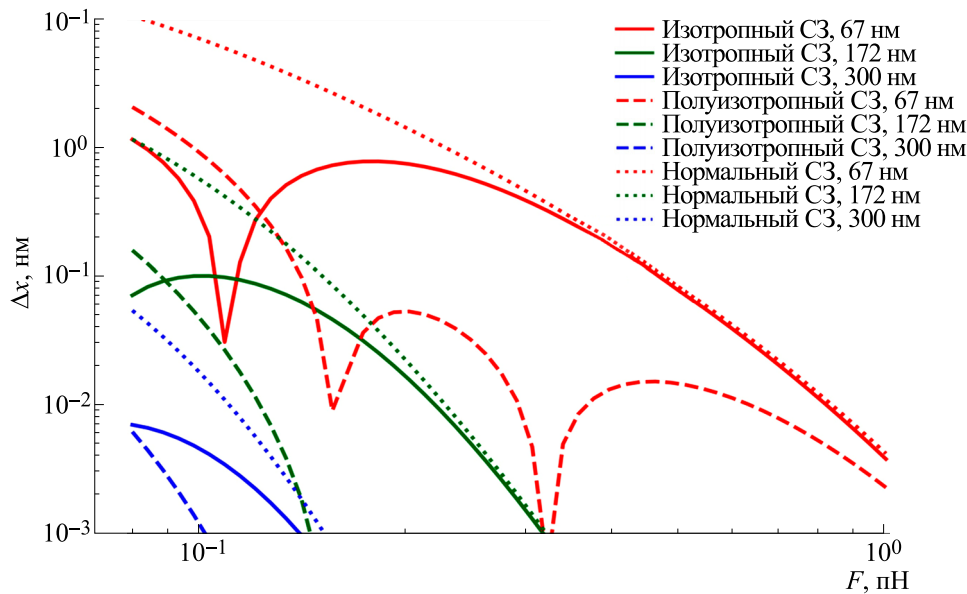


Рис. 3. Нелинейность зависимости растяжения x от длины L молекулы ДНК при малых L . По оси y отложена разница $\Delta x = |x - L \cdot p - 2 \cdot \Delta x_1|$ между точным значением x и приближенным значением, вычисленным по формуле (3) как сумма длины $L \cdot p$ в приближении длинной нити и двух слагаемых Δx_1 , отвечающих за одинаковые способы закрепления (СЗ) на концах. Длины 67 и 172 нм — значения, для которых есть экспериментальные данные [2, 4]. Рассматриваются изотропный, полуизотропный и нормальный способы закрепления. При $L = 300$ нм разница Δx ничтожно мала, но при низкой требуемой точности или больших силах формула (3) применима и при $L < 300$ нм.

длину единичного звена $l = 3$ нм порядка периода двойной спирали. Чтобы результаты были нагляднее, вычтем из всех графиков функцию $p(F)$ для $L_p = 50$ нм из работы [3].

Обратим внимание на пересечение графиков для моделей ECH, SEQ с графиками для модели WLC с разной персистентной длиной. Оно означает, что при больших силах ДНК должна растягиваться сильнее, чем в модели WLC с той же персистентной длиной, а при малых силах — слабее. Причина в том, что в модели ECH за гибкость отвечают сильные изгибы. При больших силах нить близка к прямой, сильных изгибов мало, и нить менее гибкая.

Тот же (по знаку и порядку) эффект дает и учет деформации растяжения [5], для различения этих двух поправок потребуется как теория [5], так и точные экспериментальные данные.

Точность данных, полученных в работе [4], позволяет выявить систематическое отклонение функции $x(F)$ от теоретических предсказаний, основанных на модели WLC. К сожалению, описание этого эффекта дано крайне неудачно [4]. Все графики $x(F)/L$ (даже при малых длинах ДНК) подгоняли под функцию $p(F)$ для модели WLC. В качестве параметров, регулируемых для максимального совпадения, брали персистентную длину, длину L ДНК и x -координату начала ДНК (точно не известную). Естественно, вычисленная таким образом «персистентная длина» зависела

от длины L , что связано с вкладом Δx_1 способа закрепления.

Но, кроме того, была обнаружена убывающая зависимость «персистентной длины» L_p от максимальной силы в эксперименте (L_p составляла 48 нм для диапазона сил 0.5–8 пН и 52 нм для диапазона сил 0.5–6 пН для 2500-нм ДНК). Тот же результат был виден как при малых, так и при больших L . Это означает отклонение зависимости $x(F)$ от теоретических предсказаний модели WLC. К сожалению, в работе [4] отсутствуют как исходные результаты, так и графики $x(F)$, построенные в масштабе, годном для сравнения. Поэтому, нам придется оценивать эффект лишь по порядку и по знаку.

По величине эффект вполне согласуется с рис. 4. Но знак «изменения L_p » противоположный! Наиболее простое объяснение выявленному противоречию таково. В работе [4] из аппроксимации моделью WLC вычислялась не только персистентная длина L_p , но и длина ДНК L . В статье не приведена «зависимость L от максимальной силы», лишь сказано, что она мала. Тем не менее, как видно из графиков, «изменение L » даже на 1% достаточно для компенсации «изменения персистентной длины».

Мы не будем изучать эту аппроксимацию детально, поскольку она не имеет физического смысла. Вместо этого нужно нарисовать экспери-

ментальный график $p(F)$, как только он будет доступен.

Вычисление вклада простых способов закрепления. Мы вычислим вклад $\Delta x_1(F)$ для изотропного, полуизотропного, нормального и касательного способов закрепления, немного обобщив результаты работы [4], и построим графики (рис. 5а). Оценим влияние энергетической функции на Δx_1 . Чтобы показать, что эффект мал, сравним графики для двух наиболее различающихся моделей — WLC и SEQ. Незначительные (порядка 1 нм) различия заметны только для касательных способов закрепления. Значит, можно использовать графики для модели WLC, даже не зная энергетическую функцию. Итак, сведений на рис. 5а достаточно для полного описания рассмотренных типов простых способов закрепления.

Чтобы получить результаты для простого способа закрепления «Большой шар», зафиксируем конец нити и проинтегрируем энергию шара по всевозможным его положениям. Поскольку закрепление «Большой шар» подвижно и осесимметрично, мы сразу получим функцию $Z_A(c_0)$ и посчитаем Δx_1 по формуле (30). Следуя работе [4], вычтем из Δx_1 радиус шара (рис. 5б).

На рис. 5 бросается в глаза сходство между графиками Δx_1 для шаров разного размера. Этому есть элементарное объяснение. Разобьем Δx_1 на вклад Δx_n конца нити и вклад $\Delta x_{ш}$ самого шара. Поскольку колебания шара вблизи положения равновесия малы, Δx_n оценивается как вклад простого способа закрепления на стыке «нить—шар». Чтобы оценить вклад $\Delta x_{ш}$ шара, пренебрежем влиянием нити на колебания шара. У шара есть 2 колебательных степени свободы, средняя энергия каждой из которых составляет $k_B T/2$. Тогда суммарная энергия $k_B T = -F \cdot \Delta x_{ш}$, а $\Delta x_{ш} = -k_B T/F$ не зависит от размеров шара.

Для проверки описанной теории мы посчитали разность $\Delta x(F) = \Delta x_1 - \Delta x_{ш} - \Delta x_n$. Для шара радиусом 1400 нм $\Delta x < 0.5$ нм для всего диапазона рассматриваемых сил, всех типов способов закрепления и моделей ДНК. Для шара радиусом 250 нм разность $\Delta x(F)$ построена на графике 5в. Она тоже мала по сравнению со случайной погрешностью экспериментов [4].

Анализ способа закрепления «Большой шар» — пример эффективности подхода с разбиением x на отдельные слагаемые. Так, в работе [4] основные выводы об эффективности теории способов закрепления, связанные с уменьшением «персистентной длины» при малых x , были качественными, а ключевую роль в эффекте играл способ закрепления «Большой шар». Из нашей же теории ясно, что постоянный и не связанный

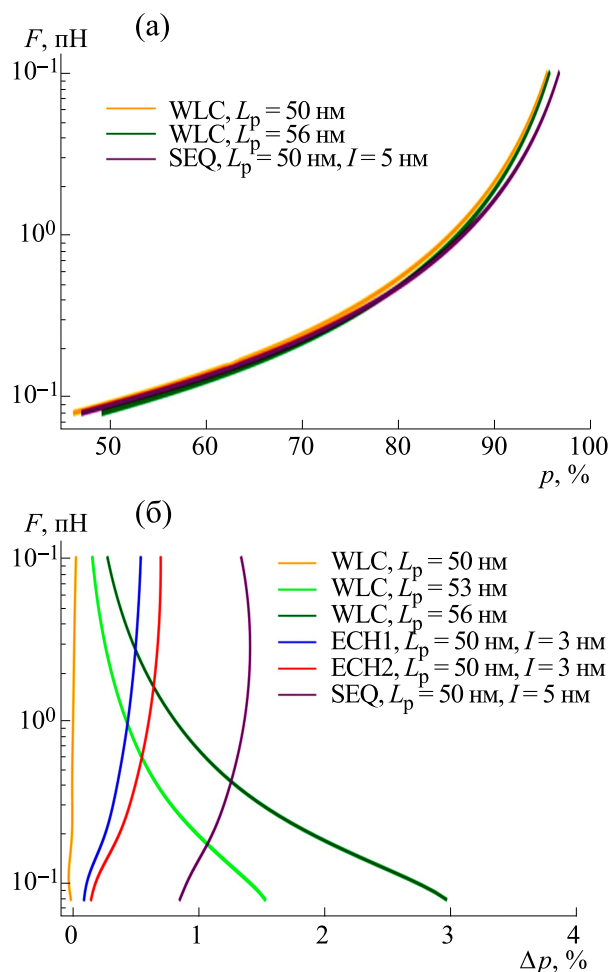


Рис. 4. Различия в значениях растяжения x , вычисленного при помощи различных моделей ДНК. (а) — Зависимость $p(F)$. Угловой коэффициент p функции $x(L)$ принимает значения от 0 до 1 и может измеряться в процентах. Графики $p(F)$ для различных энергетических функций визуально похожи, а график близок к известным [1, 9]. (б) — Разница $dp(F)$ в функции $p(F)$ между разными моделями ДНК (WLC с различной персистентной длиной, ECH1, ECH2, SEQ) и моделью WLC ($L_p = 50$ нм, $l < L_p$) [1]. В модели ECH и ее предельном случае SEQ при больших силах растяжение больше, чем в WLC, а при малых силах — меньше. Это, на первый взгляд, противоречит экспериментальным данным [4].

с ДНК вклад $\Delta x_{ш}$ шара надо исключить из x еще до построения графиков.

АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ ПОГРЕШНОСТЕЙ И ОГРАНИЧЕНИЙ

Разберем основные приближения, сделанные в работе, и связанные с ними погрешности, а также предложим методы их уменьшения.

Один из важнейших источников случайной погрешности, не описанный в литературе по растяжению ДНК, связан с топоизомерией нити.

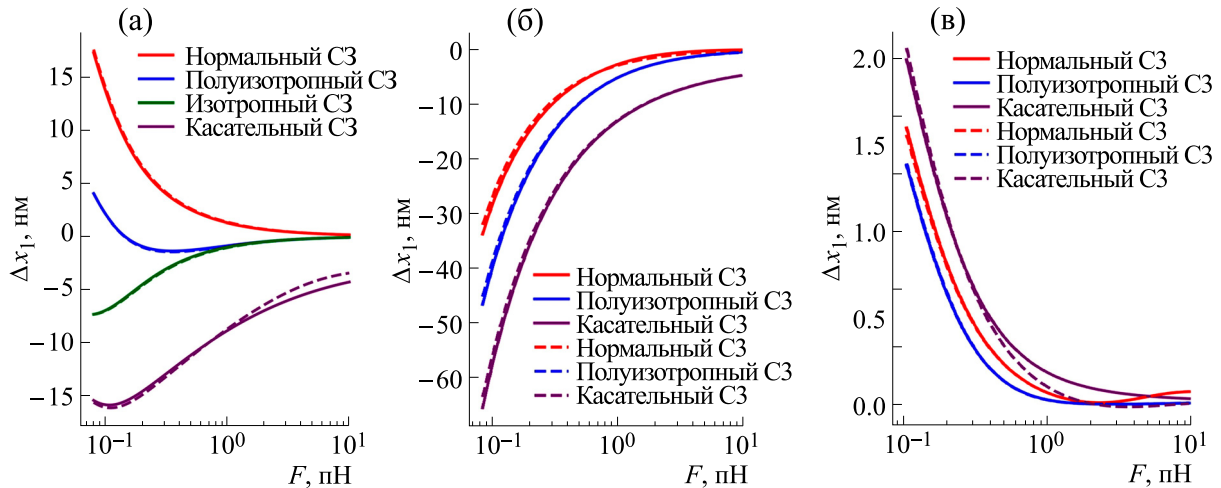


Рис. 5. Вклад Δx_1 в общее растяжение при различных способах закрепления (СЗ). (а) — Зависимость вклада Δx_1 различных простых способов закрепления от силы F для двуцепочечной ДНК. Сплошная линия — модель WLC, пунктирная — модель SEQ с той же персистентной длиной $L_p = 50$ нм. Эти результаты позволяют вычислить зависимость $x(F)$ для ДНК любой длины $L > L_{\min} = 300$ нм, с любой комбинацией описанных способов закрепления на концах. (б) — Зависимость вклада Δx_1 простого способа закрепления «Большой шар» от силы F для двуцепочечной ДНК. Во всех случаях мы вычитаем из Δx_1 радиус R шара. Сплошная линия — шар радиуса 1400 нм, используемый в эксперименте [2], пунктирная — шар радиуса 250 нм, используемый в эксперименте [4]. Видно, что Δx_1 во всех случаях слабо зависит от R . (в) — Разница $\Delta x = \Delta x_1 - \Delta x_1' - \Delta x_{\text{ш}}$ между точным значением вклада Δx_1 способа закрепления «Большой шар» и приближенным значением, вычисленным как сумма вклада $\Delta x_1'$ простого способа закрепления на стыке «нить-шар» и вклада $\Delta x_{\text{ш}} = -k_B T/F$ самого шара. Радиус шара $R = 250$ нм. Сплошные графики построены для модели WLC, пунктирные — для модели SEQ. Разница Δx невелика по сравнению с погрешностью экспериментов [2, 4], что позволяет использовать упрощенную модель способа закрепления «Большой шар» для всех типов способов закрепления на стыке «нить-шар» и всевозможных версий модели Виггинса.

Ключевую роль в данном эффекте играет размер подвижного крепления. Для образования/исчезновения узла нужно, чтобы крепление радиуса R прошло через образованную нитью петлю длиной не менее $2\pi R$. Возникновение такой петли приводит к увеличению потенциальной энергии на $2\pi R F = 40 k_B T$ при минимальных изучавшихся $R = 250$ нм, $F = 0.1$ пН [4].

Поэтому во всем диапазоне используемых сил потенциальный барьер высокий, и топоизомерию важно учитывать. Особенно интересно поведение заузленных топоизомеров ДНК, но его теоретическое описание требует серьезной работы. Узлы неизбежно возникают при подготовке эксперимента с длинными ($L = 30$ мкм $= 600 L_p$ в экспериментах, описанных в работе [1]) молекулами ДНК.

Тем не менее, при силах $F < 0.1$ пН и длине нити $L > 2\pi R$ возникает ситуация, когда переходы между топоизомерами происходят, но редко, и их можно отследить в реальном времени. Поскольку не слишком редки переходы, когда увеличение потенциальной энергии составляет порядка $k_B T$, масштаб эффекта $k_B T/F$ такой же, как и у вклада большого шара. Значит, скачкообразные изменения x при постоянной силе $F < 0.1$ пН должны быть заметны на стандартной эксперименталь-

ной установке [4] с оптической ловушкой при правильном подборе R , F и L . Так как множество простых узлов дискретно, должны быть видны переходы между дискретным набором значений x . Поскольку эксперимент позволит измерить как характерное время переходов, так и вероятности нахождения в каждом из состояний, полезна будет и теория, описывающая эти величины. Итак, топоизомерия должна быть превращена из источника случайной погрешности в область экспериментальных и теоретических исследований.

Далее, используемая нами модель Виггинса включает приближения, описанные в разделе «Используемая модель ДНК» и в тематической литературе [1]. Зависимость упругих свойств от последовательности ДНК, растяжение и кручение нити ведут к небольшому изменению x . Учет этих поправок требует теории, обобщающей формулу (3) на другие модели ДНК. Он будет особенно актуален, если удастся повысить точность экспериментов [4].

Далее, условия 1–6, наложенные нами на способ закрепления, достаточно слабые. Тем не менее, они часто не выполняются в экспериментах. В первую очередь, может нарушаться подвижность способа закрепления (условия 5 или 1). Во всех теоретических статьях по теме растяжения

ДНК, включая эту, предполагается, что отклонение подвижного способа закрепления от среднего положения, рассчитанного теоретически, ограничено лишь большой энергией или низкой энтропией полученных конформаций. Среднеквадратичное отклонение рассчитано в работе [10].

Тем не менее, в экспериментах [1, 2, 4] часто используют нить, идущую практически параллельно твердой поверхности. В этом случае тепловые флуктуации «подвижного» способа закрепления ограничены этой поверхностью. Кроме того, малый размер оптической ловушки или непостоянный градиент магнитного поля приводят к зависимости силы F от положения «подвижного» способа закрепления. Описанные эффекты приводят к систематической погрешности значения x , полученного по формулам (3) и (8), и могут изучаться теоретически. Но необходимая теория должна зависеть от типа экспериментальной установки.

Вторая проблема связана с использованием двух асимметричных способов закрепления (нарушение условия 6). Она актуальна в экспериментах, где сила создается градиентом магнитного поля [2], поскольку подвижный способ закрепления асимметричен.

Условие на размер свободной цепи $L > L_{\min} = 300$ нм выполняется почти для всех экспериментов [1, 2, 4]. Численная проверка условия 2 универсальна и легко применима. Остальные условия на способ закрепления выполнены практически всегда.

Наиболее очевидное приближение, используемое в математической модели эксперимента по растяжению ДНК, связано с тем, что сложные экспериментальные способы закрепления (содержащие, например, крепление молекулы ДНК к поверхности с помощью пары «стрептавидин–биотин») заменяют на простые модели (например, на полуизотропный способ закрепления). Для улучшения этого приближения, нужен теоретический анализ сложных способов закрепления (например, крепления нити к большому шару и к бесконечной наклонной плоскости, как в работе [4]).

Однако на этом пути имеется качественное препятствие. Использование какой-либо модели предполагает, что все способы закрепления, полученные одинаковыми экспериментальными методами, дают одинаковый вклад Δx_i . Таким образом, погрешность, связанная со способом закрепления, должна быть систематической. Тем не менее, в экспериментах в работах [2] и [4] видна большая случайная погрешность, значительная часть которой может быть связана с способом закрепления. Это означает, что, несмотря на одинаковый подход к креплению нити, способы закрепления получились разными.

Возможны два принципиально разных подхода к борьбе со случайной погрешностью способа закрепления. Первый подход основан на том, что направление конца ДНК в экспериментах, описанных в работе [4], могло быть случайным образом зафиксировано в креплении. Это давало разброс способов закрепления — от касательных до нормальных (рис. 5а). Но можно сделать концевой участок ДНК одноцепочечным. Поскольку жесткость одноцепочечной ДНК мала, получится более-менее воспроизводимый осесимметричный способ закрепления, близкий к полуизотропному.

Второй подход основан на том, что способы закрепления, имеющиеся для одной конкретной молекулы ДНК, не меняются в ходе экспериментов. Поэтому предлагается провести серию экспериментов с одной и той же ДНК, не трогая способы закрепления. В частности, серия может содержать:

- А) Создание одноцепочечных разрывов в ДНК сайт-специфической рестриктазой;
- Б) Гибридизация ДНК с помещенными в раствор одноцепочечными фрагментами;
- В) Превращение одноцепочечных участков в двухцепочечные с помощью полимеразы;
- Г) Устранение одноцепочечных разрывов с помощью лигазы.

На каждом этапе можно контролировать ход экспериментов по изменению функции $x(F)$. Если, например, удастся вставить в двухцепочечную ДНК длинный периодический фрагмент, используя пункты А–Г, возможно измерить $p(F)$ для этого фрагмента, сведя случайную погрешность способа закрепления к нулю.

Тем не менее, второй подход полезен лишь при условии, когда способы закрепления вносят основной вклад в случайную погрешность измерений. Итак, даже при выполнении всех условий на способы закрепления, они могут создавать различные погрешности. Тем не менее, все эти погрешности имеют общую черту: из формулы (3) следует, что они никак не зависят от длины нити. Это позволяет отделить их от других типов погрешностей.

Наконец, наиболее сложны в теоретическом описании эффекты, напрямую не связанные со свойствами нити, но влияющие на $x(F)$. Таковы, например, конвекционные течения, создающие вязкое трение, и неточность измерения силы, создаваемой оптической ловушкой. Отличительной их чертой является возможность измерить разные значения $x(F)$ для одной и той же молекулы ДНК, ничего не меняя в системе.

Связанную с этим случайную погрешность несложно оценить. Для этого достаточно провести следующую серию экспериментов. Во-первых,

можно измерять x в течение длительного времени. Во-вторых, можно много раз увеличить и уменьшить силу F , а затем сравнить графики $x(F)$. В-третьих, для осесимметричных способов закрепления, можно изменять направление силы F . Все это было проделано в работе [4], но в текст статьи вошли лишь усредненные графики $x(F)$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы доказали, что формула (3) для разбиения $x(F)$ на отдельные слагаемые, работает при достаточно широких предположениях. Это позволяет рассматривать способ закрепления как самостоятельный объект, характеризующийся только вкладом Δx_1 и размером. Такое рассмотрение упрощает численные расчеты. Описанная теория позволяет улучшить работу как с простыми способами закрепления, так и со сложными, в том числе невоспроизводимыми. Полученные результаты позволяют предложить новые экспериментальные методы для точного измерения $x(F)$. Используемая нами математическая модель приближенная. Тем не менее, три основных типа погрешности — топоизомерию, погрешность, связанную со способом закрепления, и неустранимую погрешность, не связанную со свойствами нити, — легко различить. Это поможет бороться с ними по отдельности.

По результатам данного исследования остаются несколько открытых теоретических вопросов. Во-первых, не хватает точного вычисления вклада конкретных сложных способов закрепления, например, вклада крепления к наклонной плоскости или твердому подвижному шару. Во-вторых, полезно теоретически описать топоизомерию, в особенности, поведение заузленной ДНК при растяжении. В-третьих, нужно обобщить формулу (3) для неоднородной ДНК, содержащей одноцепочечные разрывы, участки с разными последовательностями, модифицированные основания и т.д., и получить численные значения вклада этих неоднородностей в $x(F)$.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит И.Ю. Гущина за помощь в подготовке текста статьи, А. Онуфриева — за знакомство с темой и тематической литературой, В. Дидину — за помощь в доступном изложении материала.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы FSMG-2021-0002, соглашение 075-03-2023-106).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marko J. F. and Siggia E. D. Stretching DNA. *Macromolecules*, **28** (26), 8759–8770 (1995). DOI: 10.1021/ma00130a008
2. Shon M. J., Rah S. H., and Yoon T. Y. Submicrometer elasticity of double-stranded DNA revealed by precision force-extension measurements with magnetic tweezers. *Sci. Adv.*, **5** (6), eaav1697 (2019). DOI: 10.1126/sciadv.aav1697
3. Smith S. B., Finzi L., and Bustamante C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, **258** (5085), 1122–1126 (1992). DOI: 10.1126/science.1439819
4. Seol Y., Li J., Nelson P. C., Perkins T. T., and Betterton M. D. Elasticity of short DNA molecules: theory and experiment for contour lengths of 0.6–7 microm. *Biophys. J.*, **93** (12), 4360–4373. (2007). DOI: 10.1529/biophysj.107.112995
5. Fiasconaro A. and Falo F. Elastic traits of the extensible discrete wormlike chain model. *Phys. Rev. E.*, **107** (2), 024501 (2023). DOI: 10.1103/PhysRevE.107.024501
6. Kratky-Porod Chain [Electronic resource]. URL: <https://www.polymerdatabase.com/polymer%20physics/Wormlike%20Chain.html> (accessed: 01.08.2023).
7. Livadaru L., Netz R. R., and Kreuzer H. J. Stretching Response of discrete semiflexible polymers. *Macromolecules*, **36** (10), 3732–3744 (2003). DOI: 10.1021/ma020751g
8. Koslover E. F. and Spakowitz A. J. Discretizing elastic chains for coarse-grained polymer models. *Soft Matter*, **9** (29), 7016–7027 (2013). DOI: 10.1039/C3SM50311A
9. Wiggins P. A. and Nelson P. C. Generalized theory of semiflexible polymers. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **73** (3, Pt 1), 031906 (2006). DOI: 10.1103/PhysRevE.73.031906
10. Andersen N. T., Teng Y., and Chen J. Z. Y. Stretching a Semiflexible Polymer of Finite Length // *Macromolecules*, **55** (1), 210–216 (2022). DOI: 10.1021/acs.macromol.1c02087
11. Vologodskii A. and Frank-Kamenetskii M. D. Strong bending of the DNA double helix. *Nucl. Acids Res.*, **41** (14), 6785–6792 (2013). DOI: 10.1093/nar/gkt396
12. Drozdetski A. V., Mukhopadhyay A., and Onufriev A. V. Strongly bent double-stranded DNA: reconciling theory and experiment. *Front. Phys.*, **7**, 195 (2019). DOI: 10.3389/fphy.2019.00195
13. Fosdick R. L. and James R. D. The elastica and the problem of the pure bending for a non-convex stored energy function. *J. Elasticity*, **11** (2), 165–186 (1981).

Impact of Immobilization Method on DNA Stretching Characteristics

М.А. Didin*

**Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

The problem of stretching a flexible polymer with given conditions at the ends, under the action of a fixed force, is considered. A mathematical model is constructed for different energy functions describing the elasticity of the polymer and different immobilization methods. It is shown that the dependence of stretching on the polymer length is linear. Numerical results are given. The results obtained allow to improve the analysis of experimental data on polymer stretching. The theory offers several verifiable predictions, and experimental methods are proposed to improve the accuracy of measurements.

Keywords: persistence length, DNA, stretching, immobilization method

АНАЛИЗ РЕДАКТИРОВАНИЯ РНК В КОНСЕРВАТИВНЫХ УЧАСТКАХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА RPS12 ТРИПАНОСОМАТИД

© 2024 г. Е.С. Герасимов^{*,#}, Ю.А. Руденская^{*}, Е.А. Брюшкова^{*},
О.А. Коржавина^{*}, А.А. Колесников^{*}

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

[#]E-mail: jalgard@gmail.com

Поступила в редакцию 02.05.2024 г.

После доработки 02.05.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Ген RPS12 митохондриального генома кодирует важный белковый фактор малой субъединицы рибосомы. Транскрипт данного гена у ряда организмов подвергается РНК редактированию, например, он активно редактируется у всех трипаносоматид. В данной работе мы сравнили последовательности отредактированных мРНК и третичные структуры транслируемых с них белков ряда представителей семейства Trypanosomatidae и показали, что третичная структура RPS12 остается консервативной у всех видов, тогда как на уровне первичной структуры белка выделяется лишь два коротких консервативных участка. С помощью компьютерного моделирования продемонстрировано, что обнаруженные участки кодируют аминокислоты, обращенные в сторону декодирующего центра рибосомы. Характер их редактирования свидетельствует о том, что их эволюционная консервативность не связана с наличием системы редактирования, более того, прослеживается эволюционная тенденция к утрате статуса редактирования у ряда сайтов в пределах консервативных участков гена RPS12.

Ключевые слова: RPS12, рибосома, редактирование РНК, молекулярная эволюция, структура белка, консервативные области.

DOI: 10.31857/S0006302924060035, EDN: NLXCDL

Около половины генов митохондриального генома трипаносоматид подвергается процессу РНК-редактирования, в результате которого последовательность зрелой матричной РНК (мРНК) формируется из первичного транскрипта митохондриальной мРНК путем множественных вставок или удалений уридиловых оснований [1, 2]. Позиции и количество вставок и удалений уридилов определяется в результате взаимодействия с первичным транскриптом митохондриальной мРНК специальных молекул РНК, называемых гидовыми (гРНК), таким образом, генетическая информация зрелой мРНК оказывается разнесенной по разным локусам генома [3, 4]. Митохондриальные гены трипаносоматид расположены на относительно крупных кольцевых молекулах, называемых макси-кольцами. Гены гРНК в большинстве случаев располагаются на более мелких, однако более многочисленных ми-

ни-кольцах [3]. Разнообразие мини-колец в клетках создает основу для так называемого альтернативного редактирования, когда один локус может быть отредактирован разными гРНК [5].

Современные представления о транскриптом трипаносоматид, полученные на основании данных высокопроизводительного секвенирования РНК, выявляют его чрезвычайную сложность, выраженную в присутствии множества изоформ мРНК [6, 7]. В формировании сложности транскриптома задействованы как минимум два механизма: привлечение нескольких альтернативных гРНК к редактированию одного локуса [7–9] и формирование альтернативных вариантов локуса в результате взаимодействия с отдельно взятой гРНК [10].

В редактировании гена RPS12, кодирующего белок S12 малой субъединицы митохондриальной рибосомы, участвует несколько десятков гидовых РНК, производя в общей сложности вставку и удаление 124–172 уридиловых оснований в зависимости от вида организма [6, 7, 11–13]. В данной работе мы показываем, что ген RPS12 стабильно

Сокращения: мРНК — матричная РНК, гРНК — гидовая РНК, RPS12 — ген митохондриального рибосомального белка S12 (Ribosomal Protein S12), ЭТЦ — электрон-транспортная цепь.

экспрессируется у всех исследованных нами видов трипаносоматид, а также стабильно редактируется, в отличие от генов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). В белковой последовательности RPS12 можно выделить два чрезвычайно консервативных участка (блока). Сравнительный анализ редактирования этих участков мРНК RPS12 разных видов показывает, что консервативность паттерна редактирования не зависит от последовательности геновой РНК. Данные результаты вносят большой вклад в изучение эволюции системы РНК редактирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Митохондриальные геномы и транскриптомы. В данной работе анализировали митохондриальные геномы и транскриптомы различных видов трипаносоматид из разных филогенетических клад семейства, их данные приведены в табл. 1.

В случае, если необходимые анализы для вида были проведены ранее, приводится ссылка на публикацию и используются последовательности матричной РНК, геномной ДНК и результаты секвенирования РНК из данной работы. В других случаях последовательности митохондриального генома и чтения РНК скачивался из соответствующих баз данных, а анализ производился, как описано ниже.

Анализ митохондриального транскриптома. Последовательность гена и отредактированной (зрелой) мРНК RPS12 для всех исследованных видов были получены с использованием программы T-Aligner [7, 10] либо в рамках данной работы из публично доступных данных РНК-секвенирования, либо в ходе предыдущих исследований (см.

табл. 1) по методу, описанному ранее [6, 10, 13]. Кратко суть метода заключается в следующем: результаты транскриптомного секвенирования картируются с помощью программы alignlib пакета T-Aligner (алгоритм программы создан для работы с сильно измененными уридилловым редактированием чтениями РНК) на последовательность митохондриального макси-кольца, выявленные события вставки и удаления уридилов используются для аннотации границ редактируемых генов. Затем чтения, картированные на ген RPS12, отбираются и используются программой findorfs пакета T-Aligner для транскриптомной сборки и анализа изоформ. Последовательность зрелой мРНК гена RPS12 выделяется, как наиболее похожая на известные последовательности RPS12 изоформа с помощью blastp из ncbi-blast-suite [14].

Анализ транскриптома каждого из видов проводили следующим образом: количество картированных чтений и долю отредактированных чтений оценивали по результату работы инструмента alignlib, события редактирования устанавливали с использованием скрипта coverage.py пакета T-Aligner. В работе использованы полученные ранее карты взаимодействия гРНК с мРНК RPS12 для *Trypanoplasma borreli* [6], *Blastocrithidia nonstop* [12], *Leishmania tarentolae* [11] и *Leptomonas pyrrhocoris* [10].

Множественное выравнивание последовательности RPS12 и выделение консервативных позиций. Множественное выравнивание отредактированных мРНК RPS12 осуществляли путем группирования попарных потриплетных выравниваний мРНК и геномной ДНК для каждого из исследуемых видов, полученной с помощью ин-

Таблица 1. Данные анализированных видов трипаносоматид

Вид	РНК-секвенирование (номер в SRA или ссылка на источник)	Макси-кольцо (номер в GenBank, TriTrypDB или ссылка на источник)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	SRR17349272; SRR17349274	[13]
<i>Leishmania donovani</i>	ERR2191874	MN904518.1
<i>Leishmania major</i>	SRR2136265; SRR2136270	LR697138
<i>Leishmania mexicana</i>	ERR789787; ERR789788	TriTryp: MHOM/GT/2001/U1103
<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	[7]	[7]
<i>Wallacemonas</i> sp. WSD	SRR24223636	GCA_030849645.1 (скаффолд JASANQ010001068.1)
<i>Blastocrithidia nonstop</i>	[12]	[12]
<i>Trypanoplasma borreli</i>	[6]	[6]

струмента `mrna2ref` из пакета T-Aligner. Консервативность позиции оценивали путем вычисления энтропии колонки выравнивания по формуле — $\sum_x p_x \log p_x$, где p_x — наблюдаемая вероятность соответствующей аминокислоты в столбце. Консервативные блоки были выбраны в зонах выравнивания, где энтропия была меньше 0.5 для окна длиной 10 аминокислотных позиций вокруг выбранной позиции.

Моделирование третичной структуры белка RPS12. Для моделирования третичной структуры белка RPS12 использовалась последовательность, полученная путем *in silico* трансляции отредактированной мРНК. Моделирование проводилось с помощью web-сервиса SWISS-MODEL [15] Швейцарского института биоинформатики (swissmodel.expasy.org/).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика экспрессии и редактирования гена RPS12 у разных представителей семейства Trypanosomatidae. Большинство имеющихся транскрипционных данных для трипаносоматид получено в результате секвенирования лабораторных культур, однако имеются основания полагать, что в условиях культивирования на искусственных средах ЭТЦ митохондрии либо не активны, либо работают не в полную силу, что может сказаться на экспрессии генома митохондрии. Так, например, известно, что у *Leishmania tarentolae* ряд генов белков ЭТЦ транскрибируется на низком уровне, а транскрипты этих генов не редактируются до зрелых мРНК [11]. Ген RPS12 кодирует важный для трансляции белковый фактор малой субъединицы митохондриальной рибосомы, можно ожидать, что данный ген будет экспрессироваться и редактируется в любых условиях. Наши предыдущие работы подтверждают данное предположение: ген RPS12 активно транскрибируется и редактируется у *Leptomonas pyrrhocoris* [7], *Blastocrithidia nonstop* [12], трех штаммов *Trypanosoma cruzi* [13], а также у криптобии *Trypanoplasma borreli* [6]. При этом в ряде исследований были использованы дифференциальные по содержанию глюкозы и других питательных веществ условия культивирования, но уровень транскрипции RPS12 оставался стабильным. В данной работе мы расширили круг видов, проведя анализ экспрессии и характера редактирования мРНК гена RPS12 у трех представителей рода *Leishmania* и одного вида из рода *Wallacemonas*. При этом для *Leishmania mexicana* и *Leishmania major* нами проанализированы данные по экспрессии на промастиготной (характерной для нахождения паразита в насекомом) и амастиготной (проходящей в теплокровном хозяине) стадиях жизненного цикла. Во всех исследованных образцах ген RPS12 экспрессируется на относи-

тельно высоком уровне (от ~200 до ~45 000 чтений, в зависимости от глубины секвенирования), при этом для большинства видов это самый или один из самых высокоэкспрессируемых генов митохондриального генома. Во всех исследованных образцах удается реконструировать последовательность зрелой мРНК RPS12 с помощью T-Aligner, что свидетельствует о том, что ген активно и полностью редактируется. Интересно отметить, что при этом почти в половине образцов исследованных лейшманий, в том числе на амастиготной стадии, не удается реконструировать зрелые мРНК ряда генов ЭТЦ, например, ND8 и ND9.

Таким образом, можно охарактеризовать паттерн экспрессии и редактирования RPS12 как стабильный, что делает данный ген удобным объектом для исследования эволюции механизма редактирования.

Консервативные участки RPS12 и их расположение на модели 3D-структуры белка. Используя полученные ранее и реконструированные в данной работе последовательности отредактированных (зрелых) мРНК RPS12 разных видов трипаносоматид, мы построили множественное выравнивание белковых продуктов. С помощью метода оценки энтропии позиций в данном выравнивании четко выделяются два консервативных блока (длиной 9 и 11 аминокислот), которые мы обозначили по характерным аминокислотам, как PSSG и 3GFID.

Модель 3D-структуры белка RPS12 *Trypanosoma cruzi* (модели, полученные для последовательностей других видов, имеют схожие параметры) по шаблону (SWISS-MODEL) показана на рис. 1. Очевидно, что оба консервативных участка белка ориентированы на одну сторону и, вероятно, участвуют в важных взаимодействиях, что объясняет высокую степень эволюционной консервации данных участков. Известно, что белок RPS12 является важным фактором сборки рибосомы [16, 17] и находится в непосредственной близости от декодирующего центра малой субъединицы [16], при этом участок белка, отмеченный стрелкой, направлен в канал рибосомы, где проходит матричная РНК.

Интересно, что белок RPS12 кодируется митохондриальным геномом у разных организмов, что, вероятно, связано с крайней гидрофобностью данного белка и необходимостью в котрансляционном включении его в рибосомы [17]. Также известно, что RPS12 редактируется не только у трипаносоматид. У растений транскрипт гена *rps12* также подвергается редактированию по механизму конверсии цитозина (C→U) [18, 19], при этом показано, что в состав рибосомы могут включаться частично отредактированные формы [18], хотя в случае с другими белками ЭТЦ расте-

ний присутствует отбор в пользу трансляции только полностью отредактированных матриц [19].

Выравнивание геномных ДНК, мРНК и соответствующих аминокислотных последовательностей в участках, соответствующих консервативным участкам RPS12, приведено на рис. 2. Из выравнивания видно, что последовательности геномной ДНК обоих блоков очень консервативны, отличия же в основном касаются кодируемых в геноме тимидинов, наличие или отсутствие которых в геномной ДНК разных видов компенсируется затем действием системы редактирования. Логично предположить, что соответствующие мутации в геномной ДНК эволюционно компенсировались мутациями в генах гРНК, редактирующих данный регион. Ниже мы рассмотрим эту гипотезу детально. Отметим также, что за пределами выделенных нами консервативных участков белковая последовательность RPS12 трипаносоматид достаточно дивергентна, при этом согласно результатам моделирования 3D-структура белка RPS12 разных видов оказывается схожей со структурой белка *Trypanosoma brucei*, используемой в качестве шаблона SWISS-MODEL.

Изменения в геномной ДНК не связаны с компенсаторными мутациями генов гидовых РНК. Мы сравнили доступные карты гРНК RPS12 четырех видов *Trypanoplasma borreli* [6], *Blastocrothidia non-stop* [12], *Leptomonas pyrrhocoris* [10] и *Leishmania tarentolae* [11]. Выравнивания гРНК на фрагмент мРНК в зонах консервативных участков для данных видов представлены на рис. 3. Из приведенного выравнивания хорошо видно, что для редактирования консервативных участков разных видов используются негомлогичные гРНК. Во-первых, последовательности самих гРНК обладают низким уровнем сходства. Во-вторых, что более важно, гомологичные сайты на мРНК разных видов могут редактироваться в составе разных гРНК (соседних по каскаду, см. ниже). Например, область участка PSSG мРНК *Trypanoplasma borreli* редактируется одной гРНК, тогда как у *Leptomonas pyrrhocoris* данная область редактируется двумя гРНК, граница между которыми приходится между парой серинов в участке PSSG, а у относительно близкородственной *Leishmania tarentolae* граница между гРНК находится после второго серина. Аналогичную картину можно наблюдать в блоке выравнивания 3GFID, где у трех видов сайты редактирования попадают в одну гРНК, а у *T. borreli* — в две с границей перед тремя глицинами. Таким образом, в образование кодонов гомологичных и крайне консервативных аминокислотных остатков белка RPS12 вовлекаются негомлогичные и структурно различные молекулы гРНК. Из этого можно сделать вывод, что консервативность белковой структуры RPS12 сохраняется вопреки высокой вариабельности

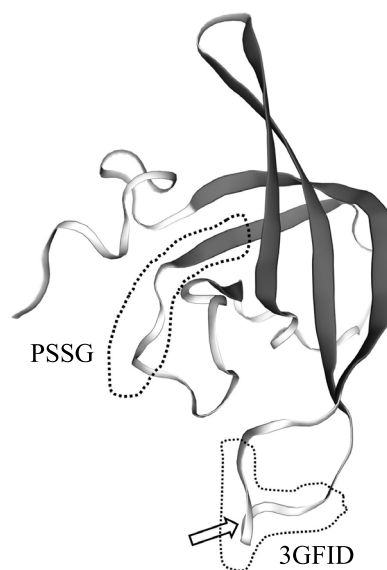


Рис. 1. Структурная модель белка RPS12 *Trypanosoma cruzi* штамма Sylvio X10. Модель 3D-структуры белка RPS12, полученная с помощью web-сервиса SWISS-MODEL [15] с использованием установленной нами последовательности зрелой мРНК *Trypanosoma cruzi* [13] в качестве запроса. Использован шаблон 7pub.8, оценка качества полученной модели (Global Model Quality Estimate, GMQE) равна 0.50. Лентой условно изображены участки со стабильной вторичной структурой согласно алгоритму DSSP. Пунктиром обведены зоны консервативных участков мРНК, обозначенные нами, как PSSG и 3GFID в данной работе. Стрелка указывает на место в структуре, наиболее близко расположенное к декодирующему центру на малой субъединице рибосомы [16].

последовательности гРНК, характер взаимодействия гРНК с мРНК в зоне консервативных участков мРНК сильно варьирует у разных видов, при этом структура зрелой мРНК остается практически неизменной.

Эволюция паттернов редактирования в консервативных участках последовательности гена RPS12. Выше мы показали, что гРНК, привлекаемые для редактирования RPS12 у разных видов, не являются эволюционно консервативными и не являются гомологами. Однако характерные паттерны редактирования остаются достаточно консервативными. На рис. 4 приведены формулы редактирования консервативных блоков PSSG и 3GFID у исследуемых видов, которые отражают последовательность редакционных действий, имеющую место при создании системной редактирования зрелой мРНК. Интересно, что паттерны редактирования оказываются намного более консервативными, чем сами последовательности гРНК, но менее консервативными, чем геномные

Lpyr AG-CCTCGA	--ACCT	AGTTCC	GG- AA-AGACG-	--A---ATAG--GAATTTTGG-	GG-GG---A--	GATCTACCC	GGA
Lpyr AGUCCUCGA	uuACCU	AGUUC	GGu AAuAGACGu	uuAuuuAuAGuuGAA-----GGu	GGuGGuuuuuuuu	GAUCUACCC	GGA
Lpyr S P R	L P	S S	G N R R	L F I V E	G G G F I	D L P	G
Lmaj AG-CCACGA	--ACCA	AGTCC	GG- AACCCGACG-	TTG---A-AG--GAATTTT	GG- GG-GG---A--	GA---GCCA	GGA
Lmaj AGUCCACGA	uuACCA	AGCUCC	GGu AACCCGACGu	UUGuuuAuAGuuGAA----	GGuGGuGGuuuuuuuu	GAuuuGCCA	GGA
Lmaj S P R	L P	S S	G N R R	L F I V E	G G G F I	D L P	G
Lmex AG-CCACGA	--ACCA	AGTCC	GG- AATCGACG-	TTG---A-AG--GAATT	GG- GG-GG---A--	GA---GCCA	GGA
Lmex AGUCCACGA	uuACCA	AGCUCC	GGu AAUCGACGu	UUGuuuAuAGuuGAA--	GGuGGuGGuuuuuuuu	GAuuuGCCA	GGA
Lmex S P R	L P	S S	G N R R	L F I V E	G G G F I	D L P	G
Ldon AG-CCACGA	--ACCA	AGTCC	GG- AACCCGACG-	TTG---A-AG--GAATTTTGG-	GG-GG---A--	GA---GCCA	GGA
Ldon AGUCCACGA	uuACCA	AGUUC	GGu AACCCGACGu	UUGuuuAuAGuuGAA-----GGu	GGuGGuGGuuuuuuuu	GAuuuGCCA	GGA
Ldon S P R	L P	S S	G N R R	L F I V E	G G G F I	D L P	G
Bnon AG-CCACG-	--GCCT	AGTTCA	GG- AA-CG---A	G-AT-GGGA---GAAT	GG- GG-GG---A--	GA-G---CCA	GG-
Bnon AGUCCACGt	uuGCCU	AGUUA	GGu AAUCGuuuA	GuAUuGGGAuuuGAA-	GGuGGuGGuuuuuuuu	GAuuuGCCA	GGu
Bnon S P R	L P	S S	G N R L	V L G F E	G G G F I	D V P	G
Wsd AGTCCACTTGG	T-GCCA	AG--CC	GG- AATCG-CG-	--A---A-AA--GATTTA	GG- GG-GG---A--	GA--G-CGA	GG-
Wsd AGUCCAC--GG	UuGCCA	AGuuCC	GGu AAUCGUCGu	uuAuuuAuAAuuGA---A	GGuGGuGGuuuuuuuu	GAuuuGCCA	GGu
Wsd S P R	L P	S S	G N R R	L F I I E	G G G F I	D C P	G
Tcru AGCCCACTTTTGA	--ACCC	AGT-CC	GG- AACCGTCG-	--A---A-A-AGATATT	GTTG-GG-GG---A--	GA---ACCCCTTTTGT	GTT
Tcru AGCCACG----	GAuuACCC	AGUUC	GGu AACCGUCGu	uuAuuuAuAAuuGA-A--	G--GuGuGGuGGuuuuuuuu	GAuuuACCC-----G---	
Tcru S P R	L P	S S	G N R R	L F I I E	G G G F I	D L P	G
Tbor -GTCCACG-	--ACTTTTCCAG--	CCTTTTTTGTGTAA	CG-A-G	A---A-GTTG-GGAA	GGC GG-GG---ATTTTGA	---ACTC-	AG-
Tbor uGUCCACGu	uuAC-----	CCAGuuCC-----	G-GUAAuCGuAuG	AuuuAuGUUuGGAA	GGC GG-GGuuuuuuuuuu	---ACTC-Cu	AGu
Tbor C P R	L P	S S	G N R M	I Y V V E	G G G F I	D L P	S

PSSG

3GFID

Рис. 2. Множественное выравнивание консервативных участков PSSG и 3GFID гена RPS12. Приведены два консервативных блока (участки PSSG и 3GFID) глобального потриплетного выравнивания последовательностей мРНК, геномной ДНК и соответствующего пептида для RPS12 исследуемых видов трипаносоматид. Для каждого вида выравнивание имеет три строки в следующем порядке сверху вниз: геномная ДНК, мРНК и последовательность белка. Вставляемые на этапе редактирования нуклеотиды показаны строчными буквами (u), удаляемые — знаком минуса (-). Видовые сокращения: Lpyr — *Leptomonas pyrrhocoris*, Lmaj — *Leishmania major*, Lmex — *Leishmania mexicana*, Ldon — *Leishmania donovani*, Bnon — *Blastocryptid-ia nonstop*, Wsd — *Wallacemonas sp.* WSD, Tcru — *Trypanosoma cruzi*, Tbor — *Trypanoplasma borelli*.

последовательности. Также заметно, что паттерн редактирования хорошо согласуется с филогенетическим положением видов, причем наиболее поздно ветвящимся родам *Leptomonas-Leishmania* присущи относительно более простые формулы редактирования.

Особенностью системы уридилового редактирования является направленность процесса по мРНК, называемая полярностью [20, 21]. Она обусловлена тем, что сайты посадки следующих гРНК обычно создаются в результате редактирования предыдущими гРНК, при этом редактиро-

Tbor	CACGUG-----	AUUUAGGG-----	U-CAUUAGCAUAC...	AAUAAUACAACACCUU]	[CACCAUAAUAA---	UUAUAAUG...
Tbor	#	## : :	:			:
Tbor	CCACGuuuAC-----	CCAGuuCC-----	G-GUAAuCGuAuG...	uuuAuuuAuGUUGuGGAA	GGCGGuGGuuuuuuuu	---GAuuuAC...
Tbor	P R L P	S S	G N R M	F I Y V V E	G G G F I	D L P...
Bnon ...	UCAGGUGCAAGCG	GAUCUUGC	CC]UUAAGCAAGTG...	GAUUGUAAGCAA	UCAUCGUGGAGUGA	CUACAAGAGUCCUC
Bnon ..		##		: :## :	: : : : :	## :
Bnon ...	AGUCCACGuuuGC	CUAGUUA	GGuAAUCGuuuAu...	uUGGGAuuuGAA	GGuGGuGGuuuuuuuu	GAUuuCCAGGUGGG
Bnon ...	S P R L P	S S	G N R L	L G F E	G G G F I	D V P G G
Lpyr ...	UUAAGAUUGAUG	GA] [AGU	CCAUAUCCAUAU	AUAAGUAUACAUAU	AUAUCGUUAGAUAUGA	UUAAGUUGGCUUACAUAU
Lpyr ...	: : : : :	#	## :		#: : : : :	: : : : :
Lpyr ...	AGUCCuCGAuAAC	CUAGuuCC	GGuAAUCGACGUG	uAuuuAuAGuuGAA	GGuGGuGGuuuuuuuu	GAUCuACCCGGAuGuAA
Lpyr ...	S P R L P	S S	G N R R	F I V E	G G G F I	D L P G C
Ltar UCAGGUGUUAUG	GAUUAAGG]	[UUAUUAAGUUGCAA...	AGAUGUUGGCUC----	UCACUAUCAAGAUAA	UUAAGCGGUCCU	
Ltar : :	:	: : :	: : : :	: : : :	: : : :	: : : :
Ltar AGUCCACGAAuAC	CUAGUUC	GGuAAUCGACGGu..	uuuAuAGuuGAA	uuuAuAGuuGAA	GGuGGuGGuuuuuuuu	GAuuuGCCAGGA
Ltar S P R L P	S S	G N R R	I	F I V E	G G G F I	D L P G

PSSG

3GFID

Рис. 3. Карты взаимодействия геновых РНК с мРНК в областях консервативных участков гена RPS12. Для каждого вида сверху вниз даны последовательности гРНК, строка выравнивания, последовательность мРНК и соответствующая им трансляция открытой рамки считывания. В строке выравнивания канонические пары оснований обозначены символом вертикальной черты (|); пары G:U, характерные для дуплексов гРНК:мРНК [2, 4] — символом двоеточия (:); несовпадающие нуклеотиды — символом (#). Малыми буквами u обозначены вставляемые урацилы. Границы гРНК обозначены квадратными скобками. Видовые сокращения: Lpyr — *Leptomonas pyrrhocoris*, Ltar — *Leishmania tarentolae*, Bnon — *Blastocryptid-ia nonstop*, Tbor — *Trypanoplasma borelli*.

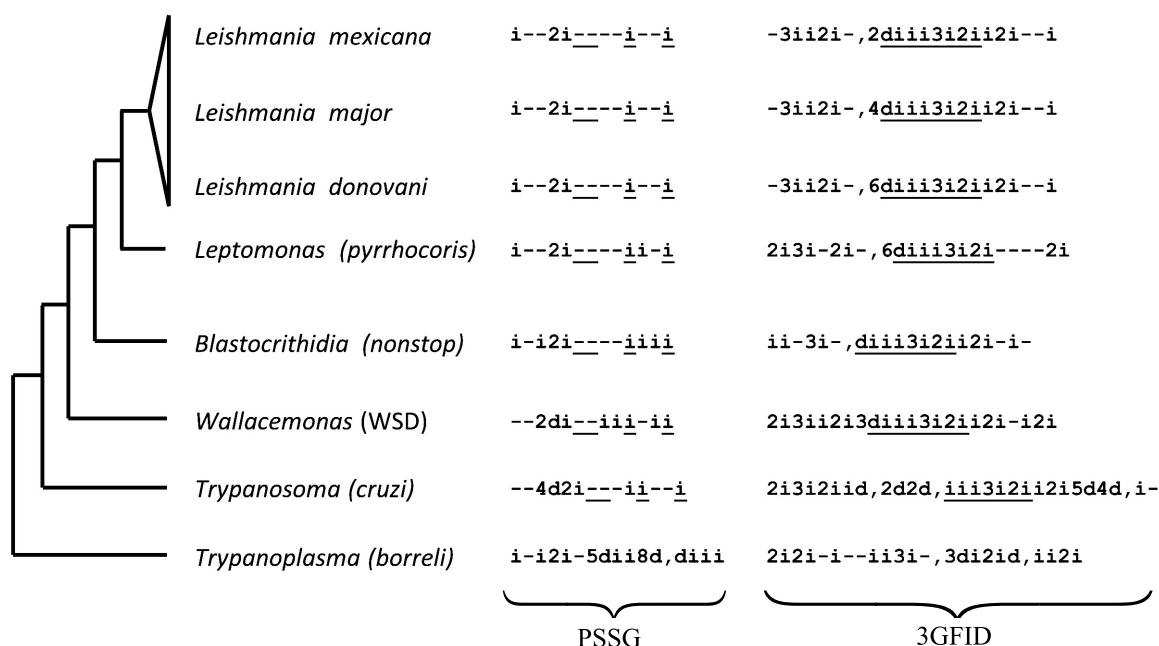


Рис. 4. Формулы редактирования консервативных участков мРНК гена RPS12 в разных кладах трипаносоматид. Кладограмма слева отражает лишь порядок ветвления исследуемых таксонов трипаносоматид, справа от нее приведены формулы редактирования участков консервативных участков мРНК гена RPS12. В случаях, когда таксон является родом, в скобках указывается вид, мРНК которого была использована для определения формулы (например, род *Wallacemonas* представлен изолятом WSD). В таксономической группе, представляющей род лейшманий, для демонстрации крайней консервативности структуры редактирования приведены 3 разных вида. Формулы редактирования являются компактной формой записи событий редактирования каждого из кодонов мРНК в пределах консервативного блока. Обозначены вставки (i) и удаления (d) уридилловых остатков системой редактирования (в случае, когда происходит вставка/удаление нескольких уридиллов, соответствующей букве предшествует число вставляемых/удаляемых остатков, например, вставка двух уридиллов обозначается 2i); нередактируемые кодоны обозначены знаком минуса (-). В случае, когда триплет возникает путем двух событий редактирования, такие события перечисляются через запятую (например, (i,2d) — вставка одного уридила сочетается с удалением 2 уридиллов при формировании данного кодона). В формулах подчеркнуты символы, отвечающие высококонсервативным типам редактирования в соответствующих кодонах (см. раздел «Результаты и обсуждение»).

вание начинается с 3'-сайтов транскрипта и заканчивается на 5'-конце. В пределах одной гРНК редактирование также протекает полярно, сайты на 3' (по мРНК) редактируются первыми [21].

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что структура каскадов гРНК, возникающая при редактировании мРНК, не является эволюционно консервативной. Гомологичные локусы мРНК разных видов могут редактироваться в составе разных гРНК, при этом последовательность аминокислот кодируемого белка может быть идентичной у очень дальних филогенетически видов (например, роды *Trypanosoma* и *Leishmania*), а структура самих каскадов сильно различаться у близких родственников (например, роды *Leptomonas* и *Leishmania*).

Интересно также отметить общую тенденцию к сокращению числа событий редактирования, характерную для семейства трипаносоматид. Так, например, у криптобии *T. borreli* наблюдаются

наиболее сложные паттерны редактирования, а у ветвящихся последними на кладограмме *Leptomonas-Leishmania* большинство сайтов не требует изменения (обозначены знаком «минус» на схеме, представленной на рис. 4). Подобная тенденция ранее была прослежена на уровне редактирования генов в целом [22, 23], когда ген или его часть в макси-кольце замещается на отредактированную версию, таким образом, снижая общее число редактируемых генов в геноме или длину редактируемого участка определенного гена. Предполагалось, что механизмом здесь служит обратная транскрипция частично или полностью отредактированной мРНК в геном макси-кольца. Данная теория хорошо согласуется с полярным характером редактирования, что объясняет редукцию редактирования на 3'-концах транскриптов. Но в случае с RPS12 ген редактируется по всей длине у всех представителей семейства, и в данной работе мы впервые указываем на тенден-

цию в эволюции к утрате редактирования на уровне отдельных сайтов. Это наблюдение может указывать на существование более точечных механизмов эволюции, направленных на отдельные сайты внутри гена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уридиловое редактирование РНК у трипаносоматид — уникальный молекулярный феномен, по-видимому, присущий только данной группе паразитических простейших. Роль редактирования в эволюции представителей семейства на сегодняшний день остается объектом интенсивного изучения, предположительно редактирование может быть связано с паразитизмом. Изучение эволюции редактирования в наиболее консервативных участках мРНК гена RPS12, стабильная экспрессия которого говорит о его важной роли для клеток всех видов, указывает на эволюционные тенденции, направленные на уменьшение числа редактируемых сайтов в генах макси-кольца и на отсутствие гомологии между аналогичными по локализации на мРНК генами гРНК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят своих коллег, профессора Островского университета Вячеслава Юрченко и доцента Университета Миннесоты Сару Лауру Циммер за помощь в обсуждении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-10008).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lukeš J., Kaur B., and Speijer D. RNA editing in mitochondria and plastids: weird and widespread. *Trends Genet.*, **37**, 99–102 (2021). DOI: 10.1016/j.tig.2020.10.004
2. Read L. K., Lukeš J., and Hashimi H. Trypanosome RNA editing: the complexity of getting U in and taking U out. *Wiley Interdisciplinary Rev.: RNA*, **7**, 33–51 (2016). DOI: 10.1002/wrna.1313
3. Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr. Mol. Med.*, **4**, 623–647 (2004). DOI: 10.2174/1566524043360096
4. Aphasizheva I., Alfonzo J., Carnes J., Cestari I., Cruz-Reyes J., Göringer H. U., Hajduk S., Lukeš J., Madison-Antenucci S., Maslov D. A., McDermott S. M., Ochsenreiter T., Read L. K., Salavati R., Schnauffer A., Schneider A., Simpson L., Stuart K., Yurchenko V., Zhou Z. H., and Aphasizhev R. Lexis and grammar of mitochondrial RNA processing in trypanosomes. *Trends Parasitol.*, **36**, 337–355 (2020). DOI: 10.1016/j.pt.2020.01.006
5. Zimmer S. L., Simpson R. M., and Read L. K. High throughput sequencing revolution reveals conserved fundamentals of U-indel editing. *Wiley Interdisciplinary Rev.: RNA*, **9**, e1487 (2018). DOI: 10.1002/wrna.1487
6. Gerasimov E. S., Afonin D. A., Korzhavina O. A., Lukeš J., Low R., Hall N., Tyler K., Yurchenko V., and Zimmer S. L. Mitochondrial RNA editing in *Trypanoplasma borreli*: New tools, new revelations. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **20**, 6388–6402 (2022). DOI: 10.1016/j.csbj.2022.11.023
7. Gerasimov E. S., Gasparian A. A., Kaurov I., Tichý B., Logacheva M. D., Kolesnikov A. A., Lukeš J., Yurchenko V., Zimmer S. L., and Flegontov P. Trypanosomatid mitochondrial RNA editing: dramatically complex transcript repertoires revealed with a dedicated mapping tool. *Nucl. Acids Res.*, **46**, 765–781 (2018). DOI: 10.1093/nar/gkx1202
8. Ochsenreiter T., Anderson S., Wood Z. A., and Hajduk S. L. Alternative RNA editing produces a novel protein involved in mitochondrial DNA maintenance in trypanosomes. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 5595–5604 (2008). DOI: 10.1128/MCB.00637-08
9. Kirby L. E. and Koslowsky D. Mitochondrial dual-coding genes in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Neglected Trop. Dis.*, **11**, e0005989 (2017). DOI: 10.1371/journal.pntd.0005989
10. Gerasimov E. S., Gasparian A. A., Afonin D. A., Zimmer S. L., Kraeva N., Lukeš J., Yurchenko V., and Kolesnikov A. A. Complete minicircle genome of *Leptomonas pyrrhocoris* reveals sources of its non-canonical mitochondrial RNA editing events. *Nucl. Acids Res.*, **49**, 3354–3370 (2021). DOI: 10.1093/nar/gkab114
11. Simpson L., Douglass S. M., Lake J. A., Pellegrini M., and Li F. Comparison of the mitochondrial genomes and steady state transcriptomes of two strains of the trypanosomatid parasite, *Leishmania tarentolae*. *PLoS Neglected Trop. Dis.*, **9**, e0003841 (2015). DOI: 10.1371/journal.pntd.0003841
12. Afonin D. A., Gerasimov E. S., Sveráková I. Š., Záhonová K., Gahura O., Albanaz A. T. S., Myšková E., Bykova A., Paris Z., Lukeš J., Opperdoes F. R., Horváth A., Zimmer S. L., and Yurchenko V. *Blastocrithidia nonstop* mitochondrial genome and its expression are remarkably insulated from nuclear codon reassignment. *Nucl. Acids Res.*, **52** (7), 3870–3885 (2024). DOI: 10.1093/nar/gkae168

13. Gerasimov E. S., Ramirez-Barrios R., Yurchenko V., and Zimmer S. L. *Trypanosoma cruzi* strain and starvation-driven mitochondrial RNA editing and transcriptome variability. *RNA*, **28**, 993–1012 (2022). DOI: 10.1261/rna.079088.121
14. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., and Madden T. L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, **10**, 421 (2009). DOI: 10.1186/1471-2105-10-421
15. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F. T., de Beer T. A. P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., and Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucl. Acids Res.*, **46**, W296–W303 (2018). DOI: 10.1093/nar/gky427
16. Lenarčič T., Niemann M., Ramrath D. J. F., Caldera S., Flügel T., Saurer M., Leibundgut M., Boehringer D., Prange C., Horn E. K., Schneider A., and Ban N. Mitochondrial small subunit maturation involves formation of initiation-like complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2114710118 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2114710118
17. Ramrath D. J. F., Niemann M., Leibundgut M., Bieri P., Prange C., Horn E. K., Leitner A., Boehringer D., Schneider A., and Ban N. Evolutionary shift toward protein-based architecture in trypanosomal mitochondrial ribosomes. *Science*, **362**, eaau7735 (2018). DOI: 10.1126/science.aau7735
18. Small I. D., Schallenberg-Rüdinger M., Takenaka M., Mireau H., and Ostersetzer-Biran O. Plant organellar RNA editing: what 30 years of research has revealed. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **101**, 1040–1056 (2020). DOI: 10.1111/tpj.14578
19. Lu B., Wilson R. K., Phreaner C. G., Mulligan R. M., and Hanson M. R. Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial rps12 gene. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1543–1549 (1996). DOI: 10.1128/MCB.16.4.1543
20. Koslowsky D. J., Bhat G. J., Read L. K., and Stuart K. Cycles of progressive realignment of gRNA with mRNA in RNA editing. *Cell*, **67**, 537–546 (1991). DOI: 10.1016/0092-8674(91)90528-7
21. Maslov D. A. and Simpson L. The polarity of editing within a multiple gRNA-mediated domain is due to formation of anchors for upstream gRNAs by downstream editing. *Cell*, **70**, 459–467 (1992). DOI: 10.1016/0092-8674(92)90170-h
22. Aravin A. A., Yurchenko V., Merzlyak E. M., and Kolesnikov A. A. The mitochondrial ND8 gene from *Crithidia oncopelti* is not pan-edited. *FEBS Lett.*, **431**, 457–460 (1998). DOI: 10.1016/s0014-5793(98)00813-8
23. Gerasimov E. S., Kostygov A. Y., Yan S., and Kolesnikov A. A. From cryptogene to gene? ND8 editing domain reduction in insect trypanosomatids, *Eur. J. Protistology*, **48**, 185–193 (2012). DOI: 10.1016/j.ejop.2011.09.002

Analysis of RNA Editing in Conserved Sequence Blocks of the Trypanosomatid RPS12 Gene

E.S. Gerasimov*, Y.A. Rudenskaya*, E.A. Bryushkova*, O.A. Korzhavina*, and A.A. Kolesnikov*

**Department of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

The RPS12 gene in the mitochondrial genome encodes the important protein from the small ribosomal subunit. The transcript of this gene in a number of organisms can undergo RNA editing, for instance it is edited actively in all tripanosomatida. In this study, a comparison between the sequences of edited mRNA and tertiary structures of the proteins when mRNA were translated from some of the members of Tripanosomatidae family showed that tertiary structures of the RPS12 gene remained unchanged in all species while only two short conserved regions were found in the primary structure of the gene. By means of computer modeling it was demonstrated that the found regions encode amino acids turned to the direction of the decoding center of ribosome. The nature of editing patterns demonstrates that evolutionary conservation of these regions is independent of the editing process and, moreover, the evolutionary tendencies on the reduction of editing process in a number of sites was seen within the conserved sites of the RPS12 gene.

Keywords: RPS12, ribosome, RNA editing, molecular evolution, protein structure, conserved domains

ТРАНСПОРТ ГЛИЦЕРИНА ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ СПЕРМАТОЗОИДА ЧЕЛОВЕКА ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2024 г. А.А. Иванова^{*,#}, И.И. Леонов^{*}, Е.С. Гнилозуб-Волобуева^{*},
М.А. Овчинников^{**}, С.А. Яковенко^{*}, Е.Ю. Симоненко^{*}

^{*}Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/2, Москва, 119991, Россия

^{**}Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобелкина Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/2, Москва, 119991, Россия

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

Поступила в редакцию 12.03.2024 г.

После доработки 02.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Криоконсервация биологического материала является важной задачей многих областей биологии и медицины, особенно для вспомогательных репродуктивных технологий. Для эффективной криоконсервации клеток используются криопротекторные среды, включающие в себя проникающие в клетку и не проникающие компоненты. Часто в качестве проникающего компонента выступает глицерин в различных концентрациях. Однако выяснение механизмов криопротекторного действия этих соединений, а также повышение доли выживших клеток после криоконсервации остаются актуальными задачами криобиологии. В работе исследуется механизм переноса глицерина через мембраны сперматозоидов с участием аквапоринов методом математического моделирования. Представленная модель описывает динамику изменения объема сперматозоида в зависимости от концентрации глицерина и сахарозы в криопротекторной среде. В результате проведенного анализа рассчитано характерное время установления равновесия между изучаемой криопротекторной средой и клетками, которое составило $t = 80$ с в присутствии 12 об. % глицерина. Определена концентрация сахарозы (0.16 М), при которой клетка возвращается к исходному объему после инкубации в криопротекторной среде. Показано, что в сперматозоиде человека может находиться 6750 аквапоринов 7-го типа с проницаемостью $P_{AQP7} = 0.00366$ мкм³/с. Проведенные эксперименты показали повышение индекса подвижности сперматозоидов при коррекции концентрации сахарозы в растворе согласно результатам моделирования.

Ключевые слова: криопротектор, глицерин, акваглицеропорин, сперматозоид, модель Кедем–Качальского.

DOI: 10.31857/S0006302924060048, EDN: NLVXVG

Криоконсервация и хранение биологического материала является перспективным направлением современной биологии и медицины. Методы криоконсервации активно используются для сохранения плазмы крови, пуповинной крови, стволовых клеток, срезов тканей, в трансплантологии; позволяют сохранить ткани видов животных, находящихся под угрозой исчезновения; позволяют транспортировать биологический материал на дальние расстояния. Эффективная криоконсервация гамет человека играет важную роль во вспомогательных репродуктивных технологиях [1–6]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области криобиологии, биологические, биохимические и физико-химические механизмы криоконсервации до сих пор полностью не изучены [7].

Криоконсервация может приводить к повреждению клеточного материала [8] и снижению выживаемости клеток, иногда до 30% в зависимости от протоколов заморозки/разморозки, а также от исходных показателей биоматериала [9]. Механизмы, лежащие в основе криоповреждений, связаны с осмотическим стрессом, холодовым шоком, образованием внутриклеточных и внеклеточных кристаллов льда, избыточной продукцией активных форм кислорода [10, 11]. Исследования в данной области были сосредоточены на поиске решений, позволяющих минимизировать влияние повреждающих факторов, что привело к разработке и использованию двух основных типов криопротекторов: проникающих и непроникающих внутрь клетки. Проникающие криопротекторы (диметилсульфоксид, глицерин,

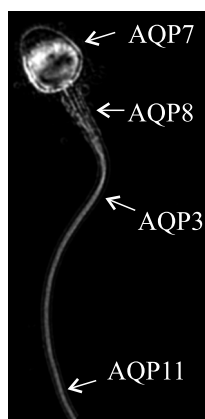


Рис. 1. Локализация аквапоринов в сперматозоиде человека, адаптировано из работы [21].

этиленгликоль и др.) создают осмотический градиент, ограничивающий образование льда и стабилизирующий липидный бислой. Непроницающие компоненты криопротекторной среды (сахариды, белки, липопротеины) выступают в качестве блокаторов льда, что позволяет снизить размеры и количество ядер кристаллизации вне клетки, а также защищают целостность мембран. Криопротекторные среды, используемые в настоящее время для криоконсервации сперматозоидов человека, обычно основаны на водно-глицериновых растворах низкой концентрации (10–15% по объему) с добавлением таких непроницающих компонент, как дисахариды и белки.

Глицерин используется в качестве проникающего внутрь клетки компонента криопротекторных сред, так как он обладает высокой вязкостью, связанной с наличием в его молекуле гидроксильных групп, а также менее токсичен для клеток. В его присутствии образуется пространственная сетка водородных связей, плотность которых в 3 раза больше, чем у одноатомных спиртов. С повышением концентрации глицерина вязкость водно-глицериновой смеси увеличивается, при этом снижается скорость движения молекул растворенного вещества и их кинетическая энергия. Данный эффект приводит к снижению скорости физико-химических процессов в биологических объектах. К числу положительных эффектов глицерина следует отнести также его способность уменьшать размер кристалла льда, поскольку его охлаждение сопровождается сжатием объема, что способствует снижению давления водного льда. Свойство глицерина сжиматься при замерзании является существенным, так как превращение воды в лед не сопровождается увеличением его объема [12]. Стеклоподобное состояние достигается в водных растворах с концентрацией глицерина выше 45% по объему, что является токсичным для клеток [13]. Для заморозки клеток используются

водно-глицериновые растворы с концентрацией 10–15% по объему, поэтому полностью избежать формирования кристаллов в криопротекторных средах не удастся. Для повышения эффективности процессов криоконсервации в среду добавляются непроницающие внутрь клетки компоненты, например, сахароза в концентрациях 0.04–0.50 М [14–19].

При кристаллизации льда все больший объем растворителя во внеклеточной среде превращается в лед, концентрация веществ в жидкой фазе резко возрастает. Это приводит к появлению градиента осмотического давления на мембране клеток, которая является единственным препятствием для свободной диффузии в системе. Появление градиента осмотического давления приводит к стремительной дегидратации клетки. Такие процессы могут приводить к осмотическому стрессу с последующей гибелью клеток. Компоненты криопротекторной среды также влияют на осмос клетки [4, 10, 14]. Когда сперматозоид помещают в раствор, который является гиперосмотическим по отношению к проникающему растворенному веществу (глицерину), но сильно гипотоническим по отношению к непроницаемым солям, он сначала сжимается из-за осмотического оттока внутриклеточной воды, а затем увеличивается в объеме по мере проникновения растворенного вещества и одновременного возвращения воды в клетку [4, 17, 20].

Известно, что глицерин проникает внутрь сперматозоидов через акваглицеропорины. Некоторые аквапорины – трансмембранные белки, служащие каналами для проникновения воды внутрь клетки, – помимо воды пропускают также и глицерин. Было показано, что сперматозоиды человека экспрессируют четыре типа аквапоринов (AQP3, AQP7, AQP8 и AQP11) со специфической локализацией как в плазматической мембране, так и во внутриклеточных органеллах (рис. 1). Из них два аквапорина – 3-го и 7-го типов – являются акваглицеропоринами [21].

Аквапорин 3 (AQP3) – это акваглицеропорин, необходимый для адаптации к изменению осмоса и миграции сперматозоидов. Данный вид аквапоринов локализован в основном участке хвостовой мембраны. Аквапорин 7 (AQP7) – акваглицеропорин, который, как предполагается, способствует транспортировке глицерина в сперматозоидах для использования его в качестве энергетического субстрата. Локализация данного белка до сих пор точно не известна. AQP7 наблюдается в области плазматической мембраны головки сперматозоида, средней части и во внутриклеточных структурах [21].

Согласно исследованию, проведенному на эритроцитах человека, аквапорины играют важную роль в транспорте глицерина через мембрану

клетки, существенно влияя на проницаемость мембраны для данного соединения [22]. В литературных данных нет подробного описания процесса проникновения глицерина в сперматозоиды человека при низких концентрациях, а все протоколы заморозки клеток, как и концентрации компонент в криопротекторной среде, подобраны опытным путем, исходя из морфологической выживаемости клеток. Поэтому в настоящей работе исследуется механизм переноса глицерина через мембрану сперматозоидов при криоконсервации методом математического моделирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Параметры модели. В работе [23] было показано, что сперматозоид человека может считаться идеальным осмометром, подчиняющимся уравнению Бойля–Вант-Гоффа, связывающему равновесный объем клетки и осмоляльность окружающего ее раствора:

$$\frac{V}{V_{\text{iso}}} = \frac{M_{\text{iso}}}{M} \left(1 - \frac{V_b}{V_{\text{iso}}} \right) + \frac{V_b}{V_{\text{iso}}},$$

где V – объем клетки при осмоляльности M , V_{iso} – объем клетки при изотонической осмоляльности M_{iso} , V_b – осмотически неактивный объемом клетки. Член V_b в уравнении представляет собой экстраполированный объем, занимаемый клеткой, когда внешняя осмоляльность становится бесконечной. Он состоит из двух элементов – объема твердых веществ в клетке и объема клеточной воды, который не может выступать в качестве растворителя и, следовательно, не может влиять на осмотическое давление [24].

Два уравнения описывают проникновение глицерина и соответствующее осмотическое изменение объема клетки [25]. Исходя из уравнения Фика, можно показать, что поток глицерина через мембрану пропорционален разнице концентраций внутри и снаружи клетки:

$$\frac{N}{t} = P_{\text{gly}} A (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}}),$$

где N – количество молей глицерина в клетке, A – площадь поверхности клетки, C_{ex} и C_{in} – молярные концентрации глицерина вне и внутри клетки соответственно, P_{gly} – коэффициент проницаемости глицерина через мембрану.

Второе уравнение описывает изменение объема внутриклеточной воды, которое необходимо для поддержания осмотического равновесия клетки в ответ на проникновение глицерина. Поскольку проницаемость воды для клеток за счет быстрого переноса воды, как правило, намного больше, чем проницаемость для глицерина, можно считать, что клетки находятся в осмотическом равновесии с внешней средой [26]. В таком случае

скорость, с которой вода входит или выходит из клетки, пропорциональна разнице осмотических давлений внутри и снаружи клетки:

$$\frac{dV}{dt} = -L_p A R T (C_{\text{ex}} + Q_{\text{ex}} - C_{\text{in}} - Q_{\text{in}}).$$

Для учета взаимодействия между молекулами воды и глицерина в модели вводится коэффициент взаимодействия потоков – σ . Данный процесс описывает модель Кедем–Качальского [21]:

$$\frac{dV}{dt} = -L_p A R T [(Q_{\text{ex}} - Q_{\text{in}}) + \sigma (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}})], \quad (1)$$

$$\frac{dN}{dt} = \frac{C_{\text{ex}} + C_{\text{in}}}{2} (1 - \sigma) \frac{dV}{dt} + P_{\text{gly}} A (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}}), \quad (2)$$

где V – объем сперматозоида, t – время, N – количество молей глицерина в клетке, A – площадь поверхности клетки, C_{ex} и C_{in} – молярные концентрации глицерина вне и внутри клетки соответственно, Q_{ex} и Q_{in} – молярные концентрации солей вне и внутри клетки соответственно, L_p – гидравлическая проводимость, P_{gly} – коэффициент проницаемости глицерина через мембрану, σ – коэффициент отражения, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура.

Внутриклеточная концентрация солей и глицерина может быть рассчитана следующим образом:

$$Q_{\text{in}} = Q_{\text{in}}(0) \frac{V(0) - V_b - V_{\text{gly}} N(0)}{V - V_b - V_{\text{gly}} N}, \quad (3)$$

$$C_{\text{in}} = \frac{N}{V - V_b - V_{\text{gly}} N}, \quad (4)$$

где $V(0)$, $N(0)$ и $Q_{\text{in}}(0)$ – начальные значения объема, молей глицерина и внутриклеточной концентрации солей, V_{gly} – молярный объем глицерина.

При условии наличия n клеток сперматозоидов в ограниченном объеме можно рассчитать изменение внешних концентраций:

$$Q_{\text{ex}} = Q_{\text{ex}}(0) \frac{V_{\text{out}}}{V_{\text{out}} - n(V - V(0))}, \quad (5)$$

$$C_{\text{ex}} = \frac{(N_{\text{out}} - nN)}{V_{\text{out}} - n(V - V(0))}, \quad (6)$$

где V_{out} и N_{out} – значения объема и количества глицерина в растворе криопротектора при помещении в него n клеток сперматозоидов.

В данной работе уравнения (1) – (6) решались численно в интегрированной среде разработки Spyder на языке программирования Python. Валидация модели проходила на основе экспериментальных данных из работы [20]. Условные обозначения и численные значения параметров при-

Таблица 1. Основные символы, используемые в уравнениях

Символ	Описание	Размерность	Значение
Lp	гидравлическая проводимость	мкм·мин ⁻¹ ·атм ⁻¹	0.77 [20]
Pgly	проницаемость глицерина	см/мин	1.68·10 ⁻³ [27]
A	площадь поверхности	мкм ²	120 [23]
Vb	осмотически неактивный объем	мкм ³	50% [20]
V	объем клетки	мкм ³	переменная
N	моли глицерина в клетке	моль	переменная
C	концентрация глицерина	моль/л	переменная
Q	концентрация солей	моль/л	переменная
σ	коэффициент отражения	—	0.93 [20]
ex	внешний	—	
in	внутренний	—	
Vgly	мольный объем	мл/моль	71 [20]
Viso	изотонический объем	мкм ³	28.5 [20]
n	количество сперматозоидов	—	20·10 ⁶ [24]
Nout	количество глицерина в растворе	моль	параметр
Vout	объем раствора	мл	0.7

ведены в табл. 1. Как было показано в работе [26], коэффициент проницаемости глицерина P_{gly} зависит от концентрации глицерина в исходном растворе. Валидация модели проходила на основе данных, полученных для 1 М раствора глицерина. Однако в растворе, который используется для криоконсервации сперматозоидов, концентрация глицерина составляет 12% по объему, что составляет примерно 1.6 М. Коэффициент проницаемости глицерина в таком случае был взят из работы [26] и равнялся $P_{gly} = 1.68 \cdot 10^{-3}$, полученный для 1.5 М раствора глицерина.

Дизайн эксперимента. С помощью построенной в работе модели исследовались криопротекторные среды, применяемые на практике в современных клиниках экстракорпорального оплодотворения. Состав криопротекторной среды представлен в табл. 2. В работе исследовались эякуляты доноров, соответствующих критериям нормозооспермии (минимальные критерии основных показателей оценки сперматозоидов в пределах нормальных значений).

Криоконсервация сперматозоидов проводилась по протоколу медленной заморозки: инкубация клеток с криопротекторной средой в соотно-

Таблица 2. Состав криопротекторной среды

Компонент	Концентрация
HEPES	20 мМ
Глицин	10 мМ
Глюкоза	5.56 мМ
Глицерин	1.6 ⁻² М
Сахароза	0.044 М
NaCl	112 мМ
KCl	2.8 мМ
KH ₂ PO ₄	0.4 мМ
MgSO ₄	0.2 мМ
Ca-лактат	1.8 мМ
NaHCO ₃	5 мМ

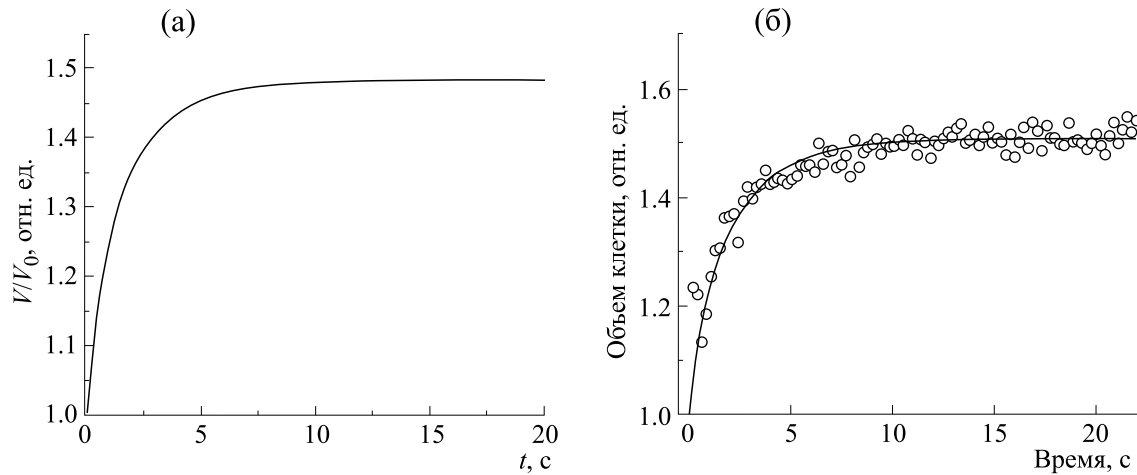


Рис. 2. Изменение объема сперматозоидов в гипоосмотическом растворе (145 мОсм/кг, $T = 22^\circ\text{C}$): (а) — результаты моделирования, (б) — экспериментальные данные; адаптировано из работы [23].

шении 1.0 : 0.7 соответственно в течение 10 мин, затем образцы в три этапа перемещаются в парах азота и инкубируются на каждом этапе 15 мин для достижения системой равновесия, далее образцы погружаются в жидкий азот (-196°C). После хранения в жидком азоте клетки размораживались и подсчитывалось количество подвижных клеток, высчитывался индекс подвижности как отношение подвижных клеток после разморозки к количеству подвижных клеток до заморозки.

Оценка количества аквапоринов. Аквапорины играют существенную роль в проницаемости глицерина. Было показано, что в отсутствии аквапоринов проницаемость клетки для глицерина значительно уменьшается [22]. Поэтому для оценки количества аквапоринов будем считать, что весь поток глицерина идет непосредственно через аквапорины AQP3 и AQP7.

Разделяем поток глицерина на два через AQP3 и AQP7:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{dN_{\text{AQP3}}}{dt} + \frac{dN_{\text{AQP7}}}{dt}.$$

Каждый из потоков пропорционален разности концентраций глицерина внутри и снаружи клетки, а также количеству аквапоринов. Назовем проницаемостью AQP3 и AQP7 величину $P_{\text{AQP3,7}}$ — коэффициент пропорциональности. Тогда поток, связанный с отдельным видом аквапоринов, можно выразить следующим образом:

$$\frac{dN_{\text{AQP3,7}}}{dt} = P_{\text{AQP3,7}} N_{\text{AQP3,7}} (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}}),$$

где $N_{\text{AQP3,7}}$ — количество аквапоринов 3-го (7-го) типов.

Для человеческого эритроцита известен коэффициент проницаемости для аквапорина 3-го ти-

па ($P = 1.4 \cdot 10^{-6}$ см/с) [27], а также оценка количества поринов данного типа — 2500 копий [28]. Известна также и площадь самого эритроцита: $S = 136$ мкм² [29]. Таким образом, исходя из предположения о том, что порины в одном семействе имеют схожие характеристики, приходим к уравнению: $P_{\text{AQP3,7}} N_{\text{AQP3,7}} = PS$. Отсюда $P_{\text{AQP3,7}} = 7.616 \cdot 10^{-4}$ см³/с.

В работе [30] была получена оценка отношения населенности аквапоринов 3-го и 7-го типов для сперматозоида быка:

$$\frac{N_{\text{AQP3}}}{N_{\text{AQP7}}} = \frac{0.889}{0.726} = 1.2245 = \gamma$$

Таким образом, получаем уравнение:

$$\frac{dN}{dt} = (P_{\text{AQP7}} + \gamma P_{\text{AQP3}}) N_{\text{AQP7}} (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}}). \quad (7)$$

С помощью программы были исследовались зависимости $N(t)$ от параметров P_{AQP7} и N_{AQP7} . Для подбора оптимальных параметров полученная функция сравнивалась с экспериментальной кривой, на которой валидировалась модель. Наилучшими параметрами являются те, которые дают наименьшее отклонение от нее.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Валидация модели и подбор параметров L_p и P_{gly} проводились на основании экспериментальных данных из работы [23]. Также на основании данных из работ [23, 31] определен параметр σ , равный 0.93. На первом этапе моделировался перенос воды через мембраны сперматозоидов при погружении в гипоосмотический раствор 145 мОсм/кг (рис. 2). При валидации модели был определен следующий коэффициент проводимо-

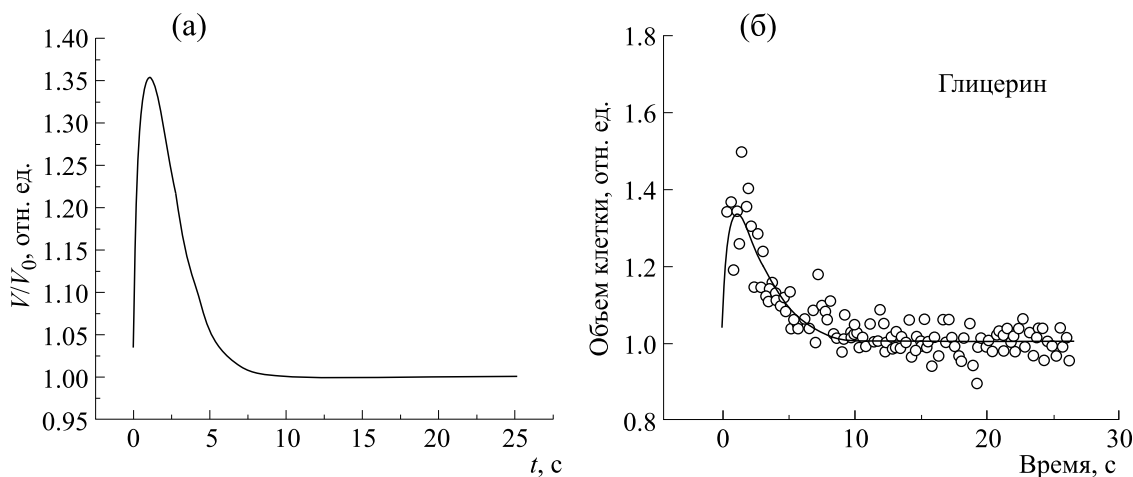


Рис. 3. Изменение объема сперматозоида при наличии потока глицерина (1 М): (а) — результат моделирования, (б) — экспериментально полученная зависимость объема клетки от времени при выходе из клетки криопротектора.

сти $L_p = 1.84 \text{ мкм} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{атм}^{-1}$. На втором этапе моделирования был учтен поток глицерина в сперматозоид через акваглицеропорины. По результатам моделирования были получены следующие коэффициенты проводимости и проницаемости соответственно: $L_p = 0.77 \text{ мкм} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{атм}^{-1}$ и $P_{\text{gly}} = 0.21 \cdot 10^{-2} \text{ см/мин}$. Анализ изменения объема сперматозоида в присутствии потока глицерина (1 М) через акваглицеропорины представлен на рис. 3. Образец погружали в 1 М раствор глицерина и дожидались установления равновесия при комнатной температуре. Затем образец резко погружали в изотонический раствор без криопротектора. Коэффициент проницаемости воды уменьшается при наличии в растворе проникающего в клетку криопротектора, что согласуется с данными работ [2, 32].

Основная задача данной работы - оценка изменений, происходящих в сперматозоиде при криоконсервации не в 1 М глицерин-содержащем растворе, а в реальной криопротекторной среде, используемой в различных лабораториях вспомогательных репродуктивных технологий. Поэтому было проведено моделирование и получена зависимость изменения относительного объема клетки для криопротекторной среды, содержащей 12 об.% глицерина вначале без сахарозы (рис. 4), а затем с добавлением сахарозы в различных концентрациях (рис. 5).

При повышении концентрации глицерина среда становится гиперосмотической. Зависимость изменения относительного объема клетки от времени представляет собой двухфазную кривую с начальным быстрым уменьшением объема, за которым следует его увеличение (рис. 4). В на-

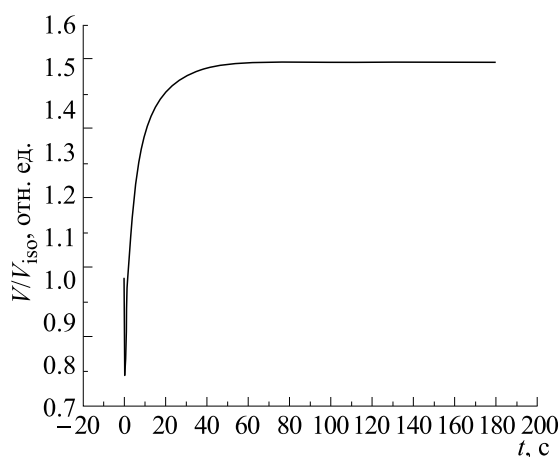


Рис. 4. Зависимость относительного объема клетки от времени для криопротекторного раствора (12 об.% глицерина) без сахарозы.

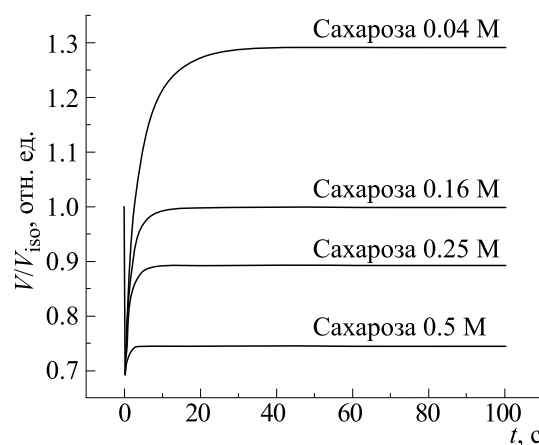


Рис. 5. Зависимость относительного объема клетки от времени для криопротекторного раствора (12 об.% глицерина) с разными концентрациями сахарозы.

чальный момент времени происходит быстрый отток воды из клетки, так как раствор криопротекторной среды является гипертоническим по отношению к содержимому клетки. Клетка при этом достигает минимального значения объема, составляющего 77% от изначального, за $t = 0.27$ с. Далее клетка постепенно набухает за счет направленного внутрь клетки потока глицерина и сопутствующего ему потока воды, пока не будет достигнуто осмотическое равновесие. После быстрого уменьшения объема, дойдя до значения 77% от изначального, клетка постепенно увеличивается в объеме, проходя начальное состояние, пока не достигнет объема, составляющего 151% от изначального, что необходимо для достижения осмотического равновесия с внешней средой. По данной зависимости можно судить о характерном времени установления равновесия между клеткой и окружающей средой (время достижения клеткой максимального объема). Установлено, что время достижения клеткой равновесного объема в среде, содержащей 12 об. % глицерина без сахарозы, составляет 80 с.

Также было исследовано изменение объема клетки при добавлении в криопротекторную среду сахарозы в различных концентрациях (рис. 5). Видно, что наличие сахарозы не влияет на общий профиль зависимости: так же наблюдается резкое уменьшение объема клетки за счет быстрого оттока воды из-за большой разницы осмотических давлений и последующее его увеличение, связанное с потоком глицерина внутрь клетки. Однако отмечено, что концентрация сахарозы влияет на характерные минимальные и максимальные размеры, достигаемые клеткой после погружения в криопротекторную среду. При увеличении концентрации сахарозы внешний раствор становится все более гипертоническим, поэтому при погружении в него клетка теряет больший свой объем на начальном этапе. Так, для растворов 0.04 М, 0.25 М и 0.5 М сахарозы значения наименьшего объема (V_{\min}) составляют соответственно 76, 73 и 69% от начального. Добавление сахарозы в криопротекторную среду также влияет на конечный объем, достигаемый клеткой при достижении равновесия и на время, необходимое для достижения этого равновесия. Для растворов 0.04 М, 0.25 М и 0.5 М сахарозы значения равновесного объема (V_{\max}) составляют соответственно 129, 89 и 73% от начального, а времена достижения равновесия $t = 50, 15$ и 5 с соответственно. Таким образом, при увеличении концентрации сахарозы в криопротекторной среде уменьшается конечный объем клетки, достигаемый при инкубации в растворе.

Исследованные в модельной системе концентрации сахарозы чаще всего используются в создании коммерческих криопротекторных сред.

Однако результаты моделирования показывают, что ни одна из выбранных концентраций сахарозы не возвращают клетку в первоначальный объем при достижении равновесия с внешней средой. Таким образом, изменяя концентрации сахарозы в криопротекторной среде, можно добиться различных конечных объемов клеток, что может повлиять на выживаемость при дальнейшей криоконсервации. С помощью построенной модели было рассчитано, что при концентрации сахарозы 0.16 М в криопротекторной среде сперматозоид при достижении равновесия вернется к своему первоначальному объему. Минимальный объем клетки для такого раствора составляет 74% от изначального, а время выхода на равновесный объем $t = 24$ с.

Проведенное исследование показывает, что клетке для насыщения глицерином достаточно находиться в криопротекторной среде порядка нескольких минут (80 с для раствора без сахарозы). Таким образом, классический протокол заморозки, включающий инкубацию клеток в криопротекторной среде в течение 10 минут, может быть оптимизирован. Данное предположение было проверено экспериментально на сперматозоидах человека. Образец клеток донора инкубировали в криопротекторной среде 2 мин, исходя из результатов моделирования. После инкубации клетки замораживали и размораживали в соответствии с протоколами, используемыми в клиниках вспомогательных репродуктивных технологий. После разморозки оценивался индекс подвижности клеток, соответствующий степени их выживаемости. Результаты сравнивались с контрольными клетками того же донора, замороженными в соответствии с классическими клиническими протоколами, требующие первоначальной инкубации клеток в криопротекторной среде на протяжении 10 мин. Результаты анализа криоконсервации образцов клеток 13 доноров с установленной нормозооспермией (по критериям Всемирной организации здравоохранения) представлены в табл. 3.

Показано, что статистически значимых различий (с уровнем значимости $p = 0.05$) в индексе подвижности сперматозоидов для разных времен инкубации в криопротекторной среде нет. На основании данных, полученных из модели и проведенных в эксперименте, можно сделать вывод о том, что время инкубации сперматозоидов в криопротекторной среде перед криоконсервацией может быть сокращено до 2 мин. Ранее мы обращали внимание на то, что инкубация сперматозоидов в криопротекторной среде повышает у них степень фрагментации ДНК после разморозки, так как проникающие криопротекторы являются цитотоксическими [33]. Сокращение времени инкубации клеток до заморозки поможет сохранить большее число клеток с целостной ДНК.

Таблица 3. Значения индексов подвижности для различных доноров в зависимости от времен инкубации

Время инкубации в криопротекторной среде	10 мин	2 мин
Среднее значение индекса подвижности клеток после криоконсервации в глицеринсодержащем криопротекторном растворе	0.34 ± 0.06	0.32 ± 0.06
Концентрация сахарозы в криопротекторной среде	0.04 М	0.16 М
Среднее значение индекса подвижности клеток	0.48 ± 0.09	0.59 ± 0.08

Также были проведены предварительные эксперименты по сравнению индекса подвижности клеток после криоконсервации в среде с концентрацией сахарозы 0.04 М (соответствует коммерческим криопротекторным средам) и 0.16 М, при которой клетка возвращается к своему изначальному объему (получена в результате моделирования). В ходе эксперимента было обнаружено, что в среде с концентрацией сахарозы 0.16 М индекс подвижности сперматозоидов на 8% выше, чем в коммерческой криопротекторной среде. Таким образом результаты моделирования предлагают пути оптимизации состава криопротекторной среды и протокола криоконсервации для повышения выживаемости клеток.

Построенная модель позволила провести оценку количества аквапоринов 7-го и 3-го типов в сперматозоиде человека, что ранее не проводилось. При решении уравнения (7) мы проводили калибровку параметров P_{AQP7} и N_{AQP7} , чтобы свести его к решению уравнения (2). В результате варьирования параметров были получены следующие результаты: проницаемость одного аквапорина 7-го типа $P_{AQP7} = 0.00366$ мкм³/с; количество аквапоринов 7-го типа составляет $N_{AQP7} = 6750$, а 3-го типа — $N_{AQP3} = 8265$.

ВЫВОДЫ

Таким образом различные концентрации отдельных компонент криопротекторных сред могут влиять на изменение объема клеток и степень выживаемости после криоконсервации. В работе представлена модель проникновения водного раствора глицерина 12 об.% через мембрану сперматозоидов человека. С помощью построенной модели была изучена динамика изменения объема клетки в зависимости от концентрации отдельных компонент криопротекторной среды; рассчитано характерное время установления равновесия между изучаемой криопротекторной средой и клетками, которое составило 80 с. Рассчитана концентрация сахарозы (0.16 М), при которой клетка возвращается к исходному объему. Проведенные эксперименты по оценке индекса подвижности клеток показали, что время инкубации клеток в криопротекторной среде перед за-

морозкой может быть сокращено с 10 до 2 мин, а повышение концентрации сахарозы до 0.16 М повышает степень выживаемости клеток. Результаты моделирования и проведенные эксперименты позволяют скорректировать привычные протоколы криоконсервации сперматозоидов человека. Созданная модель позволила оценить количество аквапоринов AQP7 в сперматозоиде человека, что составило 6750 копий, и количество аквапоринов AQP3, что составило 8265 копий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.В. Романовой за помощь с оформлением и адаптацией рисунков к статье.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта 23-Ш01-15 междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Фундаментальные и прикладные исследования космоса».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kroløkke C. Life in the cryo-kennel: The 'exceptional' life of frozen pet DNA. *Soc. Stud. Sci.*, **49** (2), 162–169 (2019). DOI: 10.1177/0306312719837610
2. Hildebrandt T. B., Hermes R., Goeritz F., Appeltant R., Colleoni S., de Mori B., Diecke S., Drukker M., Galli C., Hayashi K., Lazzari G., Loi P., Payne J., Renfree M., Seet S., Stejskal J., Swegen A., Williams SA, Zainuddin Z. Z., Holtze S. The ART of bringing extinction to a freeze — History and future of species conserva-

- tion, exemplified by rhinos. *Theriogenology*, **169**, 76–88 (2021). DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.04.006
3. Jaiswal A. N. and Vagga A. Cryopreservation: A review article. *Cureus* **14** (11), e31564 (2022). DOI: 10.7759/cureus.31564
 4. Elliott G. D., Wang S., and Fuller B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology* **76**, 74–91 (2017). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004
 5. Žáková J., Lousová E., Ventruba P., Crha I., Pochopová H., Vinklárková J., Tesařová E., and Nussir M. Sperm cryopreservation before testicular cancer treatment and its subsequent utilization for the treatment of infertility. *Sci. World J.*, **2014**, 575978 (2014). DOI: 10.1155/2014/575978
 6. Tamburrino L., Traini G., Marcellini A., Vignozzi L., Baldi E., and Marchiani S. Cryopreservation of human spermatozoa: functional, molecular and clinical aspects *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (5), 4656 (2023). DOI: 10.3390/ijms24054656
 7. Hezavehei M., Sharafi M., Kouchesfahani H. M., Henkel R., Agarwal A., Esmaeili V., and Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online*, **37** (3), 327–339 (2018). DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.05.012
 8. Colás C., Junquera C., Pérez-Pé R., Cebrián-Pérez J. A., and Muiño-Blanco T. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microsc. Res. Technique*, **72** (8), 566–572 (2009). DOI: 10.1002/jemt.20710
 9. Aliakbari F., Taghizabet N., Azizi F., Rezaei-Tazangi F., Geleghkolae K. S., and Kharazinejad E. A review of methods for preserving male fertility. *Zygote*, **30**, 289–297 (2022). DOI: 10.1017/S0967199421000071
 10. Gao D. and Critser J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.*, **41** (4), 187–196 (2000). DOI: 10.1093/ilar.41.4.187
 11. Chatterjee S. and Gagnon C., Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Devel.*, **59** (4), 451–458 (2001). DOI: 10.1002/mrd.1052
 12. Белоус А. М. и Грищенко В. И. *Криобиология* (Наук. думка, Киев, 1994).
 13. Popov I., Greenbaum (Gutina) A., Sokolov A. P., and Feldman Y. The puzzling first-order phase transition in water–glycerol mixtures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17** (27), 18063–18071 (2015). DOI: 10.1039/C5CP02851E
 14. Ozimic S., Ban-Frangez H., and Stimpfel M. Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Curr. Issu. Mol. Biol.*, **45** (6), 4716–4734 (2023). DOI: 10.3390/cimb45060300
 15. A. M. Hossain, C. O. Osuamkpe, *Archives of Andrology* **53** (2), 99 (2007). DOI: 10.1080/01485010701225675
 16. K. Murata and H. Tanaka, General nature of liquid-liquid transition in aqueous organic solutions. *Nature Commun.*, **4**, 2844 (2013). DOI: 10.1038/ncomms3844
 17. Fuller B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Lett.*, **25** (6), 375–388 (2004). PMID: 15660165
 18. Roy S., Arora S., Kumari P., and Ta M. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, **68** (3), 467–472 (2014). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.03.010
 19. Gurruchaga H., del Burgo L. S., Garate A., Delgado D., Sanchez P., Orive G., Ciriza J., Sanchez M. and Pedraz J. L. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells in an allogeneic bioscaffold based on platelet rich plasma and synovial fluid. *Sci Rep.*, **7** (1), 15733 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-16134-6
 20. Arutyunyan I. V., Kananykhina E. Yu., Elchaninov A. V., and Fatkhudinov T. Kh. Influence of sucrose on the efficiency of cryopreservation of human umbilical cord-derived multipotent stromal cells with the use of various penetrating cryoprotectants. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **171** (1), 150 (2021). DOI: 10.1007/s10517-021-05187-3
 21. Gao D. Y., Mazur P., Kleinhans F. W., Watson P. F., Noiles E. E., and Critser J. K. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology*, **29** (6), 657–667 (1992). DOI: 10.1016/0011-2240(92)90068-d
 22. Pellavio G. and Laforenza U. Human sperm functioning is related to the aquaporin-mediated water and hydrogen peroxide transport regulation. *Biochimie*, **188**, 45–51 (2021). DOI: 10.1016/j.biochi.2021.05.011
 23. Gilmore J. A., McGann L. E., Liu J., Gao D. Y., Peter A. T., Kleinhans F. W., and Critser J. K. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, **53** (5), 985–995 (1995). DOI: 10.1095/biolreprod53.5.985
 24. Nobel P. S. The Boyle–Van't Hoff relation. *J. Theor. Biol.*, **23** (3), 375 (1969). DOI: 10.1016/0022-5193(69)90025-3
 25. *Life in the Frozen State*, Ed. by B. J. Fuller, N. Lane, and E. E. Benson (CRC Press, Boca Raton, USA, 2004). DOI: 10.1201/9780203647073
 26. Lahmann J. M., Benson J. D., and Higgins A. Z. Concentration dependence of the cell membrane permeability to cryoprotectant and water and implications for design of methods for post-thaw washing of human erythrocytes. *Cryobiology*, **80**, 1–11 (2018). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.12.003
 27. Roudier N., Ripoche P., Gane P., Le Pennec P. Y., Daniels G., Cartron J.-P., and Bailly P. AQP3 deficiency in humans and the molecular basis of a novel blood group system, GIL. *J. Biol. Chem.*, **277** (48), 45854–45859 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M208999200
 28. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 6th ed. (World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021).

29. Roudier N., Verbavatz J.-M., Maurel C., Ripoche P., and Tacnet F. Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells. *J. Biol. Chem.*, **273** (14), 8407–8412 (1998). DOI: 10.1074/jbc.273.14.8407
30. Rodriguez R. A., Liang H., Chen L. Y., Plascencia-Villa G., and Perry G. Single-channel permeability and glycerol affinity of human aquaglyceroporin AQP3. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1861** (4), 768–775 (2019). DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.01.008
31. Kuche P. W., Cox C. D., Daners D., Shishmarev D., and Galvosas P. Surface model of the human red blood cell simulating changes in membrane curvature under strain. *Sci. Rep.*, **11** (1), 13712 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-92699-7
32. Kedem O. and Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 229–246 (1958). DOI: 10.1016/0006-3002(58)90330-5
33. Du J., Kleinhans F. W., Mazur P., and Critser J. K. Human spermatozoa glycerol permeability and activation energy determined by electron paramagnetic resonance. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1194** (1), 1–11 (1994). DOI: 10.1016/0005-2736(94)90196-1
34. Fujii T., Hirayama H., Fukuda S., Kageyama S., Naito A., Yoshino H., Moriyasu S., Yamazaki T., Sakamoto K., Hayakawa H., Takahashi K., Takahashi Y., and Sawai K. Expression and localization of aquaporins 3 and 7 in bull spermatozoa and their relevance to sperm motility after cryopreservation. *J. Reprod. Devel.*, **64** (4), 327–335 (2018). DOI: 10.1262/jrd.2017-166

Transport of Glycerol Through the Human Sperm Membrane during Cryopreservation

A.A. Ivanova*, I.I. Leonov*, E.S. Gnilyozub-Volobueva*, M.A. Ovchinnikov**,
S.A. Yakovenko*, and E.Yu. Simonenko*

*Physical faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/2, Moscow, 119991 Russia

**Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/2, Moscow, 119991 Russia

Cryopreservation of biological material is an important task in many areas of biology and medicine especially for assisted reproductive technologies. Cryoprotective media including cell-penetrating and non-penetrating components are used for effective cryopreservation of cells. Usually glycerol in various concentrations acts as a penetrating component. However, elucidating the mechanisms of the cryoprotective action of these compounds as well as increasing the proportion of surviving cells after cryopreservation remain urgent objective of cryobiology. The work examines the mechanism of glycerol transfer through sperm membranes with the participation of aquaporins using the method of mathematical modeling. The presented model describes dynamics of changes in sperm volume depending on the concentration of glycerol and sucrose in the cryoprotective medium. As a result of the analysis the characteristic time for establishing equilibrium between the studied cryoprotective medium and cells was calculated and amounts to $t = 80$ s in the presence of glycerol 12% vol. The concentration of sucrose (0.16 M) at which the cell returns to its original volume after incubation in a cryoprotective medium was determined. It has been shown that human sperm can contain 6750 AQP7 with a permeability $P_{\text{AQP7}} = 0.00366 \mu\text{m}^3/\text{s}$. The experiments performed showed an increase in the sperm motility index when correcting the concentration of sucrose in the solution according to the modeling results.

Keywords: cryoprotectant, glycerol, aquaglyceroporin, spermatozoon, Kedem–Kachalsky model

ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕСВЕРАТРОЛА НА ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА И УФ-СВЕТОМ

© 2024 г. М.А. Наквасина^{*,#}, В.Г. Артюхов^{*}, Е.Н. Чурсанова^{*,**}, О.В. Мячина^{**},
Е.И. Корпусова^{*}, А.Ю. Деенкова^{*}, В.А. Шестых^{*}

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

^{**}Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения
Российской Федерации, ул. Студенческая, 10, Воронеж, 394036, Россия

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

Поступила в редакцию 05.02.2024 г.

После доработки 14.03.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Обнаружено снижение интенсивности процессов апоптотической и некротической гибели лимфоцитов периферической крови человека после воздействия УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м²) и пероксида водорода (10⁻⁵ моль/л) в присутствии ресвератрола (10⁻⁷, 10⁻⁶ и 10⁻⁵ моль/л). Выявлено, что цитопротекторное действие ресвератрола на лимфоциты обусловлено снижением уровня продукции внутриклеточных активных форм кислорода и ионов кальция, повышением активности антиоксидантных ферментов — каталазы и глутатионредуктазы, увеличением пероксидной резистентности плазматических мембран, взаимодействием с ДНК. Обсуждаются возможные механизмы действия ресвератрола как регулятора процессов апоптотической и некротической гибели лимфоцитов, индуцированной воздействием пероксида водорода и УФ-излучения.

Ключевые слова: лимфоциты, ресвератрол, пероксид водорода, УФ-свет, апоптоз, некроз.

DOI: 10.31857/S0006302924060056, EDN: NLVEUG

Исследование механизмов, путей реализации и способов регулирования клеточной гибели иммуноцитов — одна из ключевых проблем клеточной биофизики и биомедицины. Нами выявлено [1, 2], что запрограммированная клеточная смерть лимфоцитов периферической крови человека после УФ-облучения (240–390 нм) в дозе 1510 Дж/м² осуществляется с участием р53-зависимого пути ядерного механизма, а также рецепторопосредованного каспазного, митохондриального и связанного с нарушением кальциевого гомеостаза механизмов. Обнаружено [1, 2], что экзогенный пероксид водорода в конечной концентрации 1 и 10 мкмоль индуцирует в лимфоцитах процессы апоптотической гибели, которые реализуются с участием рецепторопосредованного каспазного, митохондриального (с активацией каспазы-9) и р53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза. Медиаторами клеточной смерти лимфоцитов в условиях воздействия УФ-света и пероксида водорода являются активные формы кислорода (АФК) и ионы кальция. В этой связи

системы генерации и утилизации АФК, мобилизации и перераспределения ионов кальция между клеточными компартментами можно рассматривать как одни из ключевых «сайтов» регулирования процессов клеточной гибели лимфоцитов.

Перспективным антиоксидантным биогенным соединением, проявляющим противовоспалительное, противомикробное, противоопухолевое, кардио- и нейропротективное, иммуномодулирующее, радиопротекторное действие, является ресвератрол [2–15]. Ресвератрол способен активировать теломеразу, влияет на посттрансляционную модификацию и локализацию фермента, ингибирует его активность в опухолевых клетках и увеличивает — в предшественниках эпителиальных и эндотелиальных клеток [16].

Ресвератрол — растительный полифенол, фитоалексин с эстрогеноподобным действием, существующий в виде *транс*- и *цис*-стереоизомеров [17]. *Транс*-ресвератрол представляет собой биологически активную и стабильную форму соединения. Ресвератрол имеет более двадцати молекулярных мишеней, среди которых клеточные рецепторы, компоненты сигнальных трансдукторных

Сокращение: АФК — активные формы кислорода.

систем, транскрипционные факторы, различные ферменты и др. [18].

Несмотря на то, что это плейотропное соединение проявляет множество положительных эффектов в исследованиях *in vitro* и *in vivo* и представляется перспективным для профилактики и лечения целого ряда патологий (в том числе онко-, сердечно-сосудистых и воспалительных заболеваний, диабета 2 типа, гипертонической болезни, метаболического синдрома), вопрос о его клиническом применении сложен в связи с невысокой биодоступностью ресвератрола, двухфазностью его действия и определением оптимальной дозы препарата (биологически активного диапазона концентраций). Бифазный характер действия ресвератрола проявляется в антиоксидантном/цитопротективном/иммуностимулирующем/радопротекторном эффекте при низких концентрациях (обычно менее 50 мкмоль/л) и прооксидантном/цитотоксическом/иммуносупрессивном действии при более высоких концентрациях [11, 13]. В то же время для профилактики рака эффективны концентрации ресвератрола в 10–40 ммоль/л [19]. Ресвератрол может запускать апоптоз, аутофагию, репликативное старение, митотическую катастрофу опухолевых клеток [20–22].

Гибель клеток, индуцированная повышением внутриклеточной концентрации АФК, рассматривается как предельный случай редокс-регуляции активности клеток, использующейся в качестве одного из подходов противоопухолевой терапии [23]. Ресвератрол относят к перспективным соединениям для редокс-направленной терапии рака за счет индукции образования АФК (супероксидного анион-радикала и пероксида водорода) с участием ферментов дыхательной цепи митохондрий [23]. Учитывая эти обстоятельства, а также тот факт, что лимфоциты относятся к клеткам с остаточной теломеразной активностью, которая может быть активирована путем прямого взаимодействия с голоферментом теломеразы или сигнальными путями, активирующими ее, необходимо исследовать процессы клеточной гибели лимфоцитарных клеток в присутствии ресвератрола в различных концентрациях во взаимосвязи с их антиоксидантным статусом.

Обнаружено [24], что ресвератрол может нарушать структуру ДНК в лимфоцитах при концентрациях 100–200 мкмоль/л. В то же время установлено [5], что *транс*-ресвератрол в концентрациях от 0 до 219 мкмоль/л уменьшал радиационно-индуцированное повреждение хромосом лимфоцитов. Наиболее выраженный эффект снижения уровня повреждений ДНК лимфоцитов человека *in vitro* наблюдали при уровне ресвератрола 0.5 ммоль/л при воздействии радиации в дозах 0.5 и 1 Гр [25]. Ресвератрол значительно ин-

гибировал радиационно-индуцированное повреждение ДНК лимфоцитов периферической крови мышей [8]. Он проявляет эффекты гормезиса [5], относится к группе радиомитигаторов за счет антиоксидантных свойств и активации сиртуинов [26, 27]. Однако молекулярные механизмы радиозащитной активности ресвератрола детально не исследованы [15]. Необходимо уточнить диапазоны концентраций полифенола, при которых он проявляет радиопротекторное действие.

В этой связи нами были исследованы некоторые показатели (индикаторы) процессов апоптотической и некротической гибели, а также антиоксидантного статуса лимфоцитов человека, модифицированных воздействием УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м²) и пероксида водорода (10^{–5} моль/л) в присутствии ресвератрола в невысоких концентрациях (10^{–7}, 10^{–6} и 10^{–5} моль/л).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования — лимфоциты, полученные не позднее двух часов после забора крови. Забор крови производили в стеклянные центрифужные пробирки с добавлением раствора гепарина (25 Ед/мл). Донорами были здоровые мужчины 18–45 лет, у которых брали кровь в филиале Воронежской городской клинической больницы скорой медицинской помощи № 1 Воронежской областной станции переливания крови.

Лимфоциты получали путем центрифугирования гепаринизированной донорской крови в градиенте плотности фиколл-урографина (фиколл 400 (Diam, Швейцария) — 7.64 г, урографин 76% (Bayer Schering Pharma AG, Германия) — 20 мл, вода — 92.56 мл; $\rho = 1.077$ г/см³) [28]. В центрифужную пробирку на 1 мл градиентной смеси насливали 3 мл гепаринизированной крови, разбавленной раствором Хенкса (0.1 моль/л, pH 7.4 при 20°C) в соотношении 1 : 1. Центрифугирование проводили в течение 15 мин при 200 g. Полученные лимфоциты отбирали пастеровской пипеткой, а затем центрифугировали в избытке раствора Хенкса в течение 10 мин при 180 g. Отмытые лимфоциты суспендировали в растворе Хенкса до рабочей концентрации 2·10⁶ кл/мл при помощи камеры Горяева.

Для проверки чистоты полученной суспензии лимфоцитов делали мазки, которые затем окрашивали по методу Романовского—Гимзы [28]. В полученной суспензии лимфоциты составляли 95–97 % всех клеток, 3–5 % приходилось на долю нейтрофилов и моноцитов.

Число жизнеспособных клеток во взвесах определяли методом эксклюзии трипанового синего [28]. Нами установлено, что ресвератрол в

конечной концентрации 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л не влиял на жизнеспособность лимфоцитов.

В работе использовали *транс*-ресвератрол (Shaanxi Hongao Bio-Tech Inc., Китай). Суспензию лимфоцитов с ресвератролом в конечной концентрации 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л инкубировали в течение 1 ч.

УФ-облучение лимфоцитов ($2 \cdot 10^6$ кл/мл), суспендированных в растворе Хенкса, проводили в чаше Петри, помещаемой в облучатель BIO-link-BLX 254 нм (Vilber Lourmaet, Франция). Доза облучения лимфоцитов составляла 1510 Дж/м^2 .

При исследовании спектральных характеристик растворов ресвератрола нами выявлены две полосы поглощения: при 214 нм и 298–322 нм ($\lambda_{\text{max}} = 304 \text{ нм}$), что согласуется с известными данными [29].

Лимфоциты модифицировали пероксидом водорода в конечной концентрации 10^{-5} моль/л. Растворы пероксида водорода готовили с использованием коэффициента молярного поглощения H_2O_2 $43.6 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при длине волны 240 нм.

Суспензии нативных и модифицированных воздействием УФ-света и пероксида водорода лимфоцитов в отсутствие и в присутствии ресвератрола инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 .

Уровень повреждений ДНК лимфоцитов исследовали методом ДНК-комет, основанным на оценке электрофоретической подвижности ДНК единичных клеток, иммобилизованных в агарозном геле. Регистрируемым изменением является способность ДНК индивидуальной клетки мигрировать в постоянном электрическом поле благодаря нарастающей в процессе гибели деградации генома. Клетки фиксировали в слое легкоплавкой агарозы (Fermentas, США, упругость 1%-го геля — 555 г/см^2 , температура плавления — 64.8°C , температура гелеобразования — 27°C) на поверхности стекла. Пробы готовили, нагревая 150 мг агарозы в 30 мл фосфатно-солевого буфера до полного растворения агарозы. После этого пробы остужали до 37°C и вносили в агарозу intactные и модифицированные клетки. Получившиеся стекла погружали в лизирующий раствор (2.5 моль/л NaCl , 100 ммоль/л ЭДТА , $10 \text{ ммоль/л трис-HCl}$, pH 10.0, 0.5% Тритона X-100, 1% додецилсульфата натрия, 10% диметилсульфоксида) и инкубировали 18 ч при 8°C . Затем пробы инкубировали 30 мин в буфере для электрофореза (300 ммоль/л NaOH , 1 ммоль/л ЭДТА , pH 13.0). Электрофорез проводили при напряжении 0.8 В/см в течение 20 мин. После окончания электрофореза стекла промывали в $0.4 \text{ моль/л трис-HCl}$ -буфере, pH 7.5. Затем гель окрашивали раствором бромистого этидия, накрывали покров-

ным стеклом и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа (Zeiss 450–490, Ft 510, LP 520, увеличение $400\times$). Изображения ДНК-комет регистрировали цифровым фотоаппаратом. Полученные результаты обрабатывали с помощью специального программного обеспечения для расчета стандартных параметров комет Comet-Score. Рассчитывали процентное содержание ДНК в «хвосте» кометы (%T), характеризующее уровень повреждений в ДНК исследуемых клеток, наличие которых можно рассматривать как сигнал к инициации апоптоза [30].

При исследовании процессов некротической гибели к клеточным суспензиям добавляли по 5 мкл раствора пропидия йодида в растворе Хенкса (соотношение по объему 1 : 3) и инкубировали в темноте в течение 30 мин. Затем в образцы добавляли по 500 мкл раствора Хенкса и осаждали клетки центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге MiniSpin. Суспензию лимфоцитов объемом 50 мкл наносили на предметные стекла и высушивали в темноте. Анализ клеток проводили на флуоресцентном микроскопе (Zeiss 450–490, Ft 510, LP 520, увеличение $400\times$).

Уровень АФК в intactных и модифицированных лимфоцитах исследовали флуоресцентным методом при помощи 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата на спектрофлуорометре RF-1501 (Shimadzu, Япония) [31].

Уровень каталитической активности каталазы определяли спектрофотометрическим методом при $\lambda = 410 \text{ нм}$, основанным на оценке светопоглощения цветного комплекса пероксида водорода и водного раствора молибденовокислого аммония.

Ферментативную активность глутатионредуктазы оценивали по скорости окисления НАДФН, регистрируемой спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Концентрацию свободного цитоплазматического кальция в лимфоцитах измеряли с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM на спектрофлуорометре RF-1501 (Shimadzu, Япония) [32].

Уровень пероксидной резистентности лимфоцитов исследовали на биохемилюнометре БХЛ-06М. Для этого в кювету для хемилюнометра вносили 1 мл суспензии лимфоцитов, предварительно проинкубированной с FeSO_4 (10^{-7} моль/л) в течение 10 мин. Затем вносили 0.01 мл пероксида водорода (0.01%) и, переводя кювету в измерительное положение, фиксировали величину интенсивности и светосуммы люминесценции в изучаемой системе.

ДНК из нативных и модифицированных лимфоцитов выделяли с помощью набора «ПРОБА-

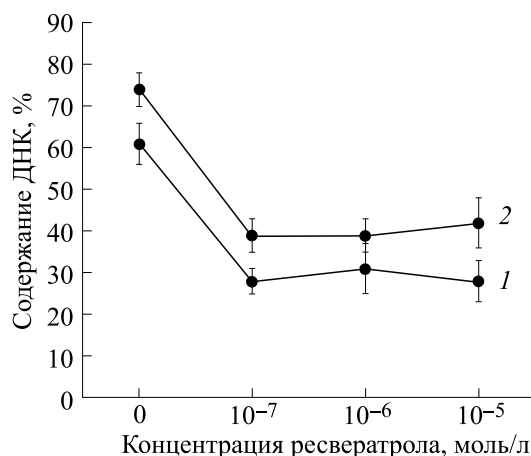


Рис. 1. Изменения процентного содержания ДНК в «хвосте» комет лимфоцитов после воздействия пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола: по оси абсцисс — конечная концентрация ресвератрола, по оси ординат — процентное содержание ДНК в «хвосте» комет; 1 — после воздействия пероксида водорода, 2 — после УФ-облучения.

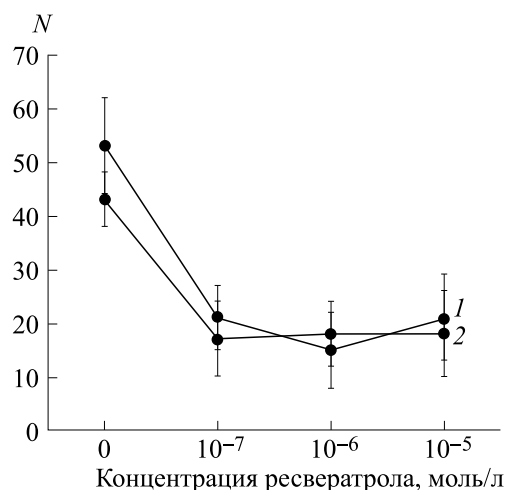


Рис. 2. Количество некротических лимфоцитов (N) через 1 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола: по оси абсцисс — конечная концентрация ресвератрола, по оси ординат — количество некротических лимфоцитов в поле зрения; 1 — после воздействия пероксида водорода, 2 — после УФ-облучения.

ГС» («ДНК-технология», Россия). Концентрацию и чистоту ДНК оценивали спектрофотометрическим методом соответственно по оптической плотности препаратов при 260 и 320 нм и соотношению A_{260}/A_{280} . Концентрация ДНК составляла 10 нг/мкл. Целостность выделенной ДНК проверяли с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле. Спектры флуоресценции системы «ДНК—этидия бромид» регистрировали на спектрофлуорофотометре RF-1501 (Shimadzu, Япония). Длина волны возбуждения и испускания флуоресценции — 495 и 605 нм соответственно. Конечная концентрация этидия бромида — 0.3 мкмоль/л.

Обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ Statgraphics: определяли среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t -критерия Стьюдента. Различия тестируемых показателей считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом ДНК-комет исследован один из маркерных показателей апоптоза — уровень повреждений ДНК лимфоцитов после воздействия пероксида водорода (10^{-5} моль/л) и УФ-света (1510 Дж/м^2) в присутствии ресвератрола в конечной концентрации 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л (рис. 1).

Через 1 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-излучения на лимфоциты уровень повреждений ДНК существенно повышается по сравнению с таковым для интактных клеток ($12 \pm 5\%$). Из анализа данных рис. 1 следует, что в присутствии ресвератрола в использованных концентрациях величина исследуемого параметра статистически достоверно снижается по отношению к таковой для лимфоцитов, модифицированных пероксидом водорода и УФ-светом в отсутствие полифенола.

Методом флуоресцентной микроскопии с окрашиванием ядер иммуноцитов раствором пропидия йодида было определено количество некротических клеток в поле зрения через 1 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-света на лимфоциты в отсутствие и в присутствии ресвератрола (рис. 2).

Из этого рисунка следует, что ресвератрол в использованных концентрациях уменьшает количество некротических клеток в суспензии лимфоцитов через 1 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-света на клетки по сравнению с таковым для модифицированных свободных иммуноцитов.

Следовательно, ресвератрол в использованных концентрациях снижает уровень повреждений ДНК апоптотических (инициированных к апоптозу) лимфоцитов и количество некротических клеток в условиях воздействия пероксида водорода и УФ-света.

С целью выявления возможных механизмов протекторного эффекта ресвератрола в отноше-

Таблица 1. Изменения уровня внутриклеточных активных форм кислорода, функциональной активности каталазы и глутатионредуктазы лимфоцитов человека, модифицированных воздействием УФ-излучения и пероксида водорода в отсутствие и в присутствии ресвератрола

Показатель	Конечная концентрация ресвератрола, моль/л			
	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Уровень продукции АФК в интактных клетках, отн. ед.	14.9 ± 2.2	$5.1 \pm 0.9^*$	$9.2 \pm 1.0^*$	$9.7 \pm 0.5^*$
Уровень продукции АФК в H_2O_2 -модифицированных клетках, отн. ед.	12.5 ± 0.9	$3.6 \pm 0.7^*$	$6.2 \pm 0.5^*$	$4.7 \pm 0.6^*$
Уровень продукции АФК в УФ-облученных клетках, отн. ед.	13.0 ± 1.2	$2.8 \pm 0.5^*$	$4.8 \pm 1.4^*$	$6.0 \pm 1.5^*$
Уровень активности каталазы в интактных клетках, мкмоль/мин	28.0 ± 11.0	$62.0 \pm 9.0^*$	$59.0 \pm 9.0^*$	$60.0 \pm 11.0^*$
Уровень активности каталазы в H_2O_2 -модифицированных клетках, мкмоль/мин	10.0 ± 5.0	$77.0 \pm 5.0^*$	$62.0 \pm 14.0^*$	$76.0 \pm 3.0^*$
Уровень активности каталазы в УФ-облученных клетках, мкмоль/мин	23.0 ± 6.0	$93.0 \pm 3.0^*$	$92.0 \pm 4.0^*$	$104 \pm 15^*$
Уровень активности глутатионредуктазы в интактных клетках, мкмоль/мин	7.3 ± 1.2	9.4 ± 0.9	7.7 ± 0.6	7.9 ± 0.8
Уровень активности глутатионредуктазы в H_2O_2 -модифицированных клетках, мкмоль/мин	9.2 ± 0.6	$16.3 \pm 0.9^*$	$16.9 \pm 1.2^*$	$15.4 \pm 2.0^*$
Уровень активности глутатионредуктазы в УФ-облученных клетках, мкмоль/мин	2.0 ± 0.5	$5.4 \pm 0.8^*$	$6.0 \pm 0.6^*$	$6.0 \pm 0.5^*$

Примечание. * — Отличия от контроля (без ресвератрола) статистически достоверны.

нии иммунцитов были исследованы изменения уровня продукции АФК, функциональной активности каталазы и глутатионредуктазы лимфоцитов, модифицированных воздействием УФ-света и пероксида водорода в отсутствие и в присутствии ресвератрола (табл. 1).

Обнаружено (табл. 1), что воздействие ресвератрола в конечной концентрации 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л в течение 1 ч на суспензию интактных лимфоцитов индуцирует статистически значимое снижение уровня внутриклеточных активных форм кислорода по сравнению с таковым для нативных (немодифицированных) иммунцитов. Уровень АФК — один из индикаторов митохондриального механизма апоптоза — в лимфоцитах, подвергнутых воздействию УФ-излучения и пероксида водорода в присутствии ресвератрола в тех же концентрациях, статистически достоверно снижается по отношению к величинам исследуемого параметра для клеток, модифицированных в отсутствие полифенола.

Уровень функциональной активности каталазы интактных лимфоцитов после воздействия ресвератрола в использованных концентрациях 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л увеличивается соответ-

ственно в 2.2, 2.1 и 2.1 раза по сравнению с таковым для клеток в отсутствие полифенола (табл. 1). Величины активности каталазы лимфоцитов после воздействия пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола в тех же концентрациях статистически достоверно увеличиваются соответственно в 7.7, 6.2, 7.6 и 4.0, 4.0, 4.5 раза по сравнению с таковыми для модифицированных клеток в отсутствие полифенола (табл. 1).

Воздействие ресвератрола на интактные лимфоциты не изменяет уровень активности глутатионредуктазы (табл. 1). Уровень активности глутатионредуктазы лимфоцитов после воздействия H_2O_2 и УФ-излучения в присутствии ресвератрола в тех же концентрациях увеличивается соответственно в 1.8, 1.8, 1.7 и 2.7, 3.0, 3.0 раза по сравнению с таковым для модифицированных клеток в отсутствие биогенного агента (табл. 1).

При этом общий уровень белка в исследуемых модифицированных клетках не изменяется по отношению к таковому для интактных лимфоцитов.

Повышение величин активности каталазы в интактных и модифицированных лимфоцитах в присутствии ресвератрола приводит, по всей ве-

Таблица 2. Изменения люминесцентных характеристик лимфоцитов в присутствии ресвератрола

Показатель	Конечная концентрация ресвератрола, моль/л			
	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Величина светосуммы люминесценции (S), мВ·сек	314 ± 23	$132 \pm 17^*$	$164 \pm 24^*$	$153 \pm 20^*$
Интенсивность люминесценции (I_{\max}), отн. ед.	73 ± 8	$7 \pm 4^*$	$3 \pm 2^*$	$5 \pm 2^*$

Примечание. * — Отличия от контроля (без ресвератрола) статистически достоверны.

Таблица 3. Изменения уровня внутриклеточного кальция (нмоль/л) в лимфоцитах, модифицированных воздействием пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола

Образец	Конечная концентрация ресвератрола, моль/л			
	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
Интактные лимфоциты	95 ± 7	$31 \pm 4^*$	$60 \pm 8^*$	$46 \pm 8^*$
Лимфоциты, модифицированные пероксидом водорода	164 ± 18	$48 \pm 15^*$	$76 \pm 14^*$	$61 \pm 9^*$

Примечание. * — Отличия от контроля (без ресвератрола) статистически достоверны.

роятности, к снижению уровня пероксида водорода и других внутриклеточных активных форм кислорода. Активация глутатионредуктазы в иммунитах после воздействия пероксида водорода и УФ-облучения клеток в присутствии полифенола индуцирует процессы восстановления окисленного глутатиона — низкомолекулярного антиоксиданта, дезактивирующего активные формы кислорода и участвующего в процессах функционирования глутатионзависимых ферментов.

При исследовании пероксидной резистентности мембран нативных лимфоцитов в присутствии ресвератрола выявлено снижение интенсивности свободно-радикальных процессов на поверхности иммунитах по сравнению с таковой для клеток без ресвератрола (табл. 2).

Обнаружено снижение уровня внутриклеточного кальция — медиатора апоптоза и «участника» процессов некроза — в цитозоле интактных и

модифицированных воздействием пероксида водорода и УФ-света лимфоцитах в присутствии ресвератрола (табл. 3). Это может быть связано с перераспределением свободных ионов кальция между клеточными компартментами, в частности, депонированием в эндоплазматическом ретикулуле и выкачиванием из клетки в среду.

В модельном эксперименте при исследовании флуоресценции в системе «ДНК лимфоцитов—этидия бромид» в присутствии ресвератрола (10^{-7} , 10^{-5} моль/л) наблюдали снижение интенсивности флуоресценции в максимуме (табл. 4), что указывает на возможность взаимодействия (интеркаляции) полифенола с молекулами ДНК. Аналогичные изменения интенсивности флуоресценции исследуемой системы обнаружены после добавления ресвератрола к ДНК, модифицированной воздействием пероксида водорода и УФ-света.

Таблица 4. Изменения интенсивности флуоресценции системы ДНК—этидия бромид в максимуме в интактном состоянии и после воздействия пероксида водорода и УФ-света на ДНК в присутствии ресвератрола

Образец	Конечная концентрация ресвератрола, моль/л		
	0	10^{-7}	10^{-5}
Интактная ДНК	628 ± 19	$554 \pm 15^*$	$519 \pm 18^*$
ДНК после воздействия пероксида водорода	605 ± 10	$504 \pm 12^*$	$463 \pm 15^*$
ДНК после УФ-облучения	614 ± 20	$555 \pm 16^*$	$485 \pm 10^*$

Примечание. Значения интенсивности флуоресценции приведены в отн. ед. * — Отличия от контроля (без ресвератрола) статистически достоверны.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами установлено, что ресвератрол за счет снижения уровня продукции внутриклеточных активных форм кислорода и ионов кальция, повышения активности антиоксидантных ферментов — каталазы и глутатионредуктазы, увеличения пероксидной резистентности плазматических мембран, может выступать в качестве регулятора процессов апоптоза и некроза лимфоцитов, индуцированных экзогенным пероксидом водорода (10^{-5} моль/л) и УФ-облучением (254 нм, 1510 Дж/м^2). Вероятно, ресвератрол способен взаимодействовать с молекулами ДНК и повышать ее устойчивость к действию модифицирующих агентов.

В наших экспериментах не выявлена зависимость обнаруженных эффектов ресвератрола от его концентрации, поэтому эти данные трудно формализовать. Полифенол в конечных концентрациях 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л проявлял практически одинаковый уровень активности. По-видимому, отсутствие усиления цитопротективных и антиоксидантных эффектов ресвератрола при повышении его уровня связано с его бифункциональным действием.

Полагают [13], что ресвератрол действует через ядерный фактор NF- κ B, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза, клеточного цикла. Ресвератрол увеличивает уровень транскрипционного фактора NF- κ B, 5'-аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы — сиртуина (SIRT1), гамма-коактиватора рецептора активатора пролиферации пероксисом (PGC-1 α), антиоксидантных ферментов. Антиоксидантное действие реализуется за счет белка SIRT1 (NAD-зависимой деацетилазы), подавляющего апоптоз [13], увеличения концентрации антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, каталазы, супероксиддисмутазы) и глутатиона, снижения продукции АФК, ингибирования пероксидного окисления липидов [33–35]. Ресвератрол может непосредственно выступать в качестве антиоксиданта в концентрации 10^{-6} моль/л и ингибировать пероксид водорода в модельных экспериментах [36], что обусловлено наличием в его молекуле двух фенольных колец с тремя гидроксильными группами [13]. Ресвератрол регулирует апоптоз через SIRT1, транскрипционные факторы (Foxo1 и p53), проапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bim и Bax), антиапоптотический белок семейства Bcl-2 (Bcl) [34]. Антиапоптотический эффект полифенола может проявляться за счет повышения уровня супероксиддисмутазы, снижения уровня АФК [7].

Влияние ресвератрола на процессы кальций-зависимых путей реализации апоптоза и некроза

может быть обусловлено его способностью модулировать внутриклеточную передачу сигналов кальция. Так, влияние ресвератрола на иммунные клетки связывают с модификацией цитозольной концентрации кальция посредством блокирования его входа в клетку и депонирования [37]. Однако конкретные механизмы изменений кальциевой сигнальной трансдукции клеток в присутствии ресвератрола не установлены.

Модуляция процессов реализации p53-зависимого пути ядерного механизма апоптоза может быть связана с взаимодействием ресвератрола с ДНК, что проявлялось в модельных экспериментах как снижение уровня флуоресценции в системе ДНК-этидия бромид в интактном состоянии и после модификации ДНК пероксидом водорода и УФ-облучением. Ресвератрол относят к ДНК-тропным соединениям, способность которых к интеркаляции в ДНК демонстрируют по тушению флуоресценции красителей (этидия бромид, акридинового оранжевого) [18, 38]. В клетках ресвератрол способен опосредованно влиять на репарацию ДНК и поддержание структуры хроматина [39]. По-видимому, при взаимодействии ресвератрола с ДНК происходит частичное раскручивание двойной спирали и изменение конформации ДНК, что нарушает образование водородных связей и интенсивность электростатических взаимодействий между фосфатными группами.

Обобщая результаты наших исследований, можно заключить, что ресвератрол в условиях воздействия пероксида водорода и УФ-излучения на лимфоциты может регулировать процессы митохондриального механизма апоптоза, связанные с увеличением внутриклеточного уровня АФК, отдельные этапы ядерного механизма, инициирующиеся вследствие повреждения молекул ДНК, а также, по-видимому, процессы «кальций-зависимых» путей программированной клеточной смерти.

В то же время не исключено, что защитное (митигаторное) действие ресвератрола может быть обусловлено его взаимодействием с лимфоцитарными мембранами, влиянием на состояние рецепторов смерти Fas, опосредующих рецепторный механизм апоптоза. Показано [40], что ресвератрол накапливается в липидных рафтах, поглощается клетками посредством рецепторзависимого эндоцитоза, в результате чего активируются киназные пути сигнальной трансдукции, перераспределяются рецепторы клеточной смерти внутри липидных микродоменов (рафтов) мембран и запускается апоптоз опухолевых клеток. Липидные рафты ассоциированы с организующими центрами (платформами) сборки и активации апоптотических и сигнальных молекул, участвующих в клеточной гибели [41].

Повышение уровня пероксидной резистентности лимфоцитов, модифицированных воздействием пероксида водорода и УФ-света в присутствии ресвератрола, а также снижение количества некротических клеток могут быть связаны со стабилизацией мембран иммунцитов, индуцированной взаимодействием полифенола с липидным бислоем. Установлено [42], что встраивание ресвератрола в липидные мембраны сопровождается повышением их текучести и проницаемости. Представления о локализации ресвератрола в липидных бислоях противоречивы и требуют детализации и уточнения. Показано [42], что ресвератрол может накапливаться в области гидрофильных головок мембранных липидов и образовывать водородные связи между гидроксильными группами молекул полифенола и гидрофильными группами липидов. Полагают [41], что ресвератрол, взаимодействуя с гидрофобными хвостами фосфолипидов, локализуется в неполярной зоне мембраны (в области рафтов), защищая ее от пероксидного окисления липидов.

ВЫВОДЫ

Обнаружено снижение уровня повреждений ДНК — маркерного показателя апоптоза — и количества некротических лимфоцитов периферической крови человека после воздействия УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м²) и пероксида водорода (10⁻⁵ моль/л) в присутствии ресвератрола (10⁻⁷, 10⁻⁶ и 10⁻⁵ моль/л). Уменьшение интенсивности процессов клеточной гибели иммунцитов в присутствии ресвератрола обусловлено снижением уровня продукции внутриклеточных активных форм кислорода и ионов кальция, повышением активности антиоксидантных ферментов — каталазы и глутатионредуктазы, увеличением пероксидной резистентности плазматических мембран, взаимодействием полифенола с ДНК.

Полученные нами данные расширяют современные представления об цитопротективном, антиапоптотическом и антиоксидантном действии ресвератрола в концентрациях 10⁻⁷, 10⁻⁶ и 10⁻⁵ моль/л на лимфоциты крови человека в условиях воздействия пероксида водорода и УФ-света. Они полезны при обсуждении вопросов, касающихся разработки способов регулирования процессов клеточной гибели иммунцитов, а также выявления механизмов фото-, радио- и геропротекторного действия ресвератрола.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ВУЗам в сфере науч-

ной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakvasina M. A., Holyavka M. G., Artyukhov V. G., Radchenko M. S., and Lidokhova O. V. Mechanisms of UV-induced human lymphocytes apoptosis. *Biophys. Rev.*, **15** (5), 1257–1267 (2023). DOI: 10.1007/s12551-023-01142-w
2. Наквасина М. А., Артюхов В. Г. и Свекло Л. С. Механизмы гибели лимфоцитов человека, индуцированной УФ-излучением и активными формами кислорода. *Вестн. ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*, **1**, 61–74 (2023).
3. Kalantari H. and Das D. K. Physiological effects of resveratrol. *BioFactors*, **36** (5), 401–406 (2010). DOI: 10.1002/biof.100
4. Yu W., Fu Y.-C., and Wang W. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J. Cell. Biochem.*, **113** (3), 752–759 (2012). DOI: 10.1002/jcb.23431
5. Sebastia N., Almonacid M., Villaescusa J. I., Cervera J., Such E., Silla M. A., Soriano J. M., and Montoro A. Radioprotective activity and cytogenetic effect of resveratrol in human lymphocytes: An *in vitro* evaluation. *Food Chem. Toxicol.*, **51**, 391–395 (2013). DOI: 10.1016/j.fct.2012.10.013
6. Park E.-J., Pezzuto J.M. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim. Biophys. Acta*, **1852** (6), 1071–1113 (2015). DOI: 10.1016/bbadis.2015.01.014
7. Singh A., Sati S., and Mishra R. I. Resveratrol: antioxidant-pro-oxidant. *Int. J. Tech. Res. Sci.*, **1** (6), 106–112 (2016).
8. Koohian F., Shanei A., Shahbazi-Gahruei D., and Moradi M.-T. The radioprotective effect of resveratrol against genotoxicity induced by γ -irradiation in mice blood lymphocytes. *Dose-Response*, **15** (2), 1559325817705699 (2017). DOI: 10.1117/1559325817705699
9. Ivanova D., Zhelev Z., Semkova S., Aoki I., and Bakalova R. Resveratrol modulates the redox-status and cytotoxicity of anticancer drugs by sensitizing leukemic lymphocytes and protecting normal lymphocytes. *Anti-cancer Res.*, **39** (7), 3745–3755 (2019). DOI: 10.21873/anti-cancer.13523

10. Malaguarnera L. Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients*, **11** (5), 946 (2019). DOI: 10.3390/nu11050946
11. Shaito A., Posadino A. M., Younes N., Nasan H., Halabi S., Alhababi D., Al-Mohannadi A., Abdel-Rahman V., Eid A. H., Nasrallah G. K., and Pintus G. Potential adverse effects of resveratrol: a literature review. *Int. J. Sci.*, **21** (6), 2084 (2020). DOI: 10.3390/ijms21062084.
12. Agbele A. T., Fasoro O. J., Fabamise O. M., Oluyide O. O., Idolor O. R., and Bamise E. A. Normal tissue damage by resveratrol: a systematic review. *Euras. J. Med.*, **52** (3), 298–303 (2020). DOI: 10.5152/eurasianjmed.2020.20143
13. Пальцын А. А. Ресвератрол. *Патологич. физиология и эксперим. терапия*, **65** (1), 116–123 (2021). DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.116-123
14. Alesci A., Nicosia N., Fumia A., Giorgianni F., Santini A., and Cicero N. Resveratrol and immune cells: a link to improve human health. *Molecules*, **27** (2), 424 (2022). DOI: 10.3390/molecules27020424
15. Gramatyka M. The radioprotective activity of resveratrol – metabolomics point of view. *Metabolites*, **12** (6), 478 (2022). DOI: 10.3390/metabo12060478
16. Коваленко Н. А., Жданов Д. Д. и Коваленко Т. Ф. Возможности и эффекты активации теломеразы. *Молекуляр. биология*, **47** (4), 544–557 (2013).
17. Bastianetto S., Ménard C., and Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta*, **1852** (6), 1195–1201 (2015). DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.09.011
18. Власова О. А., Борунова А. А., Сафина А., Сметанина И. В., Лесовая Е. А., Белицкий Г. А., Заботина Т. Н., Гурова К., Кирсанов К. И. и Якубовская М. Г. Активация сигнального пути интерферона-альфа ресвератролом, генистеином и кверцетином. *Сиб. онкол. журн.*, **18** (1), 50–55 (2019). DOI: 10.21294/1814-4861-2019.-18-1-50-55
19. Mukherjee S., Dudley D. I., and Das D. K. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose-response*, **8** (4), 478–500 (2010). DOI: 10.2203/dose-response.09-015. Mukherjee
20. Lin H. Y., Tang H. Y., Davis F. B., and Davis P. J. Resveratrol and apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1215**, 79–88 (2011). DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05846.x
21. Delmas D., Solary E., and Latruffe N. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr. Med. Chem.*, **18** (8), 1100–1121 (2011). DOI: 10.2174/092986711795029708
22. Fu X., Li M., Huang Z., and Najafi M. Targeting of cancer cell death mechanisms by resveratrol: a review. *Apoptosis*, **26** (11–12), 561–573 (2021). DOI: 10.1007/s10495-021-01689-7
23. Мартинович Г. Г., Мартинович И. В., Голубева Е. Н., Черенкевич С. Н., Демидчик Ю. Е., Гаин Ю. М., Владимирская Т. Э. и Лушчик М. Л. Редокс-биотехнологии как основа для новой стратегии в противоопухолевой терапии. *Вестн. нац. Акад. наук Беларуси*, **2**, 85–104 (2012).
24. Basso E., Regazzo G., Fiore M., Palma V., Traversi G., Testa A., Degraffi F., and Cozzi R. Resveratrol affects DNA damage induced by ionizing radiation in human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*, **806**, 40–46 (2016). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.07.005
25. Dobrzynska M. M. and Gajowik A. Protection and mitigation by resveratrol of DNA damage induced in irradiated human lymphocytes in vitro. *Radiat. Res.*, **197** (2), 149–156 (2022). DOI: 10.1667/RADE-20-00037.1
26. Легеза В. И., Гребенюк А. Н. и Драчёв И. С. Радиомитигаторы: классификация, фармакологические свойства, перспективы применения. *Радиация. биология. Радиоэкология*, **59** (2), 161–169 (2019). DOI: 10.1134/S0869803119020097
27. Быков В. Н., Гребенюк А. Н. и Ушаков И. Б. Перспективы использования противолучевых средств для предотвращения эффектов, связанных со старением организма. *Радиация. биология. Радиоэкология*, **59** (5), 488–502 (2019). DOI: 10.1134/S0869803119050035
28. *Лимфоциты. Методы*. Под ред. Дж. Клауса (Мир, М., 1990).
29. Кречетов С. П., Масленникова М. С., Соловьева Н. Л. и Краснюк И. И. Обоснование оптимального состава композиций ресвератрола с солибилизаторами. *Рос. биотерапевтич. журн.*, **20** (3), 57–65 (2021).
30. Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., and Tice R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*, **18**, 45–51 (2003). DOI: 10.1093/mutage/18.1.45.
31. Rastogi R. P., Singh S. P., Häder D. P., and Sinha R. P. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397** (3), 603–607 (2010). DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.006.
32. Hirst R. A., Harrison C., Hirota K., and Lambert D. G. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in whole cell suspensions using fura-2. *Methods Mol. Biol.*, **312**, 37–45 (2005). DOI: 10.1385/1-59259-949-4:037.
33. Galiniak S., Aebischer D., and Bartusik-Aebischer D. Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochim. Pol.*, **66** (1), 13–21 (2019). DOI: 10.18388/abp.2018_2749
34. Zhou D.-D., Luo M., Huang S.-Y., Saimaiti A., Shang A., Gan R.-Y., and Li H.-B. Effects and mechanisms of resveratrol on aging and age-related diseases. *Oxidative Med. Cell. Longevity*, **4**, 1 (2021). DOI: 10.1155/2021/9932218.
35. Пиняев С. И., Мельникова Н. А., Морозова А. А., Ревина Н. В., Спирина Ю. П., Дуленова Е. А. и Ревин В. В. Влияние ресвератрола на конформационное состояние жирных кислот и уровень перекисного окисления липидов в поврежденных соматиче-

- ских нервах. *Вестн. ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*, **2**, 78–85 (2016).
36. Наквасина М. А., Артюхов В. Г., Старикова Т. И. и Сараджи Н. Г. Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного пероксидом водорода, и их регулирование. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **7** (3), 440–445 (2022).
 37. McCalley A. E., Kaja S., Payne A. J., and Koulen P. Resveratrol and calcium signaling: molecular mechanisms and clinical relevance. *Molecules*, **19** (6), 7327–7340 (2014). DOI: 10.3390/molecules19067327
 38. Zang S., Sun X., Jing Z., and Qu F. Spectroscopic analysis on the resveratrol-DNA binding interactions at physiological pH. *Spectrochim. Acta, Part A*, **82** (1), 213–216 (2011). DOI: 10.1016/j.saa.2011.07.037
 39. Leone S., Cornetta T., Basso E., and Cozzi R. Resveratrol induces DNA double-strand breaks through human topoisomerase II interaction. *Cancer letters*, **295** (2), 167–172 (2010). DOI: 10.1016/j.canlet.2010.02.022
 40. Delmas D., Aires V., Colin D. J., Limagne E., Scagliarini A., Cotte A. K., and Ghiringheli F. Importance of lipid microdomains, rafts, in absorption, delivery, and biological effects of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1290** (1), 90–97 (2013). DOI: 10.1111/nyas.1277
 41. Neves A. R., Nunes C., and Reis S. Resveratrol induces ordered domains formation in biomembranes: Implication for its pleiotropic action. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858** (1), 12–18 (2016). DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.10.005
 42. Plachta L., Mach M., Kowalska M., and Wydro P. The effect of trans-resveratrol on the physicochemical properties of lipid membranes with different cholesterol content. *Biochim. Biophys. Acta*, **1866** (1), 184 (2024). DOI: 10.1016/j.bbamem.2023.184212

Cytoprotective and Antioxidant Effect of Resveratrol on Human Lymphocytes Modified with Hydrogen Peroxide and UV Light

М.А. Наквасина*, V.G. Artyukhov*, E.N. Chursanova*, **, O.V. Myachina, E.I. Korpuseva*, A.Yu. Deenkova*, and V.A. Shestykh***

**Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia*

***N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Studencheskaya ul. 10, Voronezh, 394036 Russia*

A decrease in the intensity of the processes of apoptotic and necrotic death of human peripheral blood lymphocytes was found after exposure to UV light (254 nm, 1510 J/m²) and hydrogen peroxide (10^{−5} mol/l) in the presence of resveratrol (10^{−7}, 10^{−6}, 10^{−5} mol/l). It was revealed that the cytoprotective effect of resveratrol on lymphocytes is due to a decrease in the level of production of intracellular reactive oxygen species and calcium ions, an increase in the activity of antioxidant enzymes - catalase and glutathione reductase, an increase in peroxide resistance of plasma membranes, and interaction with DNA. Possible mechanisms of action of resveratrol as a regulator of the processes of apoptotic and necrotic death of lymphocytes induced by exposure to hydrogen peroxide and UV radiation are discussed.

Keywords: lymphocytes, resveratrol, hydrogen peroxide, UV light, apoptosis, necrosis

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА ИНБРЕДНЫХ МЫШЕЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

© 2024 г. Ю.Л. Бабурина*, И.В. Одиноква*, Р.Р. Крестинин*, А.И. Звягина*,
Л.Д. Сотникова*, О.В. Крестинина*.*

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

#E-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.2024 г.

После доработки 27.03.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Развитие сахарного диабета, одного из наиболее распространенных метаболических заболеваний в развитом мире, связано с нарушением секреции инсулина или с резистентностью клеток к действию этого гормона (диабет 1 и 2 типа соответственно). В обоих случаях общим патологическим изменением является повышение уровня глюкозы в крови — гипергликемия, что в конечном итоге может привести к серьезному поражению органов и тканей организма. Считается, что митохондрии являются одной из основных мишеней диабета на внутриклеточном уровне. В настоящем исследовании мы изучили функциональное состояние митохондрий сердца инбредных мышей линии C57BL/Ks—db+/+m, несущих рецессивный ген *diabetes-db* (диабетические мыши). Проведен гистологический анализ левого желудочка сердца диабетических и контрольных мышей. В образцах ткани сердца диабетических мышей наблюдалось увеличение интенсивности окраски эозином, что подразумевает повреждение структуры цитоплазматических белков. Кроме того, было показано, что дыхательный контроль и емкость Ca^{2+} в митохондриях диабетических мышей снижались по сравнению с контрольными. Были проанализированы изменения в митохондриальной динамике и митофагии в этих условиях.

Ключевые слова: сахарный диабет, митохондриальная дисфункция, митохондрии сердца мыши, Ca^{2+} -емкость.

DOI: 10.31857/S0006302924060062, EDN: NLUUQB

На сегодняшний день заболевание сахарным диабетом является самой распространенной эндокринной патологией во многих странах мира. Общая численность пациентов с сахарным диабетом на территории Российской Федерации, состоящих на диспансерном учете по данным «Федерального Регистра сахарного диабета» на 1 января 2023 года составляет 4 962 762 (3.31% населения РФ). Из них сахарный диабет 1 типа — 5.58%, сахарный диабет 2 типа — 92.33%, другие типы сахарного диабета — 2.08% [1]. Митохондрии играют важную роль в процессах передачи энергии, передачи сигналов и путей гибели кле-

ток, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями [2] и являются одной из основных мишеней диабета на внутриклеточном уровне. Сахарный диабет является важным фактором риска развития патологий сердца. Сердечная дисфункция у больных сахарным диабетом обусловлена множеством патологических механизмов. Эти механизмы связаны с повреждением митохондрий, которое может быть основной причиной патофизиологии диабетической болезни сердца [3].

Общепризнано, что ионы Ca^{2+} являются универсальным регулятором многих внутриклеточных процессов. Важной функцией митохондрий является поддержание низкой концентрации Ca^{2+} внутри клеток. При высокой концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле происходит его поглощение митохондриями. Поглощенный Ca^{2+} быстро транспортируется в митохондрии и хранится в матриксе, что считается важным для регуляции

Сокращения: мПТР — митохондриальная пора неспецифической проницаемости (mitochondrial permeability transition pore), Mfn1 и Mfn2 — митофузины 1 и 2, OPA1 — белок атрофии зрительного нерва 1, АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, МСМ — митохондрии сердца мыши, PINK1 — PTEN-индуцированная киназа 1, GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, DRP1 — родственный динамину белок 1.

гомеостаза Ca^{2+} в условиях стресса. Избыточное накопление Ca^{2+} в митохондриях приводит к открытию Ca^{2+} -чувствительной неспецифической поры (мРТР — mitochondrial permeability transition pore) во внутренней мембране и инициации гибели клеток [4]. Было показано, что митохондрии сердца диабетических крыс были более чувствительны к индукции мРТР, чем митохондрии контрольных животных [5].

Митохондрии подвергаются постоянным процессам слияния и деления при этом изменяя свою форму и размер. Эти процессы характеризуют митохондриальную динамику и необходимы для удовлетворения метаболических потребностей клетки. Слияние опосредуется митофузинами 1 (Mfn1) и 2 (Mfn2) и белком атрофии зрительного нерва 1 (OPA1), тогда как деление — динамин-связанным белком 1 (Drp1) и некоторыми другими белками [6]. Исследования митохондриальной динамики при сахарном диабете ограничены, но есть убедительные доказательства того, что динамика митохондрий изменяется в кардиомиоцитах, обработанных высоким содержанием глюкозы в диабетическом сердце. Так, было показано, что высокий уровень глюкозы индуцирует образование коротких и небольших митохондрий в клетках кардиомиоцитов линии H9C2 [7]. При ингибировании деления митохондрий K38A, доминантно-негативным мутантом Drp1, снижаются продукция АФК и гибель клеток, индуцированные глюкозой. Следовательно, фрагментированные митохондрии более чувствительны к высокой токсичности глюкозы [8].

Процесс избирательного разрушения митохондрий путем аутофагии представляет собой митофагию. Митофагия необходима живой клетке для поддержания качества митохондрий и гомеостаза путем удаления ненужных или дисфункциональных митохондрий. Кроме того, митофагия также защищает от апоптоза и от повреждения клеток токсичными веществами [9]. Развитие и прогрессирование диабета и его осложнений у человека и животных приводит к подавлению митохондриального биогенеза и митофагии. В результате количество здоровых митохондрий в клетке уменьшается, а доля поврежденных увеличивается. Эти изменения лежат в основе общей митохондриальной дисфункции и нарушений при диабете [9].

В настоящем исследовании мы изучили изменение функционального состояния митохондрий сердца инбредных мышей линии C57BL/Ks—db+/+m, несущих рецессивный ген *diabetes-db*. Был проведен гистологический анализ срезов левого желудочка, исследованы изменения содержания ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), тропонина I и миогло-

бина. Проанализированы изменения дыхательной активности митохондрий, транспорта Ca^{2+} , емкости Ca^{2+} , а также митохондриальной динамики в наших экспериментальных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Использовали линию инбредных мышей C57BL/Ks—db+/+m в возрасте 4-х месяцев. Инбридинг Fn +8, генотип a, db+/+m. Мыши этой линии несут рецессивный ген *diabetes-db*, 8-я группа сцепления, 4-я хромосома (опытная мышь). Ген *db* в гомозиготном состоянии вызывает диабет, что сопровождается аномальным ожирением. Содержание сахара в крови высокое, уровень утилизации глюкозы снижен. Дефицита инсулина нет. Оба пола диабетиков бесплодны. Ген *m-misty* — рецессивный, осветляющий окраску маркер оппозитивной хромосомы, не несущий гена *db*. Окрас шерсти черный. В качестве контроля применяли линию инбредных мышей C57BL/6J в возрасте 4-х месяцев. Данная инбредная линия мышей является стандартной линией для поддержания мутаций. Применяется в качестве эталона для сравнения с особенностями других линий в исследовании культур тканей, загрязнения атмосферы, гематологии, химиотерапии рака, радиации, питания. Окрас шерсти — черный. Генотип — a, H-2b. В исследовании использовали по 8 мышей каждой линии из питомника «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России. Все животные содержались в одинаковых условиях в виварии ИТЭБ РАН, в помещении с контролируемой температурой и освещением ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-часовой световой цикл). Уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра OneTouch Select Plus (LifeScan, Швейцария).

Гистологический анализ. Для гистологического анализа верхнюю половину сердца (желудочки) отрезали скальпелем от целого сердца сразу после извлечения из грудной полости и быстро промывали холодным фосфатно-солевым буфером для удаления крови. Затем образцы фиксировали в нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч при комнатной температуре по стандартной методике. После завершения фиксации фрагменты трижды отмывали от избытка фосфатов в дистиллированной воде и погружали в среду O.K.T. Compound Tissue Tek (Sakura, Япония) на 12 ч при температуре 4°C . Серии поперечных срезов толщиной 9 мкм были изготовлены с использованием криотома Shandon 620E (Thermo Fisher Sci., США) с шагом 30 мкм. Каждую серию из трех последовательных срезов окрашивали гематоксилином и эозином и с помощью дифференциального трихромного метода окрашивания по Массону. Для получения общей картины повреждений тканей сердца были сняты гистотопограммы на мик-

роскопической станции Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) с использованием программного обеспечения Nis Elements AR4.13.05 (Build 933).

Выделение митохондрий сердца мышей. Митохондрии сердца мыши (МСМ) выделяли путем дифференцированного центрифугирования. Сердце измельчали и гомогенизировали в среде, содержащей 75 мМ сахарозы (S7903, Sigma, США), 10 мМ трис-НСl (рН 7.4), 225 мМ маннита (M4125, Sigma, США), 0.5 мМ ЭДТА (E9884, Sigma, США), 0.5 мМ ЭГТА (E3889, Sigma, США) и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (A6003, Sigma, США). Затем гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут. Полученный супернатант (с митохондриями) осаждали при 8500 g в течение 10 мин. Осадок, содержащий митохондрии, промывали средой выделения без ЭДТА, ЭГТА и бычьего сывороточного альбумина при 8500 g в течение 10 мин. Полученный осадок суспендировали в той же среде. Все процедуры проводили при температуре 4°C. Концентрацию белка в митохондриях, которая составляла 20–30 мг/мл, определяли методом Брэдфорда.

Измерение дыхательной активности митохондрий. Скорости потребления кислорода измеряли в термостатируемой ячейке, в которую вмонтированы O₂-электрод Кларка (Clark-type electrode) [10]. Митохондрии инкубировали в среде, содержащей 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 7.4, содержащем 120 мМ KCl, 2 мМ KН₂РO₄. В качестве дыхательных субстратов 5 мМ глутамата и 5 мМ малата использовали. Концентрация митохондриального белка в среде составляла 0.5 мг/мл. Скорости потребления кислорода в состояниях 2 (V₂), 3 (V₃) и 4 (V₄) определяли после добавления 200 мкМ АДФ к МСМ. Скорость разобщения окислительного фосфорилирования (V_u) измеряли после добавления 2,4-динитрофенола и оценивали, как число нг-атомов O, потребляемых митохондриями в минуту на мг белка. Дыхательный контроль рассчитывали, как соотношение V₃ к V₄. Измерения проводили в закрытой ячейке.

Приготовление тканевых образцов. Тканевые образцы готовили, как описано в работах [10, 11]. 6–7 мг ткани левого желудочка сердца отрезали и помещали в ледяной буфер (RIPA-буфер с коктейлем протеаз), гомогенизировали и перемешивали

на орбитальном шейкере в течение 2 ч при температуре 4°C. Полученные образцы центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин при 4°C. Концентрацию белка в полученных образцах определяли по методу Брэдфорда. Аликвоты тканевой суспензии из каждой экспериментальной группы солибилизировали в буфере Лэммли (Bio-Rad, США).

Электрофорез и вестерн-блоттинг. Приготовленные образцы по 20 мкг наносили на каждую линию и разделяли методом электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) осуществляли методом вестерн-блоттинга. Мембраны окрашивали антителами к АЛТ, АСТ, ЛДГ, тропонину I и миоглобину. Все антитела — от компании Abcam (Великобритания). Мембраны окрашивали антителами к родственному динамину белку 1 (DRP1, Elabscience, США), Mfn2 (Elabscience, США), OPA1 (Cloud-Clone Corp., США), PTEN-индуцированной киназе 1 (PINK1, Cusabio, США), Parkin (Cusabio, США). Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH, SantaCruz, США) использовали для нормирования количества белка в тканевых образцах.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ и апостериорный анализ (по Стьюденту—Ньюману—Кеулсу).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сначала мы измерили вес животных и уровень глюкозы в крови мышей исследуемых групп (табл. 1). Вес опытных мышей на 58% увеличился по сравнению с контрольными, а уровень глюкозы повышался в три раза.

Далее был проведен гистологический анализ гистотопограмм поперечных срезов желудочков сердца в исследуемых группах животных. (рис. 1). Выраженные изменения гистоархитектоники и структуры ткани сердца экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой обнаружены не были. Более того, дифференциальный гистохимический анализ на коллагеновые волокна не выявил признаков фибротических изменений ткани для всех групп. Детальное изуче-

Таблица 1. Характеристики массы тела и уровня глюкозы в крови используемых инбредных мышей

Животные	Масса, г	Глюкоза, ммоль/л
Инбредная мышь C57BL/6J	29.03 ± 3.66	10.59 ± 1.49
Инбредная мышь C57BL/Ks-db+/+m	45.84 ± 5.94*	35.99 ± 11.19*

Примечание. * — $p < 0.01$.

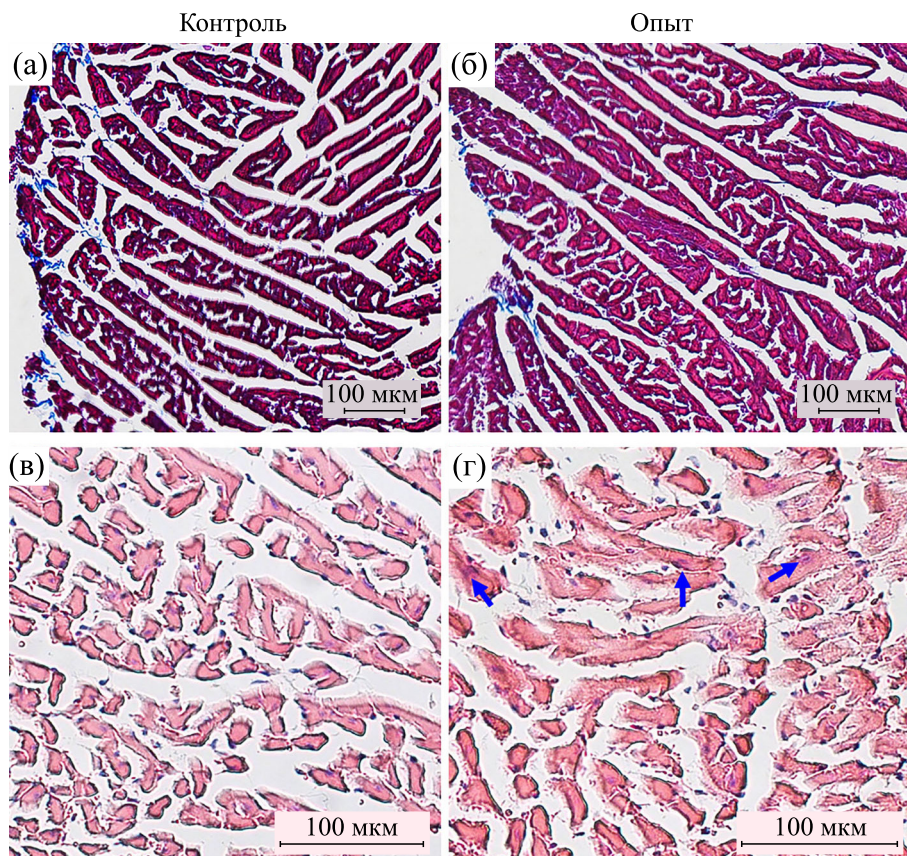


Рис. 1. Результаты гистологического исследования структуры желудочков сердца контрольных ((а) и (в)) и диабетических мышей ((б) и (г)) — световая микроскопия, масштаб 100 мкм. (а) и (б): фрагменты гистотопограмм субэндокардиальной зоны желудочков, окраска трихром по Массону (мышечные волокна/миофибриллы — малиновый цвет, соединительная ткань/фиброз — синий цвет) при 4-кратном увеличении; (в) и (г) — фрагменты субперикардиальной зоны желудочков, окраска гематоксилином и эозином (ядра клеток — фиолетовый цвет, эритроциты — красный цвет, цитоплазма клеток — розовый цвет) при 10-кратном увеличении, синими стрелками обозначено эозинофильное насыщение цитоплазмы клеток.

ние состояния миофибрилл и кардиомиоцитов проводили с использованием окраски гематоксилином и эозином. Контрольная группа образцов характеризовалась нормальной гладкой структурой миофибрилл с одиночными, овальными и центрально расположенными ядрами кардиомиоцитов. Однако в экспериментальной группе образцов было обнаружено, что миофибриллы субперикардиальной зоны сердца дезорганизованы, а у некоторых кардиомиоцитов наблюдалось увеличение интенсивности окраски эозином цитоплазмы клеток в сравнении с контрольной группой, что подразумевает повреждение структуры цитоплазматических белков.

Затем мы исследовали содержание белков (рис. 2), таких как АЛТ, АСТ, тропонин I, ЛДГ и миоглобин, в тканевых лизатах с целью выявления нарушения функционирования сердца при диабете. На рис. 2 показаны вестерн-блоты исследуемых белков и представлено количественное соотношение белковых полос после норми-

рования их по GAPDH (контроль белковой нагрузки). Обнаружено, что содержание АЛТ снижалось на 60%, АСТ — на 23%, тропонин I — на 40%, ЛДГ — на 55% и миоглобина — на 30%. Снижение содержания белков в тканевых лизатах у мышей с диабетом свидетельствует о нарушении функционирования сердца.

Далее было изучено изменение функционального состояния митохондрий, изолированных из мышечной контрольной и опытной групп. С этой целью измеряли дыхательную активность митохондрий в состояниях 2 (V₂), 3 (V₃), 4 (V₄) и разобщение окислительного фосфорилирования (V_u) (рис. 3), а также скорость входа Ca²⁺ в митохондрии после его первой и второй добавки (V^{Ca2+}_{in1}, V^{Ca2+}_{in2}) и Ca²⁺-емкость (рис. 4). На рис. 3а показаны кривые митохондриального дыхания в наших экспериментальных условиях. Оценка скорости потребления кислорода в различных состо-

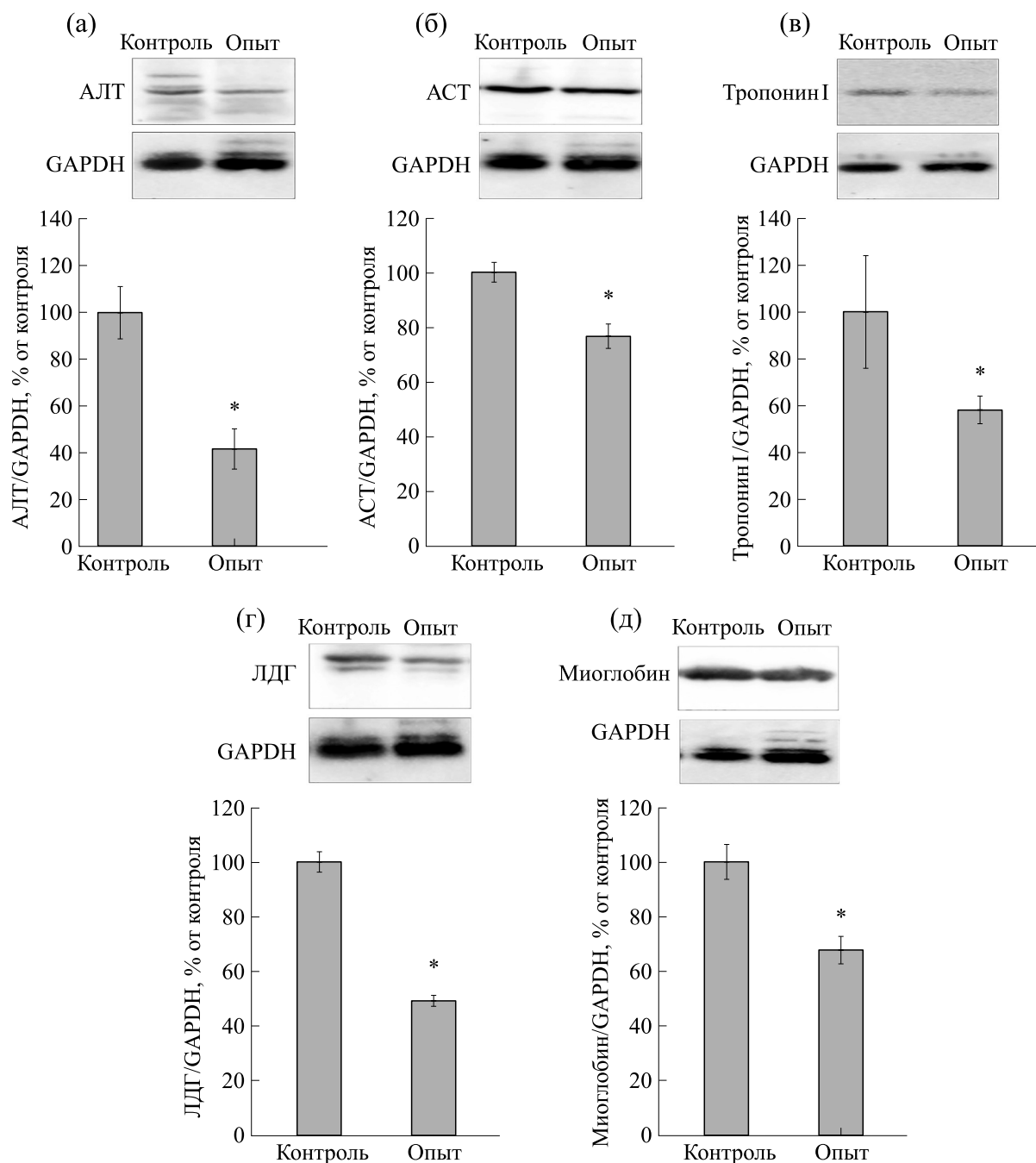


Рис. 2. Изменение содержания АЛТ, АСТ, тропонина I, ЛДГ и миоглобина в тканевых лизатах сердца контрольных и диабетических мышей. Белки экстрагировали и подвергали вестерн-блоттингу. GAPDH использовали для контроля белковой нагрузки. В верхней части — иммуноокрашивание антителами к АЛТ, АСТ, тропонину I, ЛДГ и миоглобину, в нижней части — количественная оценка иммуноокрашивания с помощью компьютерной денситометрии, данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение в серии из четырех независимых экспериментов. * — Достоверная разница в уровне белка по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

яниях представлена на рис. 36. Скорость потребления кислорода в МСМ опытной группы снижалась в V2 на 40%, в V3 ~ на 60%, V4 ~ на 50% и Vи ~ на 55% по сравнению с МСМ контрольной группы. Несмотря на то, что скорости потребления кислорода во всех состояниях в митохондри-

ях сердца из опытных мышей снижались по сравнению с контрольными, дыхательный контроль также уменьшался на 37%, однако не был драматично низким и составлял 3.38, тогда как у МСМ, изолированных из контрольной группы, дыхательный контроль равнялся 5.36.

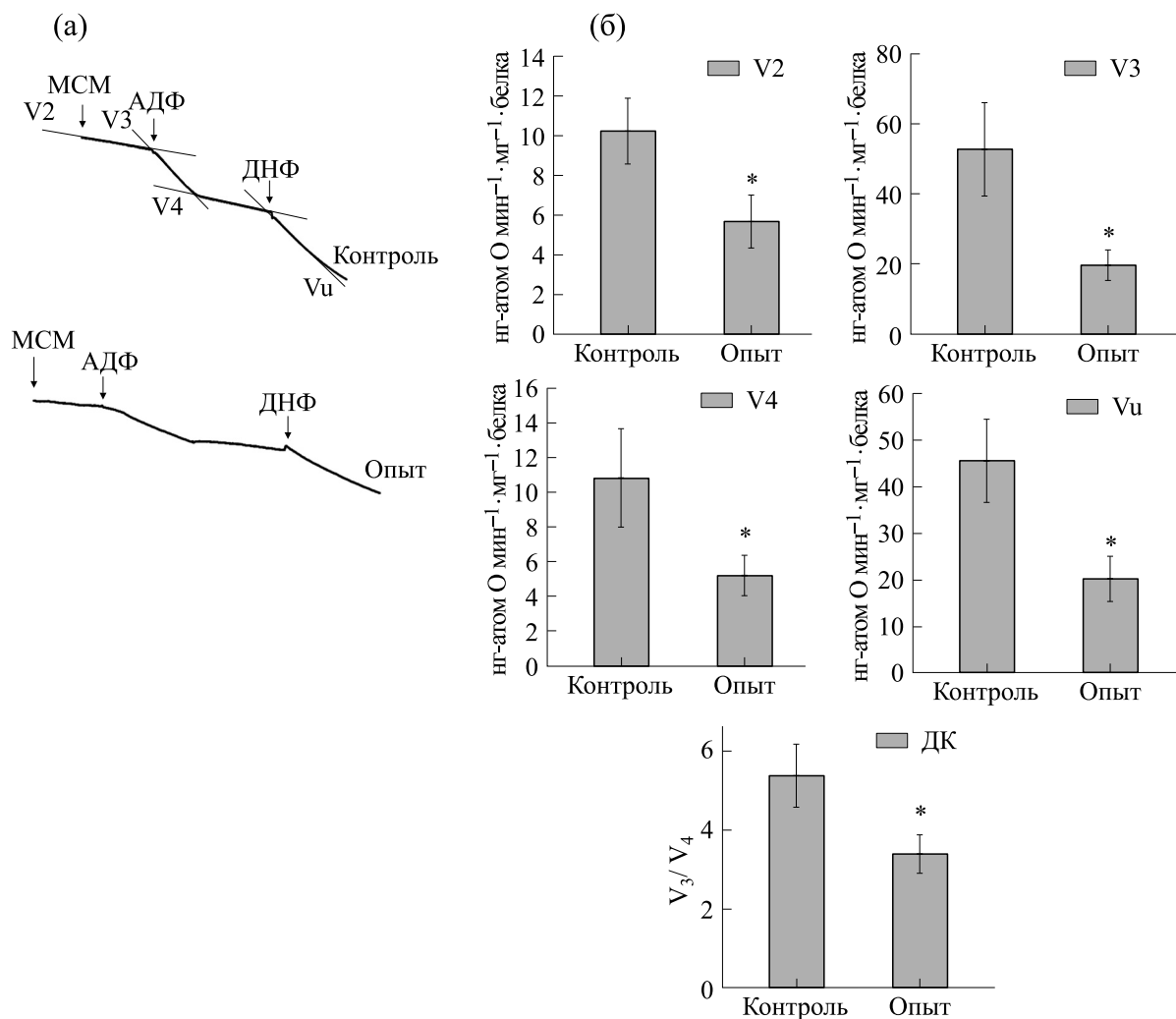


Рис. 3. Изменение дыхательной активности в митохондриях сердца контрольных и диабетических мышей. МСМ инкубировали в стандартной среде, как описано в разделе «Материалы и методы». (а) — Кривые дыхательной активности; (б) — количественный анализ скорости дыхания митохондрий в состояниях V2, V3, V4, Vu и дыхательного контроля (как соотношения V3 к V4). Данные восьми независимых экспериментов представлены как среднее \pm стандартное отклонение. * — Достоверная разница в по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

На рис. 4а показано изменение потоков Ca^{2+} в МСМ в наших экспериментальных условиях. Ca^{2+} добавляли к митохондриям до достижения пороговой концентрации Ca^{2+} , что отражало Ca^{2+} -емкость митохондрий. Как видно из рис. 4а, выход Ca^{2+} из митохондрий в контрольных условиях наблюдали после четвертой добавки, тогда как при диабете выход Ca^{2+} происходил после третьей добавки. На рис. 4б показаны количественные изменения скорости входа Ca^{2+} в МСМ после первой ($V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in1}}$) и второй ($V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in2}}$) добавок. $V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in1}}$ не отличались как в контрольной, так и в опытной группах животных, тогда как $V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in2}}$ в опытной группе была ниже почти на

50% по сравнению с контрольной. На рис. 4в показано изменение емкости Ca^{2+} в МСМ животных контрольной и опытной групп. Емкость Ca^{2+} в МСМ опытной группы снижалась на 40% по сравнению с контрольной.

На рис. 5 показано изменение содержания белков, ответственных за слияние (OPA1, Mfn2) и деление (DRP1) митохондрий, а также представлены результаты по изменению маркеров митофагии, таких как PINK1 и Parkin. Эксперименты проводили на гомогенате диабетических и контрольных мышей. На рис. 5 в верхней части показаны вестерн-блоты OPA1 (рис. а), DRP1 и Mfn2 (рис. 5б), PINK1 и Parkin (рис. 5в). В нижних частях на рис. 5 показаны количественные изменения, представленные как отношения оптической

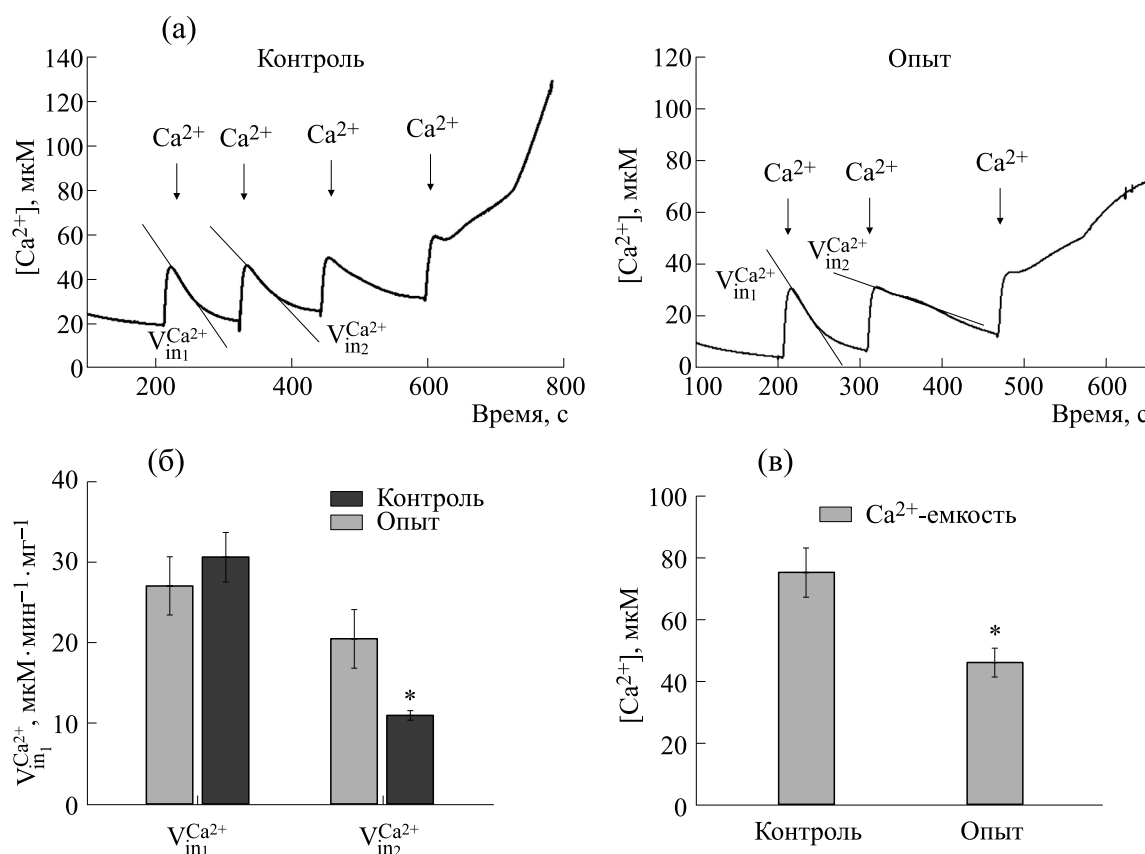


Рис. 4. Изменение транспорта Ca^{2+} и Ca^{2+} -емкости в митохондриях сердца контрольных и диабетических мышей. (а) — Изменение транспорта Ca^{2+} в МСМ контрольных и диабетических мышей; (б) — количественное изменение скоростей входа Ca^{2+} после его первой и второй добавки; (в) — количественное изменение Ca^{2+} -емкости в митохондриях сердца контрольных и диабетических мышей. Данные восьми независимых экспериментов представлены как среднее \pm стандартное отклонение. * — Достоверная разница в по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

плотности белковых полос исследуемых белков к оптической плотности GAPDH. Как видно из рисунка, наблюдалось снижение OPA1 и Mfn2 приблизительно на 80 и 30% соответственно, тогда как содержание DRP1 увеличивалось на 50% в гомогенате диабетических мышей по сравнению с контрольными. Содержание PINK1 в гомогенате диабетических мышей снижалось на 40%, а Parkin — на 50% по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальная дисфункция и окислительный стресс тесно связаны с сердечно-сосудистыми, нейродегенеративными и возрастными расстройствами. Сердечно-сосудистые заболевания часто встречаются у пациентов с диабетом и исследования показали, что риск сердечной недостаточности увеличивается у пациентов с диабетом. Хотя фактическая основа повышенного риска сердечной недостаточности является многофакторной, все больше данных свидетельствуют о том, что дисбаланс в функционировании ми-

тохондрий и связанный с ним окислительный стресс играют важную роль в этом процессе [12]. В настоящем исследовании было изучено функциональное состояние митохондрий сердца инбредных мышей линии C57BL/Ks-db+/+m с рецессивным геном *diabetes-db*.

Известно, что цитоплазматическая вакуолизация представляет собой морфологическое изменение, наблюдаемое в клетках млекопитающих после воздействия различного вида возбудителей или искусственных низкомолекулярных соединений, которое как правило сопровождается гибелью клеток [13]. Ранее было показано, что на срезах тканей сердца крыс с сахарным диабетом, индуцированным стрептозотоцином (40 мг/кг) наблюдалось увеличение интенсивности окраски эозином в некоторых клетках [14]. Считается, что ухудшение функционального состояния митохондрий, приводящее к митохондриальной дисфункции может стимулировать цитоплазматическую вакуолизацию в клетке, что в конечном счете может привести к набуханию и слиянию эндоплазматического ретикула и/или мито-

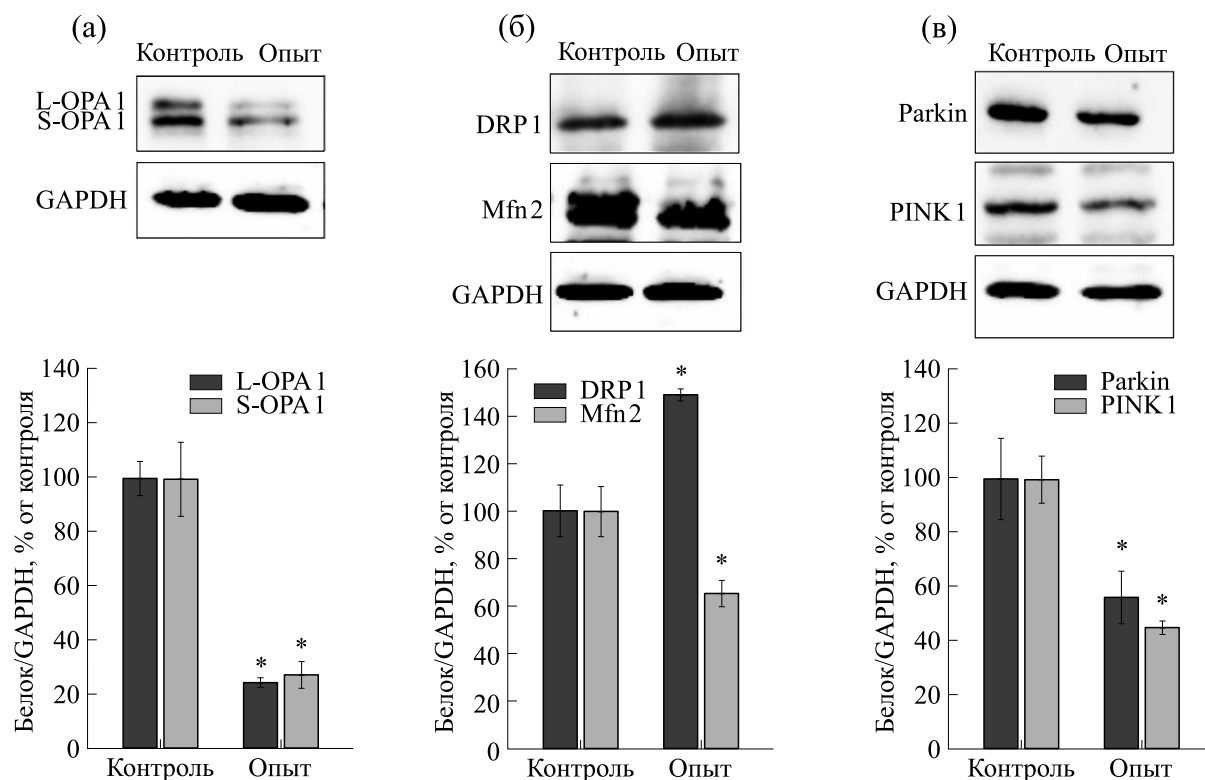


Рис. 5. Изменение содержания OPA1, Mfn2, DRP1, PINK1 и Parkin в гомогенатах ткани сердца контрольных и диабетических мышей. GAPDH использовали как контроль белковой нагрузки. (а) Иммуноокрашивание антителами к OPA1, снизу: количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии; (б) иммуноокрашивание антителами к DRP1 и Mfn2, снизу: количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии; (в) сверху: иммуноокрашивание антителами к PINK1 и Parkin, снизу: количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии. Данные четырех независимых экспериментов представлены как среднее \pm стандартное отклонение. * — Достоверная разница в уровне белка по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

хондрий [15]. В наших экспериментальных условиях, в срезах ткани сердца левого желудочка у инбредных мышей с рецессивным геном *diabetes-db* было замечено увеличение интенсивности окраски эозином цитоплазматических белков, что подразумевает повреждение их структуры, тогда как в образцах контрольных мышей такого эффекта не наблюдалось. Вероятно, повреждения ткани сердца происходили по большей части на клеточном уровне, который не выявлялся при гистологическом анализе. Кроме того, наблюдалось снижение содержания белков, таких как АЛТ, АСТ, ЛДГ, тропонина I и миоглобина в тканевых лизатах диабетических мышей, что говорит о повреждении ткани сердца в наших экспериментальных условиях.

Исследования некоторых лабораторий показали, что дыхательная функция и синтез АТФ подавляются в митохондриях, изолированных из диабетических животных. Было обнаружено, что соотношение АДФ/О и скорость АДФ-стимулированного дыхания снижались в митохондриях животных с разными моделями диабета [16, 17].

Согласно результатам, представленным в настоящем исследовании, скорости субстрат-зависимого дыхания, АДФ-стимулированное дыхание и скорость дыхания в состоянии после истощения избытка АДФ у диабетических мышей снижались по сравнению с таковыми параметрами в митохондриях контрольных мышей. Более того, дыхательный контроль митохондрий диабетических мышей был ниже, чем у контрольных. Все это предполагает ухудшение функционального состояния митохондрий у диабетических мышей.

Многочисленные исследования показали, что митохондрии сердца диабетических крыс более чувствительны к индукции мРТР, чем митохондрии контрольных животных [5, 18, 19]. Мы наблюдали, что Ca^{2+} -емкость в митохондриях диабетических мышей снижалась, по сравнению с контрольными. Митохондрии мышей с геном *diabetes-db* были более чувствительны к Ca^{2+} . Это может быть связано с развитием окислительного стресса, что, в свою очередь, может быть основной причиной развития кардиомиопатии при сахарном диабете [5].

Появляется все больше доказательств того, что изменение передачи сигналов инсулина в клетках может способствовать изменению содержания белков, ответственных за слияние митохондрий, и структуры митохондриальной сети. Было показано, что экспрессия Mfn2 и OPA1 были значительно снижена во многих тканях у животных с диабетом [20–22], тогда как деление митохондрий наоборот усиливалось, при этом наблюдалась повышенная экспрессия DRP1 и FIS1 [23–25]. Действительно, мы обнаружили, что в гомогенате, полученном из диабетических мышей содержание Mfn2 и OPA1 снижалось по сравнению с контрольными образцами, тогда как уровень DRP1 повышался в этих условиях. Функциональный статус митофагии и специфические механизмы ее регуляции в диабетическом сердце до конца не изучены. Однако известно, что содержание белков PINK1 и Parkin снижается во многих тканях животных с диабетом, включая сердце [26, 27]. Это позволяет предположить, что митофагия ингибируется в сердце с диабетом. В настоящем исследовании мы наблюдали снижение маркеров митофагии у мышей, несущих рецессивный ген *diabetes-db*, по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы изучили функциональное состояние митохондрий сердца у инбредных мышей линии C57BL/Ks-db+/+m, несущих рецессивный ген *diabetes-db*. Мы показали, что в условиях диабета наблюдались изменения ткани сердца, проявляющиеся в увеличение интенсивности окраски эозином в некоторых клетках. Наблюдалось снижение содержания ряда белков (АЛТ, АСТ, ЛДГ, тропонина I и миоглобина) в тканевых лизатах сердца диабетических мышей, что предполагает повреждение сердечной мышцы при диабете. В митохондриях, изолированных из диабетических мышей снижались дыхательные активности, вследствие чего снижался и дыхательный контроль. Скорость входа Ca^{2+} в митохондрии после второй добавки Ca^{2+} у диабетических мышей замедлялась, а сами митохондрии были более чувствительны к Ca^{2+} , что приводило к снижению Ca^{2+} -емкости. У диабетических мышей слияние митохондрий замедлялось, тогда как деление усиливалось, при этом наблюдалось снижение митофагии. Исходя из вышеизложенного, мы предполагаем, что, поскольку снижается содержание маркеров митофагии, поврежденные митохондрии не удаляются, а накапливаются в митохондриальной сети, вследствие этого функциональное состояние митохондрий ухудшается, что приводит к снижению дыхательного контроля и устойчивости митохондрий к Ca^{2+} . При этом развивается митохондри-

альная дисфункция, которая, как полагают, является одной из основных причин развития связанных с диабетом сердечно-сосудистых заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00224-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755). Протокол исследований был утвержден Комиссией по биологической безопасности и этике при ИТЭБ РАН (протокол № 4/2024 от 18 марта 2024 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И. И., Шестакова М. В., Викулова О. К., Железнякова А. В., Исаков М. А., Сазонова Д. В. и Мокрышева Н. Г. Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010 – 2022 гг. *Сахарный диабет*, **26** (2), 104–123 (2023). DOI: 10.14341/DM13035
2. Huss J. M. and Kelly D. P. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J. Clin. Invest.*, **115** (3), 547–555 (2005). DOI: 10.1172/JCI24405
3. Schilling J. D. The mitochondria in diabetic heart failure: from pathogenesis to therapeutic promise. *Antioxid. Redox Signal.*, **22** (17), 1515–1526 (2015). DOI: 10.1089/ars.2015.6294
4. Halestrap A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **46** (6), 821–831 (2009). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021
5. Riojas-Hernandez A., Bernal-Ramirez J., Rodriguez-Mier D., Morales-Marroquin F. E., Dominguez-Barragan E. M., Borja-Villa C., Rivera-Alvarez I., and Garcia-Rivas G., Altamirano J., Garcia N. Enhanced oxidative stress sensitizes the mitochondrial permeability transition pore to opening in heart from Zucker Fa/fa rats with type 2 diabetes. *Life Sci.*, **141**, 32–43 (2015). DOI: 10.1016/j.lfs.2015.09.018
6. Loson O. C., Song Z., Chen H., and Chan D. C. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in

- mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell*, **24** (5), 659–667 (2013). DOI: 10.1091/mbc.E12-10-0721
7. Yu T., Jhun B. S., and Yoon Y. High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxid. Redox Signal.*, **14** (3), 425–437 (2011). DOI: 10.1089/ars.2010.3284
 8. Yu T., Sheu S. S., Robotham J. L., and Yoon Y. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res.*, **79** (2), 341–351 (2008). DOI: 10.1093/cvr/cvn104
 9. Yang X., Pan W., Xu G., and Chen L. Mitophagy: A crucial modulator in the pathogenesis of chronic diseases. *Clin. Chim. Acta*, **502**, 245–254 (2020). DOI: 10.1016/j.cca.2019.11.008
 10. Крестинин Р. Р., Бабурина Ю. Л., Одиноква И. В., Сотникова Л. Д. и Крестинина О. В. Действие атаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга крыс при сердечной недостаточности. *Биофизика*, **67** (5), 917–925 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050088
 11. Baburina Y., Krestinin R., Odinkova I., Fadeeva I., Sotnikova L., and Krestinina O. The identification of prohibitin in the rat heart mitochondria in heart failure. *Biomedicines*, **9** (12), 1793 (2021). DOI: 10.3390/biomedicines9121793
 12. Verma S. K., Garikipati V. N. S., and Kishore R. Mitochondrial dysfunction and its impact on diabetic heart. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.*, **1863** (5), 1098–1105 (2017). DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.08.021
 13. Shubin A. V., Demidyuk I. V., Komissarov A. A., Rafieva L. M., Kostrov S. V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, **7** (34), 55863–55889 (2016). DOI: 10.18632/oncotarget.10150
 14. Karabulut D., Akin A., Kaymak E., Öztürk E., and Sayan M. Histological examination of rat heart tissue with chronic diabetes. *Exp. Appl. Med. Sci.*, **1** (1), 17–22 (2020). DOI.org/10.46871/eams.2020.2
 15. Schoeman R., Beukes N., and Frost C. Cannabinoid combination induces cytoplasmic vacuolation in MCF-7 breast cancer cells. *Molecules*, **25** (20), 4682 (2020). DOI: 10.3390/molecules25204682
 16. Bombicino S. S., Iglesias D. E., Mikusic I. A. R., D'Annunzio V., Gelpi R. J., Boveris A., and Valdez L. B. Diabetes impairs heart mitochondrial function without changes in resting cardiac performance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **81** (Pt B), 335–345 (2016). DOI: 10.1016/j.biocel.2016.09.018
 17. Koentges C., König A., Pfeil K., Holscher M. E., Schnick T., Wende A. R., Schrepper A., Cimolai M. C., Kersting S., Hoffmann M. M., Asal J., Osterholt M., Odening K. E., Doenst T., Hein L., Abel E. D., Bode C., and Bugger H. Myocardial mitochondrial dysfunction in mice lacking adiponectin receptor 1. *Basic Res. Cardiol.*, **110** (4), 37 (2015). DOI: 10.1007/s00395-015-0495-4
 18. Itoh T., Kouzu H., Miki T., Tanno M., Kuno A., Sato T., Sunaga D., Murase H., and Miura T. Cytoprotective regulation of the mitochondrial permeability transition pore is impaired in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **53** (6), 870–879 (2012). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.10.001
 19. Oliveira P. J., Seica R., Coxito P. M., Rolo A. P., Palmeira C. M., Santos M. S., and Moreno A. J. Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats. *FEBS Lett.*, **554** (3), 511–514 (2003). DOI: 10.1016/s0014-5793(03)01233-x
 20. Hu L., Ding M., Tang D., Gao E., Li C., Wang K., Qi B., Qiu J., Zhao H., Chang P., Fu F., and Li Y. Targeting mitochondrial dynamics by regulating Mfn2 for therapeutic intervention in diabetic cardiomyopathy. *Theranostics*, **9** (13), 3687–3706 (2019). DOI: 10.7150/thno.33684
 21. Peyravi A., Yazdanpanahi N., Nayeri H., and Hosseini S. A. The effect of endurance training with crocin consumption on the levels of MFN2 and DRP1 gene expression and glucose and insulin indices in the muscle tissue of diabetic rats. *J. Food Biochem.*, **44** (2), e13125 (2020). DOI: 10.1111/jfbc.13125
 22. Jezek P. and Dlaskova A. Dynamic of mitochondrial network, cristae, and mitochondrial nucleoids in pancreatic β -cells *Mitochondrion*, **49**, 245–258 (2019). DOI: 10.1016/j.mito.2019.06.007
 23. Yu J., Maimaitili Y., Xie P., Wu J. J., Wang J., Yang Y. N., Ma H. P., and Zheng H., High glucose concentration abrogates sevoflurane post-conditioning cardioprotection by advancing mitochondrial fission but dynamin-related protein 1 inhibitor restores these effects. *Acta Physiol. (Oxford)*, **220** (1), 83–98 (2017). DOI: 10.1111/apha.12812
 24. Liu R., Jin P., Yu L., Wang Y., Han L., Shi T., and Li X. Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS One*, **9** (3), e92810 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0092810
 25. Liu P., Lin H., Xu Y., Zhou F., Wang J., Liu J., Zhu X., Guo X., Tang Y., and Yao P. Frataxin-mediated PINK1-Parkin-dependent mitophagy in hepatic steatosis: The protective effects of quercetin. *Mol. Nutr. Food Res.*, **62** (16), e1800164 (2018). DOI: 10.1002/mnfr.201800164
 26. Tang Y., Liu J., and Long J. Phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1 and Parkin in diabetic heart: Role of mitophagy. *J. Diabetes Investig.*, **6** (3), 250–255 (2015). DOI: 10.1111/jdi.12302
 27. Xu X., Kobayashi S., Chen K., Timm D., Volden P., Huang Y., Gulick J., Yue Z., Robbins J., Epstein P. N., and Liang Q. Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes. *J. Biol. Chem.*, **288** (25), 18077–18092 (2013). DOI: 10.1074/jbc.M113.474650

Investigation of the Functional State of Heart Mitochondria in Inbred Mice with Type 2 Diabetes Mellitus

Y.L. Baburina*, I.V. Odinokova*, R.R. Krestinin*, A.I. Zvyagina*,
L.D. Sotnikova*, and O.V. Krestinina*

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

Diabetes mellitus is considered one of the most common metabolic diseases in the developed world and is associated either with impaired insulin secretion or with cell resistance to the action of this hormone (type 1 and 2 diabetes, respectively). In both cases, the common pathological change is an increase in blood glucose levels – hyperglycemia, which can ultimately cause serious damage to organs and tissues of the body. Mitochondria are believed to be one of the main targets of diabetes at the intracellular level. The present study addressed the functional state of mitochondria in the C57BL/Ks–db+/+m inbred mice carrying the recessive *diabetes-db* gene (diabetic mice). Histological analyses of the left ventricle of the hearts from diabetic and control mice were performed. In cardiac tissue samples from diabetic mice, an increase in the intensity of the eosin stain was observed implying that the structure of cytoplasmic proteins was distorted. In addition, it was shown that respiratory control and Ca^{2+} capacity in the mitochondria of diabetic mice decreased compared to controls. Changes in mitochondrial dynamics and mitophagy under these conditions were analyzed.

Keywords: diabetes mellitus, mitochondrial dysfunction, mouse heart mitochondria, Ca^{2+} capacity

ПРИМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ С ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ В ХВОСТОВЫХ ГРУППАХ ПОЗВОЛЯЕТ ПРЕДОТВРАТИТЬ СНИЖЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЛОДОВОЙ МУШКИ *Drosophila melanogaster* В РАННИЙ ПЕРИОД РЕАДАПТАЦИИ ПОСЛЕ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

© 2024 г. И.В. Огнева^{*,#}, К.К. Гогичаева^{*}, Ю.С. Жданкина^{*}, О.В. Котов^{*}

^{*}Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Хорошевское шоссе, 76а, Москва, 123007, Россия

[#]E-mail: iogneva@yandex.ru, iogneva@imbp.ru

Поступила в редакцию 01.07.2024 г.

После доработки 07.07.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

Целью работы была попытка предотвратить возникающее в ранний период реадaptации после космического полета снижение подвижности сперматозоидов плодовой мушки *Drosophila melanogaster* путем добавления в питательную среду фосфолипидов с полиненасыщенными жирными кислотами в хвостовых группах (эссенциальные фосфолипиды). Исследование проводили в рамках космических полетов на борту российского сегмента МКС в период 15 сентября 2023 – 27 сентября 2023 (экспедиция МКС-69) и 23 марта 2024 – 06 апреля 2024 (экспедиция МКС-70). Определяли содержание цитоскелетных белков в семенниках методом вестерн-блоттинга и подвижность сперматозоидов путем записи видео и последующего анализа. Результаты показали, что модификация питательной среды путем добавления эссенциальных фосфолипидов приводит к снижению содержания холестерина и увеличению содержания актина. Это предотвращает снижение содержания тубулина и уменьшение скорости движения сперматозоидов плодовой мушки в ранний период реадaptации (вплоть до 16 ч) после космического полета. Полученные данные, с одной стороны, демонстрируют возможный механизм запуска механотрансдукции, а с другой – позволяют предложить эссенциальные фосфолипиды как одно из средств защиты от негативных изменений, связанных с изменением поля силы тяжести, действующего на клетку.

Ключевые слова: механочувствительность клетки, невесомость, цитоскелет, подвижность сперматозоидов, *Drosophila melanogaster*.

DOI: 10.31857/S0006302924060079, EDN: NLPTEL

Освоение дальнего космоса, в частности, других тел Солнечной системы, вероятнее всего, приведет к увеличению продолжительности космических полетов и, в связи с этим, разработке принципиально новых средств поддержания здоровья и работоспособности человека в этих условиях. Развитие негативных изменений в различных органах и тканях начинается на клеточном уровне, однако механизм взаимодействия клетки и гравитационного поля до сих пор остается одним из нерешенных в современной биофизике. Более того, эволюционный аспект этой проблемы требует исследования не только сформировавшихся организмов, но и зародышей, в первую

очередь, ранних эмбрионов и половых клеток, которые у большинства видов функционируют как одиночные.

Изменение структуры цитоскелета различных типов клеток, вне зависимости от степени дифференцировки, в условиях реальной или симулируемой невесомости, также, как и в условиях гипергравитации является хорошо документированным фактом [1]. Нарушение структуры микротрубочек, промежуточных филаментов и микрофиламентов отмечают во многих исследованиях [2–10]. Однако подобные изменения в мужских половых клетках – сперматозоидах, могут привести к снижению эффективности поддержания популяции.

Сперматозоиды различных видов животных достаточно сильно отличаются друг от друга, од-

Сокращение: МКС – Международная космическая станция.

нако, сравнивая мужские половые клетки стандартных объектов экспериментальной биологии, мышей и мух, следует отметить, что основные структурно-функциональные параметры у них достаточно схожи (например, строение сперматозоида, строение аксонемы, высокая гомология структурных белков аксонемы).

Для мышей показано, что условия космического полета, также, как и симулированная невесомость, снижают число зрелых сперматозоидов [11–13], уменьшается скорость движения и доля подвижных сперматозоидов, отмечаются изменения в содержании белков цитоскелета и мРНК соответствующих генов [14, 15].

Для мух в условиях симулированной невесомости было показано, что в отличие от мышей, скорость движения сперматозоидов в коротких экспериментах возрастает, но различие, вероятно, обусловлено разной регуляцией фосфорилирования /дефосфорилирования моторных белков, а не механизмом запуска изменений [16].

Однако космический полет имеет целый ряд факторов, сочетанное действие которых может отличаться от действия только невесомости. При полете на низких орбитах, как у Международной космической станции (МКС), вклад ионизирующего излучения не столь велик. Основное действие в этом случае оказывают невесомость и перегрузки на пуске и посадке, а также период адаптации к силе тяжести Земли.

Одним из наиболее удобных объектов для изучения влияния силы тяжести на гаметогенез и развитие многоклеточного организма, причем нескольких последовательных поколений, является плодовая мушка *Drosophila melanogaster* ввиду неприхотливости в содержании, что позволяет реализовать такого рода исследования в условиях реальной невесомости. Поэтому целый ряд экспериментов в условиях космического полета был проведен на разных линиях *Drosophila melanogaster* [17–19].

В предыдущих сеансах эксперимента «Цитомеханариум», который проводят на борту Российского сегмента МКС в ходе экспедиций МКС-65 и МКС-66 мы получили данные о подвижности сперматозоидов плодовой мушки *Drosophila melanogaster* после 12-суточного космического полета [20]. Исследование двигательной активности осуществляли в условиях лаборатории через 16 ч после посадки и увидели, что скорость в полетной группе достоверно ($p < 0.05$) ниже контрольного уровня на 20%, что, исходя из данных симуляционного эксперимента с воспроизведением всех факторов космического полета (кроме ионизирующего излучения), связано с действием посадочных перегрузок и 16-часового пребывания в условиях силы тяжести Земли [20].

Мы предполагаем, что рецепция изменения поля силы тяжести, действующего на клетку, связана с деформацией кортикального цитоскелета, поэтому увеличение числа филаментов актина в нем способно снизить или даже предотвратить запуск механотрансдукции [1, 21]. Большинство препаратов, которые приводят к подобному результату, например, каликулин А, невозможно использовать *in vivo*. В ряде случаев к аналогичному эффекту, то есть к сдвигу соотношения F/G-актин в подмембранном цитоскелете в сторону F-актина, приводит экстракция из мембран холестерина [22, 23]. Поэтому мы предположили, что модификация липидного состава клеточных мембран путем введения в состав питательной среды насыщающего количества фосфолипидов с полиненасыщенными жирными кислотами в хвостовых группах (эссенциальные фосфолипиды) может снизить содержание холестерина в клеточных мембранах, привести к формированию более устойчивого к деформации кортикального цитоскелета и помочь предотвратить изменения подвижности сперматозоидов плодовой мушки, которые мы наблюдали в предыдущих сеансах космического эксперимента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Организация эксперимента. В эксперименте использовали два типа плодовой мушки *Drosophila melanogaster* линии Canton S, один из которых культивировали на стандартной для разведения дрозофилы среде следующего состава: вода — 1000 мл, агар-агар — 7 г, сахарный песок — 40 г, манная крупа — 40 г, пекарские дрожжи — 25 г, пропионовая кислота — 10 мл. Второй тип культивировали на среде модифицированного состава, в которую кроме стандартных компонентов добавляли эссенциальные фосфолипиды в виде препарата EssentialeR Forte N (A.NATTERMANN and Cie. GmbH, Германия) в дозировке 500 мг/кг среды, причем введение эссенциальных фосфолипидов начинали не менее чем за 3 поколения перед экспериментом таким образом, чтобы все стадии развития половых клеток проходили на модифицированной питательной среде.

До начала основного эксперимента (космического полета) провели исследование эффективности применения эссенциальных фосфолипидов — в группе мух, которых культивировали на стандартной немодифицированной среде (группа С) и в группе мух, которых культивировали на среде с добавлением эссенциальных фосфолипидов (группа СЕ) выделяли семенники и немедленно начинали окрашивание для определения содержания холестерина (методику см. ниже).

Циклограмму проводимого эксперимента составляли соответственно циклограмме предыдущего исследования, в котором обнаружили сни-

жение подвижности сперматозоидов в ранний период реадaptации [20]. За 11 суток до начала космического полета пятьдесят пар виргинных имаго плодовой мушки *Drosophila melanogaster* линии Canton S возрастом 2 суток помещали в пробирки типа Falcon объемом 50 мл с воздухопроницаемой крышкой и средой соответствующего состава. В течение 1 суток мухи откладывали яйца, затем их удаляли из пробирок, оставляя только яйца. Далее эти пробирки экспонировали либо в условиях космического полета, либо в синхронном контроле на Земле. Вылет мух был на второй день пребывания в условиях космического полета или наземного контроля.

Космический эксперимент «Цитомеханариум» был проведен два раза с четырьмя биологическими репликами каждый (для каждого определяемого параметра были получены результаты как минимум трех биологических реплик) в рамках космических полетов на борту Российского сегмента МКС в период 15 сентября 2023 г. – 27 сентября 2023 г. (экспедиция МКС-69) и 23 марта 2024 г. – 06 апреля 2024 г. (экспедиция МКС-70).

В реальном космическом полете и соответствующем синхронном контроле у части самцов семенники извлекали на месте посадки и немедленно замораживали для последующего определения содержания белков. Ввиду невозможности проведения прижизненных исследований на месте посадки не проводили определение параметров двигательной активности. У оставшихся самцов семенники извлекали в лаборатории (через 16 и 24 ч после посадки): часть из них замораживали для последующего выделения белка, оставшиеся использовали для определения параметров двигательной активности.

Были сформированы 12 групп исследования, из которых 6 групп культивировали на стандартной среде:

- S и F – группы синхронного контроля и полета, соответственно, семенники в которых замораживали на месте посадки, подвижность сперматозоидов не определяли;

- S+16h и F+16h – группы синхронного контроля и полета, семенники которых извлекали через 16 ч после посадки спускаемого аппарата, проводили измерения подвижности и замораживали для последующего определения содержания белков;

- S+24h и F+24h – как и выше, но все манипуляции проводили через 24 ч после посадки космического корабля.

Аналогично, были сформированы такие же 6 групп исследования, плодную мушку которых культивировали на среде с добавлением эссенциальных фосфолипидов (E): SE и FE, SE+16h и FE+16h, SE+24h и FE+24h.

Все группы имели одинаковый температурный режим, который соблюдали по графику температуры группы космического полета.

Определение относительного содержания холестерина в семенниках. Семенники плодовой мушки *Drosophila melanogaster* выделяли в физиологическом растворе для насекомых (0.65% хлорида натрия). Затем переносили в 4%-й забуференный параформальдегид, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, промывали фосфатно-солевым буфером и далее окрашивали Filipin III в концентрации 100 мкг/мл (SC-205323A; Santa Cruz Biotechnology, США) в течение 1.5 ч. Далее снова промывали фосфатно-солевым буфером и переносили в среду Fluoroshield (#F6057, Sigma, США). Флуоресценцию наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа IX73 (Olympus Corp., Япония), изображения обрабатывали в программном пакете Fiji (открытый доступ <https://imagej.net>).

Определение относительного содержания белков. Для одной биологической реплики использовали семенники двадцати мух каждой группы исследования. Для каждой группы исследования были получены результаты как минимум трех биологических реплик. Семенники выделяли, немедленно замораживали и хранили при температуре –60°C вплоть до выделения белков.

Для выделения белка замороженные пробы гомогенизировали в буфере Лэммли с добавлением смеси ингибиторов протеаз (Calbiochem, США). Измеряли концентрацию общего белка в полученных пробах и наносили одинаковое количество в каждую лунку полиакриламидного геля, в котором проводили электрофорез в денатурирующих условиях (Bio-Rad Laboratories, США) с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану, эффективность которого контролировали окраской Понсо. После переноса мембраны блокировали в 4%-м молоке (Skim milk powder #70166-500G, Sigma-Aldrich, Германия) и окрашивали с использованием первичных антител к актину (1 : 5000, #ab227387, Abcam, Великобритания), к альфа-тубулину (1 : 10000, #ab52866, Abcam, Великобритания), ацетилированному альфа-тубулину (1 : 500, #sc-23950, Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), динеину (5 мкг/мл, eBioscienceTM #14-9772-80, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США) и соответствующих им HRP-конъюгированных вторичных антител (anti-rabbit #7074S, anti-mouse #7076S, все – от Cell Signaling Technology, США). Далее мембраны обрабатывали субстратами (SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, США), детектировали с помощью ChemiDoc XRS+ imaging system (Bio-Rad Laboratories, США) и анализировали, используя Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories, США).

Определение параметров двигательной активности сперматозоидов. Скорость движения сперматозоидов плодовой мушки измеряли в соответствии с методикой, подробно описанной нами ранее [16, 20].

Вкратце: семенники мух каждой группы исследования выделяли, разрезали в физиологическом растворе для насекомых (0.65% хлорида натрия) с целью высвобождения сперматозоидов и переносили в камеру Маклера (Sefi Medical Instruments Ltd., Израиль), которую размещали под фазово-контрастным объективом микроскопа Eclipse E200 MV (Nikon, Япония) с общим увеличением 200×. Записывали видео движения сперматозоидов с частотой 60 кадров в секунду с разрешением 2 мегапикселя (цветная камера Basler puA1600-60uc с сенсором e2V EV76C570 CMOS, Basler AG, Германия). Для анализа видеоизображений использовали программный пакет Fiji с плагином Manual Tracking (открытый доступ <https://imagej.net/software/fiji/>). Определяли скорость движения (в мкм/с) как расстояние, пройденное концом хвоста за секунду.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Относительное содержание холестерина. Для определения влияния эссенциальных фосфолипидов на содержание холестерина в семенниках плодовой мушки *Drosophila melanogaster* проводили окрашивание красителем Filipin III.

Полученные результаты (рис. 1) свидетельствуют о том, что у мух, предыдущие три поколения которых культивировали на среде, содержащей эссенциальные фосфолипиды (группа СЕ), относительное содержание холестерина в семенниках снижено на 35% ($p < 0.05$) по сравнению с группой, культивирование которой проходило на стандартной немодифицированной среде (группа С).

Относительное содержание цитоскелетных белков. Относительное содержание актина (Рис. 2, А) в группе F не отличалось от уровня контроля (группа S). Через 16 ч реадaptации к силе тяжести оно было ниже соответствующего контроля на 43% ($p < 0.05$), но через 24 ч возрастало, хотя уровень контроля не достигало и оставалось ниже на 22% ($p < 0.05$). В семенниках мух, которые получали эссенциальные фосфолипиды в питательной среде, относительное содержание актина в контрольной группе SE было на 42% выше ($p < 0.05$), чем в группе S. Столь же высоким оно оставалось после космического полета и в течение всего периода реадaptации.

Относительное содержание динеина (рис. 2б) не менялось ни в одной из групп исследования, включая группы, которые культивировали на мо-

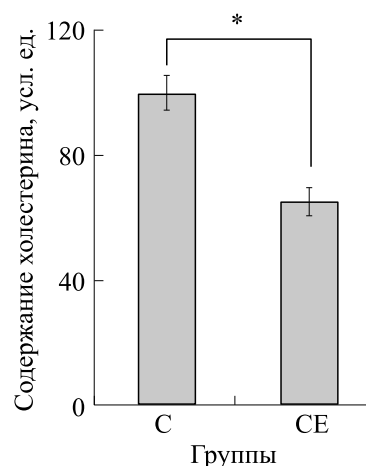


Рис. 1. Содержание холестерина в семенниках плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Группа С — семенники мух, которых культивировали на стандартной среде; группа СЕ — семенники мух, которых культивировали на среде с добавлением эссенциальных фосфолипидов; * — $p < 0.05$ по сравнению с группой С.

дифицированной среде с добавлением эссенциальных фосфолипидов.

Относительное содержание альфа-тубулина (рис. 2в) и ацетилированного альфа-тубулина (рис. 2г) в группе F возрастало в условиях космического полета на 50% и 25% ($p < 0.05$), соответственно. Через 16 ч реадaptации, в группе F+16h, содержание альфа-тубулина и его ацетилированной формы было ниже соответствующего контроля на 37% и 29% ($p < 0.05$), соответственно, но через 24 ч восстановления от уровня контроля эти параметры не отличались. При этом в группах, получавших эссенциальные фосфолипиды, ни в контрольной группе SE по сравнению с группой S, ни в группах полета (FE) и восстановления (FE+16h и FE+24h) изменений не было.

Подвижность сперматозоидов. Ввиду технической невозможности организации условий для осуществления методики на месте посадки космического корабля определение двигательной активности сперматозоидов проводили через 16 и 24 ч пребывания в условиях силы тяжести Земли, то есть в период реадaptации.

Следует отметить, что скорость движения сперматозоидов мух групп синхронного контроля S+16h и S+24h не отличалась (рис. 3). Более того, в контрольных группах мух, которые получали эссенциальные фосфолипиды, SE+16h и SE+24h, скорость была такой же как в группах S+16h и S+24h.

В полетной группе F+16h скорость движения конца хвоста сперматозоида снижена на 33% ($p < 0.05$) по сравнению с соответствующей группой синхронного контроля S+16h, но через 24 ч ре-

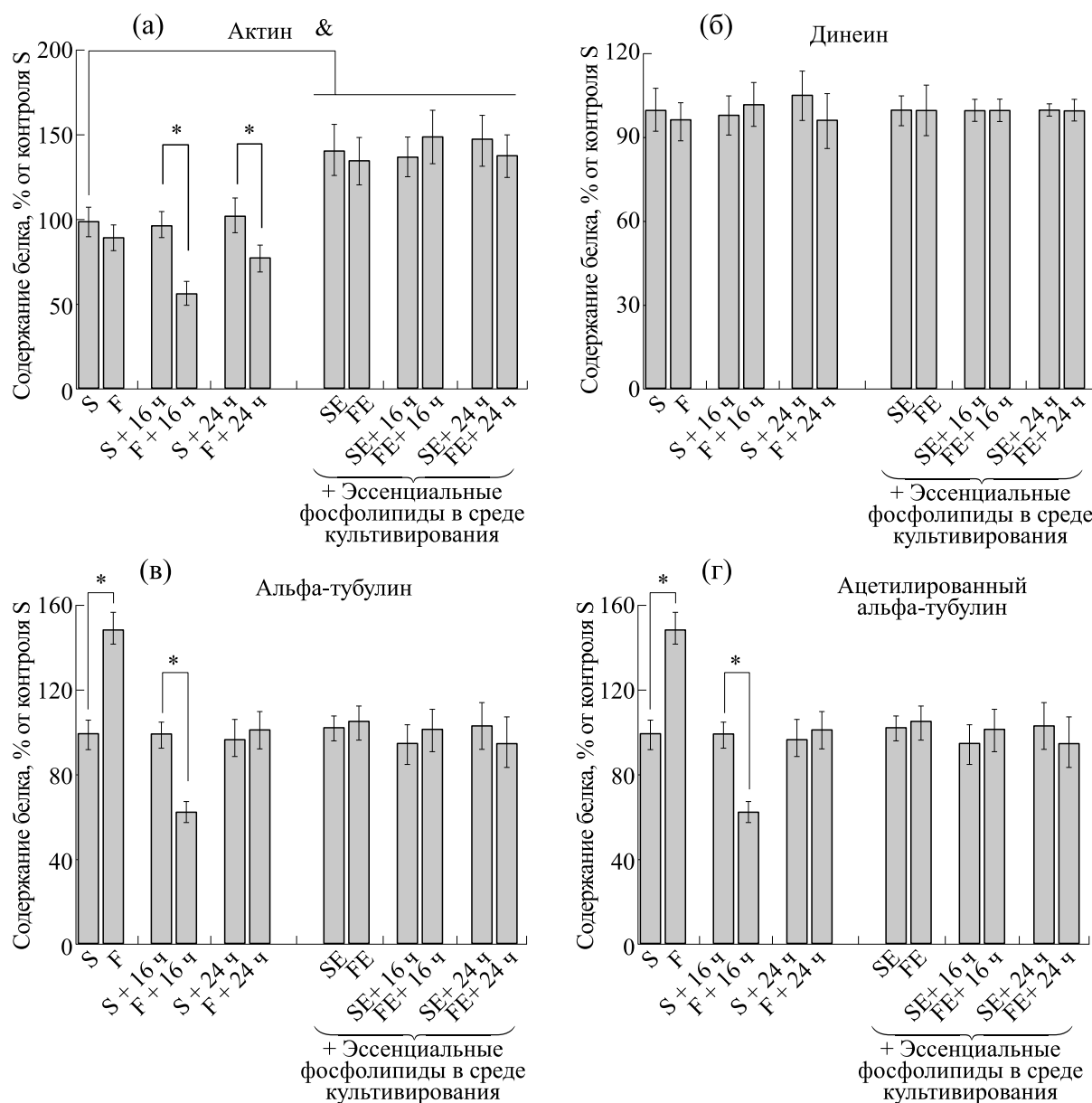


Рис. 2. Относительное содержание цитоскелетных белков в семенниках плодовой мушки *Drosophila melanogaster* после космического полета: (а) — относительное содержание актина, (б) — динеина, (в) — альфа-тубулина, (г) — ацетилированного альфа-тубулина; & — $p < 0.05$ по сравнению с группой S, * — $p < 0.05$ по сравнению с соответствующей группой синхронного контроля.

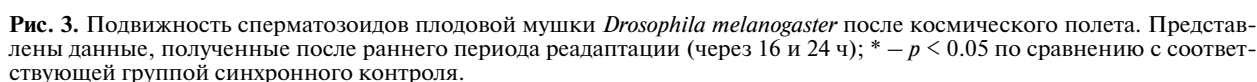
адаптации достоверных отличий не было (группа F+24h vs. группа S+24h). Однако, в полетных группах мух, которые получали эссенциальные фосфолипиды отличий скорости движения сперматозоидов от уровня синхронного контроля не было ни через 16 ч реадаптации (FE+16h vs. SE+16h), ни через 24 ч (FE+24h vs. SE+24h).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование было предпринято с целью проверки возможности использования эс-

сенциальных фосфолипидов как протекторного средства, позволяющего сохранить подвижность сперматозоидов плодовой мушки *Drosophila melanogaster* в ранний период адаптации к силе тяжести Земли после космического полета.

Для проверки эффективности введения в составе питательной среды и используемой концентрации эссенциальных фосфолипидов в среде культивирования до начала применения в условиях космического полета провели окрашивание семенников мух Filipin III, что позволило определить относительное содержание холестерина. Ре-



Поскольку мы предполагаем, что изменение действующей на клетку силы тяжести приводит к ее деформации [1, 21], то конденсация кортикального актина может увеличить устойчивость к изменению внешнего механического напряжения [21] и, соответственно, защитить от его негативного воздействия. Полученные данные показывают, что содержание актина в семенниках плодовой мушки, полетной группы, которую содержали на стандартной среде, снижается через 16 ч после космического полета, и хотя через 24 ч возрастает, но уровня контроля, тем не менее, не достигает (рис. 2а). При этом на фоне получения эссенциальных фосфолипидов изменения содержания актина в семенниках полетной группы, по сравнению с соответствующими группами синхронного контроля не было (рис. 2а), что свиде-

Таким образом, в данном эксперименте нам удалось показать эффективность применения эссенциальных фосфолипидов для поддержания цитоскелетного профиля в семенниках и скорости движения сперматозоидов плодовой мушки *Drosophila melanogaster* в космическом полете и в ранний период реадаптации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН FMFR-2024-0041 и финансированием Госкорпорации «Роскосмос».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры были одобрены комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 521 от 25 сентября 2019 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ogneva I. V. Single cell in a gravity field. *Life (Basel)*, **12** (10), 1601 (2022). DOI: 10.3390/life12101601
- Schatten H., Lewis M. L., and Chakrabarti A. Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells. *Acta Astronaut.*, **49** (3–10), 399–418 (2001). DOI: 10.1016/s0094-5765(01)00116-3
- Uva B. M., Masini M. A., Sturla M., Prato P., Passalacqua M., Giuliani M., Tagliaferro G., and Strollo F. Clinorotation-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture. *Brain Res.*, **934** (2), 132–139 (2002). DOI: 10.1016/s0006-8993(02)02415-0
- Gaboyard S., Blanchard M. P., Travo C., Viso M., Sans A., and Lehouelleur J. Weightlessness affects cytoskeleton of rat utricular hair cells during maturation *in vitro*. *Neuroreport*, **13** (16), 2139–2142 (2002). DOI: 10.1097/00001756-200211150-00030
- Kacena M. A., Todd P. and Landis W. J. Osteoblasts subjected to spaceflight and simulated space shuttle launch conditions. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **39** (10), 454–459 (2003). DOI: 10.1290/1543-706X(2003)039<0454:OSTSAS>2.0.CO;2
- Crawford-Young S. J. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, **50** (2–3), 183–191 (2006). DOI: 10.1387/ijdb.052077sc
- Corydon T. J., Kopp S., Wehland M., Braun M., Schutte A., Mayer T., Halsing T., Oltmann H., Schmitz B., Hemmersbach R., and Grimm D. Alterations of the cytoskeleton in human cells in space proved by life-cell imaging. *Sci. Rep.*, **6**, 20043 (2016). DOI: 10.1038/srep20043
- Thiel C. S., de Zolicourt D., Tauber S., Adrian A., Franz M., Simmet D. M., Schoppmann K., Hauschild S., Krammer S., Christen M., Bradacs G., Paulsen K., Wolf S. A., Braun M., Hatton J., Kurtcuoglu V., Franke S., Tanner S., Cristoforetti S., Sick B., Hock B., and Ullrich O. Rapid adaptation to microgravity in mammalian macrophage cells. *Sci. Rep.*, **7** (1), 43 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-00119-6
- Thiel C. S., Tauber S., Seebacher C., Schropp M., Uhl R., Lauber B., Polzer J., Neelam S., Zhang Y., and Ullrich O. Real-time 3D high-resolution microscopy of human cells on the international space station. *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (8), 2033 (2019). DOI: 10.3390/ijms20082033
- Thiel C. S., Tauber S., Lauber B., Polzer J., Seebacher C., Uhl R., Neelam S., Zhang Y., Levine H., and Ullrich O. Rapid morphological and cytoskeletal response to microgravity in human primary macrophages. *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (10), 2402 (2019). DOI: 10.3390/ijms20102402
- Serova L. V. and Denisova L. A. The effect of weightlessness on the reproductive function of mammals. *Physiologist*, **25** (6), S9–S12 (1982).
- Serova L. V., Denisova L. A., and Baikova O. V. The effect of microgravity on the reproductive function of male-rats. *Physiologist*, **32** (1 Suppl.), S29–S30 (1989).
- Tash J. S., Johnson D. C., and Enders G. C. Long-term (6-wk) hindlimb suspension inhibits spermatogenesis in adult male rats. *J. Appl. Physiol.*, **92** (3), 1191–1198 (2002). DOI: 10.1152/jappphysiol.00931.2001
- Usik M. A. and Ogneva I. V. Cytoskeleton structure in mouse sperm and testes after 30 days of hindlimb unloading and 12 hours of recovery. *Cell. Physiol. Biochem.*, **51** (1), 375–392 (2018). DOI: 10.1159/000495235
- Ogneva I. V., Usik M. A., Loktev S. S., Zhdankina Yu. S., Biryukov N. S., Orlov O. I., and Sychev V. N. Testes and duct deferens of mice during space flight: cytoskeleton structure, sperm-specific proteins and epigenetic events. *Sci. Rep.*, **9**, 9730 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-46324-3
- Ogneva I. V. Mouse and fly sperm motility changes differently under modelling microgravity. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **43** (1), 590–604 (2021). DOI: 10.3390/cimb43020043
- Parfyonov G. P., Platonova R. N., Tairbekov M. G., Zhvalikovskaya V. P., Mozgovaya I. E., Rostopshina A. V., and Rozov A. N. Biological experiments carried out aboard the biological satellite Cosmos-936. *Life Sci. Space Res.*, **17**, 297–299 (1979). DOI: 10.1016/B978-0-08-023416-8.50044-1
- Marco R., Bengura A., Sanchez J., and de Juan E. Effects of the space environment on *Drosophila melanogaster* development. Implications of the IML-2 experiment. *J. Biotechnol.*, **47** (2–3), 179–189 (1996). DOI: 10.1016/0168-1656(96)01408-3
- Ogneva I. V., Belyakin S. N., and Sarantseva S. V. The development of *Drosophila melanogaster* under different duration space flight and subsequent adaptation to earth gravity. *PLoS One*, **11** (11), e0166885 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0166885
- Ogneva I. V., Zhdankina Y. S., and Kotov O. V. Sperm of fruit fly *Drosophila melanogaster* under space flight. *Int J Mol Sci*, **23** (14), 7498 (2022). DOI: 10.3390/ijms23147498

21. Ogneva I. V. The Mechanoreception in *Drosophila melanogaster* oocyte under modeling micro- and hypergravity. *Cells*, **12** (14), 1819 (2023). DOI: 10.3390/cells12141819
22. Morachevskaya E., Sudarikova A., and Negulyaev Y. Mechanosensitive channel activity and F-actin organization in cholesterol-depleted human leukaemia cells. *Cell Biol. Int.*, **31** (4), 374–381 (2007). DOI: 10.1016/j.cellbi.2007.01.024
23. Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Negulyaev Y. A., and Morachevskaya E. A. Cholesterol depletion-induced inhibition of stretch-activated channels is mediated via actin rearrangement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412** (1), 80–85 (2011). DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.07.046
24. Jayaraman T., Kannappan S., Ravichandran M. K., and Anuradha C. V. Impact of Essentiale L on ethanol-induced changes in rat brain and erythrocytes. *Singapore Med. J.*, **49** (4), 320–327 (2008).
25. Harder T. and Simons K. Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Immunol.*, **29** (2), 556–562 (1999). DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199902)29:02<556::AID-IMMU556>3.0.CO;2-2
26. Brown D. A. and London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.*, **275** (23), 17221–17224 (2000). DOI: 10.1074/jbc.R000005200
27. Brown DA. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 430–439 (2006). DOI: 10.1152/physiol.00032.2006

The Administration of Phospholipids with Polyunsaturated Fatty Acids in the Tail Groups Makes It Possible to Prevent the Decrease of Sperm Motility of the Fruit Fly *Drosophila melanogaster* in the Early Period of Readaptation after Space Flight

I.V. Ogneva, K.K. Gogichaeva, Yu.S. Zhdankina, and O.V. Kotov

SSC RF Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoye shosse 76a, Moscow, 123007 Russia

The aim of the study was the attempt to prevent the decrease in sperm motility of the fruit fly *Drosophila melanogaster* that occurs in the early period of readaptation after space flight by adding phospholipids with polyunsaturated fatty acids in the tail groups (essential phospholipids) to the nutrient medium. The study was carried out as part of space flights on board the Russian segment of the International Space Station during the period September 15, 2023 – September 27, 2023 (ISS-69) and March 23, 2024 – April 6, 2024 (ISS-70). The content of cytoskeletal proteins in the testes was determined by Western blotting and sperm motility by video recording and subsequent analysis. The results of the study show that modification of the nutrient medium by adding essential phospholipids leads to a decrease in cholesterol content and an increase in actin content, which prevents a decrease in tubulin content and a decrease in the speed of movement of fruit fly sperm in the early period of readaptation (up to 16 hours) after space flight. The data obtained, on the one hand, demonstrate a possible mechanism for triggering mechanotransduction, and on the other, allow us to propose essential phospholipids as one of the means of protection against negative changes associated with changes in the gravity field acting on the cell.

Keywords: cell mechanosensitivity, weightlessness, cytoskeleton, sperm motility, Drosophila melanogaster

РОЛЬ ДВУХ ИЗОФОРМ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА Hsp90 В ОБЕСПЕЧЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ФИБРОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА HT1080 К ИНГИБИТОРАМ HSP90 И ЦИТОТОКСИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

© 2024 г. В.С. Петренко*,*, О.С. Моренков*, Ю.Ю. Скарга*,
М.А. Жмурина*, В.В. Врублевская*

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

*E-mail: 79182797935@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.06.2024 г.

После доработки 14.06.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Внутриклеточный белок теплового шока 90 (Hsp90) выполняет важные функции, связанные с укладкой, стабилизацией и деградацией различных белков в клетке, предотвращает агрегацию и денатурацию белков при различных видах стресса. Существуют две изоформы Hsp90, индуцибельная изоформа Hsp90α и конститутивная изоформа Hsp90β. Считается, что Hsp90β играет ключевую роль в обеспечении функционирования белков «домашнего хозяйства», в то время как Hsp90α играет важную роль в ответе клеток на стрессовые воздействия. Мы впервые исследовали роль двух изоформ Hsp90 в обеспечении устойчивости клеток фибросаркомы человека HT1080 к ингибиторам Hsp90 и ряду противоопухолевых препаратов с разным механизмом действия. Показано, что обе изоформы Hsp90 вносят сопоставимый вклад в устойчивость клеток к ингибиторам Hsp90 и одна изоформа Hsp90 не способна полностью компенсировать отсутствие другой изоформы Hsp90 при действии ингибиторов Hsp90. В обеспечении устойчивости клеток к цитотоксическим противоопухолевым препаратам также участвуют обе изоформы Hsp90, при этом Hsp90α, вероятно, играет более важную роль, чем Hsp90β, в обеспечении защиты клеток от цитотоксического действия сорафениба и нокадазола. В случае цисплатина каждая из изоформ Hsp90 способна в значительной степени компенсировать отсутствие другой изоформы. В случае доксорубина, бортезомиба, сорафениба, паклитакселя и нокадазола отсутствие одной из изоформ Hsp90 приводило к существенному снижению устойчивости клеток к противоопухолевым препаратам, особенно резко выраженному в случае паклитакселя и нокадазола. Ингибитор Hsp90 17-(аллиламино)гелданамицин потенцирует действие цитотоксических препаратов на клетки, обеспечивая наиболее выраженный синергизм с паклитакселем и нокадазолом. В результате впервые определена важная роль обеих изоформ Hsp90 в обеспечении устойчивости клеток к ингибиторам Hsp90 и противоопухолевым препаратам с различными механизмами действия. Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки Hsp90α- или Hsp90β-специфических ингибиторов для противоопухолевой терапии и их комбинированном применении с известными противоопухолевыми препаратами.

Ключевые слова: белки теплового шока Hsp90α и Hsp90β, ингибиторы Hsp90, цитотоксические препараты.

DOI: 10.31857/S0006302924060086, EDN: NLKMWQ

Белок теплового шока 90 (Hsp90) является консервативным молекулярным шапероном, обеспечивающим фолдинг внутриклеточных бел-

ков и участвующим в регуляции их активности и деградации [1, 2]. Мономер Hsp90 состоит из трех консервативных доменов — N-терминального домена, среднего домена и C-концевого домена; между N-терминальным доменом и средним доменом располагается заряженная линкерная область. N-терминальный домен обеспечивает связывание Hsp90 с АТФ, что является необходимым

Сокращения: Hsp90 — белок теплового шока 90, 17-AAG — 17-(аллиламино)гелданамицин, Hsp90α-KO и Hsp90β-KO — мутантные клеточные линии, не экспрессирующие Hsp90α и Hsp90β соответственно.

условием функционирования Hsp90. Средний домен содержит сайты связывания для клиентских белков и ко-шаперонов, а С-концевой домен опосредует гомодимеризацию Hsp90 и содержит нуклеотид-связывающий домен, который аллостерически регулирует АТФазную активность N-терминального домена [1, 3–5]. К настоящему времени выявлено более 700 белков-клиентов Hsp90, участвующих во внутриклеточной сигнализации, репарации ДНК, активации и транспортировке рецепторов и т.д. [1, 2, 6]. В этой связи Hsp90 играет важную роль во многих клеточных процессах, включая поддержание цитоскелета, выживание и дифференцировку клеток, пролиферацию, миграцию клеток и т.д. [1–3, 7]. Среди белков-клиентов Hsp90 найдено множество онкобелков, включая, например, опухоль-ассоциированные киназы (RAF-1, HER2 и т.д.), сигнальные белки (Akt и SRC), факторы транскрипции (p53, stat3, HIF-1), экспрессия которых напрямую связана с пролиферацией и иммортализацией раковых клеток [1–3, 7, 8]. Hsp90, концентрация которого в опухолевых клетках увеличена в 2–10 раз в сравнении с нормальными клетками, способствует конформационному созреванию онкобелков и препятствует их деградации [7–9]. Ингибирование Hsp90 приводит к неправильному «созреванию» и деградации белков-клиентов Hsp90, что, в конечном счете, заканчивается гибелью опухолевых клеток [8, 10–13]. С учетом важной роли Hsp90 в функционировании опухолевых клеток, Hsp90 считается перспективной молекулярной мишенью для разработки противоопухолевых препаратов [10–13]. Ингибиторы Hsp90 имеют ряд преимуществ по сравнению с другими противоопухолевыми препаратами, поскольку большое количество клиентских белков Hsp90 являются белками, участвующими во внутриклеточной сигнализации, и ингибиторы Hsp90 действуют одновременно на многочисленные сигнальные пути, подавляя функционирование опухолевых клеток. Поэтому анти-Hsp90-терапия с меньшей вероятностью приведет к выживанию опухолевых клеток, чем терапия, направленная только на одну мишень.

К настоящему времени разработаны ингибиторы Hsp90 различного типа. Большинство ингибиторов специфичны к N-терминальному домену и препятствуют его взаимодействию с АТФ [10–13]. Первым описанным ингибитором Hsp90 был гелданамицин, природное соединение, выделенное из *Streptomyces hygroscopicus* и относящееся к группе бензохиноновых анасаминов [11–14]. Недостатком гелданамицина является его низкая стабильность и высокая гепатотоксичность [15]. На основе гелданамицина были разработаны структурно близкие ингибиторы нового поколения — 17-(аллиламино)гелданамицин (17-AAG),

17-DMAG, 17-AAGH2 и др. [11–16], которые характеризуются сниженной гепатотоксичностью и улучшенной растворимостью по сравнению с гелданамицином, что делает их более предпочтительными для использования *in vivo* [14–17]. Разработаны ингибиторы N-терминального домена Hsp90 пуринового ряда (например, ВПВ021, ВПВ028 и др.), резотиновые ингибиторы (ганетеспиб, люминеспиб и др.) [10, 18, 19]. Созданы ингибиторы, специфичные к С-терминальному домену Hsp90 (новобиоцин, KU-174), в также к среднему домену Hsp90 (San A, H-10, H-15), которые также эффективно ингибируют шаперонный цикл Hsp90 [13, 14, 20]. Ингибиторы Hsp90 продемонстрировали выраженный антипролиферативный эффект по отношению к разным типам раковых клеток, что обуславливает их изучение как в качестве монотерапии, так и в комбинации с уже известными противоопухолевыми цитостатиками [21, 25–27]. Установлено, что ингибиторы Hsp90 демонстрируют аддитивный или синергетический эффект в подавлении роста опухолевых клеток в сочетании с такими цитотоксическими препаратами, используемыми для лечения рака, как таксаны, цисплатин, ингибиторы протеасом и др. [10, 21–24]. Например, 17-ААГ и гелданамицин сенситилизовали клетки рака легких и молочной железы к индуцированной паклитакселем цитотоксичности *in vitro* и *in vivo* [21–23]. В комбинации 17-ААГ и цисплатина синергетическая противоопухолевая активность наблюдалась по отношению к раку толстой кишки и некоторых солидных опухолей [24, 25]. Комбинированная терапия с использованием ингибиторов Hsp90 и различных цитостатиков неоднократно демонстрировала более эффективное антипролиферативное воздействие на раковые клетки *in vitro* и *in vivo* [21–25]. Проводятся доклинические и клинические исследования различных ингибиторов Hsp90 для терапии рака [24–27]. Основным недостатком ингибиторов Hsp90 является их токсичность для клеток и организмов [15, 25–27].

Существуют две изоформы цитоплазматического Hsp90, стресс-индуцибельная изоформа Hsp90 α и конститутивная изоформа Hsp90 β [1, 3, 6, 7]. Уровень гомологии Hsp90 α и Hsp90 β составляет ~86% [6, 7], что обуславливает их схожесть в функциональном плане. Экспрессия Hsp90 α увеличивается в ответ на стрессовые воздействия и считается, что эта изоформа Hsp90 участвует в адаптации клеток к стрессу [5, 28]. Hsp90 β синтезируется конститутивно и участвует в фолдинге белков «домашнего хозяйства», обеспечивая жизнеспособность клеток [3, 5, 28]. К настоящему времени не созданы эффективные ингибиторы, строго селективные к отдельным изоформам Hsp90. Разработка таких ингибиторов, с учетом высокого уровня гомологии Hsp90 α и Hsp90 β , является нетривиальной задачей. Изоформа-специ-

фические Hsp90 ингибиторы могут быть менее токсичными, т.к. они не будут подавлять другую изоформу Hsp90, что обеспечит выживаемость клеток. При этом изоформа-специфические ингибиторы могут ингибировать сигнальные пути, вовлеченные в онкогенез. Для оценки перспективности разработки такого типа ингибиторов Hsp90 необходимо понимание роли отдельных изоформ Hsp90 в обеспечении выживаемости клеток в ответ на действие ингибиторов Hsp90 и противоопухолевых препаратов. Ранее мы создали клеточные линии фибросаркомы человека HT1080 с нокаутом гена *HSP90AA1*, кодирующего Hsp90 α -изоформу, и линии с нокаутом гена *HSP90AB1*, кодирующего Hsp90 β -изоформу [29]. В данном исследовании с использованием созданных нокаутных клеточных линий мы исследовали роль двух изоформ Hsp90 в обеспечении устойчивости клеток к различным ингибиторам Hsp90, цитотоксическим противоопухолевым препаратам и при комбинированном действии ингибиторов Hsp90 и цитостатиков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линия клеток фибросаркомы человека HT1080 была получена из Коллекции клеточных культур позвоночных (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия). Получение линий клеток HT1080 с нокаутированным геном *HSP90AA1*, кодирующим Hsp90 α , и нокаутированным геном *HSP90AB1*, кодирующим Hsp90 β , описано ранее [29]. Вкратце, для индель-мутагенеза первого экзона генов *HSP90AA1* и *HSP90AB1* использовали плазмидные конструкции на основе никазного вектора All-in-One (AIO-GFP, Addgene 74119). Никазный вектор AIO-GFP применяли с целью снижения возможного мутагенеза в нецелевых областях (off-target) генома [30]. Успешный нокаут генов *HSP90AA1* и *HSP90AB1* в полученных клонах был подтвержден методом иммуноблоттинга и проточной цитометрии с использованием специфических антител. Биаллельность мутаций генов в Hsp90 α - и Hsp90 β -негативных клонах доказана посредством секвенирования целевых участков генов *HSP90AA1* и *HSP90AB1*. Мутации приводили к сдвигу рамки считывания и сопровождалась остановкой синтеза соответствующих белков. В результате были отобраны три клеточные линии с нокаутом гена *HSP90AA1* (Hsp90 α -КО, линии 5C3/7D5, 2C8/7F10 и 1C7) и три клеточные линии с нокаутом гена *HSP90AB1* (Hsp90 β -КО, линии 6D6/3D8, 3E5/2F8/3B9 и 1G3) [29]. Схематическое представление локализации и характера мутаций в генах *HSP90AA1* и *HSP90AB1* линий Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО приведено на рис. 1.

Исходную культуру HT1080 и мутантные клеточные линии Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО культивировали в среде ДМЕМ (среда Игла в модификации Дульбекко), содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров (ЭБС) и антибиотики пенициллин/стрептомицин (ДМЕМ-ЭБС). Пересев клеток осуществляли посредством трипсинизации через 2-3 дня, не допуская перерастания клеток.

В работе использовали ингибиторы Hsp90: гелданамицин, 17-ААГ, ганетеспиб и ВПВ021, а также цитотоксические противоопухолевые препараты нокадазол, доксорубин, бортезомиб, паклитаксел, цисплатин и сорафениб. Ингибиторы Hsp90 и цитотоксические препараты растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации 1–2 мг/мл и хранили при температуре –80°C. Для оценки чувствительности клеток к ингибиторам Hsp90 и цитотоксическим препаратам мутантные клеточные линии Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО и исходную культуру HT1080 (контроль) ресуспендировали в среде ДМЕМ-ЭБС, высевали в лунки 96-луночного культурального планшета (Fudau, Китай) с плотностью $1.5 \cdot 10^5$ клеток в лунке и инкубировали в течение 24 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. К экспоненциально растущим клеткам (50–60% монослоя) добавляли соответствующие ингибиторы Hsp90 или цитотоксические препараты в разных концентрациях, либо же их комбинации. В качестве контроля использовали клетки без обработки ингибиторами/цитостатиками с добавлением 0.5–1.0% диметилсульфоксида. Клетки инкубировали в течение 48 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. После этого к клеткам в культуральную среду добавляли 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид (МТТ-реагент) до конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем среду удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 570 нм (OP_{570}) с помощью планшетного ридера iMax (Bio-Rad, США). Для каждой клеточной линии и каждого варианта обработки ингибитором/цитостатиком использовали три-пять независимых повторов. Каждый эксперимент повторяли три-шесть раз. Результаты выражали как средние значения $OP_{570} \pm$ стандартное отклонение. Исходя из полученных результатов рассчитывали концентрацию ингибиторов/цитостатиков, обеспечивающую гибель 50% клеток (IC_{50}). Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 13.0 (Systat Software Inc., США). Результаты отдельных экспериментов представлены на рисунках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния различных ингибиторов Hsp90 на исходную клеточную линию HT1080 и

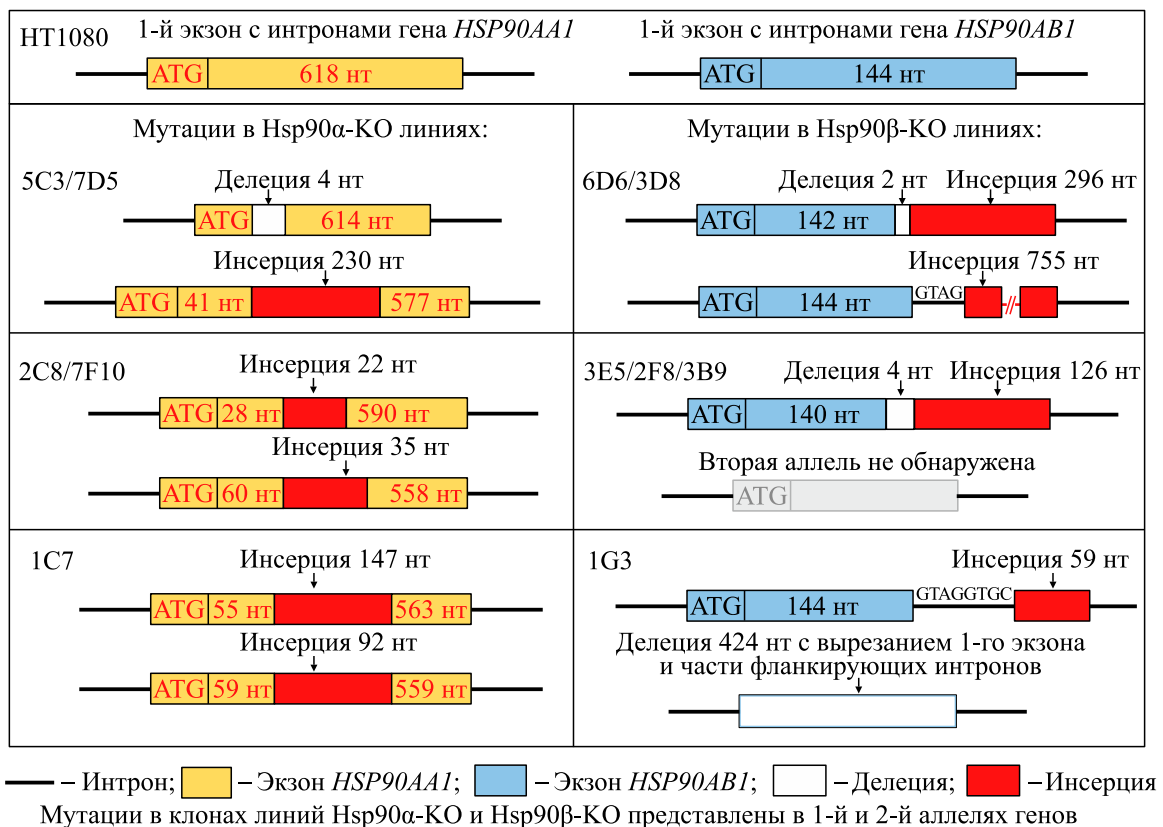
Создание клонов клеток HT1080 с нокаутированным геном *HSP90AA1* и *HSP90AB1*

Рис. 1. Схематическое представление локализации и характера мутаций в двух аллелях генов *HSP90AA1* и *HSP90AB1* клеточных линий Hsp90α-КО и Hsp90β-КО.

мутантные клеточные линии Hsp90α-КО и Hsp90β-КО клетки инкубировали в присутствии ингибиторов Hsp90 в различных концентрациях в течение 48 ч и далее оценивали относительное количество жизнеспособных клеток с помощью МТТ-метода. Чувствительность клеток к ингибиторам Hsp90 рассчитывали по величине IC_{50} : чем больше величина IC_{50} , тем выше чувствительность клеток к ингибитору. Все ингибиторы Hsp90 дозозависимым образом оказывали цитотоксическое действие на клетки (рис. 2). Все мутантные клеточные линии Hsp90α-КО и Hsp90β-КО были более чувствительны к ингибиторам Hsp90 в сравнении с исходной линией HT1080; разница между HT1080 и мутантными линиями по чувствительности к гелданамицину, 17-AAG и ганетеспибу, рассчитанная по величине IC_{50} , составляла 2–3 раза. При обработке клеток гелданамицином, 17-AAG или ганетеспибом мутантные линии Hsp90α-КО и Hsp90β-КО продемонстрировали примерно одинаковую чувствительность к цитотоксическим препаратам (рис. 2а–е). Наиболее выраженная разница между HT1080 и мутантными линиями наблюдалась при обработке клеток ВІВ021: IC_{50} для HT1080 составляла 2 мкМ

ВІВ021, для мутантных линий — при 200–500 нМ (рис. 2ж,з). При обработке клеток ингибитором ВІВ021, отсутствие Hsp90α в клетках (линии Hsp90α-КО) было более критично, чем отсутствие Hsp90β (линии Hsp90β-КО). В целом, полученные результаты свидетельствовали, что обе изоформы Hsp90 вносят вклад в устойчивость клеток к ингибиторам Hsp90 и что вклад Hsp90α и Hsp90β в устойчивость клеток к этим ингибиторам сопоставим. Одна изоформа Hsp90 не способна полностью компенсировать отсутствие другой изоформы. При этом следует учитывать, что при нокауте гена, кодирующего одну из изоформ Hsp90, содержание второй изоформы в клетках увеличивается в 1.2–1.5 раза [29], что частично нивелирует потерю одной из изоформ цитоплазматического Hsp90.

К настоящему времени роль Hsp90α и Hsp90β в обеспечении устойчивости клеток к цитотоксическим препаратам, используемым в онкологии, не исследована. Мы оценили чувствительность клеток HT1080, а также нокаутных линий Hsp90α-КО и Hsp90β-КО, к цитотоксическим препаратам цисплатину, доксорубину, бортезомибу, сорафенибу, паклитакселю и нокодазо-

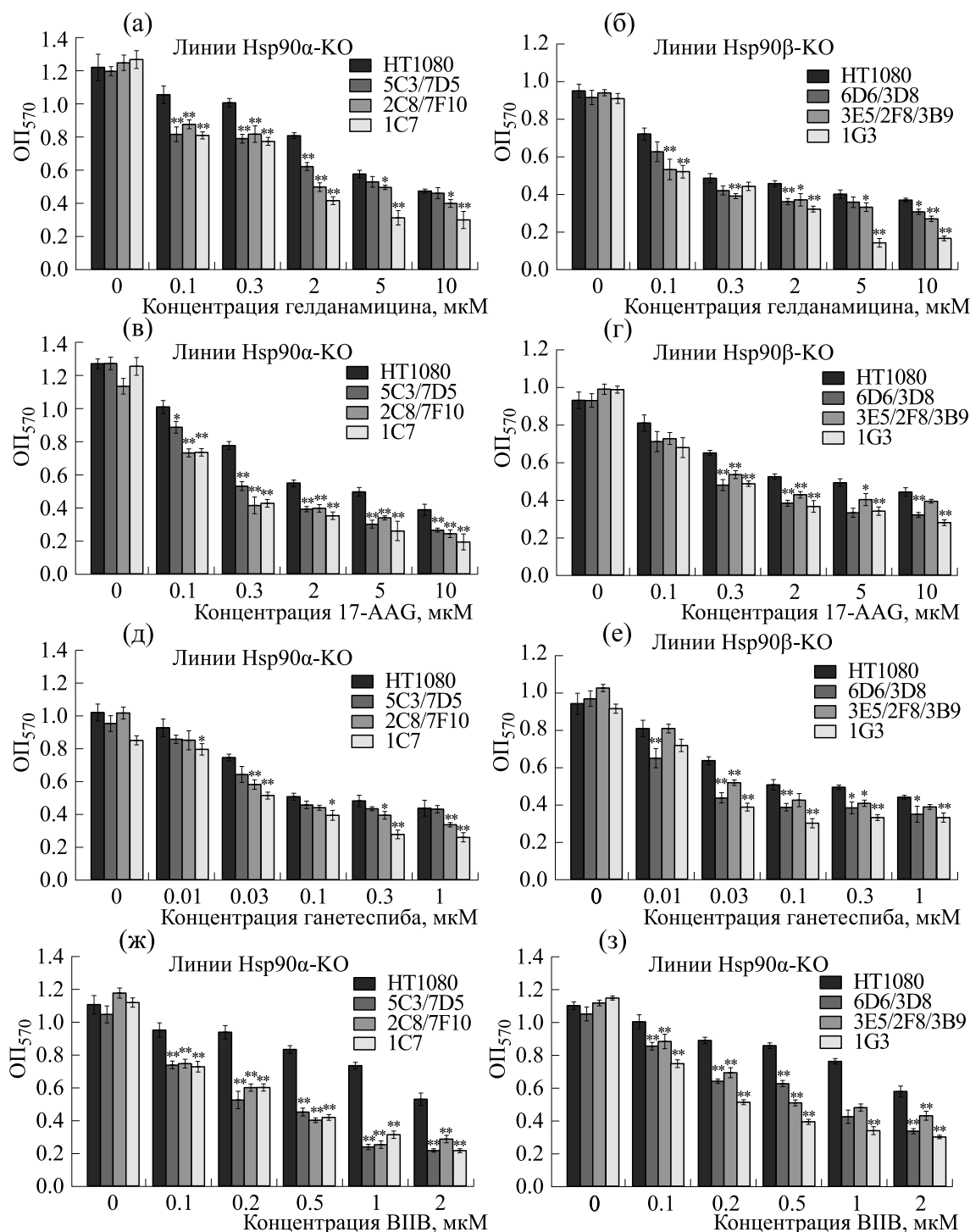


Рис. 2. Влияние Hsp90-специфических ингибиторов на клетки линий Hsp90α-KO и Hsp90β-KO, не экспрессирующих соответственно Hsp90α или Hsp90β. Клетки обрабатывали гелданамицином (а, б), 17-AAG (в, г), ганетеспибом (д, е) и ВПВ021 (ж, з) в разных концентрациях. Каждая точка представляет собой среднее арифметическое значение $OP_{570} \pm SD$ ($n = 4-5$). Звездочками отмечены статистически достоверные отличия от контрольных клеток HT1080, обработанных сходным образом: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

лу, обладающими разными механизмами цитотоксического действия. Цисплатин является платиносодержащим алкилирующим соединением,

которое, связываясь с пуриновыми основаниями гуанином и аденином, приводит к внутрицепочечным и межцепочечным сшивкам, вызываю-

Таблица 1. Чувствительность клеток HT1080 и клеток мутантных линий Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО к цитотоксическим препаратам в отсутствие и в присутствии 100 нМ ингибитора Hsp90 17-AAG

Препарат		50%-я ингибирующая концентрация цитотоксического препарата (IC_{50}), мкМ						
		HT1080	Hsp90 α -КО			Hsp90 β -КО		
			5C3/7D5	2C8/7F10	1C7	6D6/3D8	3E5/2F8/3B9	1G3
Цисплатин	—	4.60 \pm 0.38	5.50 \pm 0.43	5.70 \pm 0.41	7.20 \pm 0.51	4.20 \pm 0.38	3.90 \pm 0.42	3.80 \pm 0.33
	17-AAG	4.20 \pm 0.60	4.00 \pm 0.49	4.80 \pm 0.55	4.90 \pm 0.54	3.40 \pm 0.38	1.60 \pm 0.33	2.30 \pm 0.29
Доксорубицин	—	0.22 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03	0.17 \pm 0.04	0.16 \pm 0.04	0.15 \pm 0.03
	17-AAG	0.16 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.05 \pm 0.03	0.08 \pm 0.03	0.09 \pm 0.03	0.08 \pm 0.04
Бортезомиб	—	0.020 \pm 0.006	0.015 \pm 0.002	0.010 \pm 0.002	0.015 \pm 0.003	0.008 \pm 0.002	0.010 \pm 0.002	0.01 \pm 0.003
	17-AAG	0.010 \pm 0.003	0.007 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.002	0.007 \pm 0.002
Сорафениб	—	4.40 \pm 0.55	3.20 \pm 0.33	3.40 \pm 0.36	2.20 \pm 0.29	4.80 \pm 0.37	6.1 \pm 1.1	4.3 \pm 0.5
	17-AAG	2.30 \pm 0.35	1.00 \pm 0.18	1.90 \pm 0.20	2.00 \pm 0.03	1.50 \pm 0.41	2.30 \pm 0.37	1.80 \pm 0.35
Паклитаксел	—	3.15 \pm 0.25	1.90 \pm 0.31	0.51 \pm 0.05	0.43 \pm 0.04	0.42 \pm 0.04	0.33 \pm 0.03	0.22 \pm 0.02
	17-AAG	0.35 \pm 0.04	0.08 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01
Нокодазол	—	15.7 \pm 2.7	1.30 \pm 0.21	0.77 \pm 0.11	0.65 \pm 0.08	2.90 \pm 0.33	4.70 \pm 0.53	2.30 \pm 0.04
	17-AAG	1.40 \pm 0.25	0.09 \pm 0.02	0.13 \pm 0.03	0.14 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.17 \pm 0.03

Примечание. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm SD ($n = 4-5$).

щим последующие разрывы нитей ДНК и, как следствие, нарушение транскрипции и репликации ДНК, задержку клеточного цикла и апоптоз клеток [31]. Доксорубицин, относящийся к антрациклиновым антибиотикам, обладает сложным механизмом действия, включающим повреждение ДНК посредством интеркаляции, взаимодействие с топоизомеразой II и связывание с липидами клеточных мембран, что приводит к выработке активных форм кислорода, апоптозу, аутофагии, ферроптозу и пироптозу [32]. Бортезомиб является модифицированной борной кислотой, связывается с каталитическим сайтом 26S протеасомы и ингибирует протеасома-зависимую деградацию проапоптотических факторов, тем самым запуская запрограммированную гибель опухолевых клеток [33]. Сорафениб является мультикиназным ингибитором, блокирующим RAF/MEK/ERK сигнальный путь в опухолевых клетках и ингибирующим ангиогенез путем по-

давления передачи сигналов VEGFR и PDGFR в сосудистой сети опухоли [34]. Паклитаксел (таксол), относящийся к таксанам, стабилизирует микротрубочки за счёт ингибирования их деполимеризации, что приводит к остановке клеточного цикла на митотической фазе и является причиной его цитотоксичности [35]. Нокодазол тоже влияет на динамику сборки/разборки микротрубочек, связывается в клетках с β -тубулином и препятствует полимеризации микротрубочек, что блокирует митоз и индуцирует апоптоз в опухолевых клетках [36]. Обобщенные результаты оценки токсичности различных противоопухолевых препаратов на клетки HT1080 и мутантные клеточные линии Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО представлены в табл. 1.

Отсутствие Hsp90 α и Hsp90 β в клетках незначительно влияло на чувствительность клеток к цисплатину. К доксорубину и бортезомибу му-

тантные линии были несколько более чувствительны, в сравнении с исходной линией HT1080: IC_{50} для линий Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО для этих ингибиторов были снижены в 1.5–2.0 раза, в сравнении с HT1080. В сравнении с HT1080, клеточные линии Hsp90 α -КО были в 1.5–2.0 раза чувствительнее в сорафенибу, однако чувствительность Hsp90 β -негативных линий к цитотоксическому препарату была сопоставима с чувствительностью клеток HT1080. Более того, клеточная линия 3E5/2F8/3B9, не экспрессирующая Hsp90b, проявляла более высокую устойчивость к сорафенибу в сравнении с клетками HT1080. Потеря клетками одной из изоформ Hsp90 очень резко повышала их чувствительность к паклитакселю и нокодазолу. Чувствительность Hsp90 α -КО клеточных линий 2C8/7F10 и 1C7 к паклитакселю, рассчитанная по IC_{50} , была в 6–8 раз выше, чем клеток HT1080, однако чувствительность к паклитакселю Hsp90 α -негативной линии 5C3/7D5 и HT1080 были сопоставимы. Чувствительность всех трех клеточных линий Hsp90b-КО к паклитакселю была в 7–15 раз выше, чем клеток HT1080. При обработке клеток нокодазолом IC_{50} для клеток линий Hsp90 α -КО была в 10–25 раз ниже, а для клеточных линий Hsp90b-КО – в 3–7 раз ниже в сравнении с клетками HT1080.

В целом, полученные результаты свидетельствовали, что в случае цисплатина каждая из изоформ Hsp90 была способна в значительной степени скомпенсировать отсутствие другой изоформы в обеспечении фолдинга/активности белков, задействованных в механизмах устойчивости к цисплатину. Для остальных цитотоксических препаратов обе изоформы Hsp90 вносили сопоставимый вклад в обеспечение устойчивости клеток к их цитотоксическому действию. При этом каждая из изоформ Hsp90 не способна полностью скомпенсировать отсутствие другой изоформы Hsp90 в клетке при действии доксорубина, бортезомиба, сорафениба, паклитакселя и нокодазола, что приводит к существенному повышению чувствительности клеток в отсутствие Hsp90 α или Hsp90 β в клетках Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО. Hsp90 α , вероятно, играет более важную роль, чем Hsp90 β , в обеспечении защиты клеток от цитотоксического действия сорафениба, так как утрата клетками Hsp90 β незначительно влияла на их устойчивость к этому препарату. Снижение устойчивости клеток к доксорубину, бортезомибу и сорафенибу у Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО было не очень значительным и в определенной степени коррелировало с суммарным содержанием Hsp90 в мутантных клетках, для которых характерно повышенное содержание оставшейся изоформы Hsp90 после нокаута другой изоформы Hsp90 [29]. Другая картина наблюдалась при обработке клеток паклитакселем и но-

кодазолом. Отсутствие в клетках Hsp90 α или Hsp90 β сопровождалась резким повышением чувствительности клеток к этим цитотоксическим препаратам: каждая из изоформ Hsp90 была не способна скомпенсировать отсутствие другой изоформы Hsp90 в клетке при действии этих цитотоксических препаратов. Hsp90 α , вероятно, играет более важную роль, чем Hsp90 β в обеспечении защиты клеток от цитотоксического действия нокодазола. Возможно, что в механизмах устойчивости клеток к паклитакселю и нокодазолу участвуют белки, функционирование которых критически зависит от Hsp90 α или от Hsp90 β . Иначе говоря, сохраняющаяся вторая изоформа Hsp90 обладает ограниченной возможностью заменить другую изоформу Hsp90. Интересно, что механизмы действия паклитакселя и нокодазола хоть и отличаются, однако связаны с дестабилизацией динамики сборки/разборки микротрубочек – ключевого компонента цитоскелета клеток [35, 36].

Далее мы оценили синергизм цитотоксических препаратов и ингибиторов Hsp90 на клетках HT1080 и мутантных линиях клеток Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО. Для этого оценивали действие цитотоксических препаратов в комбинации с ингибитором Hsp90 17-AAG в невысокой концентрации – 100 нм. 17-AAG в этой концентрации практически не влиял на жизнеспособность клеток HT1080 (~90% жизнеспособных клеток) и незначительно снижал жизнеспособность клеток Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО (от 90 до 75% жизнеспособных клеток). Комбинированное воздействие 17-AAG и цисплатина незначительно повышало чувствительность клеток исходной линии HT1080 и мутантных линий к цисплатину, свидетельствуя о слабом синергическом эффекте 17-AAG и цисплатина. Чувствительность клеток HT1080, а также клеток мутантных линий Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО к доксорубину, бортезомибу и сорафенибу повышалась в 1.5–3.0 раза в присутствии 17-AAG, что свидетельствовало об определенном уровне синергизма 17-AAG и этих цитотоксических препаратов в проявлении цитотоксического эффекта при обработке клеток. Гораздо больший синергический эффект наблюдался при комбинированной обработке клеток 17-AAG и паклитакселем или нокодазолом. В присутствии 17-AAG величина IC_{50} для паклитакселя снижалась в 7–9 раз для исходной линии HT1080 и в 3–4 раза – для всех линий клеток Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО; при этом IC_{50} для мутантных клеток была в 3–5 раз ниже, в сравнении с клетками HT1080. При комбинированном воздействии нокодазола и 17-AAG чувствительность к нокодазолу повышалась примерно в 15 раз для клеток HT1080, в 5–15 раз – для разных линий клеток Hsp90 α -КО и в 15–50 раз – для разных ли-

ний клеток Hsp90 β -КО. При этом при сочетанном воздействии 17-ААГ и нокадазола IC₅₀ для мутантных клеток была в 8–15 раз ниже в сравнении с клетками HT1080. В целом, на клетках HT1080 и на мутантных линиях наблюдалось синергическое действие всех исследованных цитотоксических препаратов с 17-ААГ, ингибитором Hsp90. Особенно выраженный синергический эффект регистрировался при комбинированном воздействии 17-ААГ с нокадазолом и с паклитакселем; для исходной линии HT1080 это согласуется с ранее полученными данными [21, 22, 37].

В данной работе мы показали, что отсутствие одной из изоформ Hsp90 повышает цитотоксическое действие ряда противоопухолевых препаратов, в особенности паклитакселя и нокадазола. Более того, ингибитор Hsp90 17-ААГ в невысокой концентрации проявляет выраженный синергизм с цитотоксическими противоопухолевыми препаратами при воздействии на исходные клетки HT1080 и мутантные линии. Рассматривая клетки Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО, у которых отсутствует синтез Hsp90 α или Hsp90 β , в качестве модели фармакологического подавления одной из изоформ Hsp90, полученные нами данные свидетельствуют о перспективности разработки Hsp90 α - или Hsp90 β -специфических ингибиторов для противоопухолевой терапии. Hsp90 α - или Hsp90 β -специфические ингибиторы, вероятно, не будут обладать значительной токсичностью для организма, так как отсутствие отдельно Hsp90 α или Hsp90 β незначительно сказывается на жизнеспособности клеток [29]. Полученные нами данные о крайне высокой чувствительности Hsp90 α - или Hsp90 β -негативных клеток к цитотоксическим препаратам, в особенности к паклитакселю и нокадазолу, позволяют предположить, что применение Hsp90 α - или Hsp90 β -специфических ингибиторов может позволить существенно снизить дозы противоопухолевых препаратов с сохранением терапевтического эффекта. Незначительное ингибирование оставшейся функционально активной изоформы Hsp90 низкими дозами ингибиторов Hsp90 может позволить дополнительно снизить эффективные дозы противоопухолевых препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обе изоформы Hsp90, Hsp90 α и Hsp90 β , вносят вклад в устойчивость клеток к ингибиторам Hsp90 и цитотоксическим противоопухолевым препаратам. При этом одна изоформа Hsp90 не способна полностью скомпенсировать отсутствие другой изоформы при действии ингибиторов Hsp90 и противоопухолевых препаратов, в особенности паклитакселя и нокадазола. Показан синергизм действия ингибитора Hsp90 17-

ААГ с цитотоксическими препаратами, особенно выраженный при обработке клеток паклитакселем и нокадазолом. Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки Hsp90 α - или Hsp90 β -специфических ингибиторов для использования в комбинированной противоопухолевой терапии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biebl M. M. and Buchner J. Structure, function, and regulation of the Hsp90 machinery. *Perspect. Biol.*, **11** (9), a034017 (2019). DOI: 10.1101/cshperspect.a034017
2. Neckers L., Mollapour M., and Tsutsumi S. The complex dance of the molecular chaperone Hsp90. *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 223 (2009). DOI: 10.1016/j.tibs.2009.01.006
3. Maiti S. and Picard D. Cytosolic Hsp90 isoform-specific functions and clinical significance. *Biomolecules*, **12**, 1166 (2022). DOI: 10.3390/biom12091166
4. Wandinger S. K., Richter K., and Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, **283**, 18473 (2008). DOI: 10.1038/nrm.2017.20
5. Prodromou C. The ‘active life’ of Hsp90 complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 614 (2012). DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.07.020
6. Zuehlke A. D., Beebe R., Neckers L., and Prince T. Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene*, **570**, 8 (2015). DOI: 10.1016/j.gene.2015.06.018
7. Hoter A., El-Sabban M. E., and Naim H. Y. The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (9), 2560 (2018). DOI: 10.3390/ijms19092560
8. Pick E., Kluger Y., Giltzane J. M., Moeder C., Camp R. L., Rimm D. L., and Kluger H. M. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.*, **67**, 2932 (2007).
9. Ciocca D. R., Arrigo A. P., and Calderwood S. K. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: An update. *Arch. Toxicol.*, **87**, 19 (2013). DOI: 10.1007/s00204-012-0918-z
10. Dernovsek J. and Tomasic T. Following the design path of isoform-selective Hsp90 inhibitors: Small differences, great opportunities. *Pharmacol. Ther.*, **245**, 108396 (2023). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2023.108396

11. Sanchez J., Carter T. R., Cohen M. S., and Blagg B. S. Old and new approaches to target the Hsp90 chaperone. *Curr. Cancer Drug Targets.*, **20** (4), 253 (2020). DOI: 10.2174/1568009619666191202101330
12. Miyata Y., Nakamoto H., and Neckers L. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Curr. Pharm. Des.*, **19** (3), 347 (2013). DOI: 10.2174/138161213804143725
13. Neckers L., Blagg B., Haystead T., Trepel J. B., Whitesell L., and Picard D. Methods to validate Hsp90 inhibitor specificity, to identify off-target effects, and to rethink approaches for further clinical development. *Cell Stress & Chaperones.*, **23** (4), 467 (2018). DOI: 10.1007/s12192-018-0877-2
14. Park S., Park J. A., Jeon J. Y., and Lee Y. Traditional and novel mechanisms of heat shock protein 90 (HSP90) inhibition in cancer chemotherapy including HSP90 cleavage. *Biomol. Ther.*, **27** (5), 423 (2019). DOI: 10.4062/biomolther.2019.051
15. Gorska M. and Popowska U. Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **17** (6), 2269 (2012). DOI: 10.2741/4050
16. Saad Z. U., Robert B., and Zihai L. 17 AAG for HSP90 inhibition in cancer – from bench to bedside. *Curr. Mol. Med.*, **9** (5), 654 (2009). DOI: 10.2174/156652409788488757
17. Taiyab A., Srinivas U. K., and Sreedhar A. S. 17-(Allyl-amino)-17-demethoxygeldanamycin combination with diferuloylmethane selectively targets mitogen kinase pathway in a human neuroblastoma cell line. *J. Cancer Ther.*, **1**, 197 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.14031
18. Biamonte M. A., Water R. V., Arndt J. W., Scannevin R. H., Perret D., and Lee W. Heat shock protein 90: Inhibitors in clinical trials. *J. Med. Chem.*, **53** (1), 3 (2010). DOI: 10.1021/jm9004708
19. Hong D., Said R., Falchook G., Naing A., Moulder S., Tsimberidou A., Galluppi G., Dakappagari N., Storgard C., Kurzrock R., and Rosen L.S. Phase I study of BIIB028, a selective heat shock protein 90 inhibitor, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, **19** (17), 4824 (2013). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0477
20. Soti C., Racz A., and Csermely P. A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *J. Biol. Chem.*, **277** (9), 7066 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M105568200
21. Berko Y. A., Funmilola A. F., and Akala E. O. Fabrication of paclitaxel and 17AAG-loaded poly-ε-caprolactone nanoparticles for breast cancer treatment. *J. Pharm. Drug Deliv. Res.*, **10** (1), 196 (2021). DOI: 10.48047/ecb/2023.12.si4.1190
22. Katragadda U., Fan W., Wang Y., Wang Y., Teng Q., and Tan C. Combined delivery of paclitaxel and tanespimycin via micellar nanocarriers: pharmacokinetics, efficacy and metabolomic analysis. *PLoS One.*, **8** (3), e58619 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0058619
23. Ui T., Morishima K., Saito S., Sakuma Y., Fujii H., Hosooya Y., Ishikawa S., Aburatani H., Fukayama M., Niki T., and Yasuda Y. The HSP90 inhibitor 17-N-allyl-amino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway. *Oncol Rep.*, **31** (2), 619 (2014). DOI: 10.3892/or.2013.2899
24. Schmidt L., Issa I. I., Haraldsdóttir H., Hald J. J., Schmitz A., Due H., and Dybkær K. Hsp90 inhibition sensitizes DLBCL cells to cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **89**, 431 (2022). DOI: 10.1007/s00280-022-04407-5
25. Li Z. N. and Luo Y. HSP90 inhibitors and cancer: Prospects for use in targeted therapies (Review). *Oncol Rep.*, **49** (1), 6 (2023). DOI: 10.3892/or.2022.8443
26. Magyar C. T. J., Vashist Y. K., Stroka D., Kim-Fuchs C., Berger M. D., and Banz V. Heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors in gastrointestinal cancer: where do we currently stand? – A systematic review. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **149**, 8039 (2023). DOI: 10.1007/s00432-023-04689-z
27. Lang J. E., Forero-Torres A., Yee D., Yau C., Wolf D., Park J., Parker B. A., Chien A. J., Wallace A. M., Murthy R., Albain K. S., and Ellis E. D. Safety and efficacy of HSP90 inhibitor ganetespib for neoadjuvant treatment of stage II/III breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, **8** (1), 128 (2022). DOI: 10.1038/s41523-022-00493-z
28. Becker B., Multhof, G., Farkas B., Wild P. J., Landthaler M., and Stolz W. Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases. *Exp. Dermatol.*, **13** (1), 27 (2004). DOI: 10.1111/j.0906-6705.2004.00114.x
29. Petrenko V., Vrublevskaya V., Bystrova M., Masulis I., Kopylova E., Skarga Y., Zhmurina M., Morenkov O. Proliferation, migration, and resistance to oxidative and thermal stresses of HT1080 cells with knocked out genes encoding Hsp90α and Hsp90β *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **674**, 62 (2023). DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.06.076
30. Chiang T. W., Le Sage C., Larrieu D., Demir M., and Jackson S. P. CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci. Rep.*, **6**, 24356 (2016). DOI: 10.1038/srep24356
31. Dasari S. and Tchounwou P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.*, **740**, 364 (2014). DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025
32. Kciuk M., Gielecinska A., Mujwar S., Kołat D., Kałużińska-Kołat Z., Celik E., and Kontek R. Doxorubicin – an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells*, **12** (4), 659 (2023). DOI: 10.3390/cells12040659
33. Bonvini P., Zorzi E., Basso G., and Rosolen A. Bortezomib-mediated 26S proteasome inhibition causes cell-cycle arrest and induces apoptosis in CD-30+ anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*, **21** (4), 838 (2007). DOI: 10.1038/sj.leu.2404528
34. Wilhelm S. M., Adnane L., and Newell P. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets

- both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol. Cancer Ther.*, **7** (10), 3129 (2008). DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0013
35. Wang T. H., Wang H. S., and Soong Y. K. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer*, **88** (11), 2619 (2000). DOI: 10.1002/1097-0142(20000601)88:11<2619::aid-cn-cr26>3.0.co;2-j
36. Kallas A., Pook M., Maimets M., Zimmermann K., and Maimets T. Nocodazole treatment decreases expression of pluripotency markers nanog and Oct4 in human embryonic stem cells. *PLoS One.*, **6** (4), e19114 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0019114
37. Mo Q., Zhang Y., Jin X., Gao Y., Wu Y., Hao X., Gao Q., and Chen P. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, increases paclitaxel-mediated toxicity in ovarian cancer cells through sustained activation of the p38/H2AX axis. *Tumour Biol.*, **37** (11), 14745 (2016). DOI: 10.1007/s13277-016-5297-2

The Role of Two Isoforms of Heat Shock Protein Hsp90 in Resistance of Human Fibrosarcoma Cells HT1080 to Hsp90 Inhibitors and Cytotoxic Drugs

V.S. Petrenko*, O.S. Morenkov*, Y.Y. Skarga*, M.A. Zhmurina*, and V.V. Vrublevskaya*

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

Intracellular heat shock protein 90 (Hsp90) performs important functions related to the folding, stabilization and degradation of various proteins in the cell, and prevents protein aggregation and denaturation under various types of stress. There are two isoforms of Hsp90, the inducible isoform Hsp90 α and the constitutive isoform Hsp90 β . Hsp90 β is thought to play a key role in the functioning of housekeeping proteins, while Hsp90 α plays an important role in the cellular response to stress. We explored for the first time the role of two Hsp90 isoforms in ensuring the resistance of human fibrosarcoma cells HT1080 to Hsp90 inhibitors and a number of antitumor drugs with different mechanisms of action. Both Hsp90 isoforms have been shown to make a comparable contribution to cell resistance to Hsp90 inhibitors, and one Hsp90 isoform is not able to completely compensate for the absence of another Hsp90 isoform under the influence of Hsp90 inhibitors. Both Hsp90 isoforms are also involved in ensuring cell resistance to cytotoxic anticancer drugs, with Hsp90 α likely playing a more important role than Hsp90 β in protecting cells from the cytotoxic effects of sorafenib and nocodazole. In the case of cisplatin, each of the Hsp90 isoforms is able to largely compensate for the absence of the other isoform. In the case of doxorubicin, bortezomib, sorafenib, paclitaxel, and nocodazole, the absence of one of the Hsp90 isoforms led to a significant decrease in cell resistance to anticancer drugs, which was especially pronounced in the case of paclitaxel and nocodazole. The Hsp90 inhibitor 17-AAG potentiates the effect of cytotoxic drugs on cells, providing the most pronounced synergy with paclitaxel and nocodazole. As a result, the important role of both Hsp90 isoforms in cell resistance to Hsp90 inhibitors and anticancer drugs with different mechanisms of action was determined for the first time. The data obtained indicate the prospects of developing Hsp90 α - or Hsp90 β -specific inhibitors for antitumor therapy and their combined use with known antitumor drugs.

Keywords: heat shock proteins Hsp90 α and Hsp90 β , Hsp90 inhibitors, cytotoxic drugs

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ПОЛИАКРИЛАТОВ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА ДЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

© 2024 г. Л.А. Островская*,#, Д.Б. Корман*, Е.И. Некрасова*, Н.В. Блюхтерова*,
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 имени Н.Н. Блохина Минздрава Российской Федерации, 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 03.07.2024 г.

После доработки 03.07.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

Проведено изучение *in vitro* цитотоксической активности двух соединений на основе полиакриловой кислоты, содержащих золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил), в отношении панели клеточных культур опухолей человека (карцинома почки – линии 769-P, Saki-2, SKRC-1, карцинома молочной железы BT-474, мелкоклеточная карцинома легкого NCI-H211). Полученные результаты проанализированы в сопоставлении с данными, полученными нами ранее для других клеточных культур (карцинома молочной железы MCF-7, карцинома легкого A-549, карцинома толстой кишки HCT116, меланома Mel Me). Показатель цитотоксического эффекта IC_{50} препаратов в отношении девяти протестированных линий опухолевых клеток варьирует в пределах от 0.8 до 5.2 мкг/мл для аурумакрила и в диапазоне от 0.2 до 14.4 мкг/мл для аргакрила (в пересчете на содержание золота и серебра соответственно), изменяясь в зависимости от типа. Обнаружены существенные различия в спектрах летального действия аурумакрила и аргакрила на клетки опухолей различной природы.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), полиакрилат серебра (аргакрил), цитотоксический эффект, культуры опухолевых клеток человека.

DOI: 10.31857/S0006302924060097, EDN: NLCOTT

Металлоорганические соединения, в том числе вещества, содержащие благородные металлы – золото и серебро, широко исследуются в последние годы в качестве потенциальных противоопухолевых агентов [1].

Ранее нами было показано, что полимерные соединения на основе полиакриловой кислоты, содержащие золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил) обладают значительной противоопухолевой активностью *in vivo* в отношении солидных опухолей животных (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755), а также проявляют цитотоксический эффект *in vitro* на моделях ряда клеточных линий опухолей человека (рак молочной железы MCF-7,

рак легкого A-549, колоректальная карцинома HCT116, меланома Mel Me) [2–4].

В продолжение данного направления исследований проведено сравнительное изучение цитотоксической активности аурумакрила и аргакрила на расширенной панели клеточных культур, результаты которого приведены в представленной работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Исследовавшиеся полиметаллоакрилаты представляют собой неполные металлические соли полиакриловой кислоты, содержащие ионы благородных металлов (8 масс. %). Аурумакрил – неполная золотая соль полиакриловой кислоты, отвечает общей формуле $(-CH_2-CHCOOH-)_n (-CH_2CHCOO(AuCl_3H-))_m$, аргакрил – неполная серебряная соль полиакриловой кислоты отвечает формуле $(-CH_2-$

Сокращения: ОП – оптическая плотность, IC_{50} – показатель цитотоксичности (значение концентрации вещества, вызывающей гибель 50% клеток).

$\text{CHCOOH-})_n (-\text{CH}_2\text{CHCOOAgCl}_3\text{H-})_m$, где $n = 12\,000\text{--}35\,000$, $m = 1\,650\text{--}6\,650$. Молекулярная масса полимеров составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препаратов содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 см^{-1} . Субстанции препаратов представляют собой стекловидные пластинки золотистого (аурумакрил) и серебристого (аргакрил) цвета, хорошо растворимые в воде. Оценка цитотоксического эффекта препаратов *in vitro* проведена при их применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 0.244 до 500 мкг/мл для аурумакрила и от 0.976 до 500 мкг/мл для аргакрила.

Оценка цитотоксического эффекта *in vitro*. Для сравнительной оценки цитотоксического эффекта аурумакрила и аргакрила в отношении клеток опухолей человека использованы клеточные культуры карциномы почки трех линий (769-P, Saki-2, SK-RC-1), карциномы молочной железы BT-474, мелкоклеточной карциномы легких NCI-H211. Культуры клеток, протестированные в работе, получены из банка опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Цитотоксичность препаратов оценивали путем определения доли выживших по сравнению с контролем клеток с использованием стандартного МТТ-теста, основанного на сравнительном спектрофотометрическом определении оптической плотности раствора формазана в группах клеток, подвергавшихся воздействию препарата и в контроле, в соответствии с ранее описанной методикой [5].

Долю выживших клеток определяли в соответствии с показателем оптической плотности (ОП) раствора формазана, измеряемой спектрофотометрически при длине волны 570 нм на анализаторе «Multiscan FC» («ThermoScientific», США). В качестве показателя цитотоксического действия препаратов служило соотношение между числом выживших клеток в тестируемой, подвергавшейся воздействию и контрольной группах клеток, выраженное в процентах. Выживаемость клеток, подвергавшихся воздействию препаратов, определялась в соответствии с формулой: (ОП экспериментальной группы/ОП контрольной группы) $\times 100\%$, где ОП — оптическая плотность раствора.

Результаты экспериментов представлены в виде кривых «доза–эффект», характеризующих изменение доли погибших клеток в зависимости от концентрации препаратов и позволяющих определить показатель цитотоксичности IC_{50} (значение концентрации вещества, которая вызывает гибель 50% клеток) в отношении изучавшихся клеточных культур.

Статистический анализ результатов. Статистическая обработка результатов проведена с помощью программ Statistica 6.0, Statistica 8.0 и Excel for Windows 10. Результаты представлены как

среднее из 6 индивидуальных измерений для культивируемых клеток. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия признаются достоверными при условии, что вычисленные значения *t* превышают значения критерия Стьюдента $t_{0.1}$ для определенных уровней значимости ($p \leq 0.01$) при заданном числе степеней свободы f [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние аурумакрила и аргакрила на выживаемость клеток различных опухолей человека в зависимости от концентрации препаратов характеризуют данные, представленные на рис. 1 и 2 соответственно.

Как видно из приведенных данных, оба изученных препарата обладают дозо-зависимым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации препарата, типа опухоли и природы металла, содержащегося в полимере.

Оба препарата вызывают практически полную гибель опухолевых клеток всех изученных линий при применении в концентрациях, далеких от максимальной, составлявшей 250 мкг/мл. Так, концентрации препаратов, вызывающие гибель 90–95% клеток, составляют 62,5 мкг/мл для аурумакрила и 31.25 мкг/мл для аргакрила (рис. 1 и 2).

Вместе с тем очевидно, что концентрационные зависимости, характеризующие цитотоксическое действие препаратов в отношении протестированных клеточных линий, имеют определенные количественные различия, что находит свое отражение в разнице между расчетными значениями концентрации вещества, вызывающей гибель 50% опухолевых клеток (IC_{50}) для аурумакрила и аргакрила (рис. 1 и 2, табл. 1).

Так, значения IC_{50} варьируют в пределах от 10 до 35 мкг/мл для аурумакрила и в границах от 2.5 до 10 мкг/мл для аргакрила, изменяясь в зависимости от типа протестированных в данном исследовании опухолей (табл. 1).

Для более полной характеристики спектра цитотоксического действия препаратов результаты предпринятого исследования, проведенного с вышеупомянутыми культурами клеток (карцинома почки линий 769-P, Saki-2 и SK-RC-1, карцинома молочной железы BT-474, мелкоклеточная карцинома легких человека NCI-H211) проанализированы в сопоставлении с данными, полученными нами ранее для других клеточных культур (рак молочной железы MCF-7, карцинома легкого A-549, колоректальная карцинома HCT116, меланома Mel Me) [3].

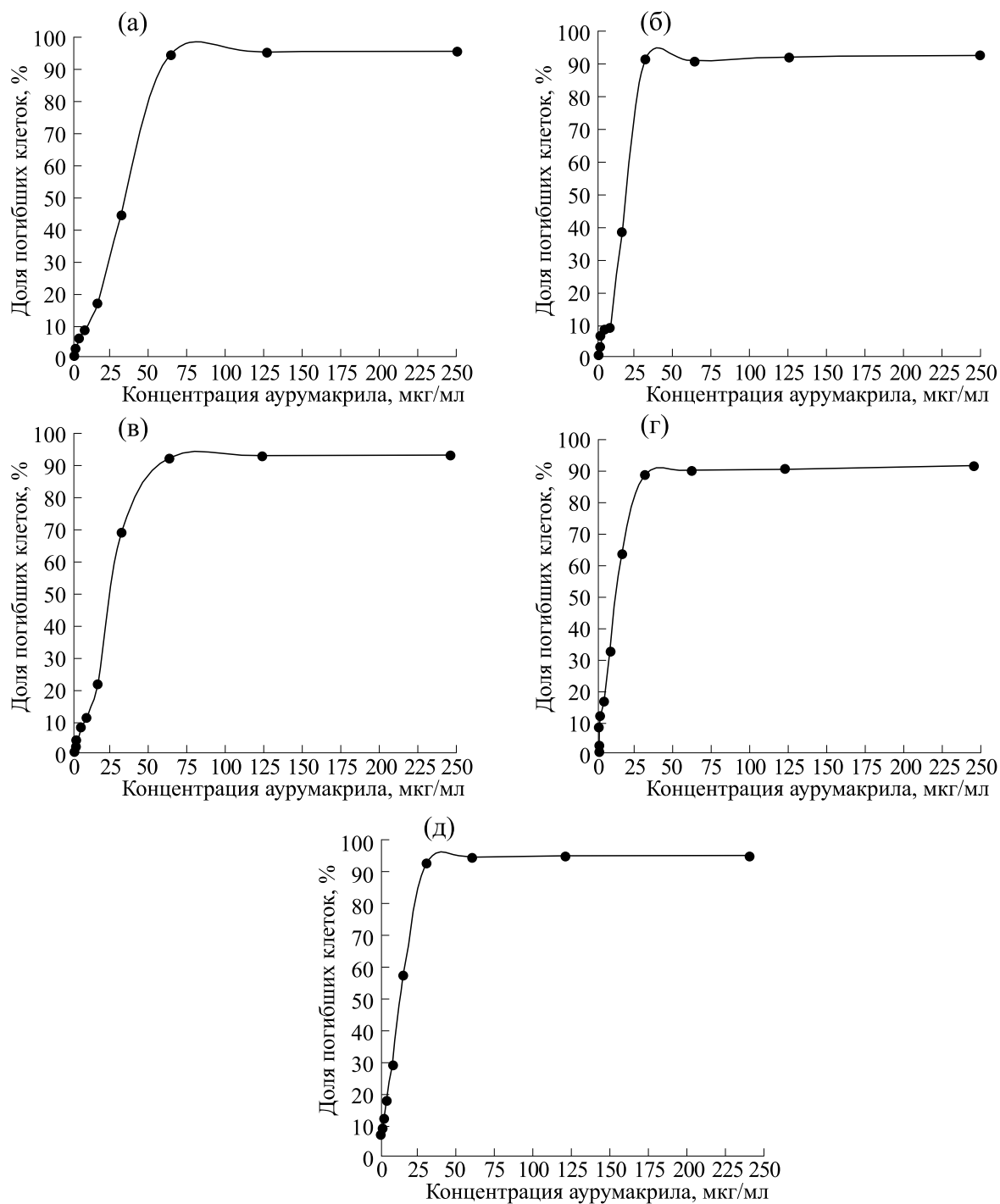


Рис. 1. Изменение доли погибших клеток ряда клеточных культур опухолей человека в зависимости от концентрации препарата аурумакрила: (а) — карцинома почки 769-Р, (б) — карцинома почки Sak-2, (в) — карцинома почки SK-RC-1, (г) — карцинома молочной железы BT-474, (д) — карцинома легких NCI-H211.

Обобщенные результаты, характеризующие в соответствии со значениями показателя IC_{50} чувствительность девяти линий различных культур опухолевых клеток к препаратам аурумакрила и аргакрила, представлены в табл. 1.

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

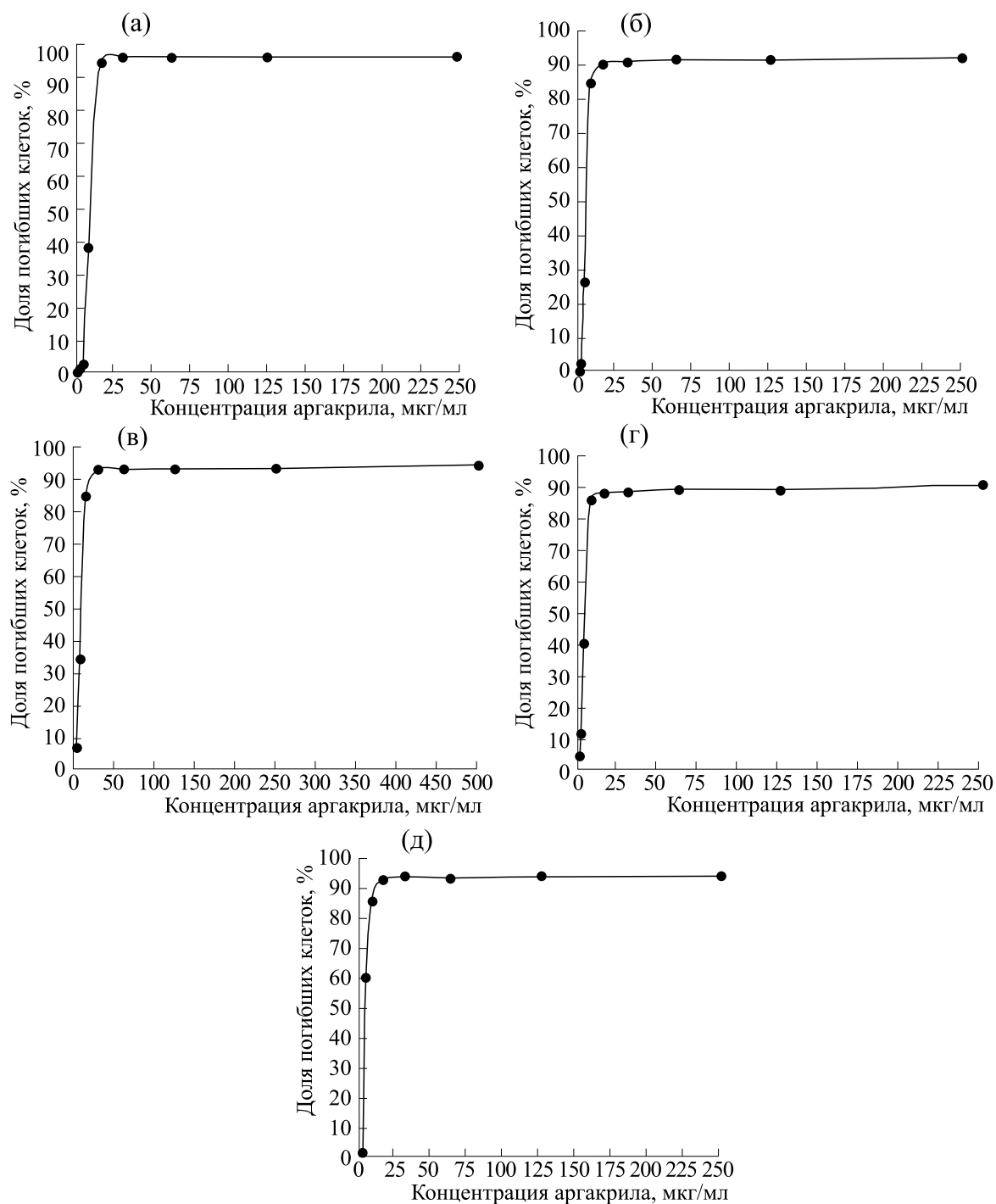


Рис. 2. Изменение доли погибших клеток ряда клеточных линий опухолей человека в зависимости от концентрации препарата аргакрила: (а) – карцинома почки 769-Р, (б) – карцинома почки Sak-2, (в) – карцинома почки SK-RC-1, (г) – карцинома молочной железы BT-474, (д) – карцинома легких NCI-H211.

входящих в них металлов, представляется уместным характеризовать цитотоксическую активность этих препаратов соответствующими показателями в пересчете на содержание золота и серебра, соответственно, которые также приведены в табл. 1.

Коэффициент цитотоксической активности IC_{50} в отношении девяти исследовавшихся клеточных культур изменяется в диапазоне от 0.8 до 5.2 мкг/мл для аурумакрила и в пределах от 0.2 до 14.4 мкг/мл для аргакрила (в пересчете на содержание золота и серебра соответственно).

Таблица 1. Значения показателя IC_{50} аурумакрила и аргакрила для ряда опухолевых клеток человека, культивируемых *in vitro*

Культура клеток	Аурумакрил	Аргакрил
	IC_{50} , мкг/мл	
Аденокарцинома почки 769-P	35 (2.8)	8 (0.6)
Светлоклеточная карцинома почки Caki-2	20 (1.6)	5 (0.4)
Карцинома почки SKRC-1	23 (1.8)	10 (0.8)
Карцинома протока молочной железы BT-474	10 (0.8)	5 (0.4)
Аденокарцинома молочной железы MCF-7	13 (1.0)	25 (2.0)
Мелкоклеточная карцинома легкого NCI-H211	14 (1.1)	2.5 (0.2)
Карцинома легкого A549	50 (4.0)	80 (6.4)
Колоректальная карцинома HCT116	65 (5.2)	180 (14.4)
Меланома Mel Me	62 (5.0)	180 (14.4)

Примечание. В скобках указаны значения концентраций IC_{50} для препаратов аурумакрил и аргакрил в пересчете на содержание золота и серебра, соответственно.

Основываясь на величине показателя IC_{50} , позволяющей дифференцировать опухоли различной природы по чувствительности к испытанным препаратам, представляется возможным охарактеризовать предполагаемый спектр их действия.

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, чувствительность культивируемых опухолевых клеток к аурумакрилу снижается в следующем ряду: карцинома молочной железы BT-474 – рак молочной железы MCF-7 – карцинома легкого NCI-H211 – карцинома почки Caki-2 – карцинома почки SK-RC-1 – карцинома почки 769-P – карцинома легкого A-549 – меланома Mel Me – колоректальная карцинома HCT116.

Чувствительность опухолевых клеток к аргакрилу уменьшается в последовательности: карцинома легкого NCI-H211 – карцинома почки Caki-2 – карцинома молочной железы BT-474 – карцинома почки 769-P – карцинома почки SK-RC-1 – рак молочной железы MCF-7 – карцинома легкого A-549 – меланома Mel Me – колоректальная карцинома HCT116.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой цитотоксической активности полиакрилатов как золота, так и серебра. Наблюдаемые при этом весьма существенные различия в спектрах летального действия аурумакрила и аргакрила на клетки разных опухолей очевидно связаны не только с различиями в природе опухолевых клеток, но также и со свойствами металлов, содержащихся в изучаемых препаратах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В экспериментальной терапии опухолей определение цитотоксической активности соединений *in vitro* на клетках разных опухолей человека является важным этапом в изучении потенциальных противоопухолевых агентов. Результаты этих исследований позволяют достаточно быстро установить целесообразность дальнейшего изучения и выбрать из нескольких близких по строению веществ наиболее перспективные. Кроме того, результаты таких исследований могут дать указания относительно опухоли с наиболее вероятной чувствительностью к изучаемому соединению, что может быть использовано при планировании и проведении последующих экспериментальных исследований *in vivo* на ксенографтах соответствующих опухолей человека и при клинических испытаниях.

При анализе полученных результатов обращает на себя внимание тот факт, что цитотоксичность аурумакрила и аргакрила практически для каждой отдельной линии клеток существенно различается.

Основываясь на величине IC_{50} можно полагать, что цитотоксичность аргакрила превосходит цитотоксичность аурумакрила для 5 из 9 изученных клеточных линий.

Особенно это выражено в отношении клеток всех трех протестированных линий опухолей почек. IC_{50} аргакрила колеблется в пределах от 0.4 до 0.8 мкг/мл, а IC_{50} аурумакрила – в диапазо-

не от 1.6 до 2.8 мкг/мл, изменяясь в зависимости от типа опухолевых клеток.

Более высокая цитотоксичность аурумакрила по сравнению с аргакрилом весьма выражена в отношении клеток меланомы Мел Ме и карциномы толстой кишки НСТ116, но при этом отметим, что цитотоксичность обоих соединений для клеток данных опухолей вообще была незначительной, значения IC_{50} были близки или выше того значения этого показателя цитотоксичности (<100 мкг/мл), который принято считать указанием на наличие значимой цитотоксичности.

Следует отметить, что имеются существенные различия в цитотоксичности аурумакрила и аргакрила для клеток разных линий одной и той же опухоли.

Так, в отношении клеток рака молочной железы линии MCF-7 цитотоксичность выше у аурумакрила, а для клеток рака молочной железы линии BT-474 у аргакрила. Возможно, это обусловлено некоторыми различиями в биологических характеристиках клеток этих линий. Исходно обе клеточные линии получены от пациенток с инвазивным протоковым раком молочной железы, но клетки линии MCF-7 происходят из метастатических клеток, выделенных из метастатической плевральной жидкости, а клетки линии BT-474 получены из первичной опухоли молочной железы. Клетки обеих линий содержат рецепторы эстрогена и прогестерона, но для клеток BT-474 характерна еще гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста HER2/new, тогда как в клетках MCF-7 этого не обнаружено.

Аргакрил обладает более выраженной, по сравнению с аурумакрилом, цитостатической активностью в отношении клеток рака легкого линии NCI-H211, тогда как для клеток рака легкого линии A549 более токсичен аурумакрил. Следует отметить, что эти две клеточные линии представляют разные гистологические типы рака легкого — линия NCI-H211 получена из мелкоклеточного рака легкого, A549 — из аденокарциномы легкого. Известно, что эти два типа рака легкого резко различаются по чувствительности к химиотерапии — при мелкоклеточном раке легкого эффективны алкилирующие препараты, особенно нитрозоалкилмочевины, а при аденокарциноме легкого препараты «традиционной» химиотерапии неэффективны. В то же время при некоторых формах аденокарциномы легкого (в частности при опухолях с мутацией ALK) эффективен ряд таргетных препаратов, которые неэффективны при мелкоклеточном раке легкого.

Важно отметить, что оба препарата показали высокую цитостатическую активность по отношению к клеткам почечно-клеточного рака, который до недавнего времени (до появления таргетных и иммунотерапевтических препаратов)

считался полностью нечувствительным к лекарственной терапии. Особенно это заметно для аргакрила, который вызывал гибель клеток всех трех линий этой опухоли при весьма низких концентрациях. Следует отметить, что клетки всех трех линий относятся к светлоклеточному гистологическому типу почечно-клеточного рака, однако исходные клетки были получены от разных пациентов и, по-видимому, были выделены из разных участков опухолей, что может отразиться на разной чувствительности к цитотоксическому действию, учитывая известную клеточную гетерогенность злокачественных опухолей.

В связи с наблюдениями, свидетельствующими о различиях в спектрах цитотоксичности аурумакрила и аргакрила, представляется уместным отметить, что ранее при исследовании механизма действия этих соединений, были выявлены определенные отличия в механизме влияния препаратов, содержащих золото и серебро, на структуру ДНК опухолевых клеток [7].

Механизм действия аурумакрила реализуется через образование однонитевых разрывов ДНК, трансформирующихся в сшивки типа «ДНК—белок».

Механизм действия аргакрила связан с индукцией однонитевых и двунитевых разрывов ДНК, число которых в два раза превосходит контрольный (спонтанный) уровень этих показателей, при отсутствии образования под влиянием препарата сшивок в молекуле ДНК [7].

Полученные в проведенном исследовании результаты могут рассматриваться в качестве экспериментального подтверждения имеющихся сведений о противоопухолевой и цитотоксической активности аурумакрила и аргакрила, свидетельствующего 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 проведены на клеточных культурах в условиях *in vitro* без привлечения лабораторных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Островская Л. А. и Корман Д. Б. *Золото и серебро в экспериментальной терапии опухолей* (Практическая медицина, М., 2023).

2. 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.
3. 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.
4. Островская Л. А., Корман Д. Б., Некрасова Е. И., Чигасова А. К., Блюхтерова Н. В., Рыкова В. А., Фомина М. М., Хоченкова Ю. А. и Абзаева К. А. Соединения золота и серебра как потенциальные противоопухолевые препараты. *Биофизика*, **69** (2), 386–398 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924020221, EDN: OTFKZY.
5. 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.
6. Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К., Андропова Н. В. и Гарин А. М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 640–654.
7. Чигасова А. К., Островская Л. А., Корман Д. Б. и Блюхтерова Н. В. Полиакрилаты благородных металлов — механизм цитотоксического действия на опухолевые клетки. *Биофизика*, **68** (6), 1187–1199 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923060108, EDN: RORUYD.

Cytotoxicity of Gold and Silver Polyacrylates for Tumor Cells

**L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman*, E.I. Nekrasova*, N.V. Bluhterova*,
U.A. Hochenkova**, and K.A. Abzaeva*****

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

**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 study of the cytotoxic activity of two polyacrylic acid-based compounds containing gold (aurumacryl) and silver (argacryl) against a panel of human tumor cell cultures (769-P, Caki-2, SK-RC-1 renal carcinoma lines, BT-474 breast carcinoma, NCI-H211 small cell lung carcinoma) was carried out in vitro. The results obtained were analyzed in comparison with the data established earlier for other cell cultures (MCF-7 breast carcinoma, A-549 lung carcinoma, HCT116 colon carcinoma, Mel Me melanoma). The IC_{50} cytotoxic index of drugs for the nine tested tumor cell lines ranged from 0.8 to 5.2 $\mu\text{g/ml}$ for aurumacryl and from 0.2 to 14.4 $\mu\text{g/ml}$ for argacryl (in terms of gold and silver content, respectively), varying depending on the type of tumor. Significant differences have been found in the spectra of the lethal effect of aurumacryl and argacryl against tumor cells of various natures.

Keywords: gold polyacrylate (aurumacryl), silver polyacrylate (argacryl), cytotoxic effect, human tumor cell cultures

УПРАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТЬЮ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ КАК СТРАТЕГИЯ ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ

© 2024 г. С.Р. Павлов*, В.В. Гурский*, **, #, М.Г. Самсонова*, А.А. Канапин*, А.А. Самсонова*

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

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

#E-mail: gursky@math.ioffe.ru

Поступила в редакцию 25.11.2023 г.

После доработки 25.11.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Актуальным направлением в борьбе с онкозаболеваниями является разработка новых стратегий лечения, связанных с воздействием на механизмы функционирования регуляторных путей и элементы генома, участвующие в злокачественной трансформации. Предлагается концепция такой стратегии, которая заключается в инициации механизмов клеточной смерти в ответ на истощение энергетических ресурсов раковой клетки из-за неконтролируемого распространения мобильных генетических элементов по ее геному. Результаты расчетов в рамках предварительной математической модели биоэнергетического баланса клетки, учитывающей энергозатраты на ретротранспозицию мобильных элементов LINE-1 и SINE, показывают принципиальную возможность такого сценария. Критическое перераспределение внутриклеточных ресурсов происходит при воздействии на механизмы геномной защиты и на скорость транскрипции LINE-1. Результатом воздействия является резкое увеличение энергетических затрат на транскрипцию ретротранспозонов, как следствие, происходит значительное уменьшение пула свободных АТФ в клетке.

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, ретротранспозоны, биоэнергетика, математическое моделирование, системная биология, онкология, клеточная смерть.

DOI: 10.31857/S0006302924050102, EDN: NLAKHR

Мобильные элементы являются перспективным объектом исследований, направленных на разработку новых методов лечения и диагностики рака [1–6]. Развитие раковых заболеваний у человека может быть связано с нарушением механизмов регуляции транспозонов, что потенциально может привести к геномной нестабильности, поломке хромосом и активации онкогенов [7]. Известно, что LINE-1 (Long INterspersed Element-1) сильно экспрессируется при многих видах рака человека, выступая в роли эндогенного мутагена [6, 8]. Одна из стратегий иммунотерапии опухолей, воспалительных заболеваний и других патологий основана на запуске в клетках интерферонов нового ответа на экспрессию мобильных элементов LINE-1 и SINE (Short INterspersed Element) [9–12]. Изучение механизмов регуляции транспозонов и их нарушений, лежащих в основе транспозон-опосредованного канцерогенеза, является одним из основных направлений исследований. В число механизмов регуляции входят альтернативный сплайсинг, делеции, вставки, ду-

пликация в генах и промоторах, приводящие к активизации, подавлению или инактивации генов [5, 6].

Другое направление исследований связано с изучением энергетического баланса и метаболизма опухолевых клеток. Существенная реорганизация биоэнергетики клетки и метаболическое перепрограммирование, происходящие в результате онкологической трансформации, приводят к нарушению энергетического гомеостаза [13, 14]. Такая трансформация определяется необходимостью распределения энергетических затрат на процессы роста, деления и выживания опухолевых клеток в рамках энергетических ограничений и возможностей метаболических путей. Высокий уровень экспрессии мобильных элементов в опухолевых клетках может приводить к нарушению энергетического баланса с последующей гибелью клеток [15, 16]. Перспективным направлением для разработки новых способов терапии представляется борьба с опухолевыми клетками путем

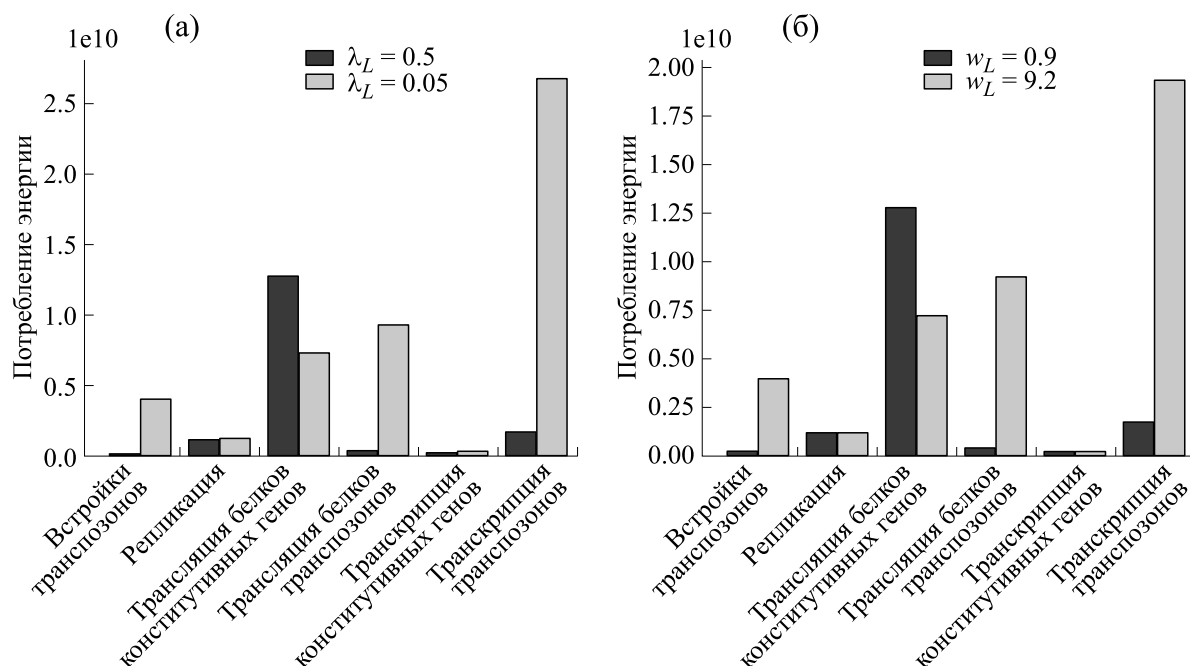


Рис. 1. Распределение энергозатрат (количество АТФ) по основным клеточным процессам в предварительной математической модели. Для каждого процесса показаны энергозатраты в нормальных условиях (черным цветом) и при возмущенном значении одного из двух параметров (серым цветом): (а) — константы скорости деградации LINE-1 λ_L (данный параметр можно связать с действием механизмов сайленсинга транспозонов), (б) — максимальной скорости транскрипции LINE-1 w_L .

нарушения энергетического обмена, вызванного повышением активности мобильных элементов.

Среди возможных методов исследования в этом направлении можно предложить методы математического моделирования динамики мобильных элементов в контексте меняющегося энергетического ресурса в раковых клетках, а также в условиях нарушения механизмов защиты генома. Поскольку растущее количество транспозонов в геноме опухолевой клетки накладывает дополнительную нагрузку на энергопотребление, искомая модель должна учитывать конкуренцию за ресурсы между различными клеточными процессами и включать результаты анализа биоэнергетических затрат на основные внутренние процессы в различных условиях [17–19]. Согласно оценкам, наиболее энергозатратной стадией клеточного цикла является трансляция [19], при этом конкуренция за рибосомы может проявляться, когда конечное количество доступных в клетке рибосом становится лимитирующим фактором [20, 21]. Энергетический метаболизм раковых клеток переключается в режим активного гликолиза (эффект Варбурга), вызывая трансформацию сигнальных каскадов в клетке и процессов транскрипции и трансляции в целом [22–24]. Показано, что клетки могут быть очень чувствительны к текущим уровням энергии и инициировать программы клеточной гибели даже при относительно умеренном падении концентрации

АТФ [25–27]. Учет в модели высокой скорости транспозиции мобильных элементов в опухолевых клетках может привести к нахождению сценариев, в которых транспозоны могут активно конкурировать с другими клеточными агентами за доступные объемы АТФ.

Существуют успешные примеры моделирования роста бактерий в контексте исследования распределения ресурсов по основным клеточным процессам, учитывающие эффекты конкуренции за ресурсы на уровне отдельных клеток и на уровне популяций [28, 29]. С помощью такого подхода, использующего формализм кинетических уравнений или стохастические методы, можно исследовать универсальные для всех живых клеток ограничения, а именно конечные уровни клеточной энергии, конечные уровни рибосом и конечное количество белков. Похожие модели могут быть применены к эукариотическим клеткам и апробированы на имеющихся данных. Мезоскопический характер моделей позволяет масштабировать их на клеточные популяции.

В ходе расчетов в рамках предварительной модели, реализующей описанный подход и учитывающей динамику транспозонов, были исследованы возможные сценарии перераспределения энергозатрат внутри клетки при нарушении механизмов регуляции транспозонов. Расчеты показывают возможность значительного влияния на

клеточные ресурсы со стороны транспозонов при модификации их скорости транскрипции и при дерегуляции механизмов сайленсинга (рис. 1). Степень уменьшения концентрации свободных АТФ в клетке при возмущении параметров в модели, связанных с активностью транспозонов, может быть достаточной для инициации программ клеточной гибели [25–27]. Полученные предварительные результаты моделирования свидетельствуют о принципиальной возможности реализации сценариев, связанных с уничтожением опухолевых клеток за счет увеличения нагрузки на энергетический баланс со стороны активизирующихся транспозонов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00153.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moreira D. A., de Lanna C. A., da Cruz J. G. V., and Boroni M. To build or to break: the dual impact of interspersed transposable elements in cancer. In *Human Genome Structure, Function and Clinical Considerations*, Ed. by L. A. Haddad (N.-Y., Springer, Cham., 2021), pp. 245–273. DOI: 10.1007/978-3-030-73151-9_8
- Demidov G., Park J., Armeanu-Ebinger S., Roggia C., Faust U., Cordts I., Blandfort M., Haack T. B., Schroeder C., and Ossowski S. Detection of mobile elements insertions for routine clinical diagnostics in targeted sequencing data. *Mol. Genet. Genom. Med.*, **9** (12), e1807 (2021). DOI: 10.1002/mgg3.1807
- Steely C. J., Russell K. L., Feusier J. E., Qiao Y., Tavtigian S. V., Marth G., and Jorde L. B. Mobile element insertions and associated structural variants in longitudinal breast cancer samples. *Sci. Rep.*, **11** (1), 13020 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-92444-0
- Solovyov A., Behr J. M., Hoyos D., Banks E., Drong A. W., Zhong J. Z., Garcia-Rivera E., McKerron W., Chu C., Zaller D. M., Fromer M., and Greenbaum B. D. Mechanism-guided quantification of LINE-1 reveals p53 regulation of both retrotransposition and transcription. *BioRxiv*, 2023.05.11.539471 (2023). DOI: 10.1101/2023.05.11.539471
- Pradhan R. K. and Ramakrishna W. Transposons: unexpected players in cancer. *Gene*, **808**, 145975 (2022). DOI: 10.1016/j.gene.2021.145975
- Burns K. H. Transposable elements in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **17** (7), 415–424 (2017). DOI: 10.1038/nrc.2017.35
- Kassiotis G. and Stoye J. P. Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat. Rev. Immunol.*, **16** (4), 207–219 (2016). DOI: 10.1038/nri.2016.27
- Ishak C. A. and De Carvalho D. D. Reactivation of endogenous retroelements in cancer development and therapy. *Annu. Rev. Cancer Biol.*, **4** (1), 159–176 (2020). DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-030419-033525
- Leonova K. I., Brodsky L., Lipchick B., Pal M., Novototskaya L., Chenchik A. A., Sen G. C., Komarova E. A., and Gudkov A. V. p53 cooperates with DNA methylation and a suicidal interferon response to maintain epigenetic silencing of repeats and noncoding RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** (1), E89–98 (2013). DOI: 10.1073/pnas.1216922110
- Chiappinelli K. B., Strissel P. L., Desrichard A., Li H., Henke C., Akman B., Hein A., Rote N. S., Cope L. M., Snyder A., Makarov V., Budhu S., Slamon D. J., Wolchok J. D., Pardoll D. M., Beckmann M. W., Zahnow C. A., Merghoub T., Chan T. A., Baylin S. B., and Strick R. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell*, **162** (5), 974–986 (2015). DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.011
- Roulois D., Loo Yau H., Singhanian R., Wang Y., Danesh A., Shen S. Y., Han H., Liang G., Jones P. A., Pugh T. J., O'Brien C., and De Carvalho D. D. DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. *Cell*, **162** (5), 961–973 (2015). DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.056
- Ishak C. A., Classon M., and De Carvalho D. D. De-regulation of retroelements as an emerging therapeutic opportunity in cancer. *Trends Cancer*, **4** (8), 583–597 (2018). DOI: 10.1016/j.trecan.2018.05.008
- DeBerardinis R. J. and Chandel N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.*, **2** (5), e1600200 (2016). DOI: 10.1126/sciadv.1600200
- Vander Heiden M. G. and DeBerardinis R. J. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell*, **168** (4), 657–669 (2017). DOI: 10.1016/j.cell.2016.12.039
- Fresquet V., Garcia-Barchino M. J., Larrayoz M., Celay J., Vicente C., Fernandez-Galilea M., Larrayoz M. J., Calasanz M. J., Panizo C., Junza A., Han J., Prior C., Fortes P., Pio R., Oyarzabal J., Martinez-Baztan A., Pavia B., Moreno-Aliaga M. J., Otero M. D., Agirre X., Yanes O., Prosper F., and Martinez-Climent J. A. Endogenous retroelement activation by epigenetic therapy reverses the warburg effect and elicits mitochondrial-mediated cancer cell death. *Cancer Discov.*, **11** (5),

- 1268–1285 (2021). DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1065
16. Takeshima H., Yoda Y., Wakabayashi M., Hattori N., Yamashita S., and Ushijima T. Low-dose DNA demethylating therapy induces reprogramming of diverse cancer-related pathways at the single-cell level. *Clin. Epigenetics*, **12** (1), 142 (2020). DOI: 10.1186/s13148-020-00937-y
 17. Wagner A. Energy constraints on the evolution of gene expression. *Mol. Biol. Evol.*, **22** (6), 1365–1374 (2005). DOI: 10.1093/molbev/msi126
 18. Lane N. and Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature*, **467** (7318), 929–934 (2010). DOI: 10.1038/nature09486
 19. Lynch M. and Marinov G. K. The bioenergetic costs of a gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112** (51), 15690–15695 (2015). DOI: 10.1073/pnas.1514974112
 20. Raveh A., Margaliot M., Sontag E. D., and Tuller T. A model for competition for ribosomes in the cell. *J. R. Soc. Interface*, **13** (116), 20151062 (2016). DOI: 10.1098/rsif.2015.1062
 21. Rogalla P. S., Rudge T. J., and Ciandrini L. An equilibrium model for ribosome competition. *Phys. Biol.*, **17** (1), 015002 (2019). DOI: 10.1088/1478-3975/ab4fbc
 22. Vander Heiden M. G., Cantley L. C., and Thompson C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, **324** (5930), 1029–1033 (2009). DOI: 10.1126/science.1160809
 23. Hanahan D. and Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144** (5), 646–674 (2011). DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013
 24. Kasperski A. and Kasperska R. Bioenergetics of life, disease and death phenomena. *Theor. Biosci.*, **137** (2), 155–168 (2018). DOI: 10.1007/s12064-018-0266-5
 25. Eguchi Y., Shimizu S., and Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.*, **57** (10), 1835–1840 (1997).
 26. Lieberthal W., Menza S. A., and Levine J. S. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **274** (2), F315–F327 (1998). DOI: 10.1152/ajprenal.1998.274.2.f315
 27. Skulachev V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*, **11** (4), 473–485 (2006). DOI: 10.1007/s10495-006-5881-9
 28. Weiße A. Y., Oyarzún D. A., Danos V., and Swain P. S. Mechanistic links between cellular trade-offs, gene expression, and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112** (9), E1038–E1047 (2015). DOI: 10.1073/pnas.1416533112
 29. Thomas P., Terradot G., Danos V., and Weiße A. Y. Sources, propagation and consequences of stochasticity in cellular growth. *Nat. Commun.*, **9** (1), 4528 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-06912-9

Control of the Activity of Mobile Elements in Cancer Cells as a Strategy for Anticancer Therapy

S.R. Pavlov*, V.V. Gursky*, **, M.G. Samsonova*, A.A. Kanapin*, and A.A. Samsonova*

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

**Ioffe Physical-Technical Institute, Polytekhnicheskaya ul. 26, Saint Petersburg, 194021 Russia

An important direction in cancer prevention is the development of novel strategies that can be used in the treatment by affecting the mechanisms of the regulatory pathways and genomic elements involved in malignant transformation. Strategy proposed in this study is to initiate cell death mechanisms in response to the depletion of the energy resources within a cancer cell due to the uncontrolled spread of mobile genetic elements throughout its genome. The calculation results obtained using a preliminary mathematical model that simulates cellular bioenergetic balance, taking into account the energy consumption for retrotransposition of the mobile elements such as LINE-1 and SINE, show that this scenario is plausible. Intracellular resources undergo a critical redistribution when affecting the genomic defense mechanisms and the LINE-1 transcription rate. This leads to a sharp increase in energy consumption for retrotransposon transcription that causes a significant decrease in the pool of free ATPs in the cell.

Keywords: mobile genetic elements, retrotransposons, bioenergetics, mathematical modeling, systems biology, oncology, cell death

МЕХАНИЗМЫ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

© 2024 г. М.Г. Шарапов*, #, Е.Е. Карманова*, С.В. Гудков**

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

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

#E-mail: sharapov.mg@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.10.2024 г.

После доработки 01.10.2024 г.

Принята к публикации 16.10.2024 г.

Лучевая терапия занимает одно из ключевых мест в арсенале методов лечения онкологических заболеваний. Этот неинвазивный метод активно применяется на протяжении многих десятилетий и демонстрирует высокую эффективность в борьбе с различными видами злокачественных новообразований. Несмотря на значительный прогресс в технологиях доставки ионизирующего излучения и внедрение таргетных препаратов-радиосенсибилизаторов и иммунотерапии, классическая лучевая терапия сталкивается с ограничениями, которые связаны с радиорезистентностью опухолевых клеток. Это обусловлено множеством факторов, таких как генетические мутации, метаболические особенности раковых клеток, их способность к репарации ДНК, наличие опухолевого микроокружения и многие другие. Радиорезистентность опухолей снижает успех лечения, что делает необходимым поиск новых подходов к повышению эффективности лучевой терапии. В этом обзоре обсуждаются основные принципы лучевой терапии и свойства раковых клеток, влияющие на их радиочувствительность. Рассматриваются как существующие методы преодоления радиорезистентности раковых клеток, так и перспективы их дальнейшего развития, что может значительно повысить эффективность лечения онкологических заболеваний.

Ключевые слова: рак, лучевая терапия, радиорезистентность.

DOI: 10.31857/S0006302924060117, EDN: NKWBSV

Заболеваемость раком становится все более серьезной проблемой для мирового здравоохранения. Примерно каждый пятый человек в течение

своей жизни сталкивается с этим заболеванием. Согласно данным Международного агентства по исследованию рака (International Agency for

Сокращения: ЛТ — лучевая терапия, ИИ — ионизирующее излучение, АФК — активные формы кислорода, DSB — двухцепочечные разрывы (double strand break), НМРЛ — немелкоклеточный рак легких, ТМЕ — микроокружение опухоли (tumor microenvironment), FDA — Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration), ICD — иммуногенная гибель клеток (immunogenic cell death), РСК — раковые стволовые клетки, ЕМТ — эпителиально-мезенхимальный переход (epithelial-mesenchymal transition), АТМ — серин/треониновая киназа или мутировавшая атаксия-телеангиэктазия (ataxia telangiectasia mutated), АТР — атаксия-телеангиэктазия и белок, связанный с Rad3 (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), DDR — ответ на повреждение ДНК (DNA damage response), PARP — поли[АДФ-рибоза]полимераза (poly[ADP-ribose]polymerase), PI3K — фосфоинозитид-3-киназа (phosphoinositide 3-kinases), EGFR — рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor), Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) — ядерный фактор эритроидный 2-родственный фактор 2, HIF — фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia-inducible factor), ЖК — жирные кислоты, CAF — ассоциированные с раком фибробласты (cancer-associated fibroblasts), TAM — ассоциированные с раком макрофаги (tumor-associated macrophages), MDSC — супрессорные клетки миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells), PAMP — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns), DAMP — молекулярные паттерны, связанные с повреждением (damage-associated molecular patterns), Akt (protein kinase B (PKB)) — протеинкиназа B, CDK (cyclin-dependent kinase) — циклин-зависимые киназы, CHK (checkpoint kinase) — киназа контрольной точки, EGF (epidermal growth factor) — эпидермального фактора роста, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) — рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2, MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases) — p38 митоген-активируемые протеинкиназы, NF-κB (nuclear factor κ of activated B cells — ядерный фактор κ активированных В-клеток), STAT (signal transducer and activator of transcription) — белки трансдукторы сигналов и активаторы транскрипции, TAM (tumor-associated macrophages) — ассоциированные с раком макрофаги, TGFβ (transforming growth factor β) — трансформирующий фактор роста β, VEGF (vascular endothelial growth factor) — фактор роста эндотелия сосудов, лнРНК (lncRNA) — длинные некодирующие РНК, микроРНК (miR) — малые интерферирующие РНК, нкРНК — некодирующие РНК.

Research on Cancer, IARC), в 2022 г. было зарегистрировано около 20 миллионов новых случаев рака и 9.7 миллиона смертей от этого заболевания. Прогнозы неутешительны: к 2050 г. число новых случаев рака может достигнуть 35 миллионов, что демонстрирует нарастающий характер онкологических заболеваний и их значительное влияние на мировое сообщество [1]. В Российской Федерации также наблюдается тревожный рост заболеваемости. В 2022 г. было выявлено 624 835 новых случаев злокачественных новообразований, что на 7.6% больше по сравнению с 2021 г., когда было зафиксировано 580 415 случаев [2]. Это говорит о том, что онкология остается одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения в стране. Рак легких был наиболее часто диагностируемым типом рака в 2022 г., на него пришлось 12.4% всех случаев рака в мире. За ним следуют рак груди (11.6%), колоректальный рак (9.6%), рак простаты (7.3%) и рак желудка (4.9%). Эта статистика подчеркивает, что рак легких не только лидирует по числу новых случаев, но и является основной причиной смертности от рака, вызывая 1.8 миллиона смертей в год, что составляет 18.7% всех случаев смерти от рака. Колоректальный рак, рак печени, рак груди и рак желудка также входят в пятерку основных причин смертности [1]. Однако важно отметить, что эти показатели могут значительно варьироваться в зависимости от региона, отражая различия в доступе к медицинским услугам, уровнях диагностики и образе жизни [1].

Онкологи отмечают, что классическая химиотерапия и лучевая терапия, которые долгое время были основными методами лечения рака, уже достигают пределов своей эффективности. В связи с этим существует острая необходимость в разработке альтернативных подходов, которые могли бы повысить эффективность лечения и улучшить прогноз для пациентов [3, 4]. В последние 20 лет в области онкологии был достигнут значительный прогресс, особенно в части обнаружения и терапии рака. Современные методы лечения включают таргетную терапию [5, 6], иммунотерапию [7–9], а также антитела – конъюгаты лекарственных средств, которые демонстрируют многообещающие результаты в борьбе с раком [6, 10, 11]. Кроме того, персонализированные подходы, основанные на машинном обучении, открывают новые горизонты в онкологическом лечении, позволяя максимально точно адаптировать терапию под конкретного пациента [12].

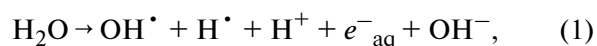
Таким образом, несмотря на рост онкологической заболеваемости, разработки и усовершенствования новых методов диагностики и лечения рака продолжаются. Особое внимание уделяется преодолению радиорезистентности опухолей и уменьшению побочных эффектов лучевой тера-

пии, что остается одной из самых актуальных биомедицинских проблем на сегодняшний день.

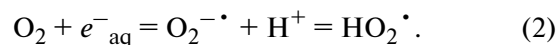
ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ РАКА

Лучевая терапия (ЛТ) как сама по себе, так и в сочетании с другими методами, по-прежнему остается важнейшей стратегией лечения для многих неоперабельных форм рака (около 65% всех случаев) [9, 12–15]. В России ЛТ получают до 60% онкологических больных в зависимости от вида опухоли. В 2022 г. как самостоятельный метод ЛТ была использована в 7.0% случаев, а в комбинированных стратегиях – в среднем в 50% случаев [2]. Следует также отметить, что при некоторых формах рака ЛТ может оказаться не только наиболее безопасным и эффективным способом лечения, но также и экономически более выгодным подходом [19, 20]. Однако ее эффективность не одинакова для различных видов опухолей. ЛТ ограничивается радиорезистентностью и токсичностью для нормальных тканей. Хирургические и химиотерапевтические методы так же имеют свои ограничения [9, 12–16]. Например, рутинно используемые стандартные методы лечения опухолей головного мозга неэффективны: химиотерапия – из-за гематоэнцефалического барьера, системной токсичности и множественной лекарственной устойчивости, хирургическая резекция – из-за диффузной инвазии, инфильтративного разрастания и нечетких границ опухоли, а ЛТ – из-за повреждения здоровых клеток головного мозга [17, 18].

ЛТ основана на прямом и косвенном воздействии ионизирующего излучения ИИ на опухолевые клетки [21]. Ионизирующее излучение убивает клетки либо напрямую вызывая повреждение ДНК, либо за счет реактивных продуктов радиолитиза воды (реакция 1):



который усиливается в присутствии кислорода – «кислородный эффект» (реакция 2):



Эти первичные продукты реагируют между собой [22], образуя широкий спектр низкомолекулярных активных форм кислорода (АФК) (OH^\bullet , H^\bullet , HO_2^\bullet , $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , $^\bullet\text{NO}$, ONOO^- , HCO_3^\bullet) и продуктов их реакции с другими биомолекулами (органические радикалы (R^\bullet , RO^\bullet , ROO^\bullet) и гидропероксиды (ROOH)) [23, 24]. В итоге образуются гидропероксиды липидов, карбонилы и долгоживущие радикальные формы белков [25], которые могут быть значительно разрушительнее первичных АФК [23]. Поскольку воздействие ИИ на нормальные клетки такое же, основным недостатком лучевой терапии является ее неспе-

цифичность [17]. Облучение, как правило, проводится в виде фракционированных доз в течение нескольких дней или недель. Классический режим фракционирования — это ежедневные фракции по 1.8–2.0 Гр, 5 дней в неделю, что в течение 3–7 недель позволяет достигнуть общей дозы 30–70 Гр [26]. Преимуществам фракционированного излучения при традиционной фотонной терапии способствуют «4R» — восстановление, репопуляция, перераспределение и реоксигенация (Repair, Repopulation, Redistribution, Reoxygenation), которые составляют фундаментальное обоснование радиационного фракционирования [27]. Однако установлено, что проведение длительных курсов ЛТ может отрицательно сказываться на эффективности лечения. Причиной этому является ускоренная репопуляция клонов опухоли, которые приобретают устойчивость к действию радиации [28, 29]. Радиорезистентные формы раковых клеток могут быть в разы и даже на порядки более устойчивыми к действию ИИ, а летальная доза может достигать 120 Гр [30]. Поэтому, в зависимости от особенностей опухоли и ее ответа на лечение, могут применяться альтернативные схемы, в том числе ускоренное фракционирование (гипер- и гипофракционирование). Гипофракционирование — это использование фракций более 2 Гр [26]. Гипофракционирование может нивелировать проблему резистентности, но оно неэффективно для сильно гипоксических раковых клеток, поэтому требуется либо системное адъювантное лечение, либо дальнейшее увеличение дозы [31]. Из-за этого гипофракционирование все равно может привести к побочным реакциям и плохому прогнозу [28]. Клинические испытания гиперфракционирования, направленного на снижение токсичности для нормальных тканей и повышение контроля опухоли, не увенчались успехом [26]. Поэтому идентификация прогностических биомаркеров радиорезистентности и возможность прогнозировать ответ на ЛТ может иметь решающее значение для принятия решения о выборе в пользу того или иного метода облучения или иных методов лечения [16, 32], а также для прогнозирования и оценки ответа на новые комбинированные схемы лечения [12]. Однако исследования биомаркеров для прогнозирования радиорезистентного рака часто демонстрируют противоречивые результаты из-за различий в использовании биологических материалов, методов идентификации и терапевтических режимов [33].

В лучевой терапии используют ионизирующее фотонное (рентгеновское и гамма-излучение) или корпускулярное излучение (нейтроны, электроны, протоны и тяжелые ионы) [27, 28, 34, 35]. Фотонное ИИ (традиционная ЛТ) имеет низкую линейную передачу энергии и меньше повреждает ДНК напрямую, а корпускулярное (адронная

терапия) обладает высокой линейной передачей энергии и создает больше наиболее критичных двуцепочечных разрывов ДНК (DSB) [4, 13, 27]. В настоящее время, хотя и ограниченно [12], для лечения рака используются следующие три типа адронной терапии: протонно-лучевая терапия, углеродно-ионная ЛТ и бор-нейтронозахватная терапия [8, 27, 36]. За счет высокой линейной передачи энергии, возможности высвобождать большую часть энергии в нужной точке пространства (пик Брэгга) [27, 36], а также слабого влияния на некоторые пути радиорезистентности, обусловленные генерацией АФК [31], адронная терапия в некоторых случаях может преодолевать радиорезистентность раковых клеток и снижать токсичность ЛТ [4, 12]. В настоящее время для лечения рака используется или находится на стадии разработки и внедрения в клиническую практику ряд высокотехнологичных лучевых методов лечения и диагностики [12, 19, 32, 37], включая брахиотерапию [4], внешнюю ЛТ (external beam radiation therapy, EBRT) [38], ЛТ под визуальным контролем (image-guided radiotherapy, IGRT) [39], ЛТ с модулированной интенсивностью (intensity-modulated radiotherapy, IMRT), объемно-модулированную дуговую терапию (volumetric-modulated arc therapy, VMAT) [40], компьютерную томографию с конусным лучом (cone-beam computed tomography, CBCT) [41], стереотаксическую ЛТ (stereotactic body radiotherapy, SBRT) [42], стереотаксическую радиохимию (stereotactic radiosurgery, SRS) [43], высокодозное облучение (high dose rate, HDR) и низкодозное облучение (low dose rate, LDR) [44]. Помимо этого, повышается точность системы дозоанатомического планирования с использованием объединенных технологий компьютерной, магнитно-резонансной и позитронно-эмиссионной томографии [4].

Зачастую одной лучевой терапии недостаточно для лечения рака, и с успехом используется комбинированная терапия, включающая двух- или трех-, а в последнее время даже четырехкомпонентное лечение. Иммунотерапия сегодня дополнила три традиционных метода лечения: хирургию, ЛТ и химиотерапию, а новейшие таргетные методы лечения, вероятно, станут пятым компонентом лечения рака [8, 17, 18]. Например, при лечении немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) ЛТ играет ключевую роль, несмотря на радиорезистентность опухолей и системную токсичность [15], и для повышения эффективности ЛТ при НМРЛ разрабатываются стратегии сочетания с ингибиторами иммунных контрольных точек, химиотерапевтическими и таргетными препаратами [14]. Поэтому базовые «4R» недавно были расширены до «6R» — радиочувствительность, восстановление, перераспределение, репопуляция, реоксигенация, реактивация иммунного ответа (Radiosensitivity, Repair, Redistribu-

tion, Repopulation, Reoxygenation, Reactivation of the immune response) [45]. Для некоторых видов рака также подходит гормональная терапия [46, 47]. К примеру, резистентность к тамоксифену рака молочной железы обеспечивает активация передачи сигналов STAT3 [47], поэтому нацеливание на STAT3 в этом случае может быть потенциальной таргетной терапией в дополнение к гормональной терапии тамоксифеном [48].

Химиотерапевтические соединения (алкилирующие агенты, нитрозомочевины, антиметаболиты, антрациклины, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы митоза, кортикостероиды и др.) оказывают противоопухолевое действие широкого спектра, вызывая обширные повреждения ДНК (одно- и двухцепочечные разрывы) в быстро пролиферирующих клетках опухоли [13, 24]. Различные комбинации ЛТ и химиотерапии (доксорубин, цисплатин, оксалиплатин, темозоломид, гемцитабин, карбоплатин и др.) используются давно и нацелены на синергичное усиление повреждения ДНК раковых клеток [24].

Важность иммунной регуляции для прогрессирования рака можно объяснить наличием в микроокружении опухоли (TME – tumor microenvironment) повышенного количества иммуносупрессивных факторов и клеток, а также дефицитом сигналов, активирующих иммунную систему [49] (см. ниже). Применение иммунотерапии уже прочно вошло в клиническую практику и исследования направлены не только на поиск новых перепаратов, но и на расширение применения уже одобренных. Например, гуманизированное моноклональное антитело ганитумаб (AMG479) является одним из новейших и высокоэффективных ингибиторов инсулиноподобного фактора роста (IGF1, IGF2) или инсулинопосредованной активации его рецептора IGF1R. Ганитумаб усиливает цитотоксические эффекты карбоплатина или паклитаксела, одобрен управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и проходит другие клинические испытания с различными видами рака и различными типами химиотерапии [6]. На сегодняшний день существует несколько моноклональных антител, нацеленных на ингибирующие рецепторы Т-клеток (белок запрограммированной смерти-1 (PD-1) [10, 50] и белок-4 ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA4), которые были одобрены FDA для лечения ряда видов рака [11]. Популярным направлением является разработка персонализированных противоопухолевых вакцин на основе раковых клеток, полученных от пациентов. Для этого используются либо дендритные клетки, примированные лизатами опухолевых клеток, либо умирающие раковые клетки [51]. Во втором случае повышения эффективности можно достигнуть индукцией иммуногенной

гибели клеток (ICD – immunogenic cell death) (см. ниже) [52]. Эти положительные результаты подчеркивают тот факт, что у небольшой части пациентов иммунная система способна распознавать и уничтожать раковые клетки, если подается достаточное количество ко-стимулирующих сигналов. Но клинический опыт иммунотерапии также показал, что многие опухоли обладают высокой степенью первичной или приобретенной резистентности, что препятствует положительному эффекту для большинства пациентов [53], и переход от доклинических исследований к клиническим испытаниям оказывается провальным [6]. В итоге менее 30% пациентов получают пользу от иммунотерапии, поэтому необходимы комбинированные подходы [8]. Сочетание ЛТ с иммунотерапией является одним из самых перспективных подходов. ИИ дозозависимым образом может вызывать ICD, которая активирует врожденный и адаптивный иммунитет против рака, а неповрежденная иммунная система необходима для эффективной ЛТ [9]. ЛТ может преодолеть ограничения ингибиторов иммунных контрольных точек [8] и высокая эффективность иммунотерапии в сочетании с ЛТ показана даже при иммунно-дефицитных опухолях [54]. В свою очередь, иммунотерапия также может сделать опухоли чувствительными к ЛТ, например, способствуя гибели опухолевых клеток по пути ферроптоза (см. ниже) [55]. Однако на практике эта комбинация имеет множество нюансов. При сочетании иммунотерапии с ЛТ необходимо учитывать, что ИИ оказывает модулирующий эффект на иммунную реакцию в TME, которая зависит как от дозы, так и от типа излучения [8]. Например, облучение низкими дозами (0.5–2.0 Гр на дозу) может использоваться в качестве низкотоксичного лечения в синергизме с иммунотерапией для противоопухолевого перепрограммирования TME [13, 54, 56], однако низкие дозы могут вызвать радиоадаптивный ответ [13]. Воздействие ИИ в некоторых случаях индуцирует системные иммунные реакции, ослабляя рост опухолей, не подвергавшихся непосредственному лечению – абскопальный эффект [57], который значительно ускоряется иммунотерапией [8]. Дополнительно, по сравнению с дистанционной ЛТ брахиотерапия показывает лучшие результаты в сочетании с иммунотерапией у пациентов с метастазами [4]. В результате возникли два перспективных направления разработок комбинированной терапии: сочетание иммунотерапии с ЛТ и воздействие на метастатические опухоли с помощью ИИ для достижения ICD [8, 9], получившего название «эффект RadScopal» [58]. К сожалению, при переходе к клиническим испытаниям существуют значительные сложности подбора временных рамок сочетания иммунотерапии и ЛТ, так как от этого критически зависят как эффективность синерге-

тического действия, так и побочные эффекты, связанные с комбинированной терапией [8].

Гены и эпигенетические изменения, обуславливающие радиорезистентность, могут быть либо уже активными в раковых клетках (и в этом случае они являются потенциальными биомаркерами врожденной радиорезистентности) [56], либо ИИ может их активировать во время лучевой терапии [59, 60]. Таргетная (направленная) терапия против идентифицированных эффекторов (генов) радиорезистентности показала многообещающие результаты в доклинических и клинических исследованиях, улучшая эффективность ЛТ [5]. Например, потенциальными клинически значимыми биомаркерами для таргетной терапии могут быть особенности экспрессии онкогенов, репарация ДНК и ее дефекты, ферменты посттрансляционной модификации, нкРНК и др. [12, 31, 56, 61, 62]. Таргетная терапия является перспективной и многообещающей темой исследований, но ее реализация усложняется из-за множества пересечений между сигнальными путями и их вариативностью в различных опухолях [56]. Таргетная терапия может ориентироваться как на коррекцию одного из этапов ответа клетки на воздействие, например, реакцию клетки на индуцированные лучевой терапией DSB [12], так и на ключевых участников сразу нескольких путей клеточного ответа на лечение, например, p53 [31]. Однако эффективность однонаправленных препаратов ограничена и необходимо разрабатывать многоцелевые препараты с синергическим эффектом и низкой токсичностью [14]. Так же необходимо учитывать, что воздействия на разных участников одной сигнальной оси, участвующей в резистентности, может иметь значительную разницу по эффективности [8]. Поскольку мишени таргетной терапии напрямую связаны с механизмами радиорезистентности, подробнее о некоторых ее вариантах мы скажем ниже, при обсуждении непосредственно факторов радиорезистентности.

РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК

За последние 20 лет исследования рака позволили идентифицировать множество факторов устойчивости к существующим методам лечения. Однако на сегодняшний день механизмы развития резистентности опухолей изучены недостаточно и являются предметом активных исследований, в том числе из-за ограниченного доступа к образцам пациентов, гетерогенности опухолей и сложности полноценного воспроизведения их биологии в модельных системах [13]. Далее мы будем говорить о радиорезистентности, но подавляющее большинство этих механизмов участвуют

в резистентности и к остальным методам лечения, таким как химиотерапия [63].

Рак приобретает устойчивость к лучевой терапии за счет врожденной и приобретенной радиорезистентности [14]. Врожденная радиорезистентность в основном связана с локализацией опухоли [19], онкогенными мутациями, раковыми стволовыми клетками (РСК) и опухолевой гипоксией [7, 14, 56, 64, 65]. В ответ на терапию происходят изменения на клеточном и молекулярном уровнях (особенно на уровне транскриптома и метилома), которые могут быть причиной возникновения приобретенной терапевтической резистентности [66]. Приобретенная радиорезистентность в основном связана с ферментами репарации ДНК и регуляции клеточного цикла, метаболическим и эпигенетическим перепрограммированием, ремоделированием ТМЕ, иммунным ответом, стареющими клетками, эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT — epithelial-mesenchymal transition) [56, 67], а так же опухолевой микробиотой (интратуморальный микробиом) для некоторых опухолей кожи пищеварительной, дыхательной и мочеполовой систем [14, 68]. В итоге опухоль обладает такими путями выживания, как повышение экспрессии генов антиоксидантных ферментов [69], увеличение эффективности репарации повреждений ДНК, устойчивость к апоптозу (или другим формам клеточной гибели), репопуляция опухолевых клеток [7, 14, 56], внутриопухолевая гетерогенность, способность к метастазированию и инвазии [67, 70], множественная лекарственная устойчивость [63, 71, 72] и уклонение от иммунитета [7, 56].

Локализация опухоли. На радиочувствительность клеток оказывает влияние гистологическое строение опухоли или ее локализация. Например, некоторые раковые клетки, расположенные дальше от места применения ЛТ, получают меньшую интенсивность ионизирующего излучения [19]. Опухоли плотных тканей (например, остеосаркомы) обычно более радиорезистентны, чем опухоли мягких тканей (например, лимфосаркомы). Это явление обусловлено присутствием более резистентных гипоксических и аноксических клеток в опухоли. В итоге остеосаркомы требуют сложного лечения, включающего резекцию опухоли и высокие дозы ЛТ [12].

Репарация ДНК и клеточный цикл. Тип повреждения ДНК, вызванного ЛТ, определяет ее эффективность, а радиорезистентность опухоли к ЛТ возникает в результате нарушения регуляции системы репарации ДНК [13]. Воздействие ИИ вызывает одноцепочечные и двухцепочечные разрывы ДНК, повреждение оснований и перекрестные связи ДНК-белок в хромосомах [13, 14, 56]. Среди них DSB являются наиболее опасными

поражениями, которые могут привести к нестабильности генома и гибели клеток [13, 56]. В ответ происходит остановка клеточного цикла и восстановление ДНК различными путями, что и вызывает радиорезистентность. Повреждение ДНК сначала распознается двумя киназами — ATM и ATR. ATM распознает DSB, а ATR может обнаруживать одноцепочечные разрывы ДНК и изменения репликационной вилки. После распознавания DSB ATM фосфорилирует гистон H2AX (γ H2AX), участвующий в стабилизации концов ДНК и рекрутировании комплексов репарации ДНК. ATM и ATR также фосфорилируют киназы контрольных точек (CHK1 и CHK2), что приводит к остановке клеточного цикла. Они фосфорилируют p53, наиболее изученный белок, подавляющий опухоль. Раковые клетки могут противостоять радиации, увеличивая свою эффективность в восстановлении ДНК за счет повышенной экспрессии белков, участвующих в распознавании и восстановлении повреждений ДНК, включая ATM и ATR [12–14, 24]. Лекарства, нацеленные как на ATR, так и на ATM, проходят клинические испытания и одобрены FDA [8, 12]. После распознавания реализуется один или несколько путей ответа на повреждение ДНК (DDR — DNA damage response): репарация ошибочного спаривания, репарация вырезания оснований, репарация одноцепочечного разрыва, репарация эксцизионного нуклеотида, синтез трансповреждения, путь анемии Фанкони и репарация DSB посредством происходящего с ошибками негомлогичного соединения концов и относительно безошибочной гомологичной рекомбинации, ключевым участником которой является поли[АДФ-рибоза]-полимераза (PARP), ингибиторы которой используются в клинической практике [12, 13, 73]. Основным недостатком ингибиторов PARP является быстрое возникновение приобретенной резистентности, которая опосредована множеством механизмов [74]. То, как клетки выбирают путь для восстановления DSB, зависит от нескольких факторов, включая фазу клеточного цикла, качество хроматина (эухроматин против гетерохроматина) и размер вырезаемой ДНК, что оказывает прямое влияние на терапевтическую эффективность ингибиторов PARP, используемых в клинической практике [13, 32], наряду с определением количества DSB [12]. Низкий уровень повреждений ДНК запускает механизмы репарации ДНК и контрольные точки повреждения ДНК, которые останавливают прогрессирование клеточного цикла при наличии повреждения ДНК и позволяют клеткам восстанавливать ДНК перед возвращением в пролиферативный пул [13]. Например, семейство фосфоинозитид-3-киназ (PI3K), дополнительно активируемое ионизирующим излучением, способствует образованию радиорезистентных кло-

нов, усиливает DDR и ингибирует развитие ИИ-индуцированного апоптоза. Активированные киназы PI3K/Akt также способствуют росту и пролиферации опухолевых клеток, инвазии, метастазированию и ангиогенезу [56]. Ингибиторы PI3K/Akt в настоящее время используются в клинической практике для повышения чувствительности опухолей к медикаментозному лечению [8, 75, 76].

Клетки одной природы, облученные в разных фазах клеточного цикла, обладают разной радиочувствительностью. В частности, клетки наиболее чувствительны к облучению во время фазы G2/M, менее чувствительны во время фаз G1 и S и наименее чувствительны во время поздней S-фазы, что связано с повышенной активностью гомологичных механизмов репарации [69]. В обзоре [13] обсуждается роль генетических и эпигенетических факторов, таких как метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистонов и/или ремоделирование хроматина, изменение экспрессии нкРНК, участвующих в модуляции репарации ДНК и DDR, которые способствуют радиорезистентности. В итоге нацеливание на компоненты DDR и/или регуляторы клеточного цикла может преодолеть радиационно-индуцированную радиорезистентность. Ингибиторы DDR, многие из которых находятся в доклинической и клинической разработке, могут быть нацелены на ATM, ATR, CDK1, CDK4/6, CHK1, PARP-1, DNA-PKcs, Wee1, MPS1/TTK и др. [8, 13, 24, 73]. К сожалению, клиническая разработка ингибиторов CDK затруднена из-за недостаточной эффективности и токсичности для пациентов [77]. Но поиск новых мишеней продолжается. Например, нокдаун киназы 1, связанной с рецептором интерлейкина-1 (IRAK1) способствует остановке фазы G2/M, апоптозу и радиосенсибилизации клеток глиомы при обработке ИИ [18]. При дефектах репарации ДНК раковые клетки становятся более зависимыми от альтернативных путей DDR [24] или к зависимости от конкретного DDR, идентификация которого может быть использована в синергическом или синтетическом летальном терапевтическом подходе [73]. Однако из-за множественных механизмов радиорезистентности лекарства, нацеленные только на одну цель, зачастую неэффективны, требуется сочетание нескольких мишеней. Помимо этого, DDR также может способствовать высвобождению цитокинов и хемокинов, а также запускать воспалительные реакции и изменения в ТМЕ [56]. Эффективное объединение нескольких мишеней все еще требует дополнительных исследований [14].

Мутагенез раковых клеток и эпигенетические изменения. Развитие и прогрессирование рака тесно связаны с активацией онкогенов и потерей генов-супрессоров опухоли, а также запуском

сигнальных путей, регулирующих аномальный окислительно-восстановительный (редокс) статус [78]. Поэтому реакция на ЛТ у пациентов сильно варьируется из-за врожденных генетических различий и профиля экспрессии генов [19, 79]. Система репарации ДНК в клетках опухоли не способна в полной мере устранить повреждения геномной ДНК, возникшие в ходе терапевтического облучения, что увеличивает количество мутаций. Это может привести к приобретенной генетической гетерогенности и появлению новых радиорезистентных популяций раковых клеток [19]. Онкогенные мутации в раковых клетках также могут модулировать метаболизм иммунных клеток в ТМЕ, способствуя прогрессированию опухоли [80]. При этом уровень генетических изменений среди всех типов рака может варьироваться [81]. Данная проблема является очень объемной, поэтому советуем обратиться к многочисленным профильным обзорам, посвященным мутациям в конкретных генах. Вкратце, мутации онкогенов, таких как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR — epidermal growth factor receptor) и транскрипционный фактор P53 (TP53), или супрессоры опухолей, такие как Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (KEAP1) могут вызывать активацию пролиферации клеток и сопротивление сигналам гибели клеток, что приводит к радиорезистентности [14]. Самым ярким примером важности мутагенеза раковых клеток может служить белок p53. Он является важнейшим онкосупрессором, более половины из всех известных форм рака ассоциированы с потерей p53 или другими мутациями в TP53, которые приводят к нарушению его функции и онкотрансформации клеток. P53 играет важную роль в стабильности генома, регуляции клеточного цикла, индукции гибели клеток и резистентности к терапии, поэтому в последние 30 лет его генетическая вариабельность и эпигенетическая регуляция при различных видах рака стала предметом исследований, связанных с устойчивостью рака к лечению [12, 31]. Экспрессия, мутационный статус p53 и некоторые сопутствующие мутации в раковых клетках первичной опухоли, метастазов и ТМЕ потенциально могут служить прогностическими биомаркерами для выбора режимов фракционирования ЛТ, ответа на иммунную и химиотерапию, а также выбора лучшей терапевтической мишени для активации абскопального эффекта ЛТ [31]. Однако по-прежнему необходимы дальнейшие молекулярные исследования для точного определения основных механизмов радиорезистентности, обусловленных p53, с точки зрения эффекторов и функций. Кроме того, хотя было разработано несколько реактиваторов p53, только два препарата прошли клинические испытания (APR-246 и COTI-2), что в настоящее время делает нацеливание на p53 малоэффективным

[12]. Другим примером служит Nrf2. Гиперактивация Nrf2 может возникнуть из-за соматических мутаций, которые встречаются при многих видах рака и связаны с плохим прогнозом [82, 83]. Современные клинические подходы используют ингибиторы Nrf2 как для воздействия на опухоли, так и на ТМЕ для подавления прогрессирования опухоли [76, 82, 83]. Сегодня не существует прогностических биомаркеров DDR, влияющих на выбор метода лечения, однако перспективными кандидатами на эту роль являются рецептор EGFR, p16 и p53 [32]. Например, отсутствие ингибитора циклин-зависимых киназ p16 позволяет активировать CDK4/6 и войти в S-фазу клеточного цикла, приводя к радиорезистентности клетки. Доклинические исследования указывают на синергический эффект комбинации ингибиторов CDK4/6 и ЛТ [12]. Действие активируемого гипоксией ДНК-алкилирующего агента CP-506 напрямую зависит от эффективности репарации ДНК путем гомологичной рекомбинации. Поэтому в клинических испытаниях его будут оценивать у онкологических пациентов, с мутациями в соответствующих генах системы репарации ДНК: *BRCA1/2*, *RAD51*, *PALB2*, *FANCD* и др. [84]. При неоперабельном НМРЛ, с учетом наличия одобренных лекарств, рекомендуется тестировать мутации в генах *EGFR*, *ALK*, *ROS1* и *BRAF*. Сейчас, с ростом знаний, можно расширить список такими генами, как *MET*, *RET*, *NTRK*, *KRAS* и *HER2* [79]. Анализ генов-участников редокс-метаболизма также может помочь в выборе стратегии лечения. Например, подавление генов, кодирующих оксидоредуктазы, препятствует устранению повреждений ДНК опухолевыми клетками [85]. Таким образом, секвенирование генома может быть проведено до лечения, чтобы определить тип мутации и сформулировать эффективные стратегии лечения, чтобы в соответствии с потенциальным генетическим механизмом радиорезистентности подобрать таргетный препарат (или несколько препаратов) и повысить эффективность лечения [14, 79].

Наименее исследованными механизмами развития радиорезистентности раковых клеток являются эпигенетические модификации генома. Они включают в себя метилирование ДНК, модификацию гистонов и ремоделирование хроматина, тем самым регулируют транскрипционную активность онкогенов и онкосупрессоров, оказывая критическое влияние на канцерогенез. Модификации гистонов включают ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и убиквитинирование [86]. В целом метилирование генов, участвующих в активации DDR, остановке клеточного цикла и контроле апоптоза, чаще связано с повышенной радиорезистентностью [56, 87, 88]. Эпигенетическая гетерогенность раковых клеток сильно усложняет подбор таргетных методов ле-

чения, так как несмотря на сходство геномных профилей, эпигенетические ландшафты могут значительно различаться. К примеру, развитие кастрационно- и радиорезистентного рака простаты обусловлено как генетической, так и эпигенетической перестройкой [86]. В дополнение к ЛТ и таргетной терапии многообещающими являются препараты, воздействующие на эпигеном, проходящие доклинические и клинические испытания, такие как ингибиторы ДНК-метилтрансфераз и деацетилазы гистонов [12, 56, 86]. Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз децитабин и азацитидин были одобрены FDA для лечения миелодиспластических синдромов, однако предпринятые попытки перепрофилирования для других видов рака были неудачными [86].

Некодирующие РНК. Малые интерферирующие РНК (микроРНК, miR) содержат 19–24 нуклеотида и влияют на выживаемость и инвазию раковых клеток, регулируя экспрессию генов супрессоров/промоторов опухолей, индукторов стволовости и ЕМТ, а также ферментов, модифицирующих гистоны [56]. Например, некоторые микроРНК связываются с 3'UTR (untranslated regions – нетранслируемыми областями) мРНК p53 и могут подавлять гены, такие как *p21* или *MDM2*, вызывая арест в фазе G1 и индуцируя радиорезистентность. PI3-K/Akt, NF- κ B, MAPK, TGF β и др. также представляют собой пути, модулируемые микроРНК [31]. Длинные некодирующие РНК длиной более 200 нуклеотидов модулируют радиочувствительность раковых клеток несколькими иными путями: регулируя молекулярную сборку и передачу сигналов РНК-связывающих белков, воздействуя на микроРНК, регулируя клеточный цикл и аутофагию, а также действуя как факторы транскрипции [62, 89]. МикроРНК в настоящее время используются главным образом для регуляции экспрессии опухолевых супрессоров и онкогенов [56], а длинные некодирующие РНК в будущем – потенциальные диагностические и прогностические биомаркеры [62]. Помимо этого, новым терапевтическим методом, нацеленным уже непосредственно на белки, стала технология таргетной деградации с помощью регуляции системы «убиквитин–протеасома». Низкомолекулярные ингибиторы и химерные белки, нацеленные на деубиквитиназу, продемонстрировали радиосенсибилизирующий эффект [61].

Репопуляция опухоли и раковые стволовые клетки. Раковые клетки делятся бесконтрольно, в отличие от нормальных соматических клеток, а снижение эффективности ЛТ (примерно через 3–4 недели после ее начала) связано с репопуляцией активно пролиферирующих клонов опухоли [29]. Процесс репопуляции раковых клеток в первую очередь связан с описанной выше генетической и эпигенетической нестабильностью раковых кле-

ток, наличием резистентных и раковых стволовых клеток, которые являются основной причиной рецидивов опухолей [56, 90, 91]. Модель РСК определяет опухоли как иерархически организованные образования, содержащие небольшую популяцию туморогенных клеток, инициирующих опухоль, расположенных на вершине этой иерархии [90]. Однако, следуя теории клональной эволюции, все раковые клетки потенциально могут проявить стволовые свойства и быть инициаторами опухолей [73]. РСК группируются в некоторых областях ТМЕ, называемых нишами, которые обеспечивают доступность аутокринной передачи сигналов и сигналов, исходящих от опухоли-ассоциированных фибробластов, иммунных и эндотелиальных клеток и компонентов внеклеточного матрикса [37]. РСК обладают такими свойствами, как самообновление, разнонаправленная дифференцировка, неограниченная пролиферация и высокая онкогенность, а главное – резистентность к терапии [56, 73, 91]. Поэтому лечение первой линии успешно уничтожает дифференцированную опухолевую массу, но сравнительно неэффективно против субпопуляции РСК [73]. Усугубляет ситуацию то, что при ЛТ происходит отбор радиорезистентных клеток и РСК [14, 90]. Химиотерапия и ингибиторы PARP также могут индуцировать пролиферацию РСК [73]. Помимо этого, опухоли также могут содержать популяцию клеток с медленным циклом, которые невосприимчивы к антимиотическим препаратам и могут повторно вступать в пролиферативный клеточный цикл, а также в ответ на различные генотоксические стрессы образовывать полиплоидные гигантские раковые клетки [92]. Важной эволюционной особенностью таких клеток является генерация анеуплоидных клонов, увеличивая генетическое разнообразие раковых клеток в ходе деполитоидизации, что расширяет генетический репертуар раковых клеток, обеспечивая им дальнейший прогресс [93]. На сегодняшний день большинство разработок новых таргетных методов лечения не учитывают РСК и другие субпопуляции резистентных клеток [73].

РСК имеют общие свойства с химио- и радиорезистентными раковыми клетками и используют ряд механизмов самозащиты: амплификацию онкогенов, повышенный синтез мембранных АТФ-связывающих кассетных транспортеров (ABC), гиперпродукцию антиапоптотических белков, нарушение регуляции микроРНК и др. [13, 90, 94]. Усиление DDR может быть результатом общей адаптации к высоким уровням стресса репликации ДНК и повышенной защиты от АФК, которые уже активны в необработанных РСК, что может еще больше стимулироваться ионизирующим излучением [13]. Поэтому нацеливание на пути DDR РСК является потенциальной терапевтической мишенью [73, 90]. Ингиби-

рование мембранных АТФ-связывающих каскадных транспортеров для снижения лекарственной устойчивости опухоли оказалось слишком токсичным для пациентов [72]. Основные сигнальные пути РСК связаны с концентрацией внутриклеточных АФК. Антиоксидантные сигнальные пути (Nrf2, Wnt и т. д.) в РСК активированы, что способствует усиленному синтезу антиоксидантных белков для снижения уровня АФК в клетках, тем самым способствуя самообновлению РСК [95]. РСК демонстрируют усиление митохондриального биогенеза, метаболическую пластичность для терапевтической резистентности и поддержания стволовости, варьирующиеся в зависимости от типа рака и ТМЕ [94]. Ингибирование передачи сигналов самообновления и антиоксидантной защиты (пути Notch, Wnt/ β -катенин и Hedgehog), стимулирование дифференцировки, регуляция маркеров стволовых клеток (CD133, CD44, EpCAM, CD90, SOX2, OCT4 и Nanog) и нарушение микроокружения ниши РСК являются возможными стратегиями подавления РСК [73, 96, 97]. Разработка таргетной терапии, направленной на радиосенсибилизацию РСК, может стать ключевым дополнением для снижения риска рецидивов, уменьшения возникновения метастазов и повышения эффективности ЛТ [14].

Клеточная пластичность, гетерогенность и эпителиально-мезенхимальный переход. Пластичность раковых клеток — это динамический процесс переключения фенотипов для адаптации и выживания в изменяющихся условиях [98]. Фенотипическая пластичность рака усиливает гетерогенность и разнообразие, клинически связанные с агрессивностью заболевания, метастазами и устойчивостью к традиционным методам лечения [13, 99]. Эпителиально-мезенхимальная и фенотипическая пластичность теперь считаются новыми признаками рака [67] и в некоторых случаях, например, у пациентов со злокачественными опухолями головного мозга, миграция и инвазия опухоли были идентифицированы как основные причины неудачи лечения [17].

Клеточная пластичность сочетает в себе эпителиально-мезенхимальную пластичность, включающую промежуточный частичный ЕМТ, для усиления мигрирующих и инвазивных клеточных свойств [100–102]. Эпителиально-мезенхимальную пластичность при гетерогенности опухоли представляет собой непрерывный обратимый спектр фенотипических состояний, связанный с эпигенетическими, транскрипционными и трансляционными процессами, обеспечивающими выживание раковым клеткам в формирующейся микросреде [103]. Раковые клетки претерпевают серьезные метаболические изменения в состоянии эпителиально-мезенхимальной пластичности, что заставляет их адаптироваться к изменяющемуся микроокружению [104]. Наиболее

значимыми событиями ЕМТ являются снижение уровня Е-кадгерина, индукция экспрессии виментина и N-кадгерина, повышение уровня факторов Snail, Twist, Slug и др., которые способствуют метастазированию и распространению раковых клеток. Регуляторами программы ЕМТ являются TGF- β , нкРНК [56], ось Wnt/ β -катенин [105] и др. Метастазирование представляет собой многоэтапный процесс, который состоит из миграции и инвазии раковых клеток. Оно включает неоваскуляризацию, а также клеточную адгезию, инвазию, миграцию и пролиферацию, при этом важную роль играет деградация внеклеточного матрикса и базальной мембраны [106]. Поэтому мишенями для борьбы с ЕМТ являются металлопротеиназы, хлоридные каналы и аннексин 2 [17]. В итоге ЕМТ обеспечивает выживание, инвазию и метастазирование раковых клеток [107], и, в дополнение, ИИ может активировать пути, связанные с процессом ЕМТ [64]. Применение радиосенсибилизаторов, нацеленных на ЕМТ, является многообещающим подходом адъювантного лечения в клинической практике [14].

Особенности метаболизма раковых клеток. Нарушение обмена веществ является одной из важных характеристик рака. Анализ метаболома рака позволяет рассматривать его не только как генетическое, но и как метаболическое заболевание, что может быть критически важно для подбора терапевтической стратегии и прогнозирования реакции пациентов на лечение [85]. Метаболизм раковых клеток, включая метаболизм глюкозы, белков, липидов и редокс-метаболизм, изменяется в соответствии с основными событиями канцерогенеза (мутации, бесконтрольная пролиферация, ЕМТ и др.), тесно взаимосвязан с ТМЕ и может опосредовать врожденную резистентность. Метаболические ресурсы в ТМЕ ограничены, что приводит к конкуренции за питательные вещества между опухолевыми и клетками ТМЕ [56]. Также после ЛТ происходит метаболическое перепрограммирование опухоли, способствующее ремоделированию ТМЕ и приобретению радиорезистентности [14]. Вмешательство в метаболические процессы раковых или иммунных клеток — еще одна стратегия снижения радиорезистентности [8, 56].

Избыточная генерация АФК приводит к нарушению клеточного редокс-гомеостаза и развитию окислительного стресса [76, 83, 108–112]. В физиологических концентрациях АФК выполняют важную сигнальную функцию в клетке [109, 110, 112]. При нормальных условиях уровень АФК в клетке регулируется ферментативной (супероксиддисмутаза, каталаза, тиоредоксины, пероксиредоксины, глутатионпероксидазы, глутатионредуктаза, глутаредоксины и др.) и неферментативной (глутатион, полифенолы и др.) антиоксидантными системами защиты, а также

определяется активностью прооксидантной системы (комплексы I и III электрон-транспортной цепи митохондрий, NADPH-оксидазы и др.) [109–111, 113, 114]. Все аспекты рака связаны с окислительно-восстановительными процессами [115]. Опухолевые клетки часто демонстрируют активный метаболический профиль, приводящий к внутриклеточному накоплению АФК, окислительному стрессу и генетической нестабильности, способствующей онкогенезу. Такие события, как повреждение ДНК, активация онкогенов и подавление супрессоров опухоли, приводят к дисфункции митохондрий, изменению метаболизма и гипоксии, что еще больше способствует выработке АФК и приводит к еще большему росту концентрации АФК в опухолевых клетках [112, 115, 116]. В то же время раковые клетки развивают способность к элиминации АФК, например, через адаптивное увеличение синтеза белков антиоксидантной защиты, что дает им преимущество для пролиферации и выживания [69, 117, 118]. Гиперпродукция антиоксидантов зачастую стимулирует канцерогенез, а также способствует развитию у раковых клеток химио- и радиорезистентности [14, 116, 118]. На физиологическом уровне АФК, особенно H_2O_2 , могут активировать множество сигнальных путей, включающие киназные каскады (МАРК, PI3K/Akt и др.) и различные факторы транскрипции (Nrf2, HIF-1 α , NF- κ B, белок FoxO (forkhead box O), p53 и др.) [76, 92, 119, 120]. Например, АФК-опосредованная активация NF- κ B встречается при многих видах рака (через сигнальный путь PI3K/Akt/NF- κ B) [75, 119]. Гиперактивация Nrf2, помимо стимуляции антиоксидантного ответа [108], также регулирует биогенез митохондрий, пролиферацию и дифференцировку клеток, тем самым стимулируя канцерогенез [83]. С другой стороны, когда уровни АФК превышают порог, который могут переносить опухолевые клетки, запускаются соответствующие механизмы деградации поврежденных биомолекул (окисленные белки, липиды и нуклеиновые кислоты), что в конечном итоге приводит к гибели клеток [121]. В совокупности окислительный стресс, в зависимости от концентрации АФК и времени воздействия, может двуправленно активировать механизм пролиферации клеток или апоптоза. Воздействие на антиоксидантные и прооксидантные системы клетки давно привлекают внимание при разработке противоопухолевых стратегий, однако их результативность находится под вопросом [111, 116, 122].

Низкий уровень кислорода в ТМЕ солидной опухоли из-за недостаточно развитой сосудистой сети приводит к гипоксии, которая способствует прогрессированию рака [123]. Гипоксия (состояние кислородной недостаточности с уровнем кислорода $\leq 2\text{--}3\%$, $\leq 15.2\text{--}22.8$ мм рт. ст.) встреча-

ется при большинстве солидных злокачественных новообразований, хотя и со значительной индивидуальной гетерогенностью. Тяжелая гипоксия (уровень кислорода менее 0.13% , <0.988 мм рт. ст.) связана с радиорезистентностью, а при дальнейшем снижении кислорода (менее 0.02% , менее 0.15 мм рт. ст.) раковые клетки демонстрируют максимальную устойчивость к ИИ [5]. Гипоксия уменьшает продукцию АФК в ходе радиолитиза и активирует транскрипционные факторы NF- κ B, p53 и HIF-1 α . Они контролируют защитные и адаптационные метаболические процессы, приводящие к радиорезистентности: стимуляция ангиогенеза (через активацию VEGF, VEGFR, EGFR и т. д.), увеличение синтеза рецепторов и ферментов, связанных с метаболизмом глюкозы, усиление антиоксидантного метаболизма, стимуляция пролиферации клеток [12, 14]. Проонкогенная роль клинического биомаркера HIF-1 α многогранна и включает в себя: подавление апоптоза, индукция EMT, усиление миграции и метастазирования, стимулирование лекарственной устойчивости и радиорезистентности, а также иммунное уклонение опухоли [123]. Облучение вовремя ЛТ может дополнительно активировать HIF-1 α и индуцировать фенотип радиационно-индуцированной стволовости и селекцию радиорезистентных клонов, что приводит к рецидиву рака [15]. Таргетное воздействие на фактор, индуцируемый гипоксией (HIF – hypoxia-inducible factor), например, с помощью микроРНК может повысить радиочувствительность раковых клеток в клинических условиях, однако при этом важно учитывать значение pH [14 Zhou 2023], так как из-за гипоксии происходит развитие гликолитического фенотипа и локальное закисление опухоли [94]. Следует также отметить, что валидированные маркеры тяжелой гипоксии *in vivo* еще не установлены [84], и сегодня наиболее приемлемым решением проблемы гипоксии является фракционированная ЛТ [31, 84].

Эффект Варбурга – это явление, при котором раковые клетки даже в присутствии кислорода для получения энергии АТФ в первую очередь полагаются на гликолиз, а не окислительное фосфорилирование. Около $70\text{--}80\%$ случаев рака человека имеют метаболические изменения по типу эффекта Варбурга, что сопровождается активацией HIF и онкогенов, потерей супрессоров опухоли, снижению концентрации митохондриальных АФК, изменением эпигенетического ландшафта и сигнальных путей взаимодействия с компонентами ТМЕ [63, 94]. В контексте ЛТ развитие гликолитического фенотипа в первую очередь связывают с гипоксией, вызванной радиационным повреждением сосудов, затем активацией/стабилизацией HIF-1 α и активацией экспрессии генов, связанных с гликолизом [15]. Мутации генов также влияют на переход к гликолитическому фено-

типу. Например, p53 может ингибировать эффект Варбурга, но мутантный p53 наоборот, усиливает гликолиз [31]. Гликолиз отвечает за пентозофосфатный путь, увеличивая выработку многих биомолекул, необходимых для репарации ИИ-индуцированных повреждений, и НАДФН, который участвует в основных механизмах антиоксидантного ответа: восстановлении глутатиона, системе «тиоредоксин/пероксиредоксин» и реактивации каталазы. Поэтому клетки с повышенным гликолитическим фенотипом легче переносят редокс-дисбаланс и повреждение ДНК, а также обладают радиорезистентностью [14, 69, 85, 94]. Предполагается, что подавление эффекта Варбурга и/или оксигенация опухоли может быть эффективной стратегией радиосенсибилизации [94]. Нацеливание различных лекарств для модуляции эффекта Варбурга является часто используемой стратегией, однако только некоторые из них проходят клинические испытания, а большинство находится на доклиническом этапе исследований [63, 124, 125]. Несмотря на то, что ангиогенез в ТМЕ увеличивается, потребность в глюкозе и кислороде, необходимых для пролиферации и функционирования клеток, не удовлетворяется, поэтому как сами раковые клетки, так и клетки ТМЕ чтобы выжить должны адаптироваться и использовать альтернативные источники энергии [126, 127]. Жирные кислоты (ЖК) не только могут использоваться в качестве альтернативного источника энергии, но и являются важнейшими строительными блоками клеточной мембраны. Повышенное поглощение ЖК, синтез ЖК *de novo* и aberrantное накопление ЖК в раковых клетках и в ТМЕ являются общей особенностью некоторых видов рака [128, 129]. Поэтому нацеливание на липидный метаболизм раковых клеток также может выступать в качестве таргетной стратегии лечения. Например, адипонектин может ингибировать рост клеток рака молочной железы посредством подавления синтеза ЖК и стимуляции липолиза [130]. Ингибирование диацилглицерин-ацилтрансферазы 1 нарушало липидный гомеостаз что приводило к образованию высоких уровней АФК, повреждению митохондрий, высвобождению цитохрома *c* и апоптозу [131]. В последнее время большое внимание привлекло двойственное влияние метаболизма ЖК на онкогенез и резистентность к различным видам лечения рака [132]. Например, повышенный уровень фосфолипидов в клетке способствует сохранению целостности митохондрий и подавлению апоптоза, вызванного химиотерапией [133], но в то же время церамиды и полиненасыщенные ЖК способствуют развитию радиочувствительности [127]. Однако ЛТ может еще больше нарушить энергетический метаболизм опухоли, способствуя выработке ЖК [134]. Чтобы снизить токсичность АФК при ЛТ и поддержать выживаемость

клеток, облученные раковые клетки перепрограммируют свой метаболизм для подавления окислительного стресса за счет увеличения содержания ЖК в виде липидных капель [135]. В зависимости от содержания и типа ЖК, имеющихся в ТМЕ, метаболизм ЖК может способствовать противоопухолевому иммунитету или уклонению от иммунитета [136]. Таргетное воздействие на скавенджер-рецепторы или ферменты, связанные с липидным обменом, может способствовать процессингу и презентации антигена дендритными клетками и активации Т-клеток [127]. Модуляция метаболизма ЖК для улучшения реакции блокаторов иммунных контрольных точек и создания длительного противоопухолевого иммунитета в настоящее время находится на стадии активных исследований, в том числе и при ЛТ [127, 134].

Микроокружение опухоли и иммуномодуляция. Опухолевое микроокружение (ТМЕ), составляющее до 90% всей опухоли, оказывает большое влияние на радиорезистентность [4, 126] и является основным барьером на пути противоопухолевого иммунитета [53, 127]. В то время как механизмы устойчивости хозяина к иммунотерапии находятся в стадии активных исследований, то как раковые клетки инициируют развитие иммуносупрессии в ТМЕ до конца не понятно. Метаболическое перепрограммирование ТМЕ оказалось недостаточно изученным механизмом иммунорегуляции [137, 138]. Множественные типы иммунных клеток являются важными компонентами ТМЕ: ассоциированные с раком фибробласты (CAF — cancer-associated fibroblasts) и макрофаги (TAM — tumor-associated macrophages), дендритные клетки, Т-клетки, НК-клетки, супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC — myeloid-derived suppressor cells) и др. Они секретируют провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6, TGF- β и др), гормоны, ростовые факторы и т.д., ингибируют иммунную функцию и способствуют метастазированию рака [8, 9, 127, 139, 140]. Опухолевый микробиом кишечника или легких также может усиливать противоопухолевый иммунитет или способствовать иммуносупрессии и прогрессированию рака [14, 18, 141]. В итоге ТМЕ играет значительную роль в радиочувствительности рака и в ответе на ЛТ, иммунотерапию и их комбинированное воздействие. Иммунологические ответы очень динамичны и могут варьировать в зависимости от рассматриваемого ТМЕ и используемого протокола ЛТ, поэтому существует большое количество доказательств иммуностимулирующего действия ИИ, но также существует немало сведений, что ИИ может ослаблять противоопухолевый иммунный ответ и инициировать ангиогенные процессы, усиливая рост и распространение опухоли [9]. Противоопухолевый иммунный ответ тесно связан с ти-

пом и функциональным статусом инфильтрирующих иммунных клеток в ТМЕ. Стромальные клетки и иммунные клетки в ТМЕ обладают различной радиочувствительностью. CAF и TAM проявляют радиорезистентность, тогда как эндотелиальные клетки, Т-клетки и NK-клетки более чувствительны к ЛТ [127]. Генерируемые ионизирующим излучением АФК могут активировать транскрипционные факторы NF- κ B и STAT3, киназу JAK2, что увеличивает высвобождение в ТМЕ факторов роста и цитокинов для формирования и развития опухоли, таких как TGF β и фактор некроза опухоли (TNF- α) [14]. Радиационно-индуцированное воспаление уменьшает количество иммунных клеток, подавляющих опухоль, таких как CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки, в то время как иммунные клетки, способствующие развитию опухоли, такие как регуляторные Т-клетки (Treg), MDSC и TAM увеличиваются, что в конечном итоге формирует иммуносупрессивную среду [142, 143] и способствует развитию радиорезистентности [139, 144]. Направленное воздействие на воспаление, например, на хемокины и/или их рецепторы [145], может не только усилить эффект ЛТ, но также защитить нормальные клетки и ткани от побочных эффектов, вызванных радиацией [9, 14]. Кроме того, раковые клетки, выжившие после ЛТ, стареют и секретируют цитокины, которые могут влиять на соседние выжившие раковые клетки и клетки ТМЕ, стимулировать пролиферацию, инвазию и метастазирование опухолевых клеток, избегать апоптоза, индуцировать ангиогенез и способствовать канцерогенезу [67]. Такие клетки также могут переходить в состояние покоя через несколько месяцев или лет после облучения, реактивировать стволовые свойства и вызывать рецидив опухоли с усиленным ростом и метастазированием [146].

Иммунные клетки активируются через рецепторы распознавания патогенов и распознают молекулярные паттерны, связанные с патогенами (PAMP — pathogen-associated molecular patterns) или повреждением (DAMP — damage-associated molecular patterns). DAMP, включая белки HMGB1, S100 и белки теплового шока, действуют посредством рецепторов распознавания патогенов, таких как Toll-подобные рецепторы, рецептор формилпептида, рецептор лектинов С-типа и рецептор конечных продуктов гликирования. Эти рецепторы активируют общий набор воспалительных путей (NF- κ B, p38, ERK и др.), сборку воспалительных сом и высвобождение провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF, TGF- β лимфотоксин β и интерферон γ), что способствует привлечению воспалительных клеток [147–149]. Роль DAMP в патогенезе рака пока признается спорной, так как DAMP могут как усиливать канцерогенез, так и ингибировать раз-

витие опухолей. Например, иммунные клетки можно активировать через Toll-подобные рецепторы, однако про- или противоопухолевый эффект зависит от типа Toll-подобных рецепторов, типа клеток и нижестоящего после Toll-подобных рецепторов сигнального каскада. Для противораковой терапии агонисты Toll-подобных рецепторов исследуются в качестве адъювантов вакцин для стимуляции иммунных клеток [49].

Макрофаги являются наиболее распространенными иммунными клетками в ТМЕ [150]. Макрофаги реагируют на PAMP/DAMP и воспалительные медиаторы, поляризуясь в функциональные фенотипы M1, M2 и регуляторные [151]. TAM, подобно обычным макрофагам, делятся на подтипы M1 и M2. M1-подобные TAM оказывают провоспалительное и опухолесупрессирующее действие путем фагоцитоза и активации цитотоксических Т-клеток [70]. M2-подобные TAM в основном оказывают противовоспалительные и способствующие развитию опухолей эффекты, индуцируют EMT, секретируя EGF, TNF- α и TGF- β [8, 150]. Также был идентифицирован новый тип макрофагов — липид-ассоциированные макрофаги с каноническими функциональными признаками M2-подобных TAM, обладающие протуморогенными и иммуносупрессивными свойствами [152]. Наиболее широко изученным из механизмов, которые иммунная система использует для саморегуляции, является PD-1. Поляризация M2 активирует сигнальный путь PD-1, который ингибирует Т-клеточный иммунный ответ. Ингибирование поляризации M2-подобных TAM или стимуляция преобразования M2-подобных TAM в подтип M1 может быть эффективным вариантом подавления резистентности при ЛТ и иммунотерапии [8, 127].

Фибробласты — это покоящиеся клетки, находящиеся в соединительной ткани и происходящие из мезенхимы, которые активируются в ответ на травму или воспаление. Аутоиммунные заболевания или рак приводят к появлению эпигенетически модифицированной субпопуляции гиперактивированных фибробластов, которые обладают повышенной пролиферацией и устойчивостью к апоптозу. Такие фибробласты, присутствующие внутри раковой опухоли, называются CAF [153]. CAF являются основным компонентом стромы, которые секретируют белки внеклеточного матрикса, жирные кислоты, факторы роста и воспалительные лиганды, индуцируя активацию TGF- β , паракринную передачу сигналов и способствуя пролиферации раковых клеток, экспрессии маркеров EMT и метастазированию, увеличивая резистентность опухоли, ангиогенез и иммуносупрессию [154, 155]. CAF обеспечивают радиорезистентность опухоли [156], поэтому также могут выступать мишенями для таргетной или иммунотерапии совместно с ЛТ.

Клетки ТМЕ тесно взаимодействуют друг с другом и с раковыми клетками регулируя и ремоделируя ТМЕ. CAF и раковые клетки могут модулировать метаболизм друг друга [63]. Белки, воспалительные цитокины, факторы роста и нкРНК, полученные из экзосом CAF, взаимодействуют с раковыми клетками [127]. Раковые клетки выделяют в межклеточное пространство перекись водорода, которая увеличивает окислительный стресс в CAF и индуцирует трансформацию метаболической среды CAF от окислительного фосфорилирования к аэробному гликозилированию, что в дальнейшем обеспечивает раковые клетки лактатом и пируватом [157]. CAF и TAM оказывают иммуносупрессивное действие за счет перекрестных помех между друг другом и другими иммуносупрессивными клетками [127]. Например, Tregs участвуют в иммунном гомеостазе и подавлении аутоиммунитета посредством узкоспециализированных тканеспецифичных путей. Рекрутирование Treg было связано с хемокинами, секретируемыми опухолевыми клетками и TAM, которые значительно индуцировали миграцию Treg [158]. MDSC в ТМЕ могут в значительной степени нарушать цитотоксические функции Т-клеток и NK-клеток, а CAF индуцирует моноцитарную продукцию MDSC посредством передачи сигналов STAT3, активируемых IL-6/экзосомальной miR-21 [156]. Адипоциты, связанные с раком [127] могут образовывать петлю положительной обратной связи с раковыми клетками [145].

Клеточная гибель при лучевой терапии. Гибель клеток — это дегенерация важных клеточных функций, завершающаяся потерей клеточной целостности [159]. Гибель клеток может быть случайной (некроз) и регулируемой (активации одного или нескольких модулей передачи сигнала) [61, 121, 159]. Регулируемую клеточную гибель можно модифицировать с помощью лекарственного или генного вмешательства. ИИ в ходе лучевой терапии может вызывать различные виды клеточной гибели [61, 121]. Самым известным является апоптоз, который может быть внешним и внутренним [160]. Внешний путь апоптоза опосредован стимулируется через рецепторы смерти, включая рецепторы TNF (TNFR), рецепторы Fas, рецепторы лигандов, индуцирующих апоптоз, связанные с TNF (TRAIL-R) и др. Внутренний апоптоз включает два уникальных типа смерти: аноикис (запускаемый в ответ на неправильную адгезию клеток, а именно — нарушение интегрин-зависимого закрепления) и митотическую смерть, вызванную митотической катастрофой [121, 160]. Аноикис сегодня рассматривается как супрессирующий опухоль процесс и широко исследуется. Благодаря уникальному механизму

взаимодействия аноикиса и внеклеточного матрикса [161], этот путь апоптоза имеет большое значение при метастазировании [162], иммунной инфильтрации [163], лекарственной устойчивости [164] и имеет важное значение при прогнозировании лечения рака [165]. Митотическая катастрофа представляет собой регулируемый механизм подавления опухоли, а неудача митотической катастрофы является критическим событием в химиорезистентности, трансформации и прогрессировании опухоли [121]. Раковые клетки могут останавливать апоптоз и входить в анастаз, сохраняя свою пролиферативную способность [166]. Одна из форм противоракового лечения, названная «лекарствами-миметиками ВНЗ», была разработана для непосредственной активации механизма апоптоза в злокачественных клетках. Эти препараты связываются и ингибируют специфические белки семейства Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 — семейство белков В-клеточной лимфомы 2), регулирующие внутренний апоптоз. В настоящее время в клинике используется несколько миметиков ВНЗ, например, венетоклакс одобрен для клинической практики при хроническом лимфоцитарном лейкозе и остром миелолейкозе, но они еще не сочетались с ЛТ [167, 168].

ICD — форма гибели раковых клеток, которая индуцируется высвобождение DAMP из умирающих опухолевых клеток и активирует опухолеспецифические иммунные реакции [9, 169]. Основные типы ICD — это некроз, некроптоз, пироптоз и ферроптоз. [169]. Индукторы ICD (фотодинамическая, химио- и лучевая терапия) запускают клеточные стрессовые реакции, включая аутофагию, стресс эндоплазматического ретикулаума или реакции несвернутых белков, приводящие к различным формам гибели клеток и высвобождению DAMP [170]. Они включают кальретикулин, HMGB1, АТФ, аннексин А1 и интерферон I типа [171]. Поскольку долгосрочная эффективность противораковых препаратов достигается за счет сочетания как прямого уничтожения раковых клеток, так и активации противоопухолевого иммунитета, то исследования ICD позволяют разрабатывать новые варианты терапевтических комбинаций и стратегий персонализированного лечения [107]. Примерами могут послужить такие виды клеточной гибели как некроптоз и пироптоз. В последние годы растет число исследований некроптоза, связанных с раком, показывающие его неоднозначную роль, в том числе и в регуляции иммунного ответа ТМЕ [172, 173]. Острая активация некроптоза усиливает противоопухолевый иммунитет, но хронический некроптоз может создавать иммуносупрессивное ТМЕ, а мас-

сивный некроптоз в некоторых случаях способствует ангиогенезу и метастазированию [174]. Пироптоз приводит к активации и инфильтрации иммунных клеток путем высвобождения провоспалительных цитокинов и DAMP, провоцируя гибель как раковых, так и иммуногенных клеток ТМЕ [175]. Было показано, что небольшое количество пироптотических клеток может индуцировать сильный иммунный ответ и достичь отличных результатов противоопухолевого иммунного ответа, в сочетании с целевым подавлением PD-1 [176]. Но пирроптоз может индуцировать воспаление и ремоделирование ТМЕ [177].

Одной из наиболее перспективных для нацеливания форм клеточной гибели в ЛТ является открытый относительно недавно ферроптоз, ставший популярной темой исследований. Ферроптоз — гибель клеток, основанная на железо-зависимом накоплении продуктов перекисного окисления липидов [159]. Фактически возникновение ферроптоза зависит от баланса между выработкой АФК, вызванной накоплением ионов железа, и антиоксидантной системой, которая предотвращает ПОЛ [178, 179]. Ферроптоз может индуцироваться ЛТ, иммуно- и химиотерапией [180]. Перекисное окисление липидов — процесс, который индуцируется при облучении [23] и является ключевым при ферроптозе, поэтому сочетание индукции ферроптоза с ЛТ может способствовать повышению радиочувствительности раковых клеток [179, 181]. Индукторы ферроптоза в раковых клетках, действующие путем ингибирования глутатионпероксидазы (RSL3) или переносчика цистина/глутамата X_c^- (эрастин) имеют значительные перспективы в лечении некоторых типов рака [178, 182, 183, 219].

ПЕРСПЕКТИВЫ УЛУЧШЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Повышение клинической эффективности ЛТ без повреждения здоровых тканей и минимизация побочных эффектов остаются одной из важнейших междисциплинарных задач в биомедицинских исследованиях [12, 19]. Существует несколько направлений, способствующих решению этой проблемы. Во-первых, это физико-технические разработки, включающие усовершенствование источников ионизирующего излучения, совершенствование оборудования и методов медицинской физики. Так, благодаря новым типам излучений и улучшенным методам их доставки, роль ЛТ в лечении сарком костей значительно изменилась [12]. Во-вторых, важным направлением

является медикаментозная коррекция, включающая использование радиосенсибилизаторов и таргетных препаратов. Эти стратегии также можно условно разделить по типам преодолеваемых факторов резистентности, таких как гипоксия и иммуносупрессивная опухолевая микросреда (ТМЕ) (рис. 1).

Дополнительной задачей доклинических и клинических исследований является поиск надежных биомаркеров радиорезистентности и разработки тест-систем для таргетной терапии. Вспомогательным направлением является модификация и разработка новых экспериментальных *in vitro* и *in vivo* моделей для повышения валидности результатов. Развитие передовых методов, таких как секвенирование единичных клеток [67], гуманизированные мышинные модели PDX (patient-derived xenograft — ксенотрансплантаты, полученные от пациентов) и передовые системы культивирования органоидов, позволяющие учитывать РСК и ТМЕ [184–186], должно позволить в будущем решить эти проблемы и разработать эффективные комплексные схемы лечения и персонализировать адъювантную таргетную терапию.

Для преодоления радиорезистентности медикаментозным путем сегодня используется несколько основных стратегий: ингибиторы DDR и другие радиосенсибилизаторы, синтетическая летальность и сочетание иммунотерапии с ЛТ [13]. Радиосенсибилизаторы — это агенты, которые усиливают воздействие радиации на клетки и организм. Радиосенсибилизатор для лечения рака должен обладать дифференцированным воздействием на обычные ткани и опухоли при воздействии радиации, увеличивая чувствительность опухолей к радиации в большей степени, чем нормальных тканей [19]. В настоящее время в качестве радиосенсибилизаторов опухолей предлагается использовать химиотерапевтические препараты, таргетные препараты, ингибиторы иммунных контрольных точек и т.д. Однако зачастую эти препараты обладают побочными токсическими эффектами, опухоли достаточно быстро приобретают к ним устойчивость, а применение большинства из них по-прежнему ограничивается экспериментальными исследованиями, и лишь немногие препараты используются в клинической практике [14]. Большинство таргетных радиосенсибилизаторов усиливают радиационно-опосредованное повреждение ДНК и ингибируют DDR (ингибиторы PARP, HER2, EGFR, VEGF и mTOR (мишень рапамицина млекопитающих)), что в конечном итоге приводит к накоплению повреждений ДНК, остановке клеточного цикла и гибели клеток [13, 24, 74]. Клинические испытания сочетания ингибиторов иммунных

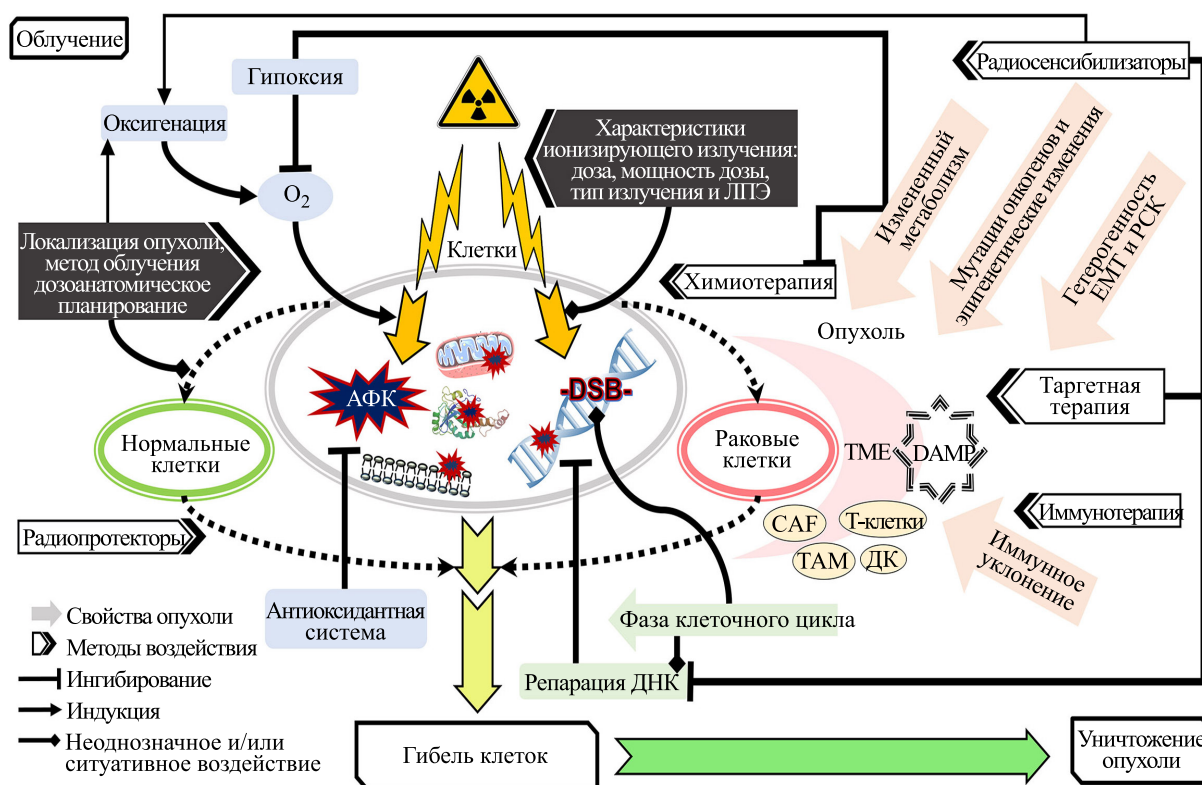


Рис. 1. Современная концепция лучевой терапии: принцип, основные факторы радиорезистентности и методы повышения эффективности. Описание в тексте.

контрольных точек и ЛТ в настоящее время проводятся в основном с ингибиторами PD-1 (камрелизумаб, пембролизумаб и др.), EGFR (цетуксимаб, гефитиниб и др.), HIF-1 α и VEGF (сунитиниб, анлотиниб и др.) [127, 142].

Синтетическая летальность означает одновременное смертельное воздействие на несколько молекулярных путей, нарушение одного из которых не летально [187]. Например, серин/треониновая киназа Auroga-A влияет на многие признаки рака (иммортализацию, энергетический метаболизм, иммунный уход и устойчивость к гибели клеток), которые участвуют в прогрессировании и устойчивости рака к химио-, лучевой, гормональной и таргетной терапии. Применение ингибиторов других сигнальных путей, в сочетании с нацеливанием на Auroga-A, может оказать синергическое цитотоксическое действие на раковые клетки [187]. Цисплатин и цетуксимаб являются агентами с доказанным радиосенсибилизирующим потенциалом и уже включены в терапевтический протокол при плоскоклеточном раке головы и шеи. В настоящее время нехирургическим стандартом лечения является ЛТ с еженедельным введением цисплатина (40 мг/м²) до достижения общей дозы 70 Гр ежедневными фракциями в течение 7 недель (всего 35 процедур), но для

случаев, не подходящих для лечения платиной, применяется ЛТ с цетуксимабом [31]. Важно определить время для комбинирования медикаментозной таргетной и иммунотерапии с ЛТ, исходя из динамики опухоли, поскольку это может значительно влиять на эффективность как лечения в целом, так отдельных компонентов терапии в частности [8, 12]. Например, на ранней стадии лучевой терапии HMPJ предлагается комбинировать таргетные препараты, направленные на мутации генов, DDR, гипоксию и иммунные контрольные точки. Предполагается, что на средней и поздней стадии ЛТ будет эффективной комбинация препаратов, направленных уже на EMT или TME [14].

ЛТ сопровождается не только уничтожением опухолевых клеток, но и повреждением здоровых тканей, что может вызывать серьезные побочные эффекты [12]. В связи с этим отдельным направлением исследований является разработка радио-защитных препаратов, таких как радиопротекторы и радиомитигаторы [21], которые защищают нормальные ткани. Однако, несмотря на многолетние и обширные исследования, большинство клинически применяемых радиопротекторов (амифостин, палифермин, нейпоген, неуласта,

лейкин и ромиплостим) имеют ограниченное одобрение для использования во время ЛТ [108].

Помимо рисков неэффективности и токсичности при переходе к клинической практике, разработка новых лекарственных препаратов в онкологии длительна и связана с огромными финансовыми затратами (1 миллиард долларов на каждый препарат, лицензированный FDA) [5]. Поэтому достаточно популярным направлением исследований является поиск для применения в онкологии радиопротекторов и радиосенсибилизаторов среди препаратов, уже применяемых в клинике при других заболеваниях (метформин, статины, нимесулид и др.) [79, 188] или известных веществ природного происхождения с ожидаемыми лечебными свойствами и малой токсичностью [14, 108]. Использование таких препаратов оправдано, т.к. их терапевтические дозы и побочные эффекты хорошо документированы, за счет чего снижаются затраты на исследования [79]. Исследование природных веществ, например, набирающих все большую популярность натуральных средств традиционной китайской медицины [14, 79, 108] или других растительных антиоксидантов [111, 116], зачастую основываются на свойствах, которые уже известны из практического применения в традиционной («народной») медицине. К примеру, *in vitro* витаферин А, выделенный из индийского женьшеня, действует как радиосенсибилизатор раковых клеток и одновременно как радиопротектор нормальных лимфоцитов. Витаферин А индуцирует в нормальных клетках Nrf-2 и экспрессию цитопротекторных генов гем-оксигеназы 1, каталазы, супероксиддисмутазы и *PRDX2*, отвечая критериям избирательности онкологического радиосенсибилизатора [108].

Отдельным направлением можно выделить редокс-стратегии, направленные на нарушение редокс-баланса раковых клеток либо путем гиперпродукции АФК, либо путем ингибирования антиоксидантных систем [85, 139]. Во-первых, это использование альтернативных механизмов генерации АФК, например, с помощью фото- или хемодинамической терапии. Они предполагают воздействие в присутствии кислорода химиотерапевтических и/или физических факторов (лазерное излучение, излучение светодиодов и других источников). Фотодинамическая терапия (photodynamic therapy, PDT) основана на избирательном накоплении в опухолевой ткани фотосенсибилизатора, способного генерировать цитотоксические агенты (например, синглетный кислород), вызывающие гибель опухолевых клеток при локальном воздействии света с длиной волны, соот-

ветствующей его максимальному поглощению [189]. Хемодинамическая терапия (chemodynamic therapy, CDT) представляет собой новую стратегию, которая производит токсичный OH^\bullet независимо от внешнего света, по реакции Фентона или фентон-подобной реакции в присутствии избыточного внутриклеточного H_2O_2 в опухолевых тканях [190]. Во-вторых, это применение низкомолекулярных природных и синтетических про- или антиоксидантов, в том числе и вышеупомянутых перепрофилированных препаратов, но результаты их клинических испытаний противоречивы и даже провальны, несмотря на относительно длительный период исследований [59, 83, 111]. К таковым относятся бардоксолон-метил, ресвератрол [92] витамины С, Е и А, полифенолы [111], куркумин [116] и др. Их эффективность значительно снижается из-за таких недостатков, как неспецифическое воздействие на опухоль, плохая проницаемость мембран, малое время пребывания в кровотоке, сложные физиологические процессы и другие проблемы, которые сегодня пытаются решить с помощью нанотехнологий [116]. В-третьих, это истощение ферментативных антиоксидантов, гетерогенный уровень которых обуславливает различия в чувствительности к терапии, продуцирующей АФК [191].

Нацеливание на гипоксию и эффект Варбурга для повышения эффективности ЛТ — одна из наиболее ранних стратегий, не оправдавшая ожиданий. Существует пять основных стратегий борьбы с гипоксией: гипоксические радиосенсибилизаторы (например, мизонидазол), активируемые при гипоксии цитотоксические пролекарства (например, эвофосфамид), снижение потребления кислорода (например, метформин), увеличение доставки кислорода (например, эфпроксирал) и подбор персонализированного режима ЛТ, учитывающий гипоксию [5]. Но несмотря на то, что имеются доказательства клинической пользы гипоксической модификации, ни один из подходов (кроме фракционирования) не был интегрирован в общую клиническую практику [84]. Поэтому разработка и апробация препаратов, направленных на борьбу с гипоксией, несколько потеряла свою привлекательность [5], однако отдельные исследования продолжаются. Например, CP-506 представляет собой новое активируемое при гипоксии пролекарство с широкой противоопухолевой активностью, примененное в сочетании с гипофракционированным облучением при гипоксических опухолях. Было одобрено клиническое исследование фазы I-IIA CP-506 в монотерапии или в сочетании с карбоплатином или ингибитором контрольной точки [84]. Но наиболее перспективным является метод подбора персонализированной дозы, позволяю-

щей локально увеличить дозу ИИ в гипоксических субобъемах, что определяется количественно и пространственно картируется с использованием методов визуализации гипоксии [5]. Направленные на эффект Варбурга радиосенсибилизирующие стратегии индуцируют окислительное фосфорилирование в митохондриях и ингибируют гликолиз. В ингибировании гликолиза можно выделить два подхода — ингибирование прямое или косвенное, посредством ингибирования гликолитических ферментов или вышестоящих регуляторов гликолиза (EGFR и HIF-1 α — применяются в клинической практике) соответственно [94]. Однако использование при ЛТ антител к EGFR или HIF-1 α ограничено рядом проблем, включая плохую сочетаемость с химиотерапией, серьезные побочные эффекты и неэффективную доставку [94, 123].

Нанотехнологии. Наномедицина, основанная на нанотехнологиях, рассматривается как перспективный инструмент для более эффективного контроля, лечения, диагностики, профилактики и мониторинга рака. В настоящее время нанотехнологии широко исследуются для повышения эффективности лучевой терапии, минимизации побочных эффектов и преодоления радиорезистентности раковых клеток [19, 120]. Сегодня проводятся масштабные исследования широкого спектра потенциальных нанотехнологий терапевтических агентов, включая наночастицы, нагруженные радиоактивными изотопами, квантовые точки, плазмонные нанопузырьки, ниосомы, липосомы, мицеллы, металлические наночастицы, магнитные наночастицы, углеродные нанотрубки, полимерные конъюгаты и т.д. Также исследуются дендримеры, связанные с противоопухолевыми молекулами и визуализирующими веществами, наночастицы для терраностики и др. [4, 19, 192–195]. Они состоят из полимеров, липидов или металлов и других материалов, которые позволяют инкапсулировать или конъюгировать с несколькими терапевтическими агентами, такими как малые молекулы, пептиды или нуклеиновые кислоты [17]. Некоторые нанотехнологии, связанные с лечением рака, уже разработаны. В их числе нановекторы для инъекционной доставки лекарств, методы на основе наночастиц для высокоспецифичного обнаружения ДНК и белков, а также биологически таргетированные наночастицы, используемые в магнитно-резонансной томографии для интраоперационной визуализации [19].

Основным преимуществом наномедицины является селективность и возможность пролонгированного действия. Наночастицы избирательно накапливаются в раковой ткани, а не в здоровых клетках, благодаря нескольким механизмам нацеливания. Сюда относится эффект повышенной проницаемости и удержания, аномальный лим-

фатический дренаж и негерметичность сосудов (пассивное нацеливание). Кроме того, наночастицы могут быть направлены на специфические молекулярные мишени раковых клеток и клеток ТМЕ (активное нацеливание) [4, 17, 192–196]. ТМЕ тоже является популярной мишенью для нанотехнологий. Проектирование современных наносистем осуществляется с учетом физиопатологии и особенностей микросреды опухоли, таких как сосудистые аномалии, уровень оксигенации, pH и перфузии, метаболический статус, высокий уровень синтеза некоторых ферментов-антиоксидантов и др. [197–199]. Наночастицы могут улучшить растворимость и биодоступность лекарственных препаратов, удерживать их длительное время и под воздействием внешних стимулов постепенно высвобождать [7, 197–198]. С помощью наночастиц в опухолевую клетку можно доставлять химиотерапевтические препараты, цитотоксические радионуклиды, диагностические реагенты, таргетные препараты и др. [4, 17]. В нанотехнологиях часто используется одновременное введение нескольких токсических агентов, что позволяет комбинировать различные терапевтические стратегии. Также рассматривается возможность применения ряда неорганических наночастиц, обладающих дополнительными оптическими, магнитными и другими свойствами, для создания мультимодальных наноплатформ [4, 200]. Наночастицы для терраностики обеспечивают одновременную доставку терапевтических препаратов и средств визуализации, что позволяет выполнять целый ряд функций: от точечного нацеливания и отслеживания до визуализации и лечения [17].

Некоторые наночастицы, несмотря на токсичность, были лицензированы для использования в клинических целях FDA и Европейским медицинским агентством [17]. Липосомальные формы химиотерапевтических препаратов [63] уже доказали свою эффективность в клинической практике терапии рака и коммерчески доступны [19, 201]. Успешным направлением является использование наночастиц в составе препаратов для нейтронозахватной терапии, а также для целевой доставки радиоизотопов при радионуклидной диагностике и терапии. Радиоизотопы могут быть инкапсулированы внутри наночастиц или прикреплены к их поверхности с помощью хелаторов [202]. Некоторые радионуклидные нанопрепараты проходят доклинические и клинические исследования, а «RP Lutathera» (^{177}Lu -DOTA-TATE) был одобрен FDA [4]. Однако это ничтожно мало по сравнению с объемом проводимых экспериментальных исследований [17], и лечение рака с использованием наночастиц еще не внедрено в рутинную клиническую практику [19]. Это связано с рядом технических и финансовых трудностей, а также проблемами биосовместимости и переноса

результатов экспериментов на человеческий организм [4, 19, 63, 116, 201]. В конечном итоге необходимо решать проблемы фармакокинетики и фармакодинамики, такие как контроль биораспределения, преодоление биологических барьеров, распознавание наночастиц иммунной системой и их выведение из организма. Существуют также технические и финансовые проблемы, связанные с разработкой стандартизированных, воспроизводимых, рентабельных и масштабируемых технологий синтеза, пригодных для медицинских целей. Многие экспериментальные лабораторные методы не отвечают этим требованиям [203]. Кроме того, как разнообразие наночастиц, так и гетерогенность злокачественных новообразований требуют персонализированного подхода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные экспериментальные и клинические исследования в области онкологии окончательно подтвердили, что рак представляет собой сложное, гетерогенное и высокопластичное образование, характеризующееся как видовыми, так и индивидуальными метаболическими, генотипическими и фенотипическими особенностями, а также специфическим ТМЕ. Вследствие этого классические методы лечения, включая лучевую терапию, обладают ограниченной эффективностью. Однако, помимо адъювантной химиотерапии, существует множество перспективных возможностей для повышения эффективности терапии, хотя лишь немногие из них успешно применяются на практике (иммунотерапия, некоторые таргетные препараты-радиосенсибилизаторы и улучшение способов доставки ИИ). Основными препятствиями на пути к широкому внедрению комплексных схем лучевой терапии с таргетными препаратами являются недостаточное понимание молекулярных механизмов радиорезистентности опухолей, ограниченные возможности экспериментального моделирования и необходимость персонализированного подхода.

В перспективе, комплексный подход к лечению рака, включающий глубокое понимание метаболических особенностей опухоли, ее ТМЕ, наличие специфических мутаций и молекулярных маркеров, позволит создавать новые эффективные комбинированные терапевтические подходы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00070).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., and Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, **74** (3), 229–263 (2024). DOI: 10.3322/caac.21834
2. Шахзадова А. О., Старинский В. В. и Лисичникова И. В. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году. *Сибирский онкол. журн.*, **22** (5), 5 (2023). DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-5-5-13
3. Papież M. A. and Krzyściak W. Biological therapies in the treatment of cancer —update and new directions. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (21), 11694 (2021). DOI: 10.3390/ijms222111694
4. Kovalchuk M. V., Deyev S. M., and Sergunova K. A. Targeted nuclear medicine: achievements, challenges and prospects. *Nanobiotechnol. Rep.*, **18** (4), 524–541 (2023). DOI: 10.1134/S2635167623700416
5. Salem A. Hypoxia-targeted dose painting in radiotherapy. *Semin. Radiat. Oncol.*, **33** (3), 298–306 (2023). DOI: 10.1016/j.semradonc.2023.03.009
6. Basu R. and Kopchick J. J. GH and IGF1 in cancer therapy resistance. *Endocrine-Related Cancer*, **30** (9), e220414 (2023). DOI: 10.1530/ERC-22-0414
7. Ding Y., Ye B., Sun Z., Mao Z. and Wang W. Reactive Oxygen Species-Mediated Pyroptosis with the Help of Nanotechnology: Prospects for Cancer Therapy. *Adv. Nano-Biomed Res.*, **3** (1), 2200077 (2023). DOI: 10.1002/anbr.202200077
8. Guo S., Yao Y., Tang Y., Xin Z., Wu D., Ni C., Huang J., Wei Q. and Zhang T. Radiation-induced tumor immune microenvironments and potential targets for combination therapy. *Signal. Transduct. Target. Ther.*, **8** (1), 205 (2023). DOI: 10.1038/s41392-023-01462-z
9. Hannon G., Lesch M. L., and Gerber S. A. Harnessing the Immunological Effects of Radiation to Improve Immunotherapies in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (8), 7359 (2023). DOI: 10.3390/ijms24087359
10. Zhao Y., Ji Z., Li J., Zhang S., Wu C., Zhang R., and Guo Z. Growth hormone associated with treatment efficacy of immune checkpoint inhibitors in gastric cancer patients. *Front. Oncol.*, **12**, 917313 (2022). DOI: 10.3389/fonc.2022.917313

11. Twomey J. D. and Zhang B. Cancer immunotherapy update: FDA-approved checkpoint inhibitors and companion diagnostics. *AAPS J.*, **23** (2), 39 (2021). DOI: 10.1208/s12248-021-00574-0
12. Locquet M. A., Brahmi M., Blay J. Y., and Dutour A. Radiotherapy in bone sarcoma: the quest for better treatment option. *BMC Cancer*, **23** (1), 742 (2023). DOI: 10.1186/s12885-023-11232-3
13. Porrazzo A., Cassandri M., D'Alessandro A., Morciano P., Rota R., Marampon F., and Cenci G. DNA repair in tumor radioresistance: insights from fruit flies genetics. *Cell. Oncol.*, **47** (3), 717–732 (2024). DOI: 10.1007/s13402-023-00906-6
14. Zhou T., Zhang L. Y., He J. Z., Miao Z. M., Li Y. Y., Zhang Y. M., Liu Z. W., Zhang S. Z., Chen Y., Zhou G. C., and Liu Y. Q. Mechanisms and perspective treatment of radioresistance in non-small cell lung cancer. *Front. Immunol.*, **14**, 1133899 (2023). DOI: 10.3389/fimmu.2023.1133899
15. Hao Y., Jiang H., Thapa P., Ding N., Alshahrani A., Fujii J., Toledano M. B., and Wei Q. Critical role of the sulfiredoxinperoxiredoxin IV axis in urethane-induced non-small cell lung cancer. *Antioxidants (Basel)*, **12** (2), 367 (2023). DOI: 10.3390/antiox12020367
16. Fischer J., Eglinton T. W., Frizelle F. A., and Hampton M. B. Peroxiredoxins in colorectal cancer: predictive biomarkers of radiation response and therapeutic targets to increase radiation sensitivity? *Antioxidants*, **7** (10), 136 (2018). DOI: 10.3390/antiox7100136
17. Boltman T., Meyer M., and Ekpo O. Diagnostic and therapeutic approaches for glioblastoma and neuroblastoma cancers using chlorotoxin nanoparticles. *Cancers*, **15** (13), 3388 (2023). DOI: 10.3390/cancers15133388
18. Li J., Sun Y., Zhao X., Ma Y., Xie Y., Liu S., Hui B., Shi X., Sun X., and Zhang X. Radiation induces IRAK1 expression to promote radioresistance by suppressing autophagic cell death via decreasing the ubiquitination of PRDX1 in glioma cells. *Cell Death Dis.*, **14** (4), 259 (2023). DOI: 10.1038/s41419-023-05732-0
19. Arif M., Nawaz A. F., Mueen H., Rashid F., Hemeg H. A., and Rauf A. Nanotechnology-based radiation therapy to cure cancer and the challenges in its clinical applications. *Heliyon*, **9** (6), e17252 (2023). DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e17252
20. Becerra V., Ávila M., Jimenez J., Cortes-Sanabria L., Pardo Y., Garin O., Pont A., Alonso J., Cots F., and Ferrer M. Economic evaluation of treatments for patients with localized prostate cancer in Europe: a systematic review. *BMC Health Serv. Res.*, **16**, 1–13 (2016). DOI: 10.1186/s12913-016-1781-z
21. Obrador E., Salvador R., Villaescusa J. I., Soriano J. M., Estrela J. M., and Montoro A. Radioprotection and radiomitigation: from the bench to clinical practice. *Biomedicines*, **8** (11), 461 (2020). DOI: 10.3390/biomedicines8110461
22. Bruskov V. I., Chernikov A. V., Ivanov V. E., Karmanova E. E., and Gudkov S. V. Formation of the reactive species of oxygen, nitrogen, and carbon dioxide in aqueous solutions under physical impacts. *Phys. Wave Phenom.*, **28**, 103–106 (2020). DOI: 10.3103/S1541308X2002003X
23. Nilsson R. and Liu N. A. Nuclear DNA damages generated by reactive oxygen molecules (ROS) under oxidative stress and their relevance to human cancers, including ionizing radiation-induced neoplasia part I: physical, chemical and molecular biology aspects. *Radiat. Med. Protect.*, **1** (3), 140–152 (2020). DOI: 10.1016/j.radmp.2020.09.002
24. Sriramulu S., Thoidingiam S., Brown S. L., Siddiqui F., Movsas B., and Nyati S. Molecular targets that sensitize cancer to radiation killing: From the bench to the bedside. *Biomed. Pharmacother.*, **158**, 114126 (2023). DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114126
25. Gudkov S. V., Guryev E. L., Gapeyev A. B., Sharapov M. G., Bunkin N. F., Shkirin A. V., Zabelina T. S., Glinushkin A. P., Sevost'yanov M. A., Belosludtsev K. N., Chernikov A. V., Bruskov V. I., and Zvyagin A. V. Unmodified hydrated C₆₀ fullerene molecules exhibit antioxidant properties, prevent damage to DNA and proteins induced by reactive oxygen species and protect mice against injuries caused by radiation-induced oxidative stress. *Nanomedicine*, **15** (1), 37–46 (2019). DOI: 10.1016/j.nano.2018.09.001
26. Ahire V., Bidakhvidi N. A., Boterberg T., Chaudhary P., Chevalier F., Daems N., Delbart W., Baatout S., Deroose C. M., Fernandez-Palomo C., Franken N. A. P., Gaipl U. S., Geenen L., Heynickx N., Koniarová I., Selvaraj V. K., Levillain H., Michaelidesová A. J., Montoro A., Oei A. L., Penninckx S., Reindl J., Rödel F., Sminia P., Tabury K., Vermeulen K., Viktorsson K., and Waked A. In *Radiobiology Textbook*, Ed. by S. Baatout (Springer, Cham, 2023), pp. 311–386. DOI: 10.1007/978-3-031-18810-7_6
27. Byun H. K., Kim C., and Seong J. Carbon ion radiotherapy in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Clin. Mol. Hepatol.*, **29**(4), 945 (2023). DOI: 10.3350/cmh.2023.0217
28. Bradley J. D., Hu C., Komaki R. R., Masters G. A., Blumenschein G. R., Schild S. E., Bogart J. A., Forster K. M., Magliocco A. M., Kavadi V. S., Narayan S., Iyengar P., Robinson C. G., Wynn R. B., Korprowski C. D., Olson M. R., Meng J., Paulus R., Curran W. J. Jr., and Choy H. Long-term results of NRG oncology RTOG 0617: Standard- versus high-dose chemoradiotherapy with or without cetuximab for unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, **38** (7), 706–714 (2020). DOI: 10.1200/JCO.19.01162
29. Chan Wah Hak C. M. L., Rullan A., Patin E. C., Pedersen M., Melcher A. A. AND Harrington K. J. Enhancing anti-tumour innate immunity by targeting the DNA damage response and pattern recognition receptors in combination with radiotherapy. *Front. Oncol.*, **12**, 971959 (2022). DOI: 10.3389/fonc.2022.971959

30. Бычкова Н. М. и Хмелевский Е. В. Современные подходы к лучевой терапии метастатических поражений скелета. *Онкология. Ж. им. ПА Герцена*, **8** (4), 295–304 (2019). EDN: XDUALP
31. Mireştean C. C., Iancu R. I., and Iancu D. P. T. p53 Modulates radiosensitivity in head and neck cancers – from classic to future horizons. *Diagnostics (Basel)*, **12** (12), 3052 (2022). DOI: 10.3390/diagnostics12123052
32. Carpov D., Buigă R., and Nagy V. M. DNA damage response and potential biomarkers of radiosensitivity in head and neck cancers: clinical implications. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **64** (1), 5–13 (2023). DOI: 10.47162/RJME.64.1.01
33. Slipsager A., Henrichsen S. N., Falkmer U. G., Dybkær K., Belting M., and Poulsen L. Ø. Predictive biomarkers in radioresistant rectal cancer: A systematic review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **186**, 103991 (2023). DOI: 10.1016/j.critrevonc.2023.103991
34. Sato K., Shimokawa T., and Imai T. Difference in acquired radioresistance induction between repeated photon and particle irradiation. *Front. Oncol.*, **9**, 1213 (2019). DOI: 10.3389/fonc.2019.01213
35. Catton C. N. and Shultz D. B. Should we expand the carbon ion footprint of prostate cancer? *Lancet Oncol.*, **20** (5), 608–609 (2019). DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30094-4
36. Matsumoto Y., Fukumitsu N., Ishikawa H., Nakai K., and Sakurai H. A critical review of radiation therapy: from particle beam therapy (proton, carbon, and BNCT) to beyond. *J. Pers. Med.*, **11** (8), 825 (2021). DOI: 10.3390/jpm11080825
37. Burko P., D'Amico G., Milytykh I., Scalia F., Conway de Macario E., Macario A. J. L., Giglia G., Cappello F., and Caruso Bavisotto C. Molecular pathways implicated in radioresistance of glioblastoma multiforme: what is the role of extracellular vesicles? *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (5), 4883 (2023). DOI: 10.3390/ijms24054883
38. Koka K., Verma A., Dwarakanath B. S., and Papineni R. V. L. Technological advancements in external beam radiation therapy (EBRT): An indispensable tool for cancer treatment. *Cancer Manag. Res.*, **14**, 1421–1429 (2022). DOI: 10.2147/CMAR.S351744
39. Wang S., Tang W., Luo H., Jin F., and Wang Y. The role of image-guided radiotherapy in prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Translat. Radiat. Oncol.*, **38**, 81–89 (2023). DOI: 10.1016/j.ctro.2022.11.001
40. Xu S., Frakulli R., and Lin Y. Comparison of the Effectiveness of Radiotherapy with 3D-CRT, IMRT, VMAT and PT for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Bayesian Network Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*, **15** (23), 5698 (2023). DOI: 10.3390/cancers15235698
41. Ebadi N., Li R., Das A., Roy A., Nikos P., and Najafirad P. CBCT-guided adaptive radiotherapy using self-supervised sequential domain adaptation with uncertainty estimation. *Med. Image Analysis*, **86**, 102800 (2023). DOI: 10.1016/j.media.2023.102800
42. Bilski M., Konat-Baska K., Zerella M. A., Corradini S., Hetnał M., Leonardi M. C., Gruba M., Grzywacz A., Hatala P., Jereczek-Fossa B. A., Fijuth J., and Kuncman Ł. Advances in breast cancer treatment: a systematic review of preoperative stereotactic body radiotherapy (SBRT) for breast cancer. *Radiat. Oncol.*, **19** (1), 103 (2024). DOI: 10.1186/s13014-024-02497-4
43. Ryu S., Deshmukh S., Timmerman R. D., Movsas B., Gerszten P., Yin F. F., Dicker A., Abraham C. D., Zhong J., Shiao S. L., Tuli R., Desai A., Mell L. K., Iyengar P., Hitchcock Y. J., Allen A. M., Burton S., Brown D., Sharp H. J., Dunlap N. E., Siddiqui M. S., Chen T. H., Pugh S. L., and Kachnic L. A. Stereotactic Radiosurgery vs Conventional Radiotherapy for Localized Vertebral Metastases of the Spine: Phase 3 Results of NRG Oncology/RTOG 0631 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.*, **9** (6), 800–807 (2023). DOI: 10.1001/jamaoncol.2023.0356
44. Schiefer H., Heinze S., and Glatzer M. A precise and simple isodose-volume-based verification method for HDR and LDR brachytherapy plans. *Brachytherapy*, **22** (3), 400–406 (2023). DOI: 10.1016/j.brachy.2022.12.007
45. Sminia P., Guipaud O., Viktorsson K., Ahire V., Baatout S., Boterberg T., Cizkova J., Dostál M., Fernandez-Palomo C., Filipova A., François A., Geiger M., Hunter A., Jassim H., Edin N. F. J., Jordan K., Koniarová I., Selvaraj V. K., Meade A. D., Milliat F., Montoro A., Politis C., Savu D., Sémont A., Tichy A., Válek V., and Vogin G. Clinical Radiobiology for Radiation Oncology. In *Radiobiology Textbook*, Ed. by S. Baatout (Springer, Cham, 2023), pp. 237–309. DOI: 10.1007/978-3-031-18810-7_5
46. Turco F., Di Prima L., Pisano C., Poletto S., De Filippis M., Crespi V., Farinea G., Cani M., Calabrese M., Saporita I., Di Stefano R. F., Tucci M., and Buttigliero C. How to Improve the Quality of Life of Patients with Prostate Cancer Treated with Hormone Therapy? *Res. Rep. Urol.*, **15** (9), 9–26 (2023). DOI: 10.2147/RRU.S350793
47. Peng W. X., Koirala P., Zhou H., Jiang J., Zhang Z., Yang L., and Mo Y. Y. Lnc-DC promotes estrogen independent growth and tamoxifen resistance in breast cancer. *Cell Death Dis.*, **12** (11), 1000 (2021). DOI: 10.1038/s41419-021-04288-1
48. Kirtishanti A., Siswodihardjo S., Sudiana I. K., Suprabawati D. G. A., and Dinariyanti A. Inhibition of Ras and STAT3 activity of 4-(tert-butyl)-N-carbamoylbenzamide as antiproliferative agent in HER2-expressing breast cancer cells. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.*, **32** (4), 363–371 (2021). DOI: 10.1515/jbcpp-2020-0508
49. Javaid N. and Choi S. Toll-like receptors from the perspective of cancer treatment. *Cancers (Basel)*, **12** (2), 297 (2020). DOI: 10.3390/cancers12020297
50. Mohamed Y. I., Duda D. G., Awiwi M. O., Lee S. S., Altameemi L., Xiao L., Morris J. S., Wolff R. A., Elsayes K. M., Hatia R. I., Qayyum A., Chamseddine S. M., Rashid A., Yao J. C., Mahvash A., Hassan M. M., Amin H. M., and Kaseb A. O. Plasma growth hormone is a potential biomarker of response to atezoli-

- zumab and bevacizumab in advanced hepatocellular carcinoma patients. *Oncotarget*, **13**, 1314–1321 (2022). DOI: 10.18632/oncotarget.28322
51. Harari A., Graciotti M., Bassani-Sternberg M. and Kandalaft L. E. Antitumour dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19** (9), 635–652 (2020). DOI: 10.1038/s41573-020-0074-8
 52. Vedunova M., Turubanova V., Vershinina O., Savyuk M., Efimova I., Mishchenko T., Raedt R., Vral A., Vanhove C., Korsakova D., Bachert C., Coppieters F., Agostinis P., Garg A. D., Ivanchenko M., Krysko O. and Krysko D. V. DC vaccines loaded with glioma cells killed by photodynamic therapy induce Th17 anti-tumor immunity and provide a four-gene signature for glioma prognosis. *Cell Death Dis.*, **13** (12), 1062 (2022). DOI: 10.1038/s41419-022-05514-0
 53. Sharma P., Hu-Lieskovan S., Wargo J. A., and Ribas A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell*, **168** (4), 707–723 (2017). DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.017
 54. Herrera F. G., Ronet C., Ochoa de Olza M., Barras D., Crespo I., Andreatta M., Corria-Osorio J., Spill A., Benedetti F., Genolet R., Orcurto A., Imbimbo M., Ghisoni E., Navarro Rodrigo B., Berthold D. R., Sarivalasis A., Zaman K., Duran R., Dromain C., Prior J., Schaefer N., Bourhis J., Dimopoulou G., Tsourtis Z., Messemaker M., Smith T., Warren S. E., Foukas P., Rusakiewicz S., Pittet M. J., Zimmermann S., Sempoux C., Dafni U., Harari A., Kandalaft L. E., Carmona S. J., Dangaj Laniti D., Irving M., and Coukos G. Low-Dose Radiotherapy Reverses Tumor Immune Desertification and Resistance to Immunotherapy. *Cancer Discov.*, **12** (1), 108–133 (2022). DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-0003
 55. Chen X., Li J., Kang R., Klionsky D. J., and Tang D. Ferroptosis: machinery and regulation. *Autophagy*, **17**(9), 2054–2081 (2021). DOI: 10.1080/15548627.2020.1810918
 56. An L., Li M. and Jia Q. Mechanisms of radiotherapy resistance and radiosensitization strategies for esophageal squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer*, **22**(1), 140 (2023). DOI: 10.1186/s12943-023-01839-2
 57. Lai J. Z., Zhu Y. Y., Liu Y., Zhou L. L., Hu L., Chen L., and Zhang Q. Y. Abscopal effects of local radiotherapy are dependent on tumor immunogenicity. *Front. Oncol.*, **11**, 690188 (2021). DOI: 10.3389/fonc.2021.690188
 58. Patel R. R., Verma V., Barsoumian H. B., Ning M. S., Chun S. G., Tang C., Chang J. Y., Lee P. P., Gandhi S., Balter P., Dunn J. D., Chen D., Puebla-Osorio N., Cortez M. A. and Welsh J. W. Use of multi-site radiation therapy for systemic disease control. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **109** (2), 352–364 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2020.08.025
 59. Russo M., Moccia S., Luongo D. and Russo G. L. Senolytic flavonoids enhance type-I and type-II cell death in human radioresistant colon cancer cells through AMPK/MAPK pathway. *Cancers (Basel)*, **15** (9), 2660 (2023). DOI: 10.3390/cancers15092660
 60. Gil Marques F., Poli E., Malaquias J., Carvalho T., Portêlo A., Ramires A., Aldeia F., Ribeiro R. M., Vitorino E., Diegues I., Costa L., Coutinho J., Pina F., Mareel M. and Constantino Rosa Santos S. Low doses of ionizing radiation activate endothelial cells and induce angiogenesis in peritumoral tissues. *Radiother. Oncol.*, **151**, 322–327 (2020). DOI: 10.1016/j.radonc.2020.06.038
 61. Cao X., Yan Z., Chen Z., Ge Y., Hu X., Peng F., Huang W., Zhang P., Sun R., Chen J., Ding M., He X., Zong D. and He X. The emerging role of deubiquitinases in radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **118** (5), 1347–1370 (2024). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2023.12.003
 62. Mehmandar-Oskuie A., Jahankhani K., Rostamlou A., Arabi S., Sadat Razavi Z. and Mardi A. Molecular landscape of lncRNAs in bladder cancer: From drug resistance to novel lncRNA-based therapeutic strategies. *Biomed. Pharmacother.*, **165**, 115242 (2023). DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115242
 63. Cunha A., Silva P. M. A., Sarmiento B. and Queirós O. Targeting glucose metabolism in cancer cells as an approach to overcoming drug resistance. *Pharmaceutics*, **15**, 2610 (2023). DOI: 10.3390/pharmaceutics15112610
 64. Olivares-Urbano M. A., Griñán-Lisón C., Marchal J. A., and Núñez M. I. CSC radioresistance: A therapeutic challenge to improve radiotherapy effectiveness in cancer. *Cells*, **9** (7), 1651 (2020). DOI: 10.3390/cells9071651
 65. Jansen J., Vieten P., Pagliari F., Hanley R., Marafioti M. G., Tirinato L., and Seco J. A novel analysis method for evaluating the interplay of oxygen and ionizing radiation at the gene level. *Front. Genet.*, **12**, 597635 (2021). DOI: 10.3389/fgene.2021.597635
 66. Schnöller L. E., Piehlmaier D., Weber P., Brix N., Fleischmann D. F., Nieto A. E., Selmsberger M., Heider T., Hess J., Niyazi M., Belka C., Lauber K., Unger K., and Orth M. Systematic *in vitro* analysis of therapy resistance in glioblastoma cell lines by integration of clonogenic survival data with multi-level molecular data. *Radiat. Oncol.*, **18** (1), 51 (2023). DOI: 10.1186/s13014-023-02241-4
 67. Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Dis.*, **12** (1), 31–46 (2022). DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
 68. Gao F., Yu B., Rao B., Sun Y., Yu J., Wang D., Cui G., and Ren Z. The effect of the intratumoral microbiome on tumor occurrence, progression, prognosis and treatment. *Front. Immunol.*, **13**, 1051987 (2022). DOI: 10.3389/fimmu.2022.1051987
 69. Forshaw T. E., Holmila R., Nelson K. J., Lewis J. E., Kemp M. L., Tsang A. W., Poole L. B., Lowther W. T., and Furdulj C. M. Peroxiredoxins in Cancer and Response to Radiation Therapies. *Antioxidants (Basel)*, **8** (1), 11 (2019). DOI: 10.3390/antiox8010011
 70. Yang Q., Guo N., Zhou Y., Chen J., Wei Q., and Han M. The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy. *Acta Pharm. Sin. B*, **10** (11), 2156–2170 (2020). DOI: 10.1016/j.apsb.2020.04.004

71. Vasan N., Baselga J. and Hyman D. M. A view on drug resistance in cancer. *Nature*, **575**, 299–309 (2019). DOI: 10.1038/s41586-019-1730-1
72. Robey R. W., Pluchino K. M., Hall M. D., Fojo A. T., Bates S. E., and Gottesman M. M. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 452–464 (2018). DOI: 10.1038/s41568-018-0005-8
73. Gillespie M. S., Ward C. M., and Davies C. C. DNA Repair and Therapeutic Strategies in Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*, **15** (6), 1897 (2023). DOI: 10.3390/cancers15061897
74. Wang N., Yang Y., Jin D., Zhang Z., Shen K., Yang J., Chen H., Zhao X., Yang L., and Lu H. PARP inhibitor resistance in breast and gynecological cancer: Resistance mechanisms and combination therapy strategies. *Front. Pharmacol.*, **13**, 967633 (2022). DOI: 10.3389/fphar.2022.967633
75. Liu R., Chen Y., Liu G., Li C., Song Y., Cao Z., Li W., Hu J., Lu C., and Liu Y. (2020) PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death Dis.*, **11**, 797 (2020). DOI: 10.1038/s41419-020-02998-6
76. Averill-Bates D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, **1871** (2), 119573 (2023). DOI: 10.1016/j.bbamcr.2023.119573
77. Gorecki L., Andrs M. and Korabecny J. Clinical candidates targeting the ATR–CHK1–WEE1 axis in cancer. [https://doi.org/ Cancers \(Basel\)](https://doi.org/Cancers), **13** (4), 795 (2023). DOI: 10.3390/cancers13040795
78. Xu L., Cao Y., Xu Y., Li R., and Xu X. Redox-responsive polymeric nanoparticle for nucleic acid delivery and cancer therapy: progress, opportunities, and challenges. *Macromol. Biosci.*, **24** (3), e2300238 (2024). DOI: 10.1002/mabi.202300238
79. Nowak P., Bil-Lula I., and Śliwińska-Mossoń M. A Cross-talk about radioresistance in lung cancer—how to improve radiosensitivity according to chinese medicine and medicaments that commonly occur in pharmacies. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (13), 11206 (2023). DOI: 10.3390/ijms241311206
80. Kumagai S., Togashi Y., Sakai C., Kawazoe A., Kawazu M., Ueno T., Sato E., Kuwata T., Kinoshita T., Yamamoto M., Nomura S., Tsukamoto T., Mano H., Shitara K., and Nishikawa H. An oncogenic alteration creates a microenvironment that promotes tumor progression by conferring a metabolic advantage to regulatory T cells. *Immunity*, **53** (1), 187–203 (2020). DOI: 10.1016/j.immuni.2020.06.016
81. Ding N., Jiang H., Thapa P., Hao Y., Alshahrani A., Allison D., Izumi T., Rangnekar V. M., Liu X., and Wei Q. Peroxiredoxin IV plays a critical role in cancer cell growth and radioresistance through the activation of the Akt/GSK3 signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **298** (7), 102123 (2022). DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102123
82. Suzuki T., Takahashi J., and Yamamoto M. Molecular basis of the KEAP1–NRF2 signaling pathway. *Mol. Cells*, **46** (3), 133–141 (2023). DOI: 10.14348/molcells.2023.0028
83. Aramouni K., Assaf R., Shaito A., Fardoun M., Al-Asmakh M., Sahebkar A. and Eid A. H. Biochemical and cellular basis of oxidative stress: implications for disease onset. *J. Cell. Physiol.*, **238** (9), 1951–1963 (2023). DOI: 10.1002/jcp.31071
84. Yaromina A., Koi L., Schuitmaker L., Dubois L. J., Krause M., and Lambin P. Overcoming radioresistance with the hypoxia-activated prodrug CP-506: A pre-clinical study of local tumour control probability. *Radiother. Oncol.*, **186**, 109738 (2023). DOI: 10.1016/j.radonc.2023.109738
85. Moretton A., Kourtis S., Ganez Zapater A., Calabro C., Espinar Calvo M. L., Fontaine F., Darai E., Abad Cortel E., Block S., Pascual-Reguant L., Pardo-Lorente N., Ghose R., Vander Heiden M. G., Janic A., Muller A. C., Loizou J. I., and Sdelci S. A metabolic map of the DNA damage response identifies PRDX1 in the control of nuclear ROS scavenging and aspartate availability. *Mol. Syst. Biol.*, **19** (7), e11267 (2023). DOI: 10.15252/msb.202211267
86. Imamura J., Ganguly S., Muskara A., Liao R. S., Nguyen J. K., Weight C., Wee C. E., Gupta S., and Mian O. Y. Lineage plasticity and treatment resistance in prostate cancer: the intersection of genetics, epigenetics, and evolution. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **14**, 1191311 (2023). DOI: 10.3389/fendo.2023.1191311
87. Barciszewska A. M., Giel-Pietraszuk M., Perrigue P. M., and Naskręć-Barciszewska M. Total DNA methylation changes reflect random oxidative dna damage in gliomas. *Cells*, **8**, 1–14 (2019). DOI: 10.3390/cells8091065
88. Gào X., Zhang Y., Burwinkel B., Xuan Y., Holleczeck B., Brenner H., and Schöttker B. The associations of DNA methylation alterations in oxidative stress-related genes with cancer incidence and mortality outcomes: a population-based cohort study. *Clin. Epigenetics*, **11** (1), 14 (2019). DOI: 10.1186/s13148-018-0604-y
89. Wu M., Deng C., Lo T. H., Chan K. Y., Li X., and Wong C. M. Peroxiredoxin, senescence, and cancer. *Cells*, **11** (11), 1772 (2022). DOI: 10.3390/cells11111772
90. Abad E., Graifer D., and Lyakhovich A. DNA damage response and resistance of cancer stem cells. *Cancer Lett.*, **474**, 106 (2020). DOI: 10.1016/j.canlet.2020.01.008
91. Paul R., Dorsey J. F., and Fan Y. Cell plasticity, senescence, and quiescence in cancer stem cells: Biological and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.*, **231**, 107985 (2022). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107985
92. Cotino-Nájera S., Herrera L. A., Domínguez-Gómez G., and Díaz-Chávez J. Molecular mechanisms of resveratrol as chemo and radiosensitizer in cancer. *Front. Pharmacol.*, **14**, 1287505 (2023). DOI: 10.3389/fphar.2023.1287505
93. Liu J., Erenpreisa J., and Sikora E. Polyploid giant cancer cells: an emerging new field of cancer biology. *Seminars Cancer Biol.*, **81**, 1–4 (2022). DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.10.006

94. Kang H., Kim B., Park J., Youn H., and Youn B. The Warburg effect on radioresistance: Survival beyond growth. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1878** (6), 188988 (2023). DOI: 10.1016/j.bbcan.2023.188988
95. Lendeckel U. and Wolke C. Redox-regulation in cancer stem cells. *Biomed.*, **10** (10), 2413 (2022). DOI: 10.3390/biomedicines10102413
96. Wei B., Cao J., Tian J. H., Yu C. Y., Huang Q., Yu J. J., Ma R., Wang J., Xu F., and Wang L. B. Mortalin maintains breast cancer stem cells stemness via activation of Wnt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway. *Am. J. Cancer Res.*, **11** (6), 2696–2716 (2021). DOI:
97. Son Y. W., Cheon M. G., Kim Y., and Jang H. H. Prx2 links ROS homeostasis to stemness of cancer stem cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **134**, 260–267 (2019). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.001
98. Burkhardt D. B., San Juan B. P., Lock J. G., Krishnaswamy S., and Chaffer C. L. Mapping Phenotypic Plasticity upon the Cancer Cell State Landscape Using Manifold Learning. *Cancer Discov.*, **12** (8), 1847–1859 (2022). DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-0282
99. Qin S., Jiang J., Lu Y., Nice E. C., Huang C., Zhang J., and He W. Emerging role of tumor cell plasticity in modifying therapeutic response. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **5** (1), 228 (2020). DOI: 10.1038/s41392-020-00313-5
100. Yuan S., Norgard R. J., and Stanger B. Z. Cellular plasticity in cancer. *Cancer Discov.*, **9** (7), 837–851 (2019). DOI: 10.1158/2159-8290
101. Brown M. S., Abdollahi B., Wilkins O. M., Lu H., Chakraborty P., Ognjenovic N. B., Muller K. E., Jolly M. K., Christensen B. C., Hassanpour S., and Pattabiraman D. R. Phenotypic heterogeneity driven by plasticity of the intermediate EMT state governs disease progression and metastasis in breast cancer. *Sci. Adv.*, **8** (31), eabj8002 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj8002>
102. Qiao L., Chen Y., Liang N., Xie J., Deng G., Chen F., Wang X., Liu F., Li Y., and Zhang J. Targeting epithelial-to-mesenchymal transition in radioresistance: crosslinked mechanisms and strategies. *Front. Oncol.*, **12**, 775238 (2022). DOI: 10.3389/fonc.2022.775238
103. Marine J. C., Dawson S. J., and Dawson M. A. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, **20** (12), 743–756 (2020). DOI: 10.1038/s41568-020-00302-4
104. Lai X., Li Q., Wu F., Lin J., Chen J., Zheng H., and Guo L. Epithelial-mesenchymal transition and metabolic switching in cancer: lessons from somatic cell reprogramming. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 760 (2020). DOI: 10.3389/fcell.2020.00760
105. Xue W., Yang L., Chen C., Ashrafizadeh M., Tian Y., and Sun R. Wnt/ β -catenin-driven EMT regulation in human cancers. *Cell. Mol. Life Sci.*, **81** (1), 79 (2024). DOI: 10.1007/s00018-023-05099-7
106. Tahtamouni L., Ahram M., Koblinski J., and Rolfo C. Molecular regulation of cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Anal. Cell Pathol. (Amst.)*, **2019**, 1356508 (2019). DOI: 10.1155/2019/1356508
107. Lee J. and Roh J. L. Epithelial-mesenchymal plasticity: Implications for ferroptosis vulnerability and cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **185**, 103964 (2023). DOI: 10.1016/j.critrevonc.2023.103964
108. Checker R., Bhilwade H. N., Nandha S. R., Patwardhan R. S., Sharma D., and Sandur S. K. Withaferin A, a steroidal lactone, selectively protects normal lymphocytes against ionizing radiation induced apoptosis and genotoxicity via activation of ERK/Nrf-2/HO-1 axis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **461**, 116389 (2023). DOI: 10.1016/j.taap.2023.116389
109. Sies H. and Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **21**, 363–383 (2020). DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3
110. Sies H., Belousov V. V., Chandel N. S., Davies M. J., Jones D.P., Mann G. E., Murphy M. P., Yamamoto M., and Winterbourn C. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **23**, 499–515 (2022).
111. Jomova K., Raptova R., Alomar S. Y., Alwasel S. H., Nepovimova E., Kuca K., and Valko M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Arch. Toxicol.*, **97** (10), 2499–2574 (2023). DOI: 10.1007/s00204-023-03562-9
112. Zhang H., Mao Z., Kang Y., Zhang W., Mei L., and Ji X. Redox regulation and its emerging roles in cancer treatment. *Coordinat. Chem. Rev.*, **475**, 214897 (2023). DOI: 10.1016/j.ccr.2022.214897
113. Richardson R. B. and Mailloux R. J. Mitochondria need their sleep: redox, bioenergetics, and temperature regulation of circadian rhythms and the role of cysteine-mediated redox signaling, uncoupling proteins, and substrate cycles. *Antioxidants (Basel)*, **12** (3), 674 (2023). DOI: 10.3390/antiox12030674
114. Peng L., Xiong Y., Wang R., Xiang L., Zhou H., and Fu Z. The critical role of peroxiredoxin-2 in colon cancer stem cells. *Aging (Albany NY)*, **13** (8), 11170–11187 (2021). DOI: 10.18632/aging.202784
115. Hayes J. D., Dinkova-Kostova A. T. and Tew K. D. Oxidative stress in cancer. *Cancer Cell*, **38**, 167–197 (2020). DOI: 10.1016/j.ccell.2020.06.001
116. Jin P., Li L., Nice E. C., and Huang C. (2023) Nanomedicine-based modulation of redox status for cancer therapy. *Australian J. Chem.*, **76** (6–8), 337–350 (2023). DOI: 10.1071/CH22246
117. Guan X., Ruan Y., Che X., and Feng W. Dual role of PRDX1 in redox-regulation and tumorigenesis: Past and future. *Free Rad. Biol. Med.*, **210**, 120–129 (2024). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.11.009
118. Jiang J., Peng L., Wang K., and Huang C. Moonlighting metabolic enzymes in cancer: new perspectives on the redox code. *Antioxid. Redox Signal.*, **34**, 979–1003 (2021). DOI: 10.1089/ars.2020.8123

119. Balasubramanian P., Vijayarangam V., Deviparasakthi M. K. G., Palaniyandi T., Ravi M., Natarajan S., Viswanathan S., Baskar G., Wahab M. R. A., and Surendran H. Implications and progression of peroxiredoxin 2 (PRDX2) in various human diseases. *Pathol. Res. Pract.*, **254**, 155080 (2024). DOI: 10.1016/j.prp.2023.155080
120. Liu W., Su J., Shi Q., Wang J., Chen X., Zhang S., Li M., Cui J., Fan C., Sun B., and Wang G. Peptide-conjugated selenium nanocomposite inhibits human glioma growth by triggering mitochondrial dysfunction and ROS-dependent MAPKs activation. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 781608 (2021). DOI: 10.3389/fbioe.2021.781608
121. Wang L. Y., Liu X. J., Li Q. Q., Zhu Y., Ren H. L., Song J. N., Zeng J., Mei J., Tian H. X., Rong D. C., and Zhang S. H. The romantic history of signaling pathway discovery in cell death: an updated review. *Mol. Cell. Biochem.*, **2023**, 1–18 (2023). DOI: 10.1007/s11010-023-04873-2
122. Azmanova M. and Pitto-Barry A. Oxidative stress in cancer therapy: Friend or enemy? *Chembiochem.*, **23**, e202100641 (2022). DOI: 10.1002/cbic.202100641
123. Mirzaei S., Ranjbar B., Tackallou S. H., and Aref A. R. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in breast cancer: The crosstalk with oncogenic and onco-suppressor factors in regulation of cancer hallmarks. *Pathol. Res. Pract.*, **248**, 154676 (2023). DOI: 10.1016/j.prp.2023.154676
124. Ali R., Alhaj Sulaiman A., Memon B., Pradhan S., Algethami M., Aouida M., McKay G., Madhusudan S., Abdelalim E. M., and Ramotar D. Altered Regulation of the glucose transporter GLUT3 in PRDX1 null cells caused hypersensitivity to arsenite. *Cells*, **12** (23), 2682 (2023). DOI: 10.3390/cells12232682
125. Yang C., Xu W., Gong J., Chai F., Cui D., and Liu Z. Six1 Overexpression promotes glucose metabolism and invasion through regulation of GLUT3, MMP2 and snail in thyroid cancer cells. *Onco Targets Ther.*, **13**, 4855–4863 (2020). DOI: 10.2147/OTT.S227291
126. Houshyari M. A critical review on exploring tumor microenvironment's impacts on radioresistance. *J. Rad. Res. App. Sci.*, **17** (2), 100937 (2024). DOI: 10.1016/j.jrras.2024.100937
127. An D., Zhai D., Wan C., and Yang K. The role of lipid metabolism in cancer radioresistance. *Clin. Transl. Oncol.*, **25** (8), 2332–2349 (2023). DOI: 10.1007/s12094-023-03134-4
128. Eltayeb K., La Monica S., Tiseo M., Alfieri R., and Fumarola C. Reprogramming of lipid metabolism in lung cancer: An overview with focus on EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Cells*, **11** (3), 413 (2022). DOI: 10.3390/cells11030413
129. Marino N., German R., Rao X., Simpson E., Liu S., Wan J., Liu Y., Sandusky G., Jacobsen M., Stoval M., Cao S., and Storniolo A. M. V. Upregulation of lipid metabolism genes in the breast prior to cancer diagnosis. *NPJ Breast Cancer*, **6** (1), 50 (2020). DOI: 10.1038/s41523-020-00191-8
130. Pham D. V. and Park P. H. Adiponectin triggers breast cancer cell death via fatty acid metabolic reprogramming. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **41** (1), 9 (2020). DOI: 10.1186/s13046-021-02223-y
131. Cheng X., Geng F., Pan M., Wu X., Zhong Y., Wang C., Tian Z., Cheng C., Zhang R., Puduvalli V., Horbinski C., Mo X., Han X., Chakravarti A., and Guo D. Targeting DGAT1 ameliorates glioblastoma by increasing fat catabolism and oxidative stress. *Cell. Metab.*, **32** (2), 229–242 (2020). DOI: 10.1016/j.cmet.2020.06.002
132. Koundouros N. and Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br. J. Cancer*, **122** (1), 4–22 (2020). DOI: 10.1038/s41416-019-0650-z
133. Li Y. J., Fahrman J. F., Aftabizadeh M., Zhao Q., Tripathi S. C., Zhang C., Yuan Y., Ann D., Hanash S., and Yu H. Fatty acid oxidation protects cancer cells from apoptosis by increasing mitochondrial membrane lipids. *Cell Rep.*, **39** (13), 111044 (2022). DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111044
134. De Martino M., Daviaud C., Minns H. E., Lazarian A., Wacker A., Costa A. P., Attarwala N., Chen Q., Choi S. W., Rabadan R., McIntire L. B. J., Gartrell R. D., Kelly J. M., Laiakis E. C., and Vanpouille-Box C. Radiation therapy promotes unsaturated fatty acids to maintain survival of glioblastoma. *Cancer Lett.*, **570**, 216329 (2023). DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216329
135. Jin Y., Tan Y., Wu J., and Ren Z. Lipid droplets: a cellular organelle vital in cancer cells. *Cell Death Discov.*, **9** (1), 254 (2023). DOI: 10.1038/s41420-023-01493-z
136. Wang D., Ye Q., Gu H., and Chen Z. The role of lipid metabolism in tumor immune microenvironment and potential therapeutic strategies. *Front. Oncol.*, **12**, 984560 (2022). DOI: 10.3389/fonc.2022.984560
137. DePeaux K. and Delgoffe G. M. Metabolic barriers to cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, **21** (12), 785–797 (2021). DOI: 10.1038/s41577-021-00541-y
138. Zhao L., Liu Y., Zhang S., Wei L., Cheng H., Wang J., and Wang J. Impacts and mechanisms of metabolic reprogramming of tumor microenvironment for immunotherapy in gastric cancer. *Cell Death Dis.*, **13** (4), 378 (2022). DOI: 10.1038/s41419-022-04821-w
139. Wang K., Michelakos T., Wang B., Shang Z., DeLeo A. B., Duan Z., Hornicek F. J., Schwab J. H., and Wang X. Targeting cancer stem cells by disulfiram and copper sensitizes radioresistant chondrosarcoma to radiation. *Cancer Lett.*, **505**, 37–48 (2021). DOI: 10.1016/j.canlet.2021.02.002
140. Su X., Xu Y., Fox G. C., Xiang J., Kwakwa K. A., Davis J. L., Belle J. I., Lee W. C., Wong W. H., Fontana F., Hernandez-Aya L. F., Kobayashi T., Tomasson H. M., Su J., Bakewell S. J., Stewart S. A., Egbulefu C., Karmakar P., Meyer M. A., Veis D. J., DeNardo D. G., Lanza G. M., Achilefu S., and Weilbaecher K. N. Breast cancer-derived GM-CSF regulates arginase 1 in myeloid cells to promote an immunosuppressive microenvironment. *J. Clin. Invest.*, **131** (20), e145296 (2021). DOI: 10.1172/JCI145296

141. Xiang L. and Meng X. Emerging cellular and molecular interactions between the lung microbiota and lung diseases. *Crit. Rev. Microbiol.*, **48** (5), 577–610 (2022). DOI: 10.1080/1040841X.2021.1992345
142. Lee Y. H., Tai D., Yip C., Choo S. P. and Chew V. Combinational Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma: Radiotherapy, Immune Checkpoint Blockade and Beyond. *Front. Immunol.*, **11**, 568759 (2020). DOI: 10.3389/fimmu.2020.568759
143. He K., Barsoumian H. B., Puebla-Osorio N., Hu Y., Sezen D., Wasley M. D., Bertolet G., Zhang J., Leuschner C., Yang L., Kettlun Leyton C. S., Fowlkes N. W., Green M. M., Hettrick L., Chen D., Masrourpour F., Gu M., Maazi H., Revenko A. S., Cortez M. A., and Welsh J. W. Inhibition of STAT6 with Antisense Oligonucleotides Enhances the Systemic Antitumor Effects of Radiotherapy and Anti-PD-1 in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Immunol. Res.*, **11** (4), 486–500 (2023). DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-22-0547
144. Zhang F., Sang Y., Chen D., Wu X., Wang X., Yang W., and Chen Y. M2 macrophage-derived exosomal long non-coding RNA AGAP2-AS1 enhances radiotherapy immunity in lung cancer by reducing microRNA-296 and elevating NOTCH2. *Cell Death Dis.*, **12** (5), 467 (2021). DOI: 10.1038/s41419-021-03700-0
145. Korbecki J., Bosiacki M., Barczak K., Łagocka R., Brodowska A., Chlubek D., and Baranowska-Bosiacka I. Involvement in Tumorigenesis and Clinical Significance of CXCL1 in Reproductive Cancers: Breast Cancer, Cervical Cancer, Endometrial Cancer, Ovarian Cancer and Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (8), 7262 (2023). DOI: 10.3390/ijms24087262
146. Tsolou A., Lamprou I., Fortosi A. O., Liouisia M., Giatromanolaki A., and Koukourakis M. I. 'Stemness' and 'senescence' related escape pathways are dose dependent in lung cancer cells surviving post irradiation. *Life Sci.*, **232**, 116562 (2019). DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116562
147. Nie Y., Yang D., and Oppenheim J. J. Alarmins and anti-tumor immunity. *Clin. Ther.*, **38** (5), 1042–1053 (2016). DOI: 10.1016/j.clinthera.2016.03.021
148. Land W. G., Agostinis P., Gasser S., Garg A. D., and Linkermann A. DAMP-induced allograft and tumor rejection: The circle is closing. *Am. J. Transplant.*, **16** (12), 3322–3337 (2016). DOI: 10.1111/ajt.14012
149. Hernandez C., Huebener P. and Schwabe R. F. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*, **35** (46), 5931–5941 (2016). DOI: 10.1038/onc.2016.104
150. Pan Y., Yu Y., Wang X., and Zhang T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front. Immunol.*, **11**, 583084 (2020). DOI: 10.3389/fimmu.2020.583084
151. Yunna C., Mengru H., Lei W., and Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.*, **877**, 173090 (2020). DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173090
152. Timperi E., Gueguen P., Molgora M., Magagna I., Kieffer Y., Lopez-Lastra S., Sirven P., Baudrin L. G., Baubrande S., Nicolas A., Champenois G., Meseure D., Vincent-Salomon A., Tardivon A., Laas E., Soumelis V., Colonna M., Mechta-Grigoriou F., Amigorena S., and Romano E. Lipid-associated macrophages are induced by cancer-associated fibroblasts and mediate immune suppression in breast cancer. *Cancer Res.*, **82** (18), 3291–3306 (2022). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-1427
153. Sahai E., Astsaturon I., Cukierman E., DeNardo D. G., Egeblad M., Evans R. M., Fearon D., Gretchen F. R., Hingorani S. R., Hunter T., Hynes R. O., Jain R. K., Janowitz T., Jorgensen C., Kimmelman A. C., Kolonin M. G., Maki R. G., Powers R. S., Puré E., Ramirez D. C., Scherz-Shouval R., Sherman M. H., Stewart S., Tlsty T. D., Tuveson D. A., Watt F. M., Weaver V., Weeraratna A. T., and Werb Z. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer*, **20** (3), 174–186 (2020). DOI: 10.1038/s41568-019-0238-1
154. Bu L., Baba H., Yoshida N., Miyake K., Yasuda T., Uchi-hara T., Tan P., and Ishimoto T. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene*, **38** (25), 4887–4901 (2019). DOI: 10.1038/s41388-019-0765-y
155. Ermakov M. S., Nushtaeva A. A., Richter V. A., and Koval O. A. Cancer-associated fibroblasts and their role in tumor progression. *Vavilovskii Zhurn. Genet. Selekcii*, **26** (1), 14–21 (2022). DOI: 10.18699/VJGB-22-03
156. Zhao Q., Huang L., Qin G., Qiao Y., Ren F., Shen C., Wang S., Liu S., Lian J., Wang D., Yu W., and Zhang Y. Cancer-associated fibroblasts induce monocytic myeloid-derived suppressor cell generation via IL-6/exosomal miR-21-activated STAT3 signaling to promote cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.*, **518**, 35–48 (2021). DOI: 10.1016/j.canlet.2021.06.009
157. Gong J., Lin Y., Zhang H., Liu C., Cheng Z., Yang X., Zhang J., Xiao Y., Sang N., Qian X., Wang L., Cen X., Du X., and Zhao Y. Reprogramming of lipid metabolism in cancer-associated fibroblasts potentiates migration of colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.*, **11** (4), 267 (2020). DOI: 10.1038/s41419-020-2434-z
158. Chen B. J., Zhao J. W., Zhang D. H., Zheng A. H., and Wu G. Q. Immunotherapy of Cancer by Targeting Regulatory T cells. *Int. Immunopharmacol.*, **104**, 108469 (2021). DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108469
159. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E. S., Altucci L., Amelio I., Andrews D. W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A. V., Arama E., Baehrecke E. H., Barlev N. A., Bazan N. G., Bernassola F., Bertrand M. J. M., Bianchi K., Blagosklonny M. V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F. K., Chandel N. S., Cheng E. H., Chipuk J. E., Cidlowski J. A., Ciechanover A., Cohen G. M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J. R., Czabotar P. E., D'Angiolella V., Dawson T. M., Dawson V. L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K. M., DeBerardinis R. J., Deshmukh M., Di

- Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V. M., Dixon S. J., Duckett C. S., Dynlacht B. D., El-Deiry W. S., Elrod J. W., Fimia G. M., Fulda S., García-Sáez A. J., Garg A. D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D. R., Greene L. A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J. M., Harris I. S., Hengartner M. O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P. J., Juin P. P., Kaiser W. J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R. N., Klionsky D. J., Knight R. A., Kumar S., Lee S. W., Lemasters J. J., Levine B., Linkermann A., Lipton S. A., Lockshin R. A., López-Otín C., Lowe S. W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J. C., Martin S. J., Martinou J. C., Medema J. P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E. A., Molkentin J. D., Moll U. M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J. M., Pereira D. M., Pervaiz S., Peter M. E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J. H. M., Puthalakath H., Rabinovich G. A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C. M. P., Rubinsztein D. C., Rudel T., Ryan K. M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H. U., Sistigu A., Stockwell B. R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S. W. G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander Heiden M. G., Villunger A., Virgin H. W., Vousden K. H., Vucic D., Wagner E. F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J. A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., and Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, **25** (3), 486–541 (2018). DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
160. Kashyap D., Garg V. K., and Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **125** (73), 73–120 (2021). DOI: 10.1016/bs.apcsb.2021.01.003
161. Zhang D., Zhou X., Zhang K., Yu Y., Cui S. W. and Nie S. Glucomannan from Aloe vera gel maintains intestinal barrier integrity via mitigating anoikis mediated by Nrf2-mitochondria axis. *Int. J. Biol. Macromol.*, **235**, 123803 (2023). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023
162. Li D., Park Y., Hemati H., and Liu X. Cell aggregation activates small GTPase Rac1 and induces CD44 cleavage by maintaining lipid raft integrity. *J. Biol. Chem.*, **299** (12), 105377 (2023). DOI: 10.1016/j.jbc.2023.105377
163. Zhao Z., Li C., Peng Y., Liu R., and Li Q. Construction of an original anoikis-related prognostic model closely related to immune infiltration in gastric cancer. *Front. Genet.*, **13**, 1087201 (2023). DOI: 10.3389/fgene.2022.1087201
164. Bose M., Sanders A., De C., Zhou R., Lala P., Shwartz S., Mitra B., Brouwer C., and Mukherjee P. Targeting tumor-associated MUC1 overcomes anoikis-resistance in pancreatic cancer. *Transl. Res.*, **253**, 41–56 (2023). DOI: 10.1016/j.trsl.2022.08.010
165. Cai C., Peng Y., Shen E., Wan R., Gao L., Gao Y., Zhou Y., Huang Q., Chen Y., Liu P., Guo C., Feng Z., Zhang X., Liu Y., Shen H., Zeng S., and Han Y. Identification of tumour immune infiltration-associated snoRNAs (TIIsno) for predicting prognosis and immune landscape in patients with colon cancer via a TIIsno score model. *EBioMedicine*, **76**, 103866 (2022). DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103866
166. Zaitceva V., Kopeina G. S., and Zhivotovsky B. Anastasis: Return journey from cell death. *Cancers (Basel)*, **13** (15), 3671 (2021). DOI: 10.3390/cancers13153671
167. Diepstraten S. T., Anderson M. A., Czabotar P. E., Lessene G., Strasser A., and Kelly G. L. The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs. *Nat. Rev. Cancer*, **22** (1), 45–64 (2022). DOI: 10.1038/s41568-021-00407-4
168. Kehr S. and Vogler M. It's time to die: BH3 mimetics in solid tumors. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1868** (5), 118987 (2021). DOI: 10.1016/j.bbamcr.2021.118987
169. Janssens S., Rennen S., and Agostinis P. Decoding immunogenic cell death from a dendritic cell perspective. *Immunol. Rev.*, **321** (1), 350–370 (2024). DOI: 10.1111/imr.13301
170. Ahmed A. and Tait S. W. G. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Mol. Oncol.*, **14** (12), 2994–3006 (2020). DOI: 10.1002/1878-0261.12851
171. Fucikova J., Kepp O., Kasikova L., Petroni G., Yamazaki T., Liu P., Zhao L., Spisek R., Kroemer G., and Galluzzi L. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis.*, **11** (11), 1013 (2020). DOI: 10.1038/s41419-020-03221-2
172. Park H. H., Kim H. R., Park S. Y., Hwang S. M., Hong S. M., Park S., Kang H. C., Morgan M. J., Cha J. H., Lee D., Roe J. S., and Kim Y. S. RIPK3 activation induces TRIM28 derepression in cancer cells and enhances the anti-tumor microenvironment. *Mol. Cancer*, **20** (1), 107 (2021). DOI: 10.1186/s12943-021-01399-3
173. Zhang T., Yin C., Fedorov A., Qiao L., Bao H., Beknazarov N., Wang S., Gautam A., Williams R. M., Crawford J. C., Peri S., Studitsky V., Beg A. A., Thomas P. G., Walkley C., Xu Y., Poptsova M., Herbert A., and Balachandran S. ADAR1 masks the cancer immunotherapeutic promise of ZBP1-driven necroptosis. *Nature*, **606** (7914), 594–602 (2022). DOI: 10.1038/s41586-022-04753-7
174. Yan J., Wan P., Choksi S., and Liu Z. G. Necroptosis and tumor progression. *Trends Cancer*, **8** (1), 21–27 (2022). DOI: 10.1016/j.trecan.2021.09.003
175. Du T., Gao J., Li P., Wang Y., Qi Q., Liu X., Li J., Wang C., and Du L. Pyroptosis, metabolism, and tumor immune microenvironment. *Clin. Transl. Med.*, **11** (8), e492 (2021). DOI: 10.1002/ctm2.492
176. Wang Q., Wang Y., Ding J., Wang C., Zhou X., Gao W., Huang H., Shao F., and Liu Z. A bioorthogonal system reveals antitumour immune function of pyroptosis. *Nature*, **579** (7799), 421–426 (2020). DOI: 10.1038/s41586-020-2079-1
177. Wei X., Xie F., Zhou X., Wu Y., Yan H., Liu T., Huang J., Wang F., Zhou F., and Zhang L. Role of pyroptosis in inflammation and cancer. *Cell. Mol. Immunol.*, **19** (9), 971–992 (2022). DOI: 10.1038/s41423-022-00905-x

178. Torres-Velarde J. M., Allen K. N., Salvador-Pascual A., Leija R. G., Luong D., Moreno-Santillán D. D., Ensminger D. C., and Vázquez-Medina J. P. Peroxiredoxin 6 suppresses ferroptosis in lung endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **218**, 82–93 (2024). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.04.208
179. Chen X., Zhang L., He Y., Huang S., Chen S., Zhao W., and Yu D. Regulation of m6A modification on ferroptosis and its potential significance in radiosensitization. *Cell Death Dis.*, **9** (1), 343 (2023). DOI: 10.1038/s41420-023-01645-1
180. Lei G., Zhuang L., and Gan B. The roles of ferroptosis in cancer: Tumor suppression, tumor microenvironment, and therapeutic interventions. *Cancer cell*, **42** (4), 513–534 (2024). DOI: 10.1016/j.ccell.2024.03.011
181. Shen D., Luo J., Chen L., Ma W., Mao X., Zhang Y., Zheng J., Wang Y., Wan J., Wang S., Ouyang J., Yi H., Liu D., Huang W., Zhang W., Liu Z., McLeod H. L., and He Y. PARPi treatment enhances radiotherapy-induced ferroptosis and antitumor immune responses via the cGAS signaling pathway in colorectal cancer. *Cancer Lett.*, **550**, 215919 (2022). DOI: 10.1016/j.canlet.2022.215919
182. Zhao L., Zhou X., Xie F., Zhang L., Yan H., Huang J., Zhang C., Zhou F., Chen J., and Zhang L. Ferroptosis in cancer and cancer immunotherapy. *Cancer Commun. (Lond.)*, **42** (2), 88–116 (2022). DOI: 10.1002/cac2.12250
183. Yan Y. and Gan B. Hyperoxidized PRDX3 as a specific ferroptosis marker. *Life Metab.*, **2** (6), load042 (2023). DOI: 10.1093/lifemeta/load042
184. Yao L. C., Aryee K. E., Cheng M., Kaur P., Keck J. G., and Brehm M. A. Creation of PDX-bearing humanized mice to study immuno-oncology. *Methods Mol. Biol.*, **1953**, 241–252 (2019). DOI: 10.1007/978-1-4939-9145-7_15
185. Tian H., Lyu Y., Yang Y. G., and Hu Z. Humanized rodent models for cancer research. *Front. Oncol.*, **10**, 1696 (2020). DOI: 10.3389/fonc.2020.01696
186. Fiorini E., Veghini L., and Corbo V. Modeling cell communication in cancer with organoids: Making the complex simple. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 166 (2020). DOI: 10.3389/fcell.2020.00166
187. Zheng D., Li J., Yan H., Zhang G., Li W., Chu E., and Wei N. Emerging roles of Aurora-A kinase in cancer therapy resistance. *Acta Pharm. Sin. B*, **13** (7), 2826–2843 (2023). DOI: 10.1016/j.apsb.2023.03.013
188. Hill R. M., Fok M., Grundy G., Parsons J. L., and Rocha S. The role of autophagy in hypoxia-induced radioresistance. *Radiother. Oncol.*, **189**, 109951 (2023). DOI: 10.1016/j.radonc.2023.109951
189. He L., Yu X., and Li W. Recent progress and trends in X-ray-induced photodynamic therapy with low radiation doses. *ACS Nano*, **16** (12), 19691–19721 (2022). DOI: 10.1021/acsnano.2c07286
190. Pan Y., Zhu Y., Xu C., Pan C., Shi Y., Zou J., Li Y., Hu X., Zhou B., Zhao C., Gao Q., Zhang J., Wu A., Chen X., and Li J. Biomimetic Yolk-Shell nanocatalysts for activatable dual-modal-image-guided triple-augmented chemodynamic therapy of cancer. *ACS Nano*, **16** (11), 19038–19052 (2022). DOI: 10.1021/acsnano.2c08077
191. Caverzán M. D., Beaugé L., Chesta C. A., Palacios R. E., and Ibarra L. E. Photodynamic therapy of Glioblastoma cells using doped conjugated polymer nanoparticles: An in vitro comparative study based on redox status. *J. Photochem. Photobiol. B*, **212**, 112045 (2020). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.112045
192. Gudkov S. V., Shilyagina N. Y., Vodeneev V. A. and Zvyagin A. V. Targeted radionuclide therapy of human tumors. *Int. J. Mol. Sci.*, **17** (1), 33 (2015). DOI: 10.3390/ijms17010033
193. Su S. and Kang P. Recent advances in nanocarrier-assisted therapeutics delivery systems. *Pharmaceutics*, **12**, 837 (2020). DOI: 10.3390/pharmaceutics12090837
194. Fujita H., Ohta S., Nakamura N., Somiya M. and Horie M. Progress of endogenous and exogenous nanoparticles for cancer therapy and diagnostics. *Genes (Basel)*, **14** (2), 259 (2023). DOI: 10.3390/genes14020259
195. Li J., Wu T., Li S., Chen X., Deng Z., and Huang Y. Nanoparticles for cancer therapy: a review of influencing factors and evaluation methods for biosafety. *Clin. Translat. Oncol.*, **25** (7), 2043–2055 (2023). DOI: 10.1007/s12094-023-03117-5
196. Sun L., Liu H., Ye Y., Lei Y., Islam R., Tan S., Tong R., Miao Y. B., and Cai L. Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **8** (1), 418 (2023). DOI: 10.1038/s41392-023-01642-x
197. Tan G. R., Hsu C. S., and Zhang Y. pH-Responsive hybrid nanoparticles for imaging spatiotemporal pH changes in biofilm-dentin microenvironments. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **13**, 46247–46259 (2021). DOI: 10.1021/acsmami.1c11162
198. Xie N., Shen G., Gao W., Huang Z., Huang C., and Fu L. Neoantigens: promising targets for cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **8**, 9 (2023). DOI: 10.1038/s41392-022-01270-x
199. Gisbert-Garzarán M., Berkmann J. C., Giasafaki D., Lozano D., Spyrou K., Manzano M., Steriotis T., Duda G. N., Schmidt-Bleek K., Charalambopoulou G., and Vallet-Regí M. Engineered pH-responsive mesoporous carbon nanoparticles for drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **12**, 14946–14957 (2020). DOI: 10.1021/acsmami.0c01786
200. Ge L., Qiao C., Tang Y., Zhang X., and Jiang X. Light-activated hypoxia-sensitive covalent organic framework for tandem-responsive drug delivery. *Nano Lett.*, **21**, 3218–3224 (2021). DOI: 10.1021/acs.nanolett.1c00488
201. Jin J. and Zhao Q. Engineering nanoparticles to reprogram radiotherapy and immunotherapy: recent advances and future challenges. *J. Nanobiotechnol.*, **18**, 75 (2020). DOI: 10.1186/s12951-020-00629-y
202. Roy I., Krishnan S., Kabashin A. V., Zavestovskaya I. N., and Prasad P. N. Transforming nuclear medicine with nanoradiopharmaceuticals. *ACS Nano*, **16**, 5036–5061 (2022). DOI: 10.1021/acsnano.1c10550
203. Domańska I. M., Figat R., Zalewska A., Cieśla K., Kowalczyk S., Kędra K., and Sobczak M. The influence of ionizing radiation on paclitaxel-loaded nanoparticles based on PLGA. *Appl. Sci.*, **13** (19), 11052 (2023). DOI: 10.3390/app131911052

Mechanisms of Cancer Cell Radioresistance: Modern Trends and Research Prospects

M.G. Sharapov*, E.E. Karmanova*, and S.V. Gudkov**

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

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

Radiation therapy holds a key position in the arsenal of cancer treatment methods. This non-invasive technique has been actively used for several decades and has demonstrated high effectiveness in combating various types of malignant tumors. Despite significant advancements in ionizing radiation delivery technologies and the introduction of targeted radiosensitizing drugs and immunotherapy, classical radiation therapy faces limitations related to the radioresistance of tumor cells. This resistance is caused by numerous factors, such as genetic mutations, the metabolic characteristics of cancer cells, their ability to repair DNA, the presence of a tumor microenvironment, and many others. Tumor radioresistance reduces the success of treatment, making it necessary to explore new approaches to enhance the effectiveness of radiation therapy. This review discusses the main principles of radiation therapy and the properties of cancer cells that affect their radiosensitivity. It examines both existing methods for overcoming the radioresistance of cancer cells and prospects for further development, which could significantly improve the effectiveness of cancer treatment.

Keywords: cancer, radiation therapy, radioresistance

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА $\Pi VmrMLM$ ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ И ПОИСКА НОВЫХ ГЕНОМНЫХ АССОЦИАЦИЙ У КУЛЬТУРНОГО НУТА

© 2024 г. М.А. Дук*, **, #, А.А. Канапин*, М.П. Банкин*, М.Г. Самсонова*

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

**Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе,
Политехническая ул., 26, Санкт-Петербург, 195251, Россия

#E-mail: duk@mail.ioffe.ru

Поступила в редакцию 14.05.2024 г.

После доработки 14.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Нут (*Cicer arietinum*) является важной сельскохозяйственной культурой, которая выращивается на Ближнем Востоке, в Средней Азии, Турции, Индии и на юге России и используется во множестве традиционных блюд. Уменьшение генетического разнообразия при доместикации, а также большая чувствительность культуры к абиотическим и биотическим стрессам наталкивают на мысль об использовании староместных сортов в селекционных программах по улучшению культуры. Новый метод $\Pi VmrMLM$ для полногеномного поиска ассоциаций позволил выявить новые, расположенные около или внутри важных генов, варианты в геномах образцов коллекции нута ВИР имени Н.И. Вавилова и провести оценку пригодности этих образцов для выращивания в условиях Кубани и Астрахани.

Ключевые слова: нут, GWAS, $\Pi VmrMLM$, староместные сорта, многолокусные модели.

DOI: 10.31857/S0006302924060126, **EDN:** NKTLLJ

Нут бараний (*Cicer arietinum*) — это однолетнее самоопыляющееся растение, выращиваемое на Ближнем Востоке, Индии, Турции, Средней Азии и юге России, и применяемое во множестве традиционных блюд [1, 2]. Нут условно делится на сорта с крупными светлыми семенами (кабули), используемыми в различных пищевых продуктах, и на сорта с мелкими темными семенами (дези), выращиваемыми преимущественно на корм животных [3].

Нут является теплолюбивым растением, чувствительным к условиям окружающей среды, и очень подвержен грибковым заболеваниям при влажной погоде [4]. Также существует большая изменчивость между сортами в весе семян и побегов, количестве ветвей, весе надземной части, скороспелости и длительности цветения. Кроме того, различные сорта показывают большую изменчивость в зависимости от места выращивания, поэтому активно исследуются механизмы цветения [5], созревания и устойчивости к абиотическим стрессам [6], которые могут оказать критическое влияние на успех выращивания культуры в разных странах.

Значительное уменьшение генетического разнообразия вида после доместикации [7] приводит

к идее использования в селекционных программах староместных сортов, которые могут стать донорами предпочтительных аллелей, оказывающих влияние на критически важные характеристики. В данный момент ведутся различные исследования по улучшению культуры [8], и полногеномный поиск ассоциаций для коллекции образцов, содержащих староместные сорта и важные селекционные линии может предоставить дополнительную информацию для их использования в селекционных программах.

Ранее мы провели полногеномный поиск ассоциаций для нута с помощью моделей Blink, FarmCPU, SUPER, MLM [9], однако было выявлено лишь небольшое количество ассоциаций. Это может быть связано с тем, что однолокусные модели, такие как MLM, имеют поправку Бонферрони на множественное тестирование, которая приводит к завышению ошибки 1 рода и может оказаться слишком строгой для обнаружения связей со сложными признаками [10]. Мультилокусные модели тестируют все маркеры в рамках одной линейной модели и оценивают эффекты всех маркеров, что помогает решить эту проблему и выявить новые ассоциации.

Таблица 1. Расшифровка используемых кодов фенотипических признаков

Краткое название	Подробное описание признака
DFst	Количество дней между всходами и началом цветения
DF	Продолжительность цветения в днях
Dmat	Количество дней между всходами и созревaniem
PoW	Вес бобов с растения
PoNP	Количество бобов с растения
PWwP	Вес растения с бобами
100SW	Вес 100 семян
PH	Высота растения
HFP	Высота прикрепления первого боба
NPB	Количество ветвей первого порядка
NSB	Количество ветвей второго порядка
LS	Размер листочка в баллах

Модель *PIVmrMLM* [10, 11] является мульти-локусной моделью и позволяет оценивать все эффекты одновременно с помощью эмпирического Байесовского алгоритма максимизации ожидания, а все ненулевые эффекты дополнительно оцениваются с помощью теста отношения правдоподобия для значимых QTN. В этом методе расчет большого количества компонентов дисперсии был заменен расчетом трех сжатых оценок, что позволяет методу быть не слишком сложным в вычислительном плане. Особенности растительных выборок учтены при строгости выявления ассоциаций в новом методе *PIVmrMLM* [11], что позволяет найти новые варианты, а также подтвердить варианты, найденные ранее другими моделями.

В данной работе метод *PIVmrMLM* в режиме *Single_env* применялся отдельно для поиска ассоциаций на данных двух опытных станций. Были выявлены новые варианты и подтверждены варианты, найденные ранее с помощью пакета *GAPIT* [12], а рассчитываемый написанным для R пакетом *PIVmrMLM* [13] аддитивный эффект каждого варианта позволил оценить продуктивность каждого сорта в зависимости от местности и выявить два староместных сорта, несущих наибольшее количество предпочтительных аллелей, для использования в селекционных программах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генотипические и фенотипические данные. В работе рассматривается набор из 171 образца нута из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР, Санкт-Петербург, Россия), включающий в

себя 147 староместных сортов (ландрасов) и 23 культурных сорта. Ландрасы были собраны Н.И. Вавиловым во время его экспедиций 1920–1930-х годов.

Фенотипирование образцов нута проведено на двух опытных станциях ВИР – на Кубани и в Астрахани. Кубанская опытная станция (45°18'с.ш. и 40°52' в.д.) расположена в степной зоне Прикубанской равнины, в 80 км от предгорий Кавказа. Типичными почвами этих регионов являются прикавказские черноземы со слабощелочной кислотностью. Климат станции характеризуется неоптимальным количеством осадков и высокими колебаниями всех климатических показателей. Астраханская опытная станция (46°06'с.ш. и 48°04' в.д.) расположена в пределах Прикаспийской низменности в южной части Астраханской области. Климат региона самый засушливый и континентальный на европейской территории Российской Федерации. В данном исследовании рассматривались 12 фенотипических признаков, сокращенные коды названий которых приведены в табл. 1. При поиске геномных ассоциаций была проведена квантильная нормализация фенотипических данных для каждого из признаков.

The DNeasy Plant Mini Kit использовали для извлечения ДНК из собранных листьев. ДНК секвенировали в BGI Group (Китай) с использованием протокола Illumina, генерирующего парные чтения длиной 150 п.н., которые были сопоставлены со сборкой эталонного генома нута ASM33114v1 с помощью *bwa-mem* с использованием параметров по умолчанию [38]. NGSEP v4.0 [39] использовали для вызова вариантов, после чего SNP были дополнительно отфильтрованы с помощью *VCFTools* [40] для сохранения SNP с ча-

стотой минорных аллелей (MAF) > 5% и частотой вызова генотипов >85%, в результате чего для дальнейшего анализа было оставлено 170 966 SNP.

Анализ геномных ассоциаций. Для преобразования форматов генетических данных для использования в пакете PIVmrMLM использовали программы TASSEL5 [41] и PLINK [42]. Для анализа геномных ассоциаций использовали пакет PIVmrMLM [13] для R в режиме Single_env на данных каждой опытной станции отдельно. Результаты сравнивали с ассоциациями, полученными в пакете GAPIT [12] для R, ранее опубликованные в [9].

Пересечения с генами. Данные о координатах генов были взяты из GFF-файла версии 1 Cicer_arietinum_GA_v1.0.gene.gff, функциональное описание генов было получено из базы данных PulseDB: <https://www.pulsedb.org/Analysis/1869759>.

Оценка качества сортов относительно места выращивания. Для оценки качества сортов использовалась оценка TI-score, посчитанная отдельно для двух опытных станций. Оценка получается таким образом: если сорт содержит вариант, ассоциированный с фенотипическими данными рассматриваемой опытной станции и оказывающий положительное действие на величину фенотипического признака, то величина TI увеличивается на 1, если содержится вариант, оказывающий негативное действие, то величина TI уменьшается на 1. В данном случае положительным действием считалось уменьшение количества дней до созревания (Dmat), а также увеличение веса бобов с растения (PoW), числа бобов с растения (PoNP) и веса растения с бобами (PWwP). Также рассматривалось количество QTN с предпочтительным эффектом у каждого сорта без учета QTN с негативным эффектом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данном исследовании был проведен полно-геномный поиск ассоциаций по 12 фенотипическим признакам: количеству дней между всходами и началом цветения (DFst), продолжительности цветения (DF), количеству дней между всходами и созреванием (Dmat), весу всех бобов с растения (PoW), количеству бобов с растения (PoNP), весу растения с бобами (PWwP), весу 100 семян (100SW), высоте растения (PH), высоте прикрепления первого боба (HFP), количеству ветвей первого порядка (NPB), количеству ветвей второго порядка (NSB), размеру листочка (LS). Полный список и краткие коды для дальнейшего обозначения признаков приведен в таблице 1.

Была использована собранная во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова коллекция из 171 образца

нута, в том числе 147 образцов староместных сортов. Образцы были выращены на двух опытных станциях с разным климатом: в Астрахани с резко континентальным климатом и на Кубани с умеренно континентальным климатом.

Значения фенотипических признаков сильно варьируют между сортами коллекции, как можно видеть на рис. 1. Кроме того, значения фенотипических признаков существенно различаются между опытными станциями. Для сравнения фенотипических данных, полученных с двух опытных станций был выполнен тест Манна–Уитни, и только для четырех признаков — числа дней от всходов до зацветания, веса 100 семян, высоты прикрепления первого боба и количества ветвей второго порядка — различия между измерениями на двух опытных станциях не были статистически значимы, что говорит о важном влиянии условий выращивания на характеристики растений.

Всего для 12 фенотипических признаков на двух опытных станциях методом PIVmrMLM было обнаружено 474 ассоциированных с признаками SNP, которые, согласно принятой терминологии, мы обозначили QTN (quantitative trait nucleotide). После фильтрации по MAF остается 170 966 SNP. Так как коллекция нута содержит большое количество староместных сортов, по большому количеству вариантов являющихся гетерозиготными, уже после проведения анализа были исключены QTN, по которым 95% растений были гетерозиготными, так как такие варианты не позволяли гарантированно проверить статистическую значимость найденных ассоциаций, то есть значимость различий между образцами, содержащими и не содержащими альтернативный аллель. После исключения таких ассоциаций осталось 455 QTN.

Только для признака «вес всех бобов с растения (PoW)», количество QTN при выращивании в Астрахани превышало таковое в Кубанских данных (рис. 2а). Для таких признаков, как количество бобов с растения (PoNP) и вес 100 семян (100SW) было найдено заметно больше QTN при выращивании образцов на Кубани, чем в Астрахани. Распределение QTN по хромосомам для данных Астраханской и Кубанской опытных станций практически одинаковое, как можно видеть на рис. 2б, и зависит в общем только от длины соответствующей хромосомы. Так, малое количество QTN на 8 хромосоме для обеих опытных станций связано с тем, что эта хромосома самая короткая из всех у нута.

Найденные QTN объясняют от 36.56% (для количества дней от всходов до созревания) до 55.50% (для количества ветвей первого порядка) вариации в данных Астраханской опытной станции, и от 36.32% (для высоты прикрепления первого боба) до 53.26% (для веса ста семян) вариации

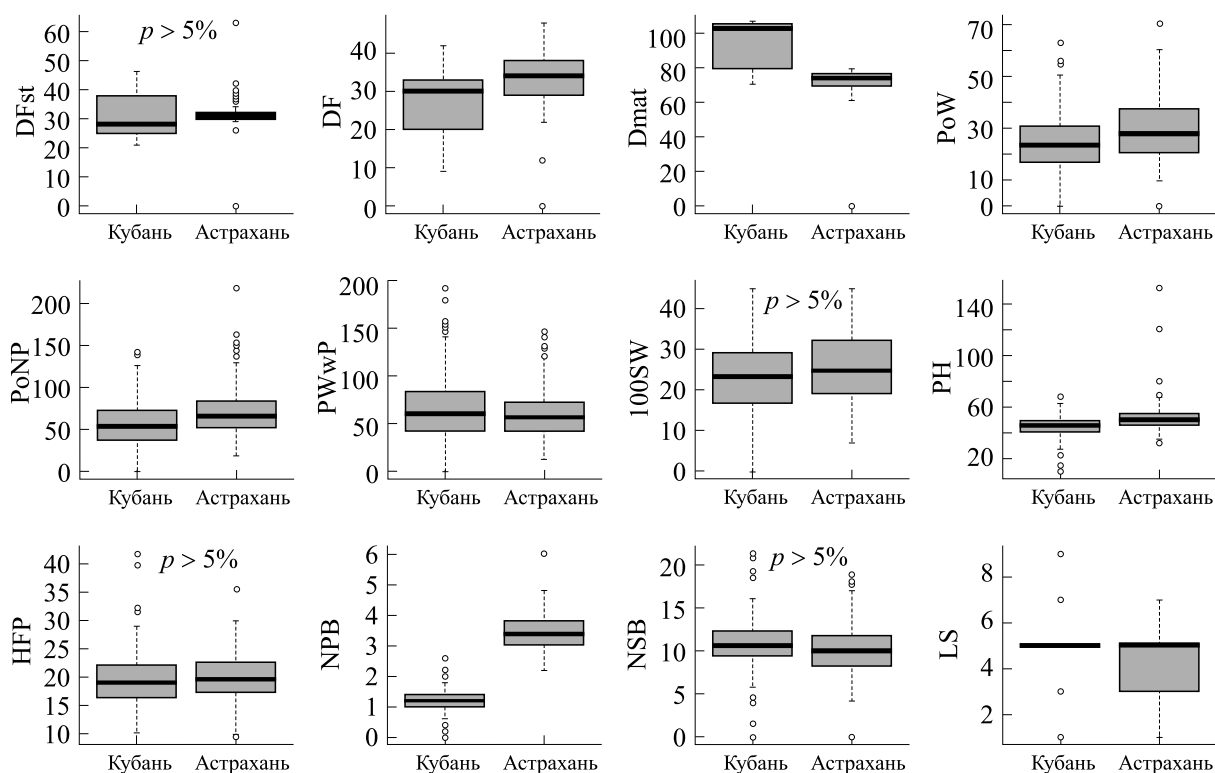


Рис. 1. Диаграммы размаха значений фенотипических признаков на разных опытных станциях. Отметки $p > 5\%$ для признаков количества дней от всходов до цветения (DFst), веса ста семян (100SW), высоты прикрепления первого боба (HFP) и числа ветвей второго порядка (NSB) означают, что различия между опытными станциями в значениях этих признаков не являются статистически значимыми по критерию Манна-Уитни.

ции в данных Кубанской опытной станции (табл. 2). В табл. 2 также приведен список QTN, которые объясняют наибольший процент вариации индивидуальных признаков на каждой опытной станции. Можно видеть, что такие QTN встречаются на всех хромосомах, кроме восьмой. При этом для данных Астраханской опытной станции большая часть QTN расположена на первой или второй хромосоме, тогда как для данных Кубанской опытной станции такие варианты распределены по семи хромосомам (табл. 2).

Из 455 QTN, найденных методом PiVmrMLM, 29 были ранее найдены методами FarmCPU, Blink, SUPER или MLM в пакете GAPIT [12] и опубликованы в работе [9] (табл. 3). При этом, помимо ассоциации с признаком высота прикрепления первого боба, программа 3VmrMLM вычленила ассоциацию QTN Ca3_3964840 и QTN Ca6_38136682 с признаками количеством дней между всходами и цветением и высотой растения, соответственно. QTN Ca4_7480193 и QTN Ca4_28678319, ассоциированные по данным пакета GAPIT с двумя признаками — высотой растения и высотой прикрепления первого боба, при использовании программы 3vmrMLM оказались ассоциированными только с высотой растения. В целом эти отличия не играют большой роли, так

как такие признаки, как высота растения и высота прикрепления первого боба коррелируют друг с другом.

Из найденных QTN 63 попали в гены или располагались на расстоянии менее чем 1000 п.н. выше или ниже «по течению». 9 из таких генов кодируют известные белки, причем у 22 генов QTN локализуется внутри гена (табл. 4).

Староместные сорта являются важным источником генетического разнообразия и могли бы стать в селекционных программах донорами новых аллелей с предпочтительным эффектом. Так, в данном исследовании мы сконцентрировались на таких признаках, как скороспелость (число дней от всходов до созревания, Dmat), вес бобов с растения (PoW), число бобов с растения (PoNP) и вес растения с бобами (PWwP). С точки зрения предпочтительных сельскохозяйственных характеристик еще может быть важен вес 100 семян, однако эта характеристика не сильно отличается в данных разных опытных станций. Для оценки качества каждого сорта для климата соответствующей опытной станции была введена характеристика TI-score, которая увеличивалась на 1, если образец содержал альтернативный аллель с предпочтительным эффектом (то есть растения, содержащие этот вариант, показывали либо мень-

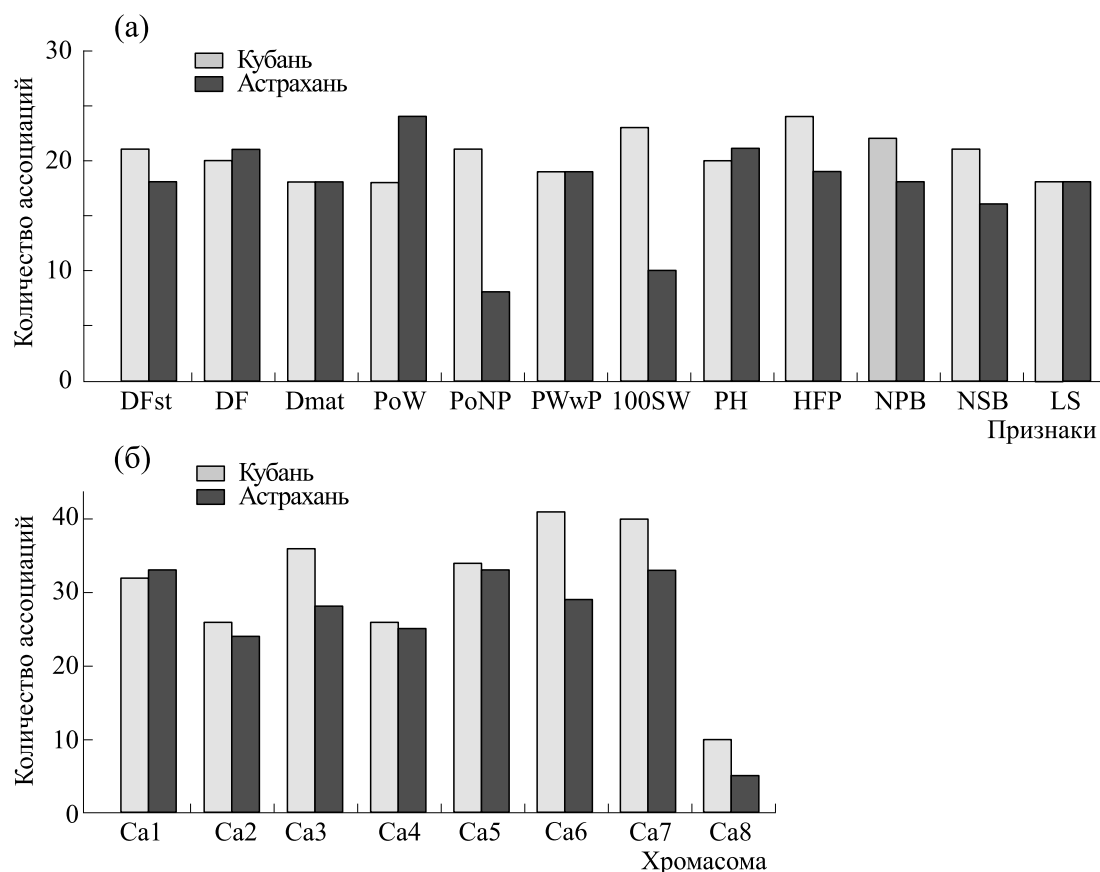


Рис. 2. Общее количество QTN, найденное методом ПIVmrMLM при выращивании образцов в Астрахани и на Кубани для каждого признака (а) и для каждой хромосомы (б).

шее количество дней до созревания, либо больший вес растения или бобов, либо большее число бобов), и уменьшалась на 1, если образец содержал альтернативный аллель с негативным эффектом.

На Кубанской опытной станции 75 староместных сортов имели положительное значение Π -score, тогда как на Астраханской опытной станции таких сортов было только 8. В табл. 5, помимо этих сортов, приведены еще 10 сортов, лучших для климата Кубанской опытной станции. Также два староместных сорта имели положительное значение характеристики Π и для Кубанской, и для Астраханской опытной станции, а именно: VIR0217 (Афганистан, дези) и VIR0637 (Иордания, дези). Эти сорта могут стать донорами новых вариантов для улучшения культуры.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из-за большого влияния климатических особенностей на важные сельскохозяйственные качества нута, важно провести полногеномный поиск ассоциаций отдельно для каждой опытной станции, чтобы выявить варианты, оказывающие

наибольшее влияние на растение в соответствующем климате, поэтому метод ПIVmrMLM был применен к данным разных опытных станций отдельно в режиме `Single_env`.

Многие из найденных нами QTN попадают в гены с важными функциями, или оказываются вблизи них, что может быть связано с их влиянием на транскрипционную или посттранскрипционную регуляцию. Многие из таких QTN также объясняют значимый процент вариации в признаке. Например, QTN Ca7_44115084 и Ca6_4538128 в генах *Ca_21365* (кодирует глутатион-S-трансферазу) и *Ca_05847* (кодирует белок NEDD1) объясняют наибольший процент вариации для таких признаков, как количество дней от всходов до цветения и число бобов с растения соответственно. У *Arabidopsis thaliana* белок NEDD1 участвует в клеточном делении [14], а глутатион-S-трансфераза участвует в липидном обмене и детоксикации у различных организмов [15, 16].

Интересно, что два QTN — Ca5_39553204, ассоциированный с количеством бобов на Астраханской опытной станции, и Ca5_39576662, ассоциированный с числом ветвей первого порядка на Кубанской опытной станции, попали в тело

Таблица 2. Процент объясненной вариации и QTN, объясняющие наибольшее количество вариации (% от r^2) в соответствующем признаке в данных разных опытных станций

Признак	Опытная станция	% вариации, объясненной всеми QTN	QTN	$r^2(\%)$
DFst	Астрахань	36.56	Ca7_44115084	5.9942
	Кубань	42.72	Ca7_37703980	3.9486
DF	Астрахань	39.19	Ca1_46864656	4.2536
	Кубань	50.89	Ca2_24113184	6.532
Dmat	Астрахань	42.98	Ca6_41622185	4.1573
	Кубань	46.23	Ca1_30627361	5.1945
PoW	Астрахань	43.38	Ca7_10545614	3.1257
	Кубань	48.61	Ca3_10254742	4.4301
PoNP	Астрахань	37.32	Ca5_7093405	6.2341
	Кубань	46.65	Ca6_4538128	5.0146
PWwP	Астрахань	52.49	Ca4_19608475	5.5026
	Кубань	50.42	Ca3_9527988	5.4915
100SW	Астрахань	49.09	Ca1_39213592	8.6285
	Кубань	53.26	Ca5_39387480	5.2738
PH	Астрахань	47.82	Ca1_35351884	3.4422
	Кубань	41.48	Ca5_25653166	3.882
HFP	Астрахань	43.56	Ca7_165722	5.3449
	Кубань	36.32	Ca7_35466316	4.0876
NPB	Астрахань	55.5	Ca7_41412619	6.3837
	Кубань	41.18	Ca1_22241685	3.712
NSB	Астрахань	49.08	Ca1_31713912	5.0263
	Кубань	51.41	Ca3_14099605	4.5697
LS	Астрахань	40.47	Ca7_35974625	5.934
	Кубань	34.82	Ca4_11296429	6.3798

гена *Ca_07489*, кодирующего серин/треонинпротеинкиназу. Кроме того, три QTN: *Ca1_37335878*, *Ca2_29653004* и *Ca7_35974625*, ассоциированные с размером листочка на обеих опытных станциях, также попадают в окрестность генов, предположительно кодирующих серин/треонинпротеинкиназы. У *Arabidopsis thaliana* серин/треонинпротеинкиназы участвуют в передаче сигнала посредством активных форм кислорода, в ответах на биотический стресс, в развитии растения, включая корневую систему [17]. Таким образом,

можно предположить, что общее здоровье растения и его корневой системы опосредованно оказывает влияние на количество ветвей, размер листа и, в конечном итоге, на число бобов.

Многие из генов участвуют в контроле роста и развития растений. Так, например, ассоциированный с длительностью цветения QTN *Ca1_16671522* локализуется в гене *Ca_06900*, кодирующем регулятор дифференцировки бутонов цветка у цветной капусты [18]. QTN *Ca3_8285781*, ассоциированный со скороспелостью (признак

Таблица 3. QTN, найденные ранее пакетом GARIT и подтвержденные также новым методом ПИVmrMLM

QTN	Признак (ПИVmrMLM)	Признак (GARIT)	Модель в GARIT	Опытная станция
Ca1_16671522*	DF	DF	FarmCPU	A**
Ca1_18866042	PH	PH	FarmCPU/Blink	K
Ca1_22963404	LS	LS	FarmCPU/Blink	A
Ca1_26297505	PWwP	PWwP	FarmCPU	K
Ca2_11031394	100SW	100SW	FarmCPU/Blink	K
Ca3_3964840	DFst, HFP	HFP	FarmCPU/MLM/GLM/Blink	K
Ca3_6550815	LS	LS	FarmCPU	K
Ca3_8285781	Dmat	Dmat	Blink	A
Ca4_4866118	PH	PH	Blink	K
Ca4_7480193	PH	PH/HFP	FarmCPU/Blink/SUPER/Blink	K/A
Ca4_11296429	LS	LS	FarmCPU	K
Ca4_19608475	PWwP	PWwP	FarmCPU/Blink	A
Ca4_28678319	PH	PH/HFP	FarmCPU/Blink/FarmCPU	K/A
Ca4_32898006	100SW	100SW	Blink	K
Ca4_33076884	DF	DF	FarmCPU	A
Ca5_4619531	PWwP	PWwP	FarmCPU	K
Ca5_24177498	Dmat	Dmat	Blink	K
Ca5_24460834	PWwP	PWwP	FarmCPU/Blink	A
Ca5_25653166	PH	PH	Blink	K
Ca6_8506723	DFst	DFst	Blink	K
Ca6_24539191	PWwP	PWwP	FarmCPU	K
Ca6_35831438	PH	PH	FarmCPU/Blink	A
Ca6_38136682	HFP, PH	HFP	Blink	A
Ca6_44176749	PoW	PoW	Blink	A
Ca6_52822315	DF	DF	Blink	K
Ca7_25146185	NPB	NPB	FarmCPU/Blink	K
Ca7_27384412	100SW	100SW	FarmCPU	K
Ca7_28975339	NPB	NPB	FarmCPU/Blink	K
Ca8_6085438	PH	PH	Blink	A

Примечание. * — Обозначение QTN следует принятой номенклатуре: CaНомерхромосомы_Позиция в хромосоме; ** — ассоциация QTN с признаком обнаружена на Астраханской (A), Кубанской (K) опытных станциях или на обеих станциях (A/K).

Таблица 4. QTN, попавшие в гены нута с известной функцией

Признак (опытная станция)	QTN	r2(%)	Ближайший ген	Положение QTN относительно CDS**	Белок
DFst (A)	Ca7_44115084*	6.0	Ca_21365	GB***	Аналог глутатион S-трансферазы 3
DFst (K)	Ca1_34415550	2.0	Ca_25480	296 п.н., 3'	Белок SAR DEFICIENT 1
DFst (K)	Ca1_47379214	1.3	Ca_12918	GB	Предполагаемый белок TSUD_08610
DFst (K)	Ca3_33599380	1.6	Ca_23666	GB	Аналог хлоропластного K(+) эффлюксного антипортера 2
DFst (K)	Ca6_15579891	1.2	Ca_05341	824 п.н., 5'	Белок EMBRYO DEFECTIVE 514
DF (A)	Ca1_16671522	1.8	Ca_06900	GB	Аналог укороченного фактор транскрипции цветной капусты
DF (A)	Ca1_27535099	1.0	Ca_25066	GB	Предполагаемый белок TSUD_335600
DF (K)	Ca6_52822315	6.5	Ca_27699	GB	Белок LYK2
DF (K)	Ca7_37894908	1.6	Ca_16382	GB	Убиквитин-карбоксильная гидролаза 2
DF (K)	Ca8_11317824	2.2	Ca_16826	GB	Аналог белок-переносчик фосфатидилинозитола 3
Dmat (A)	Ca3_8285781	1.4	Ca_24378	GB	Аналог гомеобокс- лейцинового белка-молнии PROTODERMAL FACTOR 2
Dmat (A)	Ca6_59277761	2.7	Ca_18848	975 п.н., 5'	Белок устойчивости к болезням RPS4B
Dmat (K)	Ca3_6791279	5.1	Ca_16555	GB	Аналог хлоропластной длинноцепочечной ацил-CoA- синтетазы 9
Dmat (K)	Ca3_15051454	3.2	Ca_22493	847 п.н., 3'	Белок восстановления ДНК RAD4
Dmat (K)	Ca4_21792726	2.1	Ca_19083	254 п.н., 5'	Вероятная пектин- метилтрансфераза QUA2
Dmat (K)	Ca5_24177498	2.2	Ca_17652	GB	Предполагаемый белок DVH24_038707
Dmat (K)	Ca5_46770326	2.8	Ca_04136	GB	Аналог белка DETOXIFICA- TION 9
Dmat (K)	Ca7_30208157	4.4	Ca_11706	GB	Аналог транспортера металлов Nramp2
Dmat (K)	Ca8_6708652	2.0	Ca_10713	GB	Предполагаемый WRKY транскрипционный фактор 27

Таблица 4. Продолжение

PoW (A)	Ca2_15613331	2.1	Ca_18543	459 п.н., 3'	Белок, содержащий пентатрикопептидные повторы At2g33760
PoW (A)	Ca7_12538901	1.7	Ca_09263	573 п.н., 3'	Хлоропластная DEAD-box АТФ-зависимая РНК хеликаза 3
PoW (K)	Ca6_37763788	3.7	Ca_19541	186 п.н., 5'	Частичный полипротеин gag
PoNP (A)	Ca4_35694984	4.0	Ca_22447	GB	Аналог диацилглицерин О-ацилтрансфераза 2D
PoNP (A)	Ca5_39553204	5.2	Ca_07489	GB	Аналог серин/треонин протеинкиназы OXI1
PoNP (K)	Ca4_21234531	1.6	Ca_19058	504 п.н., 3'	Субтилизин-подобная протеаза SBT1.6
PoNP (K)	Ca6_4538128*	5.0	Ca_05847	GB	Белок NEDD1 (низкого качества)
PoNP (K)	Ca6_32049391	3.9	Ca_15208	GB	Аналог флаванол синтазы/флавонон-3-гидролазы
PWwP (A)	Ca2_23905777	2.5	Ca_14940	410 п.н., 5'	Аналог белка MAIN-LIKE 2
PWwP (A)	Ca5_24460834	4.3	Ca_15581	GB	Аналог синтазы слезоточивого фактора
PWwP (K)	Ca5_4619531	2.7	Ca_25450	887 п.н., 5'	Аналог этилен-чувствительного транскрипционного фактора CRF6
PWwP (K)	Ca5_33200399	5.0	Ca_05012	GB	Фосфолипид: аналог диацилглицерол-ацилтрансферазы 1
100SW (K)	Ca2_11031394	5.3	Ca_17551	293 п.н., 3'	Белок тетраспанин-10-подобный
100SW (K)	Ca6_34567506	1.0	Ca_15816	907 п.н., 5'	Аналог белка фосфотазы 2C 77
100SW (K)	Ca7_33146251	1.4	Ca_16146	651 п.н., 3'	Гистон-деацетилаза 6
100SW (K)	Ca8_11015588	1.3	Ca_19750	969 п.н., 5'	Частичный транспозонный полипротеин Ty3-I Gag-Pol
PH (A)	Ca5_24728609	2.3	Ca_15604	581 п.н., 5'	Хлоропластная токоферол циклаза
PH (A)	Ca8_6085438	2.2	Ca_01938	GB	40S рибосомный белок S21-2
PH (K)	Ca4_29214438	1.6	Ca_14152	GB	Неописанный белок, аналог PB18E9.04c
PH (K)	Ca6_26266117	2.0	Ca_25507	315 п.н., 5'	Аспартил протеаза APCB1
HFP (A)	Ca6_53308665	3.8	Ca_22925	790 п.н., 3'	UDP-гликозил-трансфераза 89B2
HFP (K)	Ca7_551221	1.1	Ca_24413	216 п.н., 3'	Аналог белка RDM1

Таблица 4. Окончание

NPB (A)	Ca1_8647989	5.2	Ca_08100	76 п.н., 5'	EEF1A лизин метилтрансфераза 2
NPB (A)	Ca1_25058610	2.3	Ca_18317	495 п.н., 3'	60S рибосомный белок L3
NPB (A)	Ca3_3521384	2.7	Ca_21350	GB	Брефелдин А-ингибированный белок обмена гуаниновых нуклеотидов 5
NPB (K)	Ca4_35741005	1.6	Ca_22449	585 п.н., 5'	Кинезино-подобный белок KIN-14E
NPB (K)	Ca5_39576662	2.2	Ca_07489	GB	Аналог серин/треонин протеин-киназы OXI1
NPB (K)	Ca7_15463169	1.7	Ca_09916	GB	Аналог белка, содержащего пентатрикопептидные повторы At5g08305
NPB (K)	Ca7_28975339	2.1	Ca_11806	454 п.н., 3'	Аналог диригентного белка 18
NSB (K)	Ca5_3593017	2.0	Ca_18703	421 п.н., 3'	PI-PLC X доменсодержащий белок At5g67130
LS (A)	Ca1_37335878	2.5	Ca_21837	785 п.н., 5'	Предполагаемая серин/треонин протеинкиназа PBL3
LS (A)	Ca7_35974625	5.9	Ca_17801	427 п.н., 5'	Аналог протеин киназы PINOID
LS (K)	Ca2_29653004	2.4	Ca_16124	201 п.н., 3'	Предполагаемая серин/треонин протеинкиназа WNK3

Примечание. (A) и (K) означают, что ассоциацию между QTN и признаком наблюдали на Астраханской или Кубанской опытной станции соответственно. * – QTN, которые объясняют наибольший процент вариации соответствующего признака, ** – CDS – кодирующая область, *** – GB – внутри кодирующей области.

Dmat), находится в гене *Ca_24378* для PROTO-
DERMAL FACTOR 2 – белка, участвующего в
дифференцировке клеток [19]. QTN
Ca4_21234531, ассоциированный с числом бобов
(PoNP), расположен в окрестности гена
Ca_19058, кодирующего субтилизин-подобную
протеазу SBT1.6, которая играет важную роль в
формировании семенных оболочек, запуская ак-
тивацию ферментов, модифицирующих клеточ-
ную стенку [20].

QTN *Ca7_37894908* и *Ca8_11317824*, ассоции-
рованные с признаком DF (продолжительность
цветения), попадают соответственно в ген
Ca_16382, кодирующий убиквитин-карбоксиль-
ную гидролазу, и в ген *Ca_16826*, кодирующий бе-

лок-переносчик фосфатидилинозитола. Эти бел-
ки участвуют в белковом обмене, передаче сигна-
ла и транспорте мембран [21, 22]. В сохранении
целостности мембран [23] участвует хлоропласт-
ная токоферолциклаза, кодируемая геном
Ca_15604, в котором находится QTN
Ca5_24728609. QTN *Ca6_53308665*, ассоцииро-
ванный с высотой прикрепления первого боба
(HFP), попадает в окрестность гена *Ca_22925*.
Этот ген кодирует UDP-гликозилтрансферазу,
осуществляющую перенос сахаров на широкий
спектр акцепторов, от гормонов и вторичных ме-
таболитов до биотических и абиотических хими-
ческих веществ и токсинов в окружающей среде
[24].

Таблица 5. Сорты с лучшими комбинациями QTN для 4 признаков: скороспелость (или количество дней от всходов до созревания (Dmat), вес бобов с растения (PoW), число бобов с растения (PoNP), вес растения с бобами (PWwP)

Опытная станция	Описание сорта	Название сорта	TI-score
Астраханская	VIR0620: местный сорт, Израиль (дези)	Local	7
	VIR0839: местный сорт, Испания, (кабули)	POIS CHICHE DE CASTILLA	7
	VIR0217: местный сорт, Афганистан (дези)	Local	5
	VIR0239: местный сорт, Афганистан (кабули)	Local	4
	VIR0111: селекционный сорт, Германия (кабули)	Erbsen Spanische Kicher	3
	VIR0454: местный сорт, Алжир (кабули)	Local	2
	VIR0635: местный сорт, Иордания (дези)	Local	2
	VIR0637: местный сорт, Иордания (дези)	Local	1
Кубанская	VIR0244: местный сорт, Афганистан (кабули)	Local	13
	VIR0865: местный сорт, Турция (дези)	local	12
	VIR0406: местный сорт, Иран (дези)	Local	11
	VIR0669: местный сорт, Кипр (кабули)	Local	11
	VIR0539: местный сорт, Сирия (дези)	Local	10
	VIR0230: местный сорт, Афганистан (дези)	Local	9
	VIR0034: местный сорт, Индия (дези)	GRAM TYPE 15	9
	VIR0538: местный сорт, Сирия (кабули)	Local	9
	VIR0225: местный сорт, Афганистан (дези)	Local	8
	VIR0545: местный сорт, Азербайджан (кабули)	Local	8
	VIR0596: местный сорт, Турция (кабули)	Local	8

QTN Ca3_6791279 в гене Ca_16555, Ca3_15051454 в окрестности гена Ca_22493, Ca4_21792726 в окрестности гена Ca_19083, Ca7_30208157 в гене Ca_11706, а также Ca8_6708652 в гене Ca_10713 оказались ассоциированы со скороспелостью (признак Dmat). Гены, в которые попали эти QTN, участвуют в различных реакциях обмена веществ [25] и ответа на абиотические стрессы [26], скорость которых, вероятно, опосредованно влияет на скорость созревания плодов.

Ген Ca_09263, в окрестность которого попадает QTN Ca7_12538901, ассоциированный с PoW (вес бобов); ген Ca_01938, содержащий Ca8_6085438, который ассоциирован с высотой растения (признак PH); ген Ca_18317, в окрестность которого попадает Ca1_25058610, ассоциированный с числом ветвей первого порядка (признак PBN), кодируют белки, участвующие в работе рибосом [27]. QTN Ca6_15579891, ассоциированный со скоростью зацветания (признак DFst) и локализующийся в окрестности гена

Ca_05341, кодирует белок, который у *Arabidopsis thaliana* участвует в формировании рибосом и влияет на скорость деления клеток [28].

QTN *Ca5_4619531*, ассоциированный с PoWP (вес растения с бобами), расположен в окрестности гена *Ca_25450* этилен-чувствительного транскрипционного фактора CRF6, который участвует в сигнальных путях, связанных с развитием семян и листьев [29].

Гены, в которые попали найденные QTN, часто были связаны с реакцией растений на различные абиотические и биотические стрессоры. Например, *Ca6_34567506*, ассоциированный с весом семян (PoW), расположен в окрестности гена *Ca_15816*, кодирующего белковую фосфатазу 2C77, которая вовлечена в механизм закрытия устьиц в ответ на влажность и освещенность [30]. Ген *Ca_25480*, в окрестности которого локализуется *Ca1_34415550*, ассоциированный с DFst (скоростью зацветания) и ген *Ca_22447*, содержащий *Ca4_35694984*, ассоциированный с числом бобов (PoNP) кодируют белок SAR DEFICIENT 1 и диацилглицерин-О-ацилтрансферазу 2 соответственно. Оба этих белка участвуют в ответе на абиотические стрессы [31, 32]. QTN *Ca3_33599380*, также ассоциированный с признаком DFst, находится в гене *Ca_23666*, который кодирует K(+)-эффлюксный антипортер, участвующий в биосинтезе клеточной стенки и устойчивости к соли [33]. *Ca6_26266117*, ассоциированный с PH (высота растения), расположен в окрестности гена *Ca_25507*, кодирующего аспартил-протеазу APCB1, участвующую в базальном иммунитете растений [34]. QTN *Ca3_3521384*, ассоциированный с числом ветвей первого порядка (PBN), попадает в ген *Ca_21350*, кодирующий брефелдин А-ингибированный белок обмена гуаниновых нуклеотидов, который участвует в процессах раннего развития [35], а также вовлечен в работу иммунитета, регулируемого салициловой кислотой.

Ген *Ca_27699*, содержащий QTN *Ca6_52822315*, который ассоциирован с длительностью цветения (признак DF), кодирует белок LYK2. Аналог белка DETOXIFICATION 9 кодирует ген *Ca_18848*, в окрестности которого локализуется QTN *Ca6_59277761*, ассоциированный со скоростью созревания (признак Dmat). Ген *Ca_04136*, в который попал QTN *Ca5_46770326*, тоже ассоциированный со признаком Dmat, кодирует белок RPS4B. Все эти белки связаны с ответом растения на биотический стресс [36, 37]. Вероятно, общее здоровье растения оказывает опосредованное влияние на скорость зацветания и созревание плодов. Такая же связь, вероятно, есть и у QTN *Ca5_24460834*, ассоциированного с весом растения с бобами (PWwP), который попадает в ген *Ca_15581*, кодирующий слезоточивый

фактор, который важен для отпугивания вредителей.

При оценке качества сортов оказалось, что лишь небольшое их количество имеют положительную оценку TI-score для Астраханской опытной станции, тогда как значения этой характеристики для Кубанской опытной станции были положительными у 75 сортов, причем у 5 сортов значение этой оценки было больше 10. Эти результаты наталкивают на мысль, что рассматриваемые сорта нута в целом оказались менее приспособлены к климату Астрахани по сравнению с климатом Кубани.

При оценке качества сортов рассматривался рассчитанный пакетом *PIVmrMLM* аддитивный эффект для каждого признака. Аддитивный характер аллелей с предпочтительным эффектом подтверждается, если мы рассматриваем величину каждого признака отдельно для сортов, содержащих разное количество предпочтительных аллелей (рис. 3). В данном случае рассматривали только количество аллелей с позитивным эффектом у каждого сорта, и не учитывали число аллелей с негативным эффектом. На рис. 3 можно видеть, что количество дней до созревания (Dmat) и вес растения с бобами (PWwP) в данных Кубанской опытной станции, а также вес бобов (PoW) и вес растений с бобами (PWwP) в данных Астраханской опытной станции статистически значимо коррелируют с количеством у растения предпочтительных аллелей. Отсутствие статистически значимая корреляция в остальных случаях (пометка $p > 5\%$ на графиках) связана, вероятно, с накоплением у образцов также и аллелей с негативным эффектом, которые тоже вносят свой вклад. Так, например, только максимальное число аллелей с позитивным эффектом для веса бобов (PoW) в данных Кубанской опытной станции и числа бобов (PoNP) в данных Астраханской опытной станции приводят к статистически значимому увеличению этих признаков у группы сортов, а сорта с меньшим количеством аллелей различаются по значению этих признаков не слишком сильно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Суперкомпьютерному центру Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (scc.spbstu.ru) за предоставление отличных вычислительных ресурсов и поддержку данного проекта.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

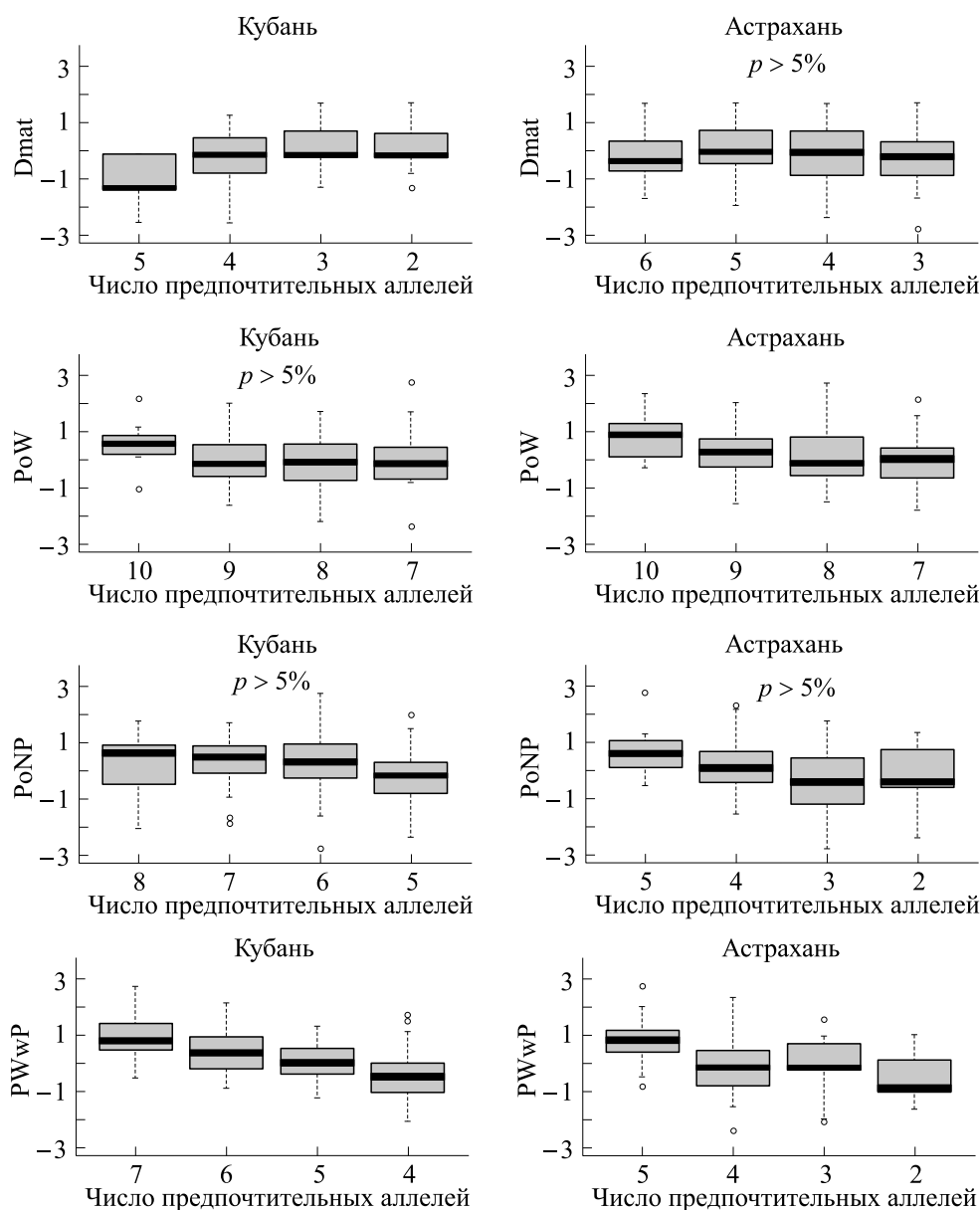


Рис. 3. Диаграммы размаха значений фенотипических признаков у сортов, содержащих различное количество предпочтительных аллелей локусов QTN, ассоциированных с числом дней от всходов до созревания (Dmat), весом бобов с растения (PoW), числом бобов с растения (PoNP), весом растения с бобами (PWwP). По оси ординат представлены нормированные величины признаков. Пометки $p > 5\%$ соответствуют случаям, когда корреляция между средними значениями признака и числом предпочтительных аллелей не была статистически значимой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Redden, R. J. and Berger J. D. History and origin of Chickpea. In *Chickpea Breeding & Management*. Ed. by S.S. Yadav, R. Redden, W. Chen, and B. Sharma (CABI, Wallingford, UK, 2007), pp. 1–13.
2. Varshney R.K., Thudi M., Roorkiwal M., He W., Upadhyaya H. D., Yang W., Bajaj P., Cubry P., Rathore A., Jian J., Doddamani D., Khan A. W., Garg V., Chitkineni A., Xu D., Gaur P. M., Singh N. P., Chaturvedi S. K., Nadigatla G. V. P. R., Krishnamurthy L., Dixit G. P., Fikre A., Kimurto P. K.,

- Sreeman S. M., Bharadwaj C., Tripathi S., Wang J., Lee S. H., Edwards D., Polavarapu K. K. B., Penmetsa R. V., Crossa J., Nguyen H. T., Siddique K. H. M., Colmer T. D., Sutton T., von Wettberg E., Vigouroux Y., Xu X., and Liu X. Resequencing of 429 chickpea accessions from 45 countries provides insights into genome diversity, domestication and agronomic traits. *Nat. Genet.*, **51**, 857–864 (2019). DOI: 10.1038/s41588-019-0401-3
3. Thudi M., Chitikeneni A., Liu X., He W., Roorkiwal M., Yang W., Jian J., Doddamani D., Gaur P. M., Rathore A., Samineni S., Saxena R. K., Xu D., Singh N. P., Chaturvedi S. K., Zhang G., Wang J., Datta S. K., Xu X., and Varshney R. K. Recent breeding programs enhanced genetic diversity in both desi and kabuli varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Sci. Rep.*, **6**, 38636 (2016). DOI: 10.1038/srep38636
 4. Kumar J. and Abbo S. Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in semiarid environments. *Adv. Agronomy*, **72**, 107–138 (2001). DOI: 10.1016/S0065-2113(01)72012-3
 5. Gursky V. V., Kozlov K. N., Nuzhdin S. V., and Samsonova M. G. Dynamical modeling of the core gene network controlling flowering suggests cumulative activation from the *FLOWERING LOCUS T* gene homologs in chickpea. *Front Genet.* **9**, 547 (2018). DOI: 10.3389/fgene.2018.00547
 6. Jha Ch. U., Kole Ch. P., and Singh P. N. QTL mapping for heat stress tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Legume Res.*, **44** (4), 382–387 (2019). DOI: 10.18805/LR-4121
 7. Sokolkova A., Bulyntsev S. V., Chang P. L., Carrasquilla-Garcia N., Igolkina A. A., Noujdina N. V., von Wettberg E., Vishnyakova M. A., Cook D. R., Nuzhdin S. V., and Samsonova M. G. Genomic analysis of vavilov's historic chickpea landraces reveals footprints of environmental and human selection. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3952 (2020). DOI: 10.3390/ijms21113952
 8. Varshney R. K., Roorkiwal M., Sun Sh., Bajaj P., Chitikeneni A., Thudi M., Singh N. P., Du X., Upadhyaya H. D., Khan A. W., Wang Y., Garg V., Fan G., Cowling W. A., Crossa J., Gentzittel L., Voss-Fels K. P., Valluri V. K., Sinha P., Singh V. K., Ben C., Rathore A., Punna R., Singh M. K., Tar'an B., Bharadwaj Ch., Yasin M., Pithia M. S., Singh S., Soren Kh. R., Kudapa H., Jarquin D., Cubry Ph., Hickey L. T., Dixit G. P., Anne-Thuillet C., Hamwieh A., Kumar Sh., Deokar A. A., Chaturvedi S. K., Francis A., Howard R., Chattopadhyay D., Edwards D., Lyons E., Vigouroux Y., Hayes B. J., von Wettberg E., Datta S. K., Yang H., H. Nguyen T., Wang J., Siddique K. H. M., Mohapatra T., Bennetzen J. L., Xu X., Liu X. A chickpea genetic variation map based on the sequencing of 3,366 genomes, *Nature*, **599** (7886), 622–627 (2021). DOI: 10.1038/s41586-021-04066-1,
 9. Duk M. A., Kanapin A. A., Bankin M. P., Vishnyakova M. A., Bulyntsev S. V., and Samsonova M. G., Genome-wide association analysis in chickpea landraces and cultivars. *Biophysics*, **68**, 952–963 (2023). DOI: 10.1134/S0006350923060076
 10. Zhang Y.-M., Jia Z., and Dunwell J. M. Editorial: The application of new multi-locus GWAS methodologies in the genetic dissection of complex traits. *Front. Plant Sci.*, **10**, 100 (2019). DOI: 10.3389/fpls.2019.00100
 11. Zhang Y.-W., Tamba C. L., Wen Y.-J., Li P., Ren W.-L., Ni Y.-L., Gao J., and Zhang Y.-M. mrMLM v4.0.2: An R platform for multi-locus genome-wide association studies. *Genom. Proteom. Bioinform.*, **18**, 481–487 (2020). DOI: 10.1016/j.gpb.2020.06.006
 12. Wang J. and Zhang Z. GAPIT Version 3: Boosting power and accuracy for genomic association and prediction. *Genom. Proteom. Bioinform.*, **19** (4), 629–640 (2021). DOI: 10.1016/j.gpb.2021.08.005
 13. Li M., Zhang Y.-W., Xiang Y., Liu M.-H., and Zhang Y.-M. IIIVmrMLM: The R and C++ tools associated with 3VmrMLM, a comprehensive GWAS method for dissecting quantitative traits. *Mol. Plant*, **15** (8), 1251–1253 (2022). DOI: 10.1016/j.molp.2022.06.002
 14. Zeng C. J. T., Lee Y.-R. J., and Liu B. The WD40 repeat protein NEDD1 functions in microtubule organization during cell division in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **21** (4), 1129–1140 (2009). DOI: 10.1105/tpc.109.065953
 15. Jakobsson P.-J., Mancini J. A., Riendeau D., and Ford-Hutchinson A. W., Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities. *J. Biol. Chem.*, **272** (36), 22934–22939 (1997). DOI: 10.1074/jbc.272.36.22934
 16. Steinmetz-Spa J., Liu J., Singh R., Ekoff M., Boddul S., Tang X., Bergqvist F., Idborg H., Heitel P., Rönnerberg E., Merk D., Wermeling F., Haeggström J. Z., Nilsson G., Steinhilber D., Larsson K., Korotkova M., and Jakobsson P.-J. *J. Lipid Res.*, **63** (12), 100310, (2022). DOI: 10.1016/j.jlr.2022.100310
 17. M. C. Rentel, D. Lecourieux, F. Ouaked, S. L. Usher, L. Petersen, H. Okamoto, H. Knight, S. C. Peck, C. S. Grierson, H. Hirt, and M. R Knight, OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, **427** (6977), 858–861 (2004). DOI: 10.1038/nature02353
 18. Li X. F., Shen R. J., Liu P. L., Tang Z. C., and He Y. K. Molecular characters and morphological genetics of CAL gene in Chinese cabbage. *Cell Res.*, **10** (1), 29–38 (2000). DOI: 10.1038/sj.cr.7290033
 19. Ogawa E., Yamada Y., Sezaki N., Kosaka S., Kondo H., Kamata N., Abe M., Komeda Y., and Takahashi T. AT-ML1 and PDF2 Play a Redundant and Essential Role in *Arabidopsis* Embryo Development. *Plant Cell Physiol.*, **56** (6), 1183–1192 (2015). DOI: 10.1093/pcp/pcv045
 20. Rautengarten C., Usadel B., Neumetzler L., Hartmann J., Büßis D., and Altmann Th. A subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from *Arabidopsis* seed coats. *Plant J.*, **54** (3), 466–480 (2008). DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03437.x

21. Tian G., Lu Q., Kohalmi S. E., Rothstein S. J., and Cui Y. Evidence that the Arabidopsis Ubiquitin C-terminal Hydrolases 1 and 2 associate with the 26S proteasome and the TREX-2 complex. *Plant Signal. Behav.*, **7** (11), 1415–1419 (2012). DOI: 10.4161/psb.21899
22. Cockcroft Sh. and Garner K. Function of the phosphatidylinositol transfer protein gene family: is phosphatidylinositol transfer the mechanism of action? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **46** (2), 89–117 (2011). DOI: 10.3109/10409238.2010.538664
23. Kumar R., Raclaru M., Schüßler T., Gruber J., Sadre R., Lühs W., Zarhloul K. M., Friedt W., Enders D., Frentzen M., and Veier D. Characterisation of plant tocopherol cyclases and their overexpression in transgenic *Brassica napus* seeds. *FEBS Lett.*, **579**, 1357–1364 (2005). DOI: 10.1016/j.febslet.2005.01.030
24. Bowles D., Lim E.-K., Poppenberger B., and Vaistij F.E. Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 567–597 (2006). DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105429
25. P. Gao, Z. Xin, and Z.-L. Zheng, The *OSU1/QUA2/TSD2*-encoded putative methyltransferase is a critical modulator of carbon and nitrogen nutrient balance response in *Arabidopsis*. *PLoS One*, **3** (1), e1387 (2008). DOI: 10.1371/journal.pone.0001387
26. T. Lahari, Lazaro J., and Schroeder D. F. RAD4 and RAD23/HMR Contribute to Arabidopsis UV Tolerance. *Genes*, **9** (1), 8 (2018). DOI: 10.3390/genes9010008
27. Okanami M., Meshi T., and Iwabuchi M. Characterization of a DEAD box ATPase/RNA helicase protein of *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.*, **26** (11), 2638–2643 (1998). DOI: 10.1093/nar/26.11.2638
28. Meinke D. W. Genome-wide identification of *EMBRYO-DEFECTIVE (EMB)* genes required for growth and development in Arabidopsis. *New Phytol.*, **226**, 306–325 (2020). DOI: 10.1111/nph.16071
29. Rashotte A. M., Mason M. G., Hutchison C. E., Ferreira F. J., Schaller G. E., and Kieber J. J. A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** (29), 11081–11085 (2006). DOI: 10.1073/pnas.060203810
30. Hua D., Wang C., He J., Liao H., Duan Y., Zhu Z., Guo Y., Chen Z., and Gong Z. A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in Arabidopsis. *Plant Cell*, **24**, 2546–2561 (2012). DOI: 10.1105/tpc.112.100107
31. Zhang Y., Xu Sh., Ding P., Wang D., Cheng Y. T., He J., Gao M., Xu F., Li Y., Zhu Z., Li X., and Zhang Y., Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** (42), 18220–18225 (2010). DOI: 10.1073/pnas.1005225107
32. Chen B., Wang J., G. Zhang, Liu J., Manan S., Hu H., and Zhao J. Two types of soybean diacylglycerol acyltransferases are differentially involved in triacylglycerol biosynthesis and response to environmental stresses and hormones. *Sci. Rep.*, **6**, 28541 (2016). DOI: 10.1038/srep28541
33. Zhu X., Pan T., Zhang X., Fan L., Quintero F. J., Zhao H., Su X., Li X., Villalta I., Mendoza I., Shen J., Jiang L., Pardo J. M., and Qiu Q.-Sh. K⁺ Efflux Antiporters 4, 5, and 6 Mediate pH and K⁺ Homeostasis in Endomembrane Compartments. *Plant Physiol.*, **178** (4), 1657–1678 (2018). DOI: 10.1104/pp.18.01053
34. Li Y., Kabbage M., W. Liu, and Dickman M. B. Aspartyl protease-mediated cleavage of bag6 is necessary for autophagy and fungal resistance in plants. *Plant Cell*, **28**, 233–247 (2016). DOI: 10.1105/tpc.15.00626
35. Tanaka H., Kitakura S., Rakusova H., Uemura T., Feraru M. I., De Rycke R., Robert S., Kakimoto T., and Friml J. Cell polarity and patterning by pin trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, **9** (5), e1003540 (2013). DOI: 10.1371/journal.pgen.1003540
36. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9SGI7/entry>
37. Saucet S. B., Ma Y., Sarris P. F., Furzer O. J., Sohn K. H., Jones J. D. Two linked pairs of *Arabidopsis* *TNL* resistance genes independently confer recognition of bacterial effector AvrRps4. *Nat. Commun.*, **6**, 6338 (2015). DOI: 10.1038/ncomms7338, PMID: 25744164.
38. Li H. and Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25** (14), 1754–1760 (2009). DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324
39. Tello D., Gonzalez-Garcia L. N., Gomez J., Zuluaga-Monares J. C., Garcia R., Angel R., Mahecha D., Duarte E., Leon M. D. R., Reyes F., Escobar-Velásquez C., Linares-Vásquez M., Cardozo N., and Duitama J. NGSEP 4: Efficient and accurate identification of orthogroups and whole-genome alignment. *Mol. Ecol. Resour.*, **23** (3), 712–724 (2023). DOI: 10.1111/1755-0998.13737
40. Danecek P., Auton A., Abecasis G., Albers C. A., Banks E., DePristo M. A., Handsaker R. E., Lunter G., Marth G. T., Sherry S. T., McVean G., and Durbin R. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, **27** (15), 2156–2158 (2011). DOI: 10.1093/bioinformatics/btr330
41. Bradbury P. J., Zhang Z., Kroon D. E., Casstevens T. M., Ramdoss Y., and Buckler E. S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, **23** (19), 2633–2635 (2007). DOI: 10.1093/bioinformatics/btm308
42. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M. A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P. I., Daly M. J., and Sham P. C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.*, **81** (3), 559–575 (2007). DOI: 10.1086/519795

Using the IIIVmrMLM Method to Confirm and Search New Genome-Wide Associations in Chickpea

M.A. Duk*, **, A.A. Kanapin*, M.P. Bankin*, and M.G. Samsonova*

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

**Ioffe Institute, Polytekhnicheskaya ul. 26, St.Petersburg, 195251 Russia

Chickpea (*Cicer arietinum*) is an important crop grown in the Middle East, Central Asia, Turkey, India and southern Russia and used in a wide variety of traditional dishes. The decrease in genetic diversity during domestication, as well as the crop's greater sensitivity to abiotic and biotic stresses, provides the idea of using landraces in breeding programs to improve the crop. The new IIIVmrMLM method for genome-wide association search allowed us to identify new variants in the genetic data of the chickpea collection, which were localized within important genes, and to identify landraces best suited to the climate of the two experimental stations.

Keywords: chickpea, GWAS, IIIVmrMLM, landraces, multilocus models

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МУСКУЛАТУРЫ ТРЕМАТОДЫ *Fasciola hepatica*

© 2024 г. Н.Д. Крещенко*,#

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

#E-mail: nkreshch@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.01.2024 г.

После доработки 19.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Исследовано морфологическое строение и функциональные свойства мускулатуры у плоских червей *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae), опасного паразита сельскохозяйственных животных и человека. Окраску мускулатуры тела фасциол проводили гистохимически с помощью флуоресцентно меченого фаллоидина и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Обнаружено наличие окраски в продольных, кольцевых и диагональных мышечных волокнах стенки тела червя, в кольцевых и диагональных мышечных волокнах, окружающих просветы разветвленного кишечника, а также в трубчатых мышечных структурах репродуктивного тракта. В брюшной и ротовой присосках трематоды обнаружены плотно упакованные и интенсивно окрашенные слои мышечных волокон. Физиологические исследования, проведенные на мышечных препаратах, полученных из *F. hepatica*, продемонстрировали наличие спонтанной сократительной активности мышечных препаратов. Нейропептид GYIRF, из семейства FMRFамид-подобных пептидов, примененный в ранге концентраций 1–10 мкМ, дополнительно стимулировал сокращение мышечных препаратов у *F. hepatica*, увеличивая частоту и амплитуду мышечных сокращений по сравнению с их базовой активностью. Полученные сведения будут использованы при дальнейшем изучении механизмов мышечного сокращения у паразитических червей, мускулатура которых является мишенью действия существующих антипаразитарных препаратов.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия, гистохимия, мускулатура, паразитические плоские черви, FMRF-подобные пептиды.

DOI: 10.31857/S0006302924050134, EDN: NKPTBW

Одним из серьезных паразитарных заболеваний, распространенных повсеместно, не только в Российской Федерации, но и во всем мире, является фасциоз. Это заболевание вызывается печеночной двуусткой, *Fasciola hepatica* (класс Trematoda, тип Platyhelminthes). Фасциолы поражают мелкий и крупный рогатый скот, свиней, лошадей, верблюдов, оленей. Подвержены фасциозу и дикие животные – кабаны, косули, олени, нутрии, бобры. Взрослые особи поселяются в желчных протоках печени и желчном пузыре, питаются кровью и тканями организма-хозяина. В период миграции фасциолы могут находиться также в других органах — легких, сердце, лимфатических узлах, поджелудочной железе. [1]. Болезнь снижает продуктивность сельскохозяйственных животных и причиняет экономический ущерб животноводству не только в нашей стране [2], но и во всем мире [3, 4]. Фасциозом болеет и че-

ловек [5, 6]. Распространение болезни обусловлено повсеместным расселением промежуточного хозяина фасциолы *F. hepatica* — моллюска малого прудовика, который является главным звеном в циркуляции паразитических плоских червей. Для проникновения в тело промежуточного или основного хозяина и прикрепления к его тканям, а также локомоции, плавания их свободноживущих личиночных стадий, паразитические черви используют хорошо развитую мускулатуру тела [7]. В организме паразитических гельминтов мускулатура выполняет и другие важные функции, такие как двигательную, опорную, и защитную [8, 9]. Поэтому изучение строения и функционирования мускулатуры у плоских червей является важной задачей в паразитологии. Наиболее изученными в этом отношении оказались опасные паразиты человека и животных — шистосомы *Schistosoma mansoni* [10] и описторхи *Opisthorchis felineus* [11, 12]. Ранее также было исследовано строение мускулатуры тела у взрослых особей и

Сокращение: PBS — фосфатно-солевой буфер.

личиночных форм червей, среди которых: *Diplostomum pseudospathaceum* [13], *Himasthla elongata* [14] и *Diplodiscus subclavatus* [15].

Немного известно о физиологических свойствах мускулатуры и механизмах мышечного сокращения у плоских червей. По своему происхождению мускулатура этих животных относится к древним первичным мышечным тканям, развившимся из эпителиально-мышечных клеток предков многоклеточных. Мускулатура у них преимущественного гладкомышечного типа, клетки значительно меньше по размерам. Механизм мышечного сокращения клеток гладкой мускулатуры у плоских червей мало изучен, а полученные данные все еще разрознены. Поступление сократительного стимула (деполяризация, электрический ток, гормон) инициирует открытие кальциевых каналов в мембране мышечной клетки, а повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, через каскад внутриклеточных реакций вызывает сокращение мышечного волокна [16, 17]. Гладкомышечные клетки плоских червей, как и других животных, подвергаются воздействию нейромедиаторов, высвобождаемых из нервных окончаний, таких как серотонин, ацетилхолин и нейропептиды [11, 18, 19].

Для борьбы с паразитическими червями много лет используется ряд препаратов, обладающих направленным действием на мускулатуру тела, таких как празиквантел, триклабендазол, которые вызывают паралич мускулатуры и отторжение паразита из организма хозяина. В последнее время замечено, что паразитические плоские черви вырабатывают резистентность к празиквантелу и триклабендазолу [20–23]. Это обстоятельство диктует необходимость поиска новых антипаразитарных препаратов.

Настоящая работа посвящена изучению морфологии мускулатуры тела *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae), а также спонтанной и пептид-индуцированной сократительной активности мускулатуры. Проведение исследований по изучению морфологических, и функциональных свойств мускулатуры у представителей паразитических червей, а именно у опасного паразита человека и животных, трематоды *F. hepatica*, является актуальной задачей настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали взрослых половозрелых особей *F. hepatica* (Trematoda, Fasciolidae), длиной 15–20 мм. Материал был получен из печени, в результате забоя крупного рогатого скота на мясокомбинатах Белфаста (Великобритания), а также Московской области (Россия). Извлеченных из желчных ходов живых фасциол немедленно помещали в физиологический раствор при

37°C и отправляли в лабораторию, где их промывали в течение 3 ч перед исследованием.

Исследования выполнены в Институте биофизики клетки Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» и в Королевском университете Белфаста, Великобритания (Queen's University Belfast, UK) и были ранее частично опубликованы в виде тезисов докладов [24].

Гистохимический метод идентификации актина. Для гистохимического окрашивания червей фиксировали плоско в свежеприготовленном 4%-м растворе параформальдегида (MP Biomedicals, США) на 0.1 М фосфатном буфере (PBS, pH 7.4, Amresco, США), в течение 24 ч при температуре 4°C, помещая между двумя предметными стеклами. После этого фиксированных животных помещали в 10%-й раствор сахарозы (Helicon, Россия) на PBS на 48 ч, затем заливали в Tissue Tek (США) и готовили фронтальные и поперечные срезы толщиной 12–14 мкм на криотоме Shandon Cryomatrix E (Termoelectron Corporation, США) при –20°C. Срезы собирали на обработанные поли-L-лизинном предметные стекла Polysine или Gold Super Frost Plus (Menzel-Glaser, Германия), высушивали на воздухе в течение 1 ч и хранили при –20°C до окрашивания. Перед окрашиванием срезы размораживали, промывали 3 раза по 5 мин в PBS и инкубировали в течение 6 ч с TRITC-(tetramethylrhodamine isotiocyanat)-меченным фаллоидином (Sigma, США) в концентрации 200 нг/мл в строго горизонтальном положении, во влажной затемненной камере при комнатной температуре. После финальной промывки 3 раза по 5 мин в PBS срезы покрывали 90%-м глицерином (Helicon, Россия) на PBS, накрывали покровным стеклом и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Микроскопия. Готовые окрашенные срезы тканей фасциол изучали с помощью флуоресцентного микроскопа DM6000 B (Leica Microsystems, Германия), соединенного с цифровой фотокамерой DC300F (Leica Microsystems, Германия). Использовали флуоресцентный фильтр возбуждающего света с длиной волны 515–560 нм (N2.1) для локализации флуорохрома TRITC. Микрофотографии, полученные с помощью микроскопа, сохраняли в виде файлов в формате TIFF. При создании иллюстраций использована программа Adobe Photoshop CS2 9.0. (Adobe Systems Inc., США). Измерение морфологических параметров мускулатуры проводили на изображениях фиксированных препаратов *F. hepatica*, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа, с помощью программы AxioVision Rel 4.8.1.0. (AxioVision, Carl Zeiss, Германия). Каждый морфологический параметр измеряли от

3 до 20 раз, вычисляли среднее \pm стандартное отклонение по числу измерений n .

Физиологические исследования. Только что извлеченных из желчных ходов живых фасциол помещали в физиологический раствор на 3–4 ч при 37°C. Для приготовления мышечных препаратов у *F. hepatica* удаляли передний участок тела с ротовой присоской и глоткой, а также боковые края и задний конец тела с брюшной присоской, таким образом получали срединный фрагмент мускулатуры длиной около 5 мм и шириной около 3.5 мм. Для изучения мышечного сокращения использовали физиологическую установку Королевского университета Белфаста, детально описанную ранее [25, 26]. Мышечный препарат помещали в камеру объемом 4 мл со средой HBSS (Gibco/BRL, Life Technologies, Paisley, Великобритания) при 37°C и прикрепляли между двумя присасываемыми пипетками — неподвижной и подвижной — на расстоянии 2.5–3.0 мм. Препараты оставляли на 15 мин для установления спонтанных ритмических мышечных сокращений. Если фрагмент мускулатуры не проявлял сократительной активности, препарат далее не исследовался.

Регистрировали амплитуду и частоту мышечных сокращений в течение следующих 10 мин в период, равный 2 мин и предшествующий каждой из временных точек: 0, 2, 5 и 10 мин после добавления тестируемого вещества. Опыты проводили при температуре при 37°C. Прикрепленные мышечные препараты оставляли в камере в течение 10–15 мин для установления устойчивых постоянных спонтанных сокращений, после чего в камеру осторожно добавляли исследуемое вещество (пептид). Движения, генерируемые мышцами между двумя пипетками, записывали на движущуюся масштабную-координатную бумажную ленту, затем треки анализировали. Физиологические эффекты нейропептида на мышечные препараты *F. hepatica* исследовали при добавлении свежеприготовленного раствора пептида GYIRF (Gly-Tyr-Ile-Arg-Phe-NH₂) (Immunogenetics, США). Пептид растворяли в деионизированной воде и хранили замороженными в мелких аликвотах, в концентрации 10⁻² М. В опыт пептид добавляли в ванночку (объемом 4 мл) с мышечным препаратом в концентрациях от 1 до 10 мкМ. В ходе анализа записанных треков, отражающих генерируемые мышечные сокращения, измеряли амплитуду и частоту спонтанных и индуцированных сокращений в течение 2 мин, предшествующих каждой временной точке: 0, 2, 5 и 10 мин. Анализ проводили для 6 и более мышечных препаратов, на которых тестировали каждую концентрацию пептида.

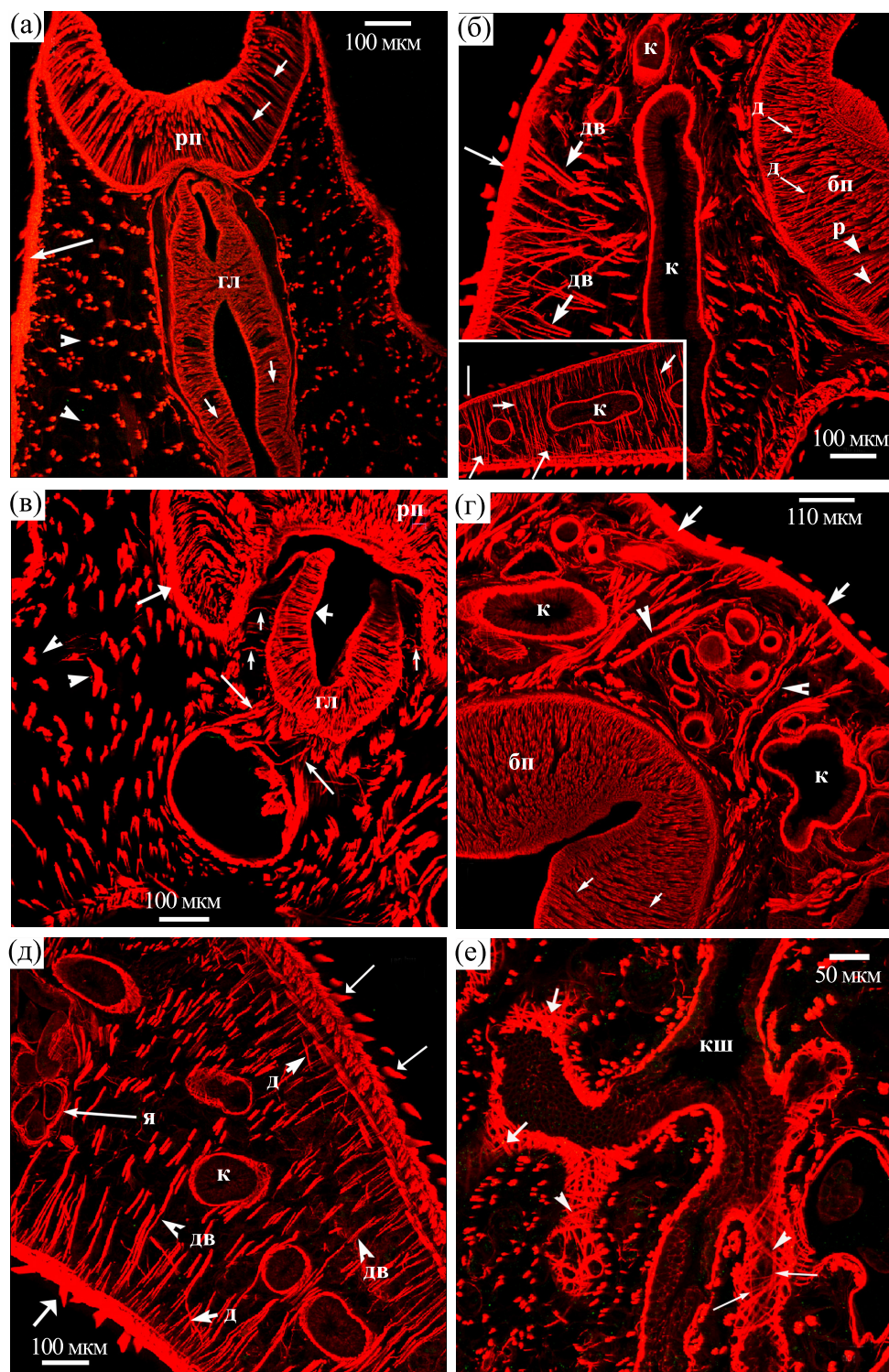
Результаты мышечных сокращений препаратов обрабатывали статистически, находя среднее

значение частоты и амплитуды мышечного сокращения и стандартное отклонение (или стандартную ошибку). Парный двухсторонний *t*-тест Стьюдента был использован для сравнения показателей амплитуды и частоты сокращений мышечного препарата в разные временные точки опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мускулатура. Окраска мускулатуры флуоресцентно-меченым фаллоидином выявила детали строения мускулатуры трематод *F. hepatica* и позволила произвести измерения некоторых ее морфологических параметров. Печеночная двуустка — трематода листовидной формы, размером от 2 до 3 см в длину и около 1 см в ширину. И спинная, и брюшная поверхности тела червя покрыты шипиками, которые были окрашены фаллоидином (рис. 1б,г,д), длина шипиков на спинной поверхности тела достигает 46.6 ± 8.9 мкм ($n = 9$) мкм. Исследование показало сложную организацию мускулатуры тела *F. hepatica*. Мускулатура стенки тела состояла из кольцевых, продольных и диагональных мышечных волокон. Под наружными кольцевыми волокнами расположены продольные волокна, они формируют компактно упакованные слои (рис. 1б,д). Немногочисленные, пересекающиеся в двух направлениях диагональные волокна расположены за этими слоями мышц (рис. 1д). Толщина мышечной стенки тела 55.8 ± 19.6 мкм ($n = 6$). Многочисленные дорзо-вентральные мышечные пучки (рис. 1а–в) соединяют спинную и брюшную мышечные стенки, пронизывая все тело червя. Дорзо-вентральные мышечные пучки состоят из 2–4 миофибрилл и достигают средней толщины 10.2–12.8 мкм, иногда до 24.4–28.7 мкм. Расположены дорзо-вентральные пучки мышц более или менее равномерно, расстояние между ними около 35.9 ± 13.7 мкм ($n = 9$). В центральной части туловища дорзо-вентральные пучки мышц огибают просветы кишечника.

Гистохимическая окраска фаллоидином выявлена в плотно упакованных мышечных волокнах специализированных прикрепительных органов фасциолы — в ротовой и брюшной присосках. Ротовая (рис. 1а,в) и брюшная (рис. 1б,г) присоски расположены в передней части тела и сближены. Обе они служат для прикрепления (присасывания) *F. hepatica* к тканям хозяина и поэтому сильно мускулинизированы (рис. 1а–г). Мускулатура ротовой присоски состоит из нескольких типов мышечных волокон — кольцевых, радиальных и продольных, ее толщина составляет около 193.3 ± 45.2 мкм ($n = 3$). Наиболее развит слой радиальных мышечных волокон, соединяющих наружную и внутреннюю мышечные стенки ротовой присоски. Присоска имеет просвет, начина-



ющийся ротовым отверстием, который ведет в цилиндрическую глотку (рис. 1а), а затем в кишечник, две ветви которого огибают брюшную присоску, расположенную на брюшной стороне в центральной части тела.

Брюшная присоска состоит из трех типов мышечных волокон — наружных кольцевых (называемых также экваториальными), наружных продольных (или меридиональных), внутренних кольцевых и радиальных. Мышечные слои

Рис. 1. Мускулатура тела трематоды *Fasciola hepatica* окрашенная TRITC-меченным фаллоидином; флуоресцентная микроскопия, замороженные срезы. (а) — Головной конец тела трематоды, продольный срез: радиальная мускулатура ротовой присоски и глотки (короткие стрелки), мускулатура стенки тела (длинная стрелка), а также дорзо-вентральные мышечные пучки (острия стрелок). (б) — Центральная область тела червя с брюшной присоской, поперечный срез: мускулатура стенки тела, спинная поверхность покрыта шипиками (длинная тонкая стрелка), дорзо-вентральные мышечные пучки (короткие толстые стрелки), просветы кишечника окружены фаллоидин-окрашенными мышечными волокнами, в брюшной присоске отмечены радиальные (острия стрелок) и диагональные мышечные волокна (тонкие стрелки); на вкладке — краевая область среза с дорзо-вентральными мышечными волокнами (короткие стрелки), и диагональными волокнами тела (тонкие тупые стрелки). (в) — Передний отдел тела с ротовой присоской и глоткой, продольный срез, дорзо-вентральные мышечные пучки отмечены (острия стрелок), мускулатура ротовой присоски (тупая длинная стрелка) и глотки (толстая короткая стрелка), отмечены мышцы, удерживающие глотку (короткие тонкие стрелки), а также продольные пучки мышц, соединяющие глотку с просветом кишечника (длинные тонкие стрелки) трематоды. (г) — Середина тела с брюшной присоской, поперечный срез, ветви кишечника окружены тонкими миофиламентами, радиальные волокна брюшной присоски отмечены короткими тонкими стрелками, также видны толстые пучки дорзо-вентральных мышечных волокон (острия стрелок), соединяющих спинную и брюшную поверхности тела, короткие толстые стрелки указывают на дорзальную мускулатуру тела с плотно упакованными миофиламентами. (д) — Центральная часть тела трематоды, поперечный срез, вентральная (толстая тупая стрелка) и дорзальная (тонкие стрелки) стенка тела червя с шипиками, толстый слой мускулатуры стенки тела интенсивно окрашен, плотно упакован и состоит из кольцевых, продольных, а также диагональных (отмечено короткими толстыми стрелками) мышечных волокон, дорзо-вентральные пучки мускулатуры тела состоят из нескольких мышечных волокон, соединяющих дорзальную и вентральную поверхности (острия стрелок), слева виден просвет матки, заполненный яйцами (тонкая стрелка), окруженный кольцевыми и диагональными мышечными волокнами; (е) — Мускулатура кишечника трематоды, центральная часть тела, продольный срез, отчетливо различимы неплотные продольные (длинные тонкие стрелки), кольцевые (короткие тупые стрелки) и диагональные мышечные волокна (острия стрелок), окружающие ветви кишечника. Сокращения: бп — брюшная присоска, гл — глотка, д — диагональные мышечные волокна, дв — дорзо-вентральные волокна, к — просвет кишечника, кш — кишечник, р — радиальные мышечные волокна, рп — ротовая присоска, я — яйца в просвете матки.

брюшной присоски *F. hepatica* плотно прилегают друг к другу (рис. 1б,г). Толщина мышечного слоя брюшной присоски на срезе около 340 мкм. Радиальные волокна брюшной присоски *F. hepatica* очень плотно упакованы. В брюшной присоске видны единичные диагональные (или хордальные) мышечные волокна (рис. 1б).

Глотка длиной 580–730 мкм, расположена в передней части туловища, имеет форму мускулистой трубки, ширина которой достигает 230.7 ± 35.9 мкм (SD), ($n = 10$). Толщина мышечного слоя глотки 79.1 ± 12.9 мкм ($n = 11$), просвет глотки 73.1 ± 19.3 мкм ($n = 6$). Мускулатура глотки представлена кольцевыми, продольными и радиальными мышечными волокнами (рис. 1а,в). Далее пищеварительный тракт фасциол разветвляется на две главные ветви кишечника, которые, направляясь к хвостовому отделу тела имеют многочисленные мелкие боковые ответвления и оканчиваются слепо. На продольных срезах видны ветви кишечника (рис. 1е). Мышцы кишечника представлены очень тонкими 2.07 ± 0.77 мкм ($n = 5$), немногочисленными и нерегулярно ориентированными (кольцевыми и диагональными) мышечными волокнами. Диагональные волокна расположены в двух перпендикулярных направлениях, с расстоянием между ними около 5.3–7.2 мкм (рис. 1е). В мышечной выстилке кишечника *F. hepatica* впервые замечены немногочисленные, но довольно крупные, продольные мышечные волокна, которые не были описаны ранее (рис. 1е). На поперечных срезах (рис. 1б,г,д) просветы кишечника имеют округлую, овальную

форму или неправильную форму, с диаметром просвета на разных уровнях тела 94.9 ± 22.7 мкм ($n = 20$).

Половая бурса и половое отверстие расположены между развилкой кишечника и брюшной присоской. При исследовании срезов были обнаружены трубчатые структуры женской репродуктивной системы, вероятно, протоки матки, заполненные зрелыми яйцами (рис. 1д). Эти протоки на поперечных срезах имели неправильную лопастную форму, с диаметром просвета около 141.5 ± 8.4 мкм ($n = 4$) и были окружены по крайней мере продольными и кольцевыми мышечными волокнами.

Физиология мышечного сокращения. Физиологическое исследование, проведенное с использованием мышечных препаратов *F. hepatica*, показало, что мышечные препараты, изолированные у фасциол, проявляли спонтанную сократительную активность, характеризующуюся определенной частотой и амплитудой сокращения (рис. 2а). После установления спонтанной сократительной активности на препараты действовали пептидом GYIRF. В концентрациях 5 мкМ (рис. 2б) и 10 мкМ (рис. 2в) пептид оказывал возбуждающее действие на сокращение мышечных препаратов.

Перед нами встала задача определения минимальной действующей концентрации пептида. Для этого измеряли амплитуду и частоту сокращений в течение 1 мин, предшествующей каждой временной точке. Нулевой точке соответствовало время добавления пептида и начала инкубации мышечного препарата с пептидом. Оказалось, что

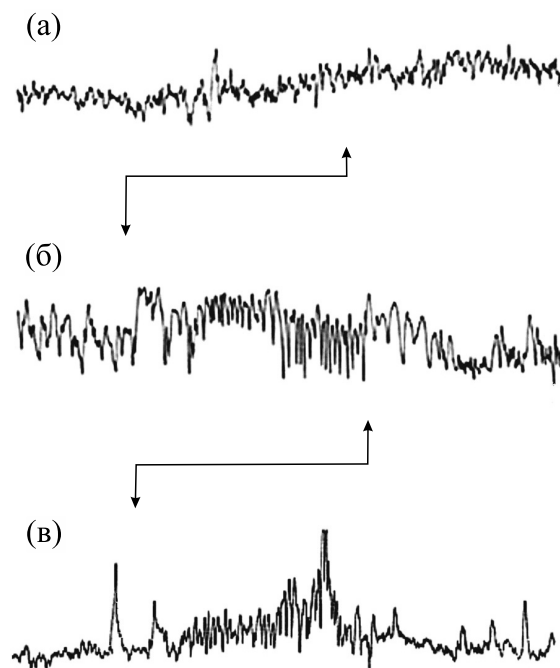


Рис. 2. Треки спонтанного сокращения мышечного препарата *F. hepatica* без добавления пептида (а), пептид-индуцированное возбуждающее действие после добавления GYIRF в концентрациях 5 мкМ (б) и 10 мкМ (в).

во всех концентрациях (от 1 мкМ, 5, 7 и 10 мкМ) пептид GYIRF оказывал возбуждающее влияние на сокращение мышечных препаратов фасциол хотя бы в одной из временных точек эксперимента — через 2, 5, и 10 мин после начала воздействия (или добавления пептида). Так, в концентрации 7 мкМ пептид GYIRF увеличивал и частоту ($n = 11$) и амплитуду сокращений ($n = 10$) мышечных препаратов фасциол. В концентрации 5 мкМ пептид статистически значимо увеличивал как частоту (в точках 5 и 10 мин), так и амплитуду сокращений через 10 мин инкубации (рис. 3а,б). В концентрации 1 мкМ нейропептид GYIRF оказывал положительное влияние, но только на частоту сокращения мышечных препаратов фасциол через 5 и 10 мин после его добавления ($n = 6$). Таким образом, концентрация 5 мкМ была определена как минимальная действующая концентрация (при которой влияние достигает уровня достоверности в большинстве точек, а также наблюдается воздействие на оба показателя — как на частоту, так и на амплитуду сокращения). Эту концентрацию мы будем использовать в экспериментах по изучению деградации нейропептида GYIRF после его воздействия на мышечные препараты (предмет дальнейшей работы).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании гистохимическое окрашивание препарата флуоресцентно меченым

фаллоидином в сочетании с флуоресцентной микроскопией использовалось для визуализации мышечных волокон у трематод *F. hepatica*. Это временный гистохимический метод, в котором фаллоидин, получаемый из ядовитого гриба *Amanita falloides*, используется в качестве специфического маркера для окраски актина. Известно, что глобулярный белок актин может полимеризоваться в филаменты F-актина [27], которые участвуют в клеточных процессах, таких как сокращение мышц, цитокinesis [28], транспорт молекул [29]. Фаллоидин специфически связывается с молекулой актина, а производные фаллоидина, меченные флуорофорами, обычно используются для визуализации F-актина в различных областях исследований [30]. Впервые этот гистохимический метод был использован в конце прошлого столетия для изучения распределения миофиламентов в мускулатуре плоских червей [31, 32]. Актин является важным белком, который может обеспечивать множество физиологических процессов в организме плоских червей, например, быть вовлеченным в движение секреторных везикул, в мышечное сокращение, цитокinesis и сохранение формы клетки [33].

После инкубации гомогенатов тканей фасциол с моноклональными анти-актиновыми антителами, с помощью геля иммуноэлектрофореза была идентифицирована наиболее интенсивная полоска, соответствующая актину с мол. весом 43 кДа. Локализация этой молекулы в организме червя с помощью иммуноцитохимического мето-

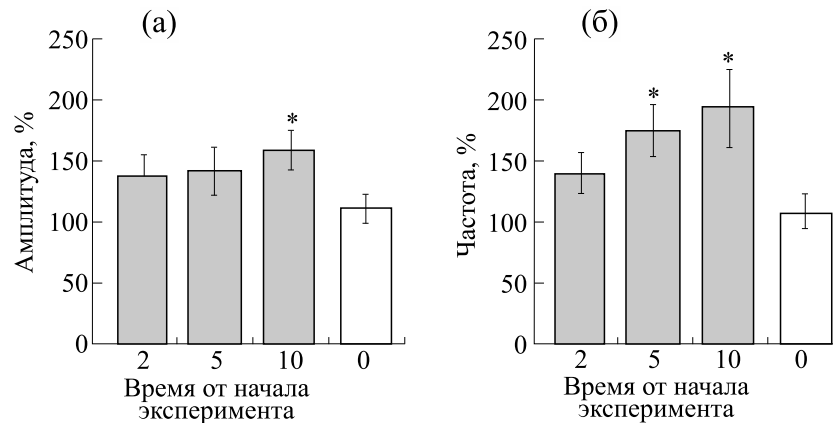


Рис. 3. Диаграмма значений амплитуды (а) и частоты (б) сокращения мышечных препаратов трематод при воздействии GYIRF в концентрации 5 мкМ, среднее значение и стандартное отклонение (*SD*). По оси ординат — процент числа сокращений по отношению к точке «0» (точка добавления пептида); по оси абсцисс — время от начала эксперимента — 2, 5 и 10 мин после добавления пептида, «0» — отмывка препарата от пептида после 10 мин инкубации. Число повторных измерений (подсчетов) для амплитуды: 2 мин ($n = 19$), 5 мин ($n = 19$), 10 мин ($n = 9$), отмывка ($n = 9$); для показателя частоты сокращения: 2 мин ($n = 16$), 5 мин ($n = 16$), 10 мин ($n = 9$), отмывка ($n = 9$). * — Достоверность различий средних, критерий Стьюдента (two-tailed) для доверительного интервала 95% при сравнении с точкой отмывки препарата: для амплитуды (а) — 10 мин ($p < 0.0244$); для частоты (б) — 5 мин ($p < 0.0316$), и 10 мин ($p < 0.0351$).

да показала, что эта форма актина входит в состав субтегументальной мускулатуры *F. hepatica* [33].

Гистохимический метод выявления фибриллярного актина с помощью фаллоидина, меченого флуоресцентным зондом TRITC, и применения флуоресцентной микроскопии позволил нам идентифицировать и охарактеризовать некоторые детали морфологического строения мускулатуры трематоды *F. hepatica*, а также впервые провести морфометрические измерения некоторых компонентов мускулатуры этих паразитических червей.

Полученные результаты показали, что мускулатура стенки тела фасциол отличается упорядоченным устройством — регулярным расположением наружных кольцевых, промежуточных продольных и внутренних диагональных мышечных волокон. Кольцевые (или экваториальные), меридиональные (или продольные) и радиальные мышечные волокна присутствуют в стенке как ротовой, так и брюшной присосок. Мышцы кишечного тракта представлены в основном диагональными, идущими в двух направлениях мышечными волокнами. Результаты показали, что общее строение мускулатуры и последовательность расположения мышечных слоев у *F. hepatica* согласуется с предыдущими исследованиями. Так, при изучении тотальных препаратов фасциол, были описаны наружные кольцевые, промежуточные продольные и внутренние диагональные мышечные волокна в мускулатуре тела [34]. В ротовой и брюшной присосках, в мужских и женских отделах репродуктивной системы *F. hepatica* отмечены преимущественно радиальные мышечные волокна [34]. Для других видов паразитических червей, например, *Schistosoma mansoni* [10], *Bucephaloides gracilescens* [35], *Diplostomum pseudospathaceum* [7, 13] также характерен общий с *F. hepatica* паттерн расположения слоев мускулатуры тела. Ранее было выявлено, что мышечные волокна фасциол, относящиеся к двум главным мышечным слоям стенки тела (кольцевым и продольным), являются гладкомышечными клетками с клеточным телом и ядром. Тела мышечных клеток расположены внутри под продольным мышечным слоем и соединены с соответствующим мышечным волокном коротким цитоплазматическим мостиком [36]. Нам впервые удалось у *F. hepatica* выявить продольные мышечные волокна в стенке кишечника, а также выявить хордальные мышечные волокна в брюшной присоске и провести измерение морфологических параметров мускулатуры тела фасциол, таким образом, дополнить и обогатить имеющиеся в отношении *F. hepatica* сведения.

У представителей плоских червей (Platyhelminthes) были выделены и синтезированы четыре FMRFамид-подобных пептида, из них GNFFRF у цестод [37], RYIRF, GYIRF и YIRF у планарий [38–40]. FMRFамид-подобные пептиды — это короткие молекулы, состоящие из 2–10 аминокислотных остатков и обладающие типичным амидированным $R(K)-X1-R-X2-NH_2$ C-концевым мотивом, где первая аминокислота всегда является щелочным основанием, таким как аргинин ($R = Arg$) или лизин ($K = Lys$), $X1$ может быть лейцин ($L = Leu$), треонин ($T = Thr$) или пролин ($P = Pro$), а $X2$ всегда ароматический аминокислотный остаток, такой как фенилаланин ($F = Phe$) или триптофан ($W = Trp$).

После того, как были синтезированы специфические антитела, их применение позволило обнаружить позитивную иммуоокраску к FMRFамид-подобным пептидам в нервной системе паразитических и свободноживущих плоских червей — у трематод и планарий [7, 41]. Иммуноцитохимически позитивная окраска к нейропептиду FMRFамиду была обнаружена в головном нервном ганглии *F. hepatica* и трех парах продольных нервных стволов и соединяющих их комиссурах [42]. В периферической нервной системе фасциол GNFFRF-иммунопозитивную окраску наблюдали в нервных сплетениях, расположенных в мускулатуре стенки тела, ротовой и брюшной присосок [43]. Кроме того, у *F. hepatica* электронная микроскопия с применением иммуномечения показала внутриклеточную локализацию пептида в цитоплазме меченных золотом GNFFRF-иммунопозитивных нейронов [43]. Мечение пептида золотом наблюдали на поверхности плотных, а также эллипсоидных электронно-плотных везикул с гомогенным матриксом, присутствующих в телах FMRF-иммунопозитивных нервных клеток, а также в малых и гигантских нервных отростках мозговых ганглиев, поперечных нервных комиссур и главных нервных стволов [44]. При этом надо отметить, что до сегодняшнего дня ни один природный FMRFамид-подобный пептид не был выделен из тканей *F. hepatica*.

Широкое распространение в нервной системе FMRF-иммунопозитивных нейронов и их отростков, а также специфическая их локализация в толще мускулатуры тела и мускулатуры прикрепительных органов паразитических червей [45] позволили предположить фундаментальную роль FMRF-подобных пептидов в нервно-мышечной физиологии. Изучение сократительной активности мускулатуры у плоских червей, а также ее регуляции, привлекло особое внимание ученых. Перед научным сообществом стояла задача разработки антипаразитарных препаратов, которые бы избирательно воздействовали на мускулатуру представителей Platyhelminthes.

В самом деле, первые опыты по выявлению мышечной активности FMRFамид-подобных пептидов были проведены на целых червях и их личинках. Так, добавление пептидов семейства FMRFамид-подобных, как было показано, не оказало влияния *in vivo* на двигательную активность целых (интактных) червей *Schistosoma mansoni* [46]. Этот факт авторы объяснили тем, что FMRF-подобные пептиды не проникали через плотные покровы червей, или, возможно, разрушались пептидазами. Однако у другого вида, цестод *Mesocostoides vogae*, было обнаружено, что пептиды GNFFRF, GYIRF и YIRF оказывали стимулирующее влияние на подвижность личинок [18, 47].

Дальнейшие исследования пошли по пути выделения фрагментов мускулатуры тела (мышечных препаратов). Начатые исследования показали, что FMRFамид-подобные пептиды (такие как YIRF, GYIRF, RYIRF, GNFFRF, и FLRF) оказывали возбуждающее влияние на препараты моногеней *Diclodophora merlangi*, у которых были обрезаны боковые края [48]. У фасциол также были проведены исследования с использованием мышечных препаратов. Было обнаружено, что GNFFRF не оказывал влияния на мускулатуру тела *F. hepatica* [49], однако другие пептиды, такие как FMRF, RYIRF, YIRF, GYIRF [49, 50], как и ряд пептидов, выделенных к тому времени у нематод, таких как SDPNFLRF, SADPNFLRF, KNEFIRF, KSAYMRF, KHEYLRF и KPNFIRF [51], оказывали возбуждающее действие на мускулатуру фасциол, демонстрируя кросс-филетическую активность FMRFамид-подобных пептидов.

Результаты настоящего исследования продемонстрировали возбуждающее действие пептида GYIRF на мышечные препараты *F. hepatica*. Проведенные опыты позволили определить рабочие концентрации пептида (1–10 мкМ), а также выявить минимальную активную концентрацию в 5 мкМ, которая используется в дальнейших экспериментах, по изучению деградации FMRFамид-подобных пептидов.

Большинство исследований индуцирующего влияния FMRFамид-подобных пептидов проводилось на паразите крови человека, кровяной двуустке *S. mansoni*. Это связано с тем, что сами шистосомы очень маленького размера и легко содержатся в культуре в лабораторных мышах. Из шистосом впервые удалось выделить и отдельные мышечные жизнеспособные клетки [52]. На изолированных мышечных клетках *S. mansoni* было показано возбуждающее действие пептидов RYIRF, GNFFRF [46], YIRF и GYIRF [53, 54]. Таким образом, FMRFамид-подобные нейропептиды оказывали у шистосом дозозависимое влияние на сокращение индивидуальных мышечных волокон [46, 54]. Физиологический механизм, посредством которого FMRFамид-подобные пептиды реализуют сократительное действие на изолированные мышечные волокна шистосом, пока полностью не раскрыт, хотя и установлено, что для проявления биологической активности нейропептиды должны иметь амидированный С-терминальный остаток, а инкубационная среда обязательно должна содержать внеклеточный Ca^{2+} [46]. Мышечные клетки также были изолированы и у свободноживущих червей *Bdelloura candida* [55] и *Procerodes littoralis* [56]. У этих видов пептиды GYIRF, RYIRF [40, 56], а также YIRF вызывали сокращение индивидуальных мышечных волокон [56]. Обнаруженное действие на

изолированные мышечные клетки [46, 48, 54] явилось демонстрацией их прямого возбуждающего влияния, и утвердило роль нейропептидов семейства FMRFамид-подобных в нейромышечной передаче у плоских червей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря пониманию сложного морфологического строения мышечной системы у паразитических плоских червей, а также функциональной активности их мускулатуры, в дальнейшем можно исследовать механизмы регуляции мышечной функции у разных представителей паразитических червей.

В результате проведенных исследований происходила отработка подходов к изучению спонтанного и пептид-индуцированного мышечного сокращения у плоских червей. Установлен факт воздействия FMRF-подобного пептида, GYIRFамида, на мышечные препараты фасциол, и минимальная действующая концентрация пептида. Эти сведения будут использованы в ходе дальнейших экспериментов.

Способом ограничения паразитарной инвазии может стать создание новых антипаразитарных препаратов, вызывающих уменьшение (или паралич) двигательной активности червей и открепление их от биологического субстрата. Это, в конечном счете, будет способствовать снижению паразитарной инвазии их хозяев — человека и животных, и загрязнения окружающей среды.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность профессору А.Г. Моу (Prof. A.G. Maule) и профессору Д.В. Халтону (Prof. D.W. Halton) Королевского Университета г. Белфаста (Queen's University of Belfast, Northern Ireland, UK) за предоставленную возможность работать в лаборатории, а также А. Моусли (Dr. A. Mousley) за помощь в освоении методики изучения физиологии мышечного сокращения и работе на физиологической установке. Для микроскопического исследования было использовано оборудование Королевского Университета (Белфаст, Великобритания), а также Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пущино, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы в Институте биофизики клетки РАН выполнены в рамках Государственного задания № 075-00609-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бронштейн А. М., Малышев Н. А., Федянина Л. В. и Давыдова И. В. Фасциолез с длительным бессимптомным течением у больного из Туркменистана, осложнившийся острой механической желтухой: описание случая и обзор литературы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*, **21** (2), 92–98 (2016).
2. Сафиуллин Р. Т. Распространение и экономический ущерб от основных гельминтозов жвачных животных. *Ветеринария*, **6**, 28–32 (1997).
3. Alba A., Grech-Angelini S., Vázquez A. A., Alda P., Blin Q., Lemmonier L., Chauvin A., Chartier C., Douchet P., Hurtrez-Boussès S., Rey O., Foata J., Boissier J., and Quilichini Y. Fasciolosis in the mediterranean island of Corsica (France): insights from epidemiological and malacological investigations. *Food Waterborne Parasitol.*, **30**, e00188 (2023). DOI: 10.1016/j.fawpar.2023.e00188
4. Nyagura I., Malatji M. P., and Mukaratirwa S. Occurrence of Fasciola (Digenea: Fasciolidae) species in live-stock, wildlife and humans, and the geographical distribution of their intermediate hosts in South Africa — a scoping review. *Front. Vet. Sci.* **9**, 935428 (2022). DOI: 10.3389/fvets.2022.935428
5. Романенко Н. А., Горохов В. В., Сергиев В. П., Колесникова М. А., Успенский А. В., Молчанов И. А., Гурьева С. С. и Горохова Е. В. Заболеваемость фасциолезом человека. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни* **2**, 57–59 (2008).
6. Никонорова М. А., Волчкова Е. В., Хорошилова И. А., Киушкина И. Н., Немилостива Е. А. и Арсеньева И. В., Трудности ранней диагностики у человека (описание клинического случая). *Эпидемиология и инфекционные болезни*, **1**, 44–49 (2018).
7. Теренина Н. Б. и Густафссон М. К. С., *Функциональная морфология нервной системы паразитических плоских червей* (Товарищество научных изданий КМК, М., 2014).
8. Толстенков О. О., Прокофьев В. В., Теренина Н. Б., Галактионов К. В., Действие некоторых фармакологических веществ на двигательную активность церкарий *Cryptocotyle lingua* (Heterophyidae). *Паразитология*, **4**, 346–370 (2010).

9. Halton D. W. and Maule A. G. Flatworm nerve-muscle: structural and functional analysis. *Can. J. Zool.*, **82**, 316–333 (2004).
10. Mair G. R., Maule A. G., Day T. A., and Halton D. W. A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **121** (2), 163–170 (2000).
11. Tolstenkov O. O., Terenina N. B., Serbina E. A., and Gustafsson M. K. S. The spatial relationship between the musculature and the 5-HT and FMRFamide-immunoreactivities in cercaria, metacercaria and adult *Opisthorchis felineus* (Digenea). *Acta Parasitologica*, **55**, 123–132 (2010). DOI: 10.2478/s11686-010-0024-4
12. Terenina N. B., Kreshchenko N. D., Mochalova N. V., Nefedova D. V., Voropaeva E. L., Movsesyan S. O., Demiaszkiewicz A., Yashin V. A. and Kuchin A. V. The new data on the serotonin and FMRFamide localization in the nervous system of *Opisthorchis felineus* metacercariae. *Acta Parasitologica*, **65**, 361–374 (2020). DOI: 10.2478/s11686-019-00165-2
13. Petrov A. and Podvyaznaya I. Muscle architecture during the course of development of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Trematoda, Diplostomidae) from cercariae to metacercariae. *J. Helminthology*, **90** (3), 321–336 (2016). DOI: 10.1017/S0022149X15000310
14. Крупенко Д. Ю. Пространственная организация мускулатуры церкарий *Himasthla elongata* (Trematoda: Echinostomatidae). *Паразитология*, **45** (6), 449–460 (2011).
15. Krupenko D. Y. Muscle system of *Diplo-discus subclavatus* (Trematoda: Paramphistomida) cercariae, pre-ovigerous and ovigerous adults. *Parasitol. Res.*, **113** (3), 941–952 (2014). DOI: 10.1007/s00436-013-3726-3
16. Salvador-Recatalà V. and Greenberg R. M. Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, **1** (1), 85–93 (2012). DOI: 10.1002/wmts.19
17. Graham M. K., McGeown J. G., and Fairweather I. Ionic mechanisms underlying spontaneous muscle contractions in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Am. J. Physiol.*, **277**, R374–R383 (1999). DOI: 10.1152/ajpregu.1999.277.2.R374
18. Hrcakova G., Velenbny S., Halton D. W., and Maule A. G. *Mesocostoides corti* (syn. *M. vogae*): modulation of larval motility by neuropeptides, serotonin and acetylcholine, *Parasitology*, **124**, 409–421 (2002). DOI: 10.1017/s0031182001001329
19. Novozhilova E., Kimber M. J., Qian H., McVeigh P., Robertson A. P., Zamanian M., Maule A. G., Day T. A. FMRFamide-like peptides (FLPs) enhance voltage-gated calcium currents to elicit muscle contraction in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4** (8), e790 (2010). DOI: 10.1371/journal.pntd.0000790
20. Wang W., Wang L., and Liang Y. S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol. Res.*, **111**, 1871–1877 (2012). DOI: 10.1007/s00436-012-3151-z
21. Greenberg R., Ca^{2+} signalling, voltage-gated Ca^{2+} channels and praziquantel in flatworm neuromusculature. *Parasitology*, **S131** (1), 97–108 (2005). DOI: 10.1017/S0031182005008346
22. Fairweather I., Brennan G. P., Hanna R. E. B., Robinson M. W., and Skuce P. J. Drug resistance in liver flukes. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.*, **12**, 39–59 (2020). DOI: 10.1016/j.ijpddr.2019.11.003
23. Kreshchenko N. D. and Maule A. G., Investigation of peptide-induced and spontaneous and muscle activity in parasitic worm, a liver fluke, *Fasciola hepatica*. In *Proc. Int. Symp. "Biological Motility: Basic Research and Practice"* (Pushchino, 2006), pp. 28–29.
24. Fellowes R. A., Maule A. G., Marks N. J., Geary T. G., Thompson D. P. and Halton D. W., Modulation of the motility of the vagina vera of *Ascaris suum* in vitro by FMRFamide-related peptides. *Parasitology*, **116**, 277–287 (1998).
25. Mousley A., Marks N. J., Halton D. W., Geary T. G., Thompson D. P., and Maule A. G. Arthropod FMRFamide-related peptide modulated muscle activity in helminths. *Int. J. Parasitol.*, **34**, 755–768 (2004).
26. Wieland T. Modification of actins by phallotoxins. *Naturwiss.*, **64**, 303–309 (1977). DOI: 10.1007/BF00446784
27. Pollard T. D. and Weihing R. R., Actin and myosin and cell movement. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **2** (1), 1–65 (1974). DOI: 10.3109/10409237409105443.
28. Matthews J. B., Tally K. J., Smith J. A., and Awtrey C. S., F-actin differentially alters epithelial transport and barrier function. *J. Surg. Res.*, **56**, 505–509 (1994). DOI: 10.1006/jsre.1994.1081
29. Chazotte B. Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **5**, pdb.prot4947 (2010). DOI: 10.1101/pdb.prot4947
30. Rieger R., Salvenmoser W., Legniti A., Reindl S., Adam H., Simonsberger P., and Tyler S., Organization and differentiation of the body-wall musculature in Macrostromum (Turbellaria, Macrostromidae). *Hydrobiologia*, **227**, 119–129 (1991). DOI: 10.1007/BF00027591
31. Wahlberg M. H. The distribution of F-actin during the development of *Diphyllbothrium dendriticum* (Cestoda). *Cell Tiss. Res.*, **291** (3), 561–570 (1998). DOI: 10.1007/s004410051025
32. Stitt A. W., Fairweather I., Trudgett A. G., Johnston C. F., and Anderson S. M. L. Localisation of actin in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.*, **78**, 96–102 (1992).
33. Mair G. R., Maule A. G., Shaw C., Johnston C. F. and Halton D. W. Gross anatomy of the muscle systems of *Fasciola hepatica* as visualized by phalloidin-fluores-

- cence and confocal microscopy. *Parasitology*, **117**, 75–82 (1998).
34. Stewart M. T., Marks N. J., and Halton D. W., Neuroactive substances and associated major muscle systems in *Bucephaloides gracilescens* (Trematoda: Digenea) metacercaria and adult. *Parasitol. Res.*, **91** (1), 12–21 (2003).
35. Kumar D., McGeown J. G., Reynoso-Ducoing O., Ambrosio J. R., and Fairweather I., Observations on the musculature and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **127**, 457–473 (2003). DOI: 10.1017/s0031182003003925
36. Maule A. G., Shaw C., Halton D. W., and Tim L., GNFFRFamide: a novel FMRFamide-immunoreactive peptide isolated from the sheep tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **193** (3), 1054–1060 (1993).
37. Maule A. G., Shaw C., Halton D. W., Curry W. J., and Tim L. RYIRFamide: a turbellarian FMRFamide-related peptide (FaRP). *Regul. Pept.* **50**, 37–43 (1994).
38. Johnston R. N., Shaw C., Halton D. W., Verhaert P., and Baguna J., GYIRFamide: a novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad turbellarian, *Dugesia tigrina*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **209** (2), 689–697 (1995).
39. Johnston R. N., Shaw C., Halton D. W., Verhaert P., Blair K. L., Brennan G. P., Price D. A. and Anderson P. Isolation, localization, and bio-activity of the FMRFamide-related neuropeptides GYIRFamide and YIRFamide from marine turbellarian *Bdelloura candida*. *J. Neurochem.*, **67**, 814–821 (1996).
40. Крещенко Н. Д. Пептидергическая сигнализация: иммуноцитохимическое определение FMRF-подобных пептидов в нервной системе планарий. *Биол. мембраны*, **30** (5–6), 430–437 (2013). DOI: 10.7868/S0233475513050095
41. Magee R. M., Fairweather I., Johnston C. F., Halton D. W. and Shaw C. Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the nervous system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitology*, **98** (2), 227–238 (1989). DOI: 10.1017/s0031182000062132
42. Marks N. J., Halton D. W., Maule A. G. Brennan G. P., Shaw C., Southgate V. R. and Johnston C. F. Comparative analyses of the neuropeptide F (NPF)- and FMRFamide-related peptide (FaRP)-immunoreactivities in *Fasciola hepatica* and *Schistosoma* spp. *Parasitology*, **110** (4), 371–381 (1995).
43. Brownlee D. J., Brennan G. P., Halton D. W., Fairweather I., and Shaw C. Ultrastructural localisation of FMRFamide- and pancreatic polypeptide-immunoreactivities within the central nervous system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitol. Res.* **80** (2), 117–124 (1994). DOI: 10.1007/BF00933778
44. Terenina N. B., Kreshchenko N. D., Mochalova N. V., and Movsesyan S. O., Serotonin and neuropeptide FMRFamide in the attachment organs of trematodes. *Helminthologia*, **55** (3), 185–194 (2018).
45. Day T. A., Maule A. G., Shaw C., Halton D. W., Moore S., Bennet J. L. and Pax R. A., Platyhelminth FMRFamide-related peptides (FaRPs) contract *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Digenea) muscle fibres *in vitro*. *Parasitology*, **109**, 455–459 (1994).
46. Hrchkova G., Velebny S., Halton D. W., Day T. A., and Maule A. G. Pharmacological characterization of neuropeptide F (NPF)-induced effects on the motility of *Mesocostoides corti* (syn. *Mesocostoides vogae*) larvae. *Int. J. Parasitol.*, **34**, 83–93 (2004).
47. Moneypenny C. G., Maule A. G., Shaw C., Day T. A., Pax R. A., and Halton D. W. Physiological effects of platyhelminth FMRFamide-related peptides (FaRPs) on the motility of the monogenean *Diclidophora merlangi*. *Parasitology*, **115** (3), 281–288 (1997). DOI: 10.1017/s0031182097001364
48. Marks N. J., Johnston C. F., Maule A. G., Halton D. W., Shaw C., Geary T. G., Moore S., and Thompson D. P. Physiological effects of platyhelminthes RFamide peptides on muscle-strip preparations of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Parasitology*, **113**, 393–401 (1996).
49. Graham M. K., Fairweather I. and McGeown J. G. Second messengers mediating mechanical responses to the FARP GYIRFamide in the fluke *Fasciola hepatica*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **279** (6), R2089–2094 (2000)
50. Marks N. J., Maule A. G., Halton D. W., Geary T. G., and Shaw C., Pharmacological effects of nematode FMRFamide-related peptides (FaRPs) on muscle contractility of the trematode, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **114**, 531–539 (1997).
51. Blair K. L., Day T. A., Lewis M. C., Bennet J. L., and Pax R. A. Studies on muscle cells isolated from *Schistosoma mansoni*. A Ca^{2+} -dependent K^{+} channel. *Parasitology*, **102**, 251–258 (1991).
52. Day T. A., Maule A. G., Shaw C., and Pax R. A. Structure-activity relationships of FMRFamide-related peptides contracting *Schistosoma mansoni* muscle. *Peptides*, **18** (7), 917–921 (1997).
53. Novozhilova E., Kimber M. J., Qian H., McVeigh P., Robertson A. P., Zamanian M., Maule A. G., and Day T. A. FMRFamide-like peptides (FLPs) enhance voltage-gated calcium currents to elicit muscle contraction in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4** (8), e790 (2010). DOI: 10.1371/journal.pntd.000079
54. Blair K. L. and Anderson P. A. Physiological and pharmacological properties of muscle cells isolated from the flatworm *Bdelloura candida* (Tricladia). *Parasitology*, **109**, 325–335 (1994).
55. Moneypenny C. G., Kreshchenko N., Moffett C. L., Halton D. W., Day T. A., and Maule A. G., Physiological effects of FMRFamide-related peptides and classical transmitters on dispersed muscle fibres of the turbellarian, *Procerodes littoralis*. *Parasitology*, **122** (4), 447–455 (2001). DOI: 10.1017/s0031182001007508.

Morphological and Functional Characteristics of the Trematode *Fasciola hepatica* Musculature

N.D. Kreshchenko*

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

The morphological structure and functional properties of musculature of flatworms *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae), parasites dangerous for agricultural animals and humans, have been studied. The histochemical staining of the body wall muscles of *F. hepatica* with fluorescently-labelled phalloidin has been performed and the stained samples were examined by fluorescent microscopy. Staining was observed both in longitudinal, circular, and diagonal muscle fibers of the body wall of the trematode, in the circular and diagonal muscle fibers surrounding the lumens of the branched intestine, and in the tubular structures of the reproductive tract. In the ventral and oral suckers of the trematode, tightly packed and intensively stained layers of muscle fibers were found. The physiological studies were conducted on the muscle strips prepared from *F. hepatica*. The results demonstrated that muscle preparations exhibit spontaneous contractile activity. Neuropeptide GYIRF, belonging to the FMRFamide-like peptide family, used at concentrations ranging from 1 μM to 10 μM , additionally stimulated the contractions of muscle preparations in *F. hepatica*, increasing the frequency and amplitude of contractions compared to their basic activity. The information obtained will be used in further investigation of muscle contraction mechanism in parasitic worms, the muscles of which are targets of antiparasitic drugs.

Keywords: fluorescent microscopy, histochemistry, muscles, parasitic flatworms, FMRFamide-like peptides

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ВРЕМЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У ПЛАНАРИЙ *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes)

© 2024 г. Г.В. Кузнецов*,*, Н.Д. Крещенко*

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

*E-mail: Mansurg999@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 14.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

С помощью гистохимической окраски тотальных препаратов флуоресцентно-меченым фаллоидином, окрашивающим мышечные клетки за счет необратимого связывания с актиновыми филаментами, методом флуоресцентной микроскопии изучена мускулатура тела планарий *Polycelis tenuis* (Turbellaria, Platyhelminthes). Показано, что мускулатура стенки тела содержит кольцевые, диагональные и продольные мышечные волокна. Кольцевые волокна наиболее тонкие и плотно расположены в наружном слое мускулатуры. Продольные волокна толстые, собраны в пучки. Отдельные диагональные мышечные волокна находятся на существенном расстоянии, в двух направлениях и под углом друг другу. Рассмотрен процесс регенерации мышечной ткани у *P. tenuis* после резекции головного конца животного. Изучение регенерации проводилось в динамике, животные отобраны на 3, 5, 7, 10 и 13 сутки после операции. По результатам микроскопического исследования сделан вывод об основных этапах регенерации мышечной ткани и их характерных чертах. Показано, что мышечная система *P. tenuis* имеет высокий приоритет и скорость регенерации и восстанавливается в течение 10–13 суток.

Ключевые слова: планарии, *Polycelis tenuis*, мускулатура, гистохимия, фаллоидин, флуоресцентная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302924060148, EDN: NKLBTN

Планарии обладают крайне высокими регенеративными способностями. Несмотря на сравнительно примитивное строение (наличие только нескольких специализированных систем: кожно-мускульный мешок, нервная система, разветвленный замкнутый кишечник; в зависимости от вида, возможно наличие специализированных половых структур), планарии широко используются для изучения процессов регенерации [1, 2]. Планарии являются классическим модельным объектом для изучения регенерации и биологии стволовых клеток. Эти животные также используются в качестве удобного объекта для изучения регенерации и биологии стволовых клеток студентами [2, 3]. Однако данные о потенциальной и фактической способности к регенерации разных частей тела планарии фрагментарны и часто противоречивы.

Регенерация у планарий происходит по эпиморфному типу, характерному для регенерации утраченных структур многих анималий (например, амфибий). Эпиморфный тип регенерации заклю-

чается в образовании на месте ранения регенерационной бластемы — скопления стволовых клеток, которые, последовательно проходя стадии деления, роста и дифференцировки, замещают утраченную структуру [2, 4]. Регенерационная способность обеспечивается наличием у планарий пула особых плюрипотентных стволовых клеток, называемых необластами [4, 5]. Дифференцировка стволовых клеток бластемы регулируется как основными генетическими факторами клеточной регуляции (такими, как H3 Ser10 (H3P), PCNA и т.д.) [6], так и специфическими факторами регуляции дифференцировки необластов, выявленными за последние 20 лет направленными исследованиями (tgs-1, zfp-1, vasa, bruli и т.д.) [5].

Мышечная ткань — одна из наиболее хорошо развитых биологических систем у плоских червей, наравне с нервной и пищеварительной. У представителей плоских червей мышечная система представляет собой замкнутый кожно-мускульный мешок, строение которого значительно

усложнено по сравнению со строением такового у кишечнополостных животных. Практически все плоские черви обладают схожим типом строения кожно-мышечного мешка. Он состоит из трех слоев: наружный слой кольцевой мускулатуры, внутренний слой продольной мускулатуры и соединяющий их слой диагональной мускулатуры, осуществляющий процесс синхронизации движений кольцевой и поперечной мускулатуры [7, 8]. В зависимости от образа жизни и типа среды обитания (свободноживущие или паразитические виды; пресноводные или морские виды; различные ареалы обитания) линейные размеры и степень развития определенных слоев кожно-мышечного мешка у разных видов может отличаться [9–11].

Данные о морфологии мускулатуры планарий немногочисленны. Так, имеются сведения в отношении планарий *Girardia tigrina* [12], *Schmidtea mediterranea* [13] и *Dugesia japonica* [14]. У некоторых планарий исследователи выделяют дополнительный слой мускулатуры, как, например, у *G. tigrina*. Согласно результатам исследований, дополнительный слой мускулатуры является дублированным слоем продольной мускулатуры [12].

Строение мышечной системы планарий изучали еще в конце XX века. Основными методами исследования строения мышечной системы плоских червей — являлись методы световой микроскопии, и общая окраска срезов тканей базовыми гистологическими красителями, такими как гематоксилин и эозин, а также методы электронной микроскопии [15, 16]. Посредством данных методов были получены базовые сведения о строении мускулатуры планарий таких видов, как *Girardia tigrina* и *Dugesia dorotocephala*.

Более современным и информативным методом стал метод флуоресцентной и/или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием специфической гистохимической окраски фаллоидином, несущим флуоресцентную метку, для окрашивания мышечной ткани [17, 18]. Использование данной окраски позволило изучать в конфокальном лазерном сканирующем микроскопе тотальные препараты планарий, и сразу получать данные по всей толщине ткани животного, не требующие трудоемкой трехмерной реконструкции.

Мускулатура играет важную роль в жизни плоских червей, как свободноживущих, так и паразитических. Мышечная система принимает участие в локомоции животного; в поглощении пищи и продвижении ее по пищеварительной системе; в процессах полового и бесполого размножения. У паразитических форм плоских червей мускулатура играет важную роль в удерживании животного в организме хозяина. Кроме того, по-

скольку плоские черви лишены наружного скелета, мышечный мешок также способствует поддержанию формы животного и защите нервной ткани и пищеварительной системы от повреждающих факторов внешней среды [18, 19].

Задачей данного исследования стало изучение процесса регенерации мышечной ткани в головном отделе тела после декапитации планарий *P. tenuis* (Turbellaria, Planariidae), вида, не изученного ранее в этом отношении. Был рассмотрен темп регенерации мышечной ткани в бластеме планарий, а также сделаны предварительные выводы о причинах и следствиях наблюдаемого процесса регенерации мышечной ткани у планарий *P. tenuis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура планарий. Исследование проводилось на планариях вида *P. tenuis*, семейства *Polycelis*. Данный вид планарий относится к половым видам и имеет много глаз на фронтальном конце тела. Средний размер отобранных для эксперимента особей составляет 0.5 см. На протяжении 1 месяца животных держали в пластиковом контейнере со смесью водопроводной и дистиллированной воды (2 : 1) в полутемных условиях при температуре 19–21°C, в этих же условиях проводили опыты. Планарий кормили мотылем два раза в неделю. За неделю до начала эксперимента (резекция головного отдела) животные перестали получать пищу.

Дизайн исследования. Для проведения исследования животные были разделены на 5 групп, после чего была проведена резекция головного отдела планарий. На 3, 5, 7, 10 и 13 сутки регенерации из общего пула животных было отобрано по 7 особей. Дополнительно была отобрана контрольная группа (8 особей) неповрежденных (интактных) планарий с целью проведения дальнейшего визуального сравнения степени регенерации поврежденного участка у подопытных животных. Отобранные особи подвергались фиксации в параформальдегиде; после чего — окраске красителем фаллоидином, предназначенным для визуализации мышечной ткани при флуоресцентной микроскопии. Готовые препараты изучали методом флуоресцентной микроскопии; были сделаны изображения участка регенерационной бластемы планарий *P. tenuis* и, исходя из этих изображений, описан процесс регенерации планарий и сделаны выводы о его особенностях.

Сущность метода. Для изучения особенностей мышечной ткани планарий был применен фаллоидин, меченый флуоресцентным зондом. Фаллоидин связывается с актином клетки в его полимерной форме и препятствует его деполимеризации [17, 20]. Молекула фаллоидина, пред-

ставляющего собой бициклический гептапептид, связывается с актиновыми филаментами гораздо сильнее, чем с мономерным актином, так как встраивается в интерфазы между двумя актиновыми субъединицами. Свойство фаллоидина специфически связываться с актиновыми микрофиламентами широко используется в клеточной биологии. Фаллоидин, меченый флуоресцентным красителем, применяется для окрашивания актиновых микрофиламентов в живых и фиксированных клетках для последующего микроскопического анализа. Эффективность применения фаллоидина для изучения мышечных структур плоских червей была подтверждена ранее [18, 21, 22].

Гистохимия. Особи планарий *P. tenuis* были зафиксированы в 4%-м растворе параформальдегида (MP Biomedicals, США) под покровным стеклом в течение 1 ч при комнатной температуре (20°C). Затем образцы были перенесены в пробирки типа «эппендорф» объемом 1.5 мл, наполненные свежим раствором параформальдегида, и инкубировались на протяжении 3.5 ч при температуре 4°C. По истечении времени инкубирования образцы переносились в фосфатно-солевой буфер (ООО «Компания Хеликон», Россия) на 24 ч с целью избавиться от возможного загрязнения. Затем образцы помещались в пробирки типа «эппендорф» с раствором фаллоидина (1 : 200, Sigma, США) на 2 ч при комнатной температуре. По завершении времени окрашивания фаллоидин удаляли из пробирок. Далее в пробирки вносили фосфатно-солевой буфер на 10 мин с целью отмыть препарат от избытка красителя. Через 10 мин буфер сливали. Данный цикл повторяли трижды. После этого планарий помещали по одной особи на предметные стекла, заключали в каплю (~60 мкл) 75%-го глицерина и накрывали покровным стеклом.

Микроскопия. Готовые образцы просматривали с помощью флуоресцентного микроскопа DM600B (Leica, Германия), оснащенного цифровой камерой DC300F (Leica, Германия). Для обнаружения фаллоидина был применен флуоресцентный фильтр N2.1 (спектр возбуждения 515–560 нм, спектр испускания 590 нм). Изображения были сохранены в формате TIFF с высоким разрешением. Морфологические измерения проводили на микрофотографиях, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа, с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США). С целью изучения формы бластемы, ее площади и степени интенсивности регенерационных процессов в целом образцы были подвергнуты микроскопии в светлом поле. Подготовка иллюстраций была осуществлена при помощи программы Adobe Photoshop C6 (Adobe Corp., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окрашивание фаллоидином позволило визуализировать актиновые миофиламенты стенки тела планарии, а также имеющие сродство к фаллоидину компоненты ее внутренней среды и участка бластемы.

Неповрежденная (интактная) планария. Все клетки и структуры мышечной системы головного конца планарии имеют одинаковую интенсивность окраски, что говорит о том, что жизнедеятельность клеток мускулатуры планарий протекает нормально. Мышечные клетки резко выделяются на фоне внутренней среды планарии, что позволяет составить схему организации мускулатуры головного конца планарии. Исследование тотальных препаратов показало наличие в стенке тела планарий трех выраженных слоев мускулатуры – наружного слоя регулярно расположенных тонких кольцевых волокон, внутреннего слоя толстых продольных мышечных волокон и слоя диагональных волокон, расположенных между продольным и кольцевым мышечными слоями (рис. 1, структуры 2 и 4). Такое строение соматической мускулатуры тела характерно для различных участков тела планарии.

По изображению мускулатуры головного конца неповрежденной (интактной) планарии *P. tenuis* (рис. 1) проводили сравнение степени восстановления мышечной ткани в головном конце планарии путем сопоставления изображений в определенные дни регенерации.

Регенерация мускулатуры головного конца тела планарий *P. tenuis*. День 3 (рис. 2а). На 3 сутки в районе резекции, на раневой поверхности планарии, наблюдается отсутствие четко окрашенных фаллоидином мышечных клеток либо клеток-предшественниц мышечной ткани. Несмотря на это, вблизи участка раневой поверхности со стороны неповрежденного участка тела животного обнаруживаются скопления слабо окрашенных (по сравнению с неповрежденным участком тела планарии) фаллоидином клеток. Предположительно, это – пул необластов, готовящихся к стадии дифференцировки по пути клеток мышечной ткани.

День 5 (рис. 2б). В области бластемы клетки окрашиваются фаллоидином крайне интенсивно, а их общее число значительно увеличивается. Это может говорить о процессах деления необластов и их дифференцировки в миобласты. Миобластами называются необласты, начавшие дифференциацию, приводящую в дальнейшем к специализации в клетки мышечной ткани, но находящиеся еще на самом раннем этапе этой клеточной линии. На некоторых препаратах отчетливо видны миофибриллоподобные структуры – так называемые «направляющие оси», которые начинаются от неповрежденного участка

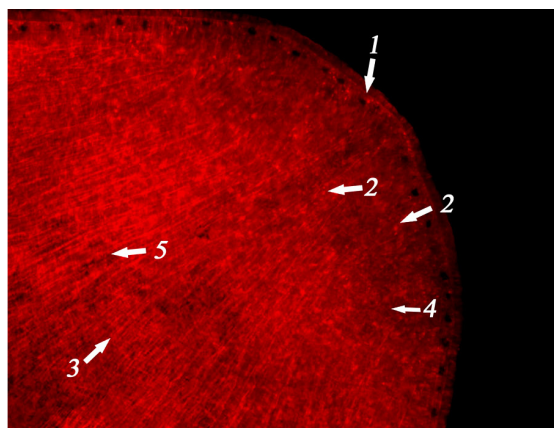


Рис. 1. Головной конец неповрежденной (интактной) планарии *Polycelis tenuis*, и его мускулатура. Обозначения: 1 — глаз планарии; 2 — клетки мышечной ткани, равномерно окрашенные и демонстрирующие нормальную жизнедеятельность; 3 — продольные волокна кожно-мускульного мешка планарии; 4 — внутренняя среда планарии; 5 — фрагмент «кольца» наружного слоя кожно-мускульного мешка планарии.

планарии, на границе с бластемой, и делятся на протяжении большей части бластемы, сходясь в одной точке, расположенной в районе бластемы (рис. 3а). Роль «направляющих осей» предположительно заключается в создании каркаса для регенерации мышечной ткани — в направлении протяженности «направляющих осей» происходит рост популяции миобластов.

День 7 (рис. 2в). Интенсивность окраски мышечных структур (как клеток, так и «направляющих осей») достигает своего пика, что говорит о крайне высокой интенсивности протекающих в данных структурах биологических процессах и повышенном формировании актина в ткани. Отчетливо видны плотно сконцентрированные в районе бластемы миобласты, интенсивность окраски которых резко контрастирует, будучи более высокой по сравнению с окраской мышечной ткани в неповрежденном участке планарий (рис. 3б). Закладка мышечной ткани в области бластемы практически завершена на этом этапе регенерации. Однако до сих пор сохраняются «направляющие оси», поддерживающие направление роста миобластов. На некоторых препаратах обнаруживаются слабо окрашиваемые паттерны внутреннего слоя мускулатуры (продольной) — очевидно, внутренний слой полноценного кожно-мускульного мешка планарии восстанавливается раньше его остальных компонентов. Видны зачатки регенерирующих глаз.

День 10 (рис. 2г). На 10 сутки «направляющие оси» теряют интенсивность окраски по сравнению с предыдущими днями и остальными клетками бластемы. Предположительно, они расслаиваются в связи с завершением процесса дифференциации миобластов в бластеме и их трансформации в клетки мышечной ткани (рис. 3в). Новообразованные клетки мышечной

ткани, переходят к завершающему этапу трансформации в зрелые клетки мышечной ткани, что видно, исходя из потери ими интенсивности окраски фаллоидином, и приближении их к окраске мышечных клеток в неповрежденном участке тела планарии. В то же время повышается интенсивность окраски внутреннего (продольного) слоя мышечной системы планарии; обнаруживаются окрашиваемые «кольца» внешнего (кольцевого) слоя мышечной системы, а также соединяющие эти два слоя короткие волокна диагональных миофибрил. На световой микроскопии наблюдается начало дифференцировки тканей внутренней среды в регенерационной бластеме планарии (рис. 4а). Отчетливо видны восстановившиеся глаза.

День 13 (рис. 2г). На 13 сутки при окрашивании фаллоидином различия в интенсивности окрашивания клеток мышечной ткани между участком бластемы и неповрежденным участком тела планарии почти не наблюдаются. Это может говорить о практически полном завершении процесса регенерации мышечной ткани в бластеме планарии, выражающемся в завершении дифференцировки миобластов (рис. 3г). Четко окрашены восстановленные слои мышечной системы планарий, как внутренние продольные, так и наружные кольцевые мышцы. Несмотря на это, при микроскопии в светлом поле, бластема все еще отчетливо выделяется; хорошо виден интенсивный процесс полного восстановления тканей внутренней среды (кишечник). Отчетливо видны восстановленные глаза, расположенные по переднему краю регенерационной бластемы (рис. 4б).

Изучение регенерационных способностей планарий проводилось с начала XX века [23, 24], однако сложные гистологические и цитологиче-

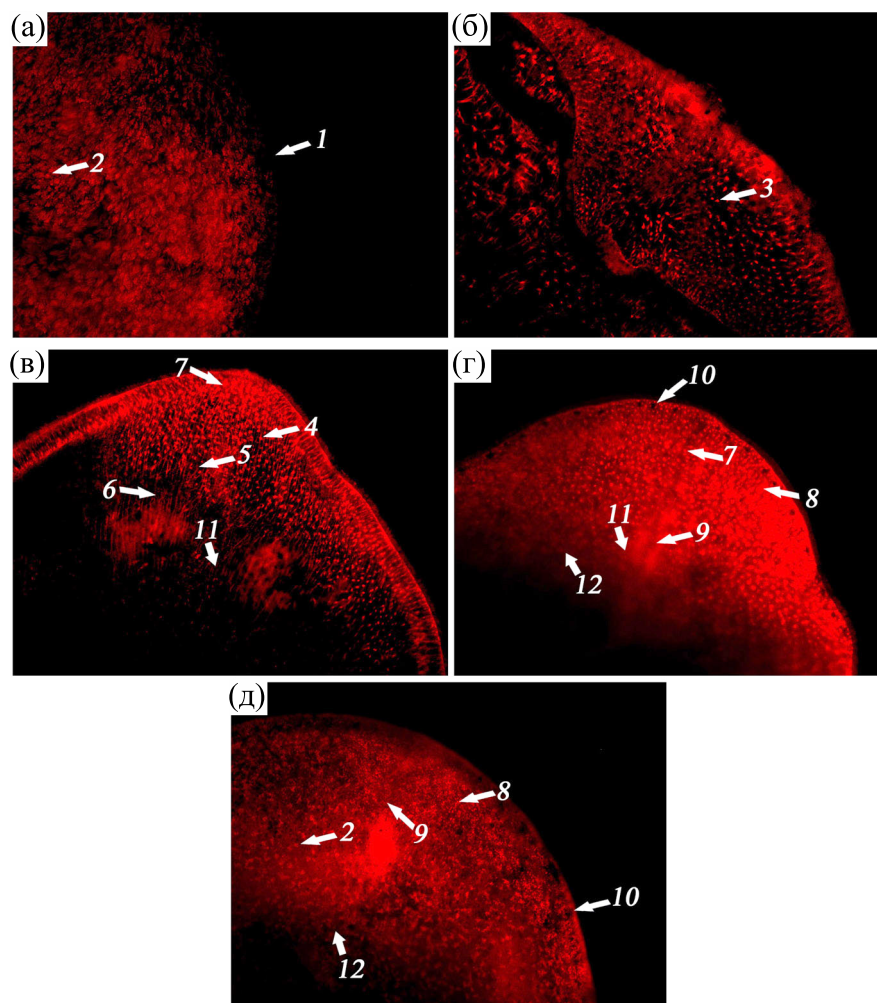


Рис. 2. Динамика образования и развития регенерационной бластемы на раневой поверхности планарии *Polycelis tenuis* после резекции головного конца (окраска фаллоидином): (а) – 3-и сутки регенерации, (б) – 5-е сутки регенерации, (в) – 7-е сутки регенерации, (г) – 10-е сутки регенерации, (д) – 13-е сутки регенерации. Обозначения: 1 – раневая поверхность; 2 – мышечные клетки неповрежденного участка тела планарии; 3 – клетки-предшественники, приступившие к интенсивной трансформации в мышечные клетки; 4 – прото-мышечные клетки, характеризующиеся активной жизнедеятельностью; 5 – мигрирующие по «направляющим осям» клетки-предшественницы; 6 – волокна мышечной ткани тела планарии; 7 – завершающие окончательную дифференцировку клетки мышечной ткани; 8 – восстановившиеся мышечные клетки; 9 – остатки распавшихся вспомогательных структур; 10 – восстановившийся глаз планарии; 11 – продольные волокна внутреннего слоя мускулатуры; 12 – «кольца» наружного слоя мускулатуры.

ские исследования стали возможны только с развитием соответствующих методов и разработке гистологических, гистохимических и иммуногистохимических красителей к различным биохимическим компонентам тканевых структур [13, 16, 25–27]. Изучение регенерации мышечной системы у нескольких видов планарий, а именно, у *G. tigrina* и, реже, у *S. mediterranea*, активно проводилось в период с 1980 до 2000 годов. Наиболее полные и точные исследования проводились на *S. mediterranea* и *G. tigrina*, результатом этих работ стали сведения о строении мускулатуры планарий данного вида, а также установление темпов и порядка их восстановления при повреждении.

Согласно полученным данным [12, 13, 28], миофибриллы планарий организуются в узнаваемые мускульные паттерны, присущие неповрежденным червям *S. mediterranea* к концу четвертых – началу пятых суток регенерации. Начиная с 2010 годов приоритет в исследовании регенерации плоских червей смещается в сторону генетических основ регенерации планарий [29–31].

Исследования особенностей строения и регенерации мышечной системы плоских червей вида *P. tenuis* до настоящего времени не проводились. Проведенное нами исследование является гистохимическим изучением процесса регенерации планарий *P. tenuis* в динамике на тотальных пре-

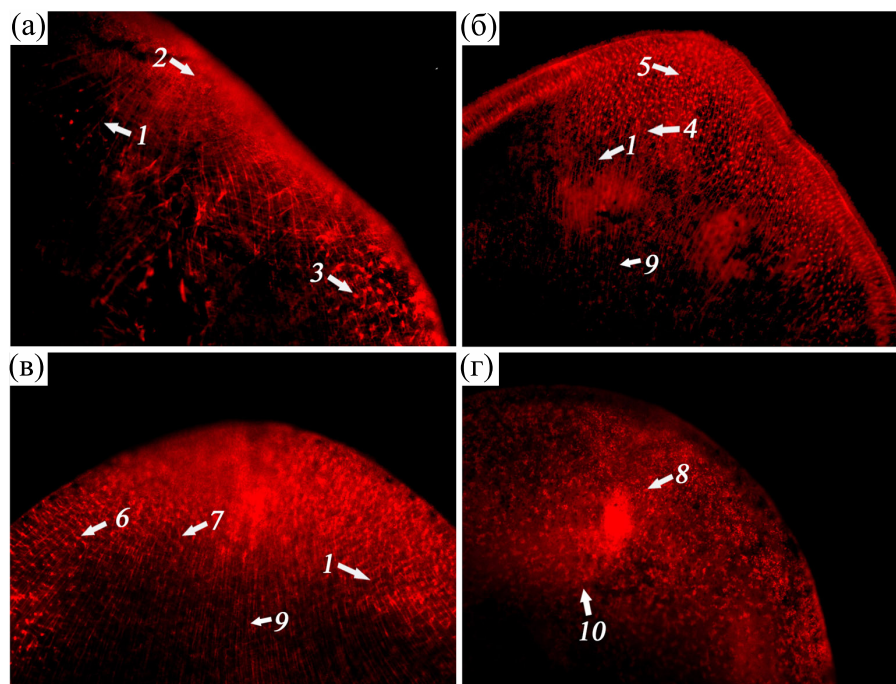


Рис. 3. Вспомогательные структуры в процессе регенерации головного конца планарии *Polycelis tenuis*, и динамика их развития: (а) – 5-е сутки регенерации, (б) – 7-е сутки регенерации, (в) – 10-е сутки регенерации, (г) – 13-е сутки регенерации. Обозначения: 1 – «направляющая ось», миофибрильный тяж; 2 – «центр схождения», к которому устремляются «направляющие оси»; 3 – клетки-предшественники, приступившие к интенсивной трансформации в мышечные клетки; 4 – мигрирующие по «направляющим осям» клетки-предшественницы; 5 – прото-мышечные клетки, характеризующиеся активной жизнедеятельностью; 6 – завершающие окончательную дифференцировку клетки мышечной ткани; 7 – начавшие распадаться «направляющие оси»; 8 – остатки распавшихся вспомогательных структур, 9 – продольные волокна мускулатуры, 10 – диагональные волокна.

паратах плоских червей. Результатом исследования стало установление сроков регенерации мускулатуры тела в головном конце планарий *P. tenuis*, а также порядка восстановления разных слоев мускулатуры. Обнаружено, что регенерация мускулатуры в головном конце *P. tenuis* до исходного состояния занимает приблизительно 10–13 суток (при 20°C); причем восстановление происходит, начиная с внутреннего (продольного)

слоя мускулатуры, на котором в дальнейшем происходит наращивание наружного (кольцевого) и соединяющего (диагонального) слоев мускулатуры. Полученные результаты характеризуются полнотой и позволяют провести сравнительный анализ с результатами аналогичных исследований, проведенных на планариях других видов. Например, в работе [13] также рассмотрен процесс регенерации мускулатуры головного конца

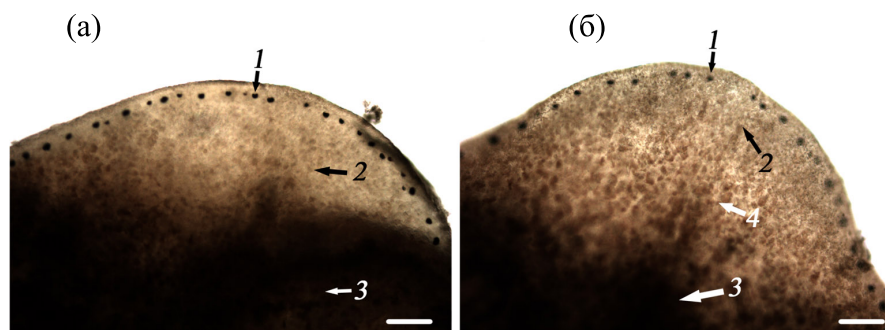


Рис. 4. Световая микроскопия финальных дней регенерации головного конца планарий *Polycelis tenuis*: (а) – 10-е сутки регенерации, (б) – 13-е сутки регенерации. Обозначения: 1 – восстановленные глаза, 2 – регенерационная бластема, 3 – неповрежденный участок тела планарии, 4 – восстановление внутренней среды планарии на участке бластемы. Масштаб 100 мкм.

S. mediterranea с указанием темпов процесса регенерации. Путем сопоставления результатов данной работы и полученных нами результатов, можно сделать вывод, что регенерация мышечной ткани у планарий *P. tenuis* протекает по такому же паттерну, что и регенерация мышечной ткани у планарий *S. mediterranea*. Однако, в отличие от *S. mediterranea*, восстановление мускулатуры у *P. tenuis* происходит медленнее, 10–13 суток против 7–10 суток.

Полученные результаты, а также их сопоставление с уже имеющимися сведениями о процессе регенерации мускулатуры планарий указывают на то, что, несмотря на различную степень родства и особенности физиологии у планарий (половой или бесполой способ размножения), процессы регенерации протекают у всех исследованных видов червей по единой схеме. Наши данные дополняют имеющиеся литературные сведения в отношении других видов что в дальнейшем позволит выработать единую теорию регенерации плоских червей, упрощающую понимание регенерации как биологического явления с позиции гистологии и цитологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что процесс регенерации мышечной ткани планарий вида *Polycelis tenuis* при температуре 20°C занимает от 10 до 13 суток; процесс регенерации тканей внутренней среды занимает больше времени. В первую очередь происходит восстановление тканей и органов, критически важных для ориентации в пространстве (глаза, нервные ганглии) и локомоции (мышечные ткани). Окрашиваемые фаллоидином клетки-предшественники мышечной ткани видны на флуоресцентном микроскопе уже на 5-е сутки регенерации, однако их метки становятся полностью идентичными клеткам сомы планарии только после 10–13 суток. Наблюдаемая скорость восстановления мышечной ткани и, очевидно, высокий приоритет ее восстановления в ходе регенерации, согласуется с описанными ранее исследованиями процесса регенерации плоских червей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность сотруднику Института биофизики клетки РАН В.А. Яшину за помощь в работе с флуоресцентным микроскопом. В работе было использовано оборудование Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пущино, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования проводились в рамках Государственного задания № 075-00609-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шейман И. М., Крещенко Н. Д. и Нетребва М. В. Процесс регенерации у планарий разных видов. *Онтогенез*, **41** (2), 114–119 (2010).
2. Тирас Х. П., Петрова О. Н., Мякишева С. Н. и Асланиди К. Б. Формирование регенерационной бластемы у планарии *Girardia tigrina*. *Фундаментальные исследования*, **7**, 493–500 (2015). EDN: UEANIF
3. Никанорова Д. Д., Купряшова Е. Е. и Костюченко Р. П. Регенерация у аннелид: клеточные источники, тканевые перестройки и дифференциальная экспрессия генов. *Онтогенез*, **51** (3), 177–192 (2020). DOI: 10.31857/S0475145020030040
4. Rink J. C. Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev. Genes Evol.*, **223**, 67–84 (2013). DOI: 10.1007/s00427-012-0426-4
5. Bowen D., den Hollander J. E., and Lewis G. H. J. Cell death and acid phosphatase activity in the regenerating planarian *Polycelis tenuis*. *Differentiation*, **21**, 160 (1982).
6. Molina M. D. and Cebrià F. Decoding stem cells: an overview on Planarian stem cell heterogeneity and lineage progression. *Biomolecules*, **11** (10), 1532 (2021). DOI: 10.3390/biom11101532
7. Mair G. R., Maule A. G., Shaw C., and Halton D. W. Muscling in on parasitic flatworm. *Parasitol. Today*, **14** (2), 73–76 (1998). DOI: 10.1016/s0169-4758(97)01182-4
8. Kreshchenko N. D. Some details on the morphological structure of planarian musculature identified by fluorescent and confocal laser-scanning microscopy. *Biophysics*, **62** (2), 271 (2017).
9. Reuter M., Mäntylä K., and Gustafsson M. K. S. Organization of the orthogon — main and minor nerve cords. *Hydrobiologia*, **383**, 175–182 (1998). DOI: 10.1023/A:1003478030220
10. Mair G. R., Maule A. G., Day T. A., and Halton D. W. A confocal microscopical study of the musculature of adult

- Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **121**, 163–170 (2000). DOI: 10.1017/s0031182099006174
11. Tolstenkov O. O., Prokofiev V. V., Terenina N. B., and Gustafsson M. K. S. The neuro-muscular system in *Cercaria* with different patterns of locomotion. *Parasitol. Res.*, **108**, 1219–1227 (2011). DOI: 10.1007/s00436-010-2166-6
 12. Cebria F., Vispo M., Bueno D., Carranza S., Newmark P., and Romero R. Myosin heavy chain gene in *Dugesia (G.) tigrina*: A tool for studying muscle regeneration in planarians. *Int. J. Dev. Biol., Suppl.* **1**, 177S–178S (1996). PMID: 9087750
 13. Cebria F. and Romero R. Body-wall muscle restoration dynamics are different in dorsal and ventral blastemas during planarian anterior regeneration. *Belg. J. Zool.*, **131** (1), 5–9 (2001).
 14. Orii H., Ito H., and Watanabe K. Anatomy of the planarian *Dugesia japonica* I. The muscular system revealed by antisera against myosin heavy chains. *Zoolog. Sci.*, **19** (10), 1123–1131 (2002). DOI: 10.2108/zsj.19.1123
 15. Morita M., Best J. B., and Noel J. Electron microscopic studies of planarian regeneration. I: Fine structure of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. *J. Ultrastructure Res.*, **27**, 7 (1969). DOI: 10.1016/S0022-5320(69)90017-3
 16. *Planarian Regeneration: Methods and Protocols*. Ed. by J. C. Rink (Methods Mol. Biol., Vol. **1774**, 2018). DOI: 10.1007/978-1-4939-7802-1
 17. Wulf E., Deboen A., Bautz F. A., Faulstich H., and Wieland T. Fluorescent phalloidin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** (9), 4498–4502 (1979). DOI: 10.1073/pnas.76.9.4498
 18. Maule A. G., Mair G. R., and Halton D. W. The neuro-muscular system of the sheep tapeworm *Moniezia expansa*. *Invertebrate Neuroscience*, **20**, 17 (2020). DOI: 10.1007/s10158-020-00246-2
 19. Krupenko D. Y. Muscle system of *Diplodiscus subclavatus* (Trematoda: Paramphistomida) cercariae, pre-ovigerous, and ovigerous adults. *Parasitol. Res.*, **113**, 941 (2014). DOI: 10.1007/s00436-013-3726-3
 20. Pascolini R., Panara F., Di Rosa I., Fagotti A., and Lorvik S. Characterization and fine-structural localization of actin- and fibronectin-like proteins in planaria (*Dugesia lugubris* s. l.). *Cell Tissue Res.*, **267**, 499 (1992). DOI: 10.1007/BF00319372
 21. Крещенко Н. Д. Изучение роли серотонина в мышечной функции у планарий. *Биол. мембраны*, **37** (1), 34–44 (2020). DOI: 10.31857/S0233475520010065
 22. Толстенков О. О., Теренина Н. Б., Шалаева Н. М. и Гайворонская Т. В. Организация мышечной системы и распределение NO-ергических и серотонинергических элементов у трематод *Allocreadium isoporum* Looss, 1894 (Allocreadiidae) и *Paramphistomum cervi* Zeder 1790 (Paramphistomatidae). *Зоология беспозвоночных*, **4** (2), 139 (2007).
 23. Salo E. and Baguna J. Regeneration and pattern formation in planarians. II. Local origin and role of cell movements in blastema formation. *Development*, **107** (1), 69–76 (1989). DOI: 10.1242/dev.107.1.69
 24. Salo E., Abril J. F., Adell T., Cebria F., Eckelt K., Fernandez-Taboada E., Handberg-Thorsager M., Iglesias M., Molina M. D., and Rodriguez-Esteban G. Planarian regeneration: achievements and future directions after 20 years of research. *Int. J. Dev. Biol.*, **53** (8–10), 1317–1327 (2009). DOI: 10.1387/ijdb.072414es
 25. Reuter M., Sheiman I. M., Gustafsson M. K. S., Halton D. W., Maule A. G., and Shaw C. Development of the nervous system in *Dugesia tigrina* during regeneration after fission and decapitation. *Invertebrate Reproduction and Development*, **29** (3), 199–211 (1996). DOI: 10.1080/07924259.1996.9672514
 26. Bueno D., Baguna J., and Romero R. Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. *Histochem. Cell. Biol.*, **107** (2), 139–149 (1997). DOI: 10.1007/s004180050098
 27. Kreshchenko N. D., Reuter M., Sheiman I. M., Halton D. W., Johnston R. N., Shaw C., and Gustafsson M. K. S. Relationship between musculature and nervous system in the regenerating pharynx in *Girardia tigrina* (Plathelminthes). *Invertebrates Reproduction and Development*, **35** (2), 109–125 (1999). DOI: 10.1080/07924259.1999.9652375
 28. Cebria F., Vispo M., Newmark P. A., Bueno D., and Romero R. Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. *Dev. Genes Evol.*, **207** (5), 306–316 (1997). DOI: 10.1007/s004270050118
 29. Fraguas S., Barberan S., and Cebria F. EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev. Biol.*, **354** (1), 87–101 (2011). DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.03.023
 30. Fraguas S., Barberan S., Iglesias M., Rodriguez-Esteban G., and Cebria F. *egr-4*, A target of EGFR signaling, is required for the formation of the brain primordia and head regeneration in planarians. *Development*, **141** (9), 1835 (2014). DOI: 10.1242/dev.101345
 31. Fraguas S., Umesono Y., Agata K., and Cebria F. Analyzing pERK activation during planarian regeneration. *Methods Mol. Biol.*, **1487**, 303–315 (2017). DOI: 10.1007/978-1-4939-6424-6_23

Morphological Features and Temporary Characteristics of the Process of Muscle Tissue Regeneration in Planaria *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes)

G.V. Kuznetsov* and N. D. Kreshchenko*

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

A body musculature of the planarian *Polycelis tenuis* (Turbellaria, Platyhelminthes) has been investigated by fluorescence microscopy using histochemical staining of whole preparations with fluorescently-labeled phalloidin, which stains muscle cells due to irreversible binding to actin filaments. The results showed that the musculature of the body wall contains circular, diagonal and longitudinal muscle fibers. The circular fibers are the thinnest ones and densely located within the outer layer of the muscle. The longitudinal fibers are thick, gathered into bundles. Individual diagonal muscle fibers are located at a significant distance, in two directions and at an angle to each other. In the work, the process of muscle tissue regeneration in *P. tenuis* is considered after removal of the planarian's head. The current study investigates tissue regeneration on days 3, 5, 7, 10 and 13 following tissue amputation. The microscopy images provided valuable information about the main stages of muscle tissue regeneration and their characteristic features. It has been shown that the muscular system in *P. tenuis* has awesome regenerative abilities and tissue is regenerated within 10–13 days.

Keywords: planarian, Polycelis tenuis, musculature, histochemistry, phalloidin, fluorescence microscopy

ВЛИЯНИЕ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ НА ПУРИНЕРГИЧЕСКУЮ МОДУЛЯЦИЮ МИОНЕВРАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧИ И СОКРАЩЕНИЯ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ

© 2024 г. А.Н. Горшунова*, А.Ю. Теплов**, С.Н. Гришин**,
Р.Д. Мухамедзянов**, А.Е. Хайруллин**, ***,#

*Казанский юридический институт МВД России, Магистральная ул., 35/1, Казань, 420108, Россия

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

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

#E-mail: khajrulli@ya.ru

Поступила в редакцию 12.08.2024 г.

После доработки 12.08.2024 г.

Принята к публикации 28.08.2024 г.

Исследована проблема изменений мионевральной передачи в присутствии интеркалирующего агента — бромистого этидия, обладающего известным угнетающим действием на нервно-мышечную передачу, природа которого остается до конца невыясненной. Для решения вопроса о возможном участии в этом процессе известных модуляторов синаптической передачи — пуринов (АТФ и аденозина) — нами проведена оценка их эффектов в присутствии данного агента. После выдерживания нервно-мышечного препарата лягушки в перфузирующем растворе, содержащем бромистый этидий, амплитуда постсинаптических ответов и сила сокращения мышцы снижались. В данных условиях оба пурина дополнительно оказывали свое обычное подавляющее действие как на амплитуду постсинаптических ответов, так и на силу сокращения скелетной мышцы. Таким образом, угнетающий эффект бромистого этидия на нервно-мышечную передачу не связан с усилением им ингибирующего действия эндогенных пуринов, вызванного квантовым выходом нейротрансмиттера.

Ключевые слова: бромистый этидий, АТФ, аденозин, нервно-мышечный синапс, вызванная квантовая секреция, мышечное сокращение.

DOI: 10.31857/S0006302924060151, EDN: NKKNPG

Как известно, бромистый этидий (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид) — органическое соединение, флуоресцентный краситель с химической формулой $C_{21}H_{20}BrN_3$ — применяется как интеркалирующий агент для выявления нуклеиновых кислот, в частности, в случае электрофореза ДНК в агарозном геле [1]. Под названием гомидиум он широко используется с 1950-х годов в ветеринарии для лечения трипаносомоза у крупного рогатого скота [2]. Кроме всего прочего, бромистый этидий активно используется в ряде исследований для оценки активности гемиканалов [3, 4], как специфический ингибитор синтеза митохондриальных белков [5], является демиелизирующим агентом [6].

Было обнаружено, что агенты, действующие на ключевые звенья пуринаргической модуляции нервно-мышечной передачи, в частности калие-

вые каналы, остаются эффективными в своем влиянии на синаптическую трансдукцию и контрактильность скелетной мышцы и при введении демиелизирующих доз бромистого этидия [6]. Однако в литературе еще нет данных, позволяющих непосредственно оценить взаимовлияние пуринов и бромистого этидия в изолированном нервно-мышечном препарате.

В настоящее время, в связи с широким внедрением в исследовательскую практику бромистого этидия, повышенное внимание уделяется всем его разнообразным эффектам. Исходя из вышесказанного, было решено провести исследование по изучению перекрестных эффектов пуринов и бромистого этидия в мионевральных синапсах.

МЕТОДИКА

Регистрация постсинаптических ответов. Эксперименты по регистрации токов концевой пла-

Сокращение: ТКП — ток концевой пластинки.

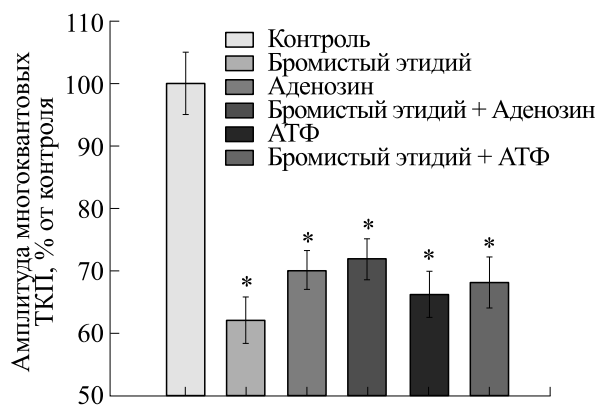


Рис. 1. Влияние бромистого этидия и агонистов пуриновых рецепторов на амплитуду многоквантовых ТКП мио-неврального препарата *m. sartorius* озерной лягушки. Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

стинки (ТКП) проводили *in vitro* на препарате: *n. ichiaticus* — *m. sartorius* *Rana Ridibunda*. Декаптацию осуществляли под эфирным наркозом. Сухожилие дистального конца мышцы брали на лигатуру, мышцу отсепарировали до места вхождения в нее нерва. После вскрытия брюшной полости седалищный нерв брали на лигатуру у места вхождения в спинной мозг и выделяли до места вхождения в мышцу. Для предотвращения сокращений мышцы ее волокна поперечно рассекали.

Непрямое раздражение нерва проводили через серебряные электроды в отдельной герметической увлажненной камере, изолированной от ванночки, в которой помещался мышечный препарат. Герметизацию отсека с нервом осуществляли тонкой пластиной, покрытой слоем вазелина. Электростимуляцию нерва для регистрации ТКП осуществляли прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды длительностью 0.2–0.4 мс с частотой 0.03 Гц.

Вызванную квантовую секрецию оценивали по амплитудно-временным параметрам вызванных ТКП, которые отводились потенциальным и токовым микроэлектродами в области концевой пластинки мышечного волокна. Оценку результатов — накопления и усреднения ТКП — осуществляли с помощью персонального компьютера с периодом опроса 5–20 мкс на точку. Расчет параметров спада токов концевой пластинки проводили при помощи программного обеспечения Origin (OriginLab Corp., США). Мышечный препарат перфузировали раствором Рингера со скоростью 2 мл/мин, куда апплицировали растворы бромистого этидия, АТФ, аденозина (Sigma, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics (SPSS: An IBM Company, США). Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению

проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривали как значимые при $p < 0.05$.

Регистрация мышечных сокращений. Мышцы фиксировали вертикально, присоединяя один конец к датчику механической активности, и погружали в ванночки объемом 10 мл, заполненные раствором Рингера. Мышцы были натянуты начальной нагрузкой в 1 г, далее оставались в покое на 30 мин для привыкания к среде.

Электростимуляцию проводили следующим образом: культи нерва помещалась в сакшн-электрод оригинальной конструкции. Сокращения мышц вызывали стимуляцией прямоугольными импульсами частотой 1 Гц, длиной 0.5 мс, амплитудой 10 В. Силу сокращений регистрировали изометрическим датчиком механической активности. Среднюю величину всех сокращений обрабатывали как один результат. Сократительные ответы рассчитывали в % относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Регистрация постсинаптических ответов. При фиксации потенциала на уровне -40 мВ средняя амплитуда многоквантовых токов концевой пластинки составила 137.1 ± 23.8 нА ($n = 30$). Через 20 мин после добавления бромистого этидия в эффективной концентрации 5 мкМ [7] амплитуда ТКП снизилась до $62.1 \pm 3.8\%$ ($n = 12$, $p < 0.05$, рис. 1).

Аденозин в микромолярной концентрации снижает амплитуды ТКП. Так, при использовании аденозина в концентрации 100 мкМ наблю-

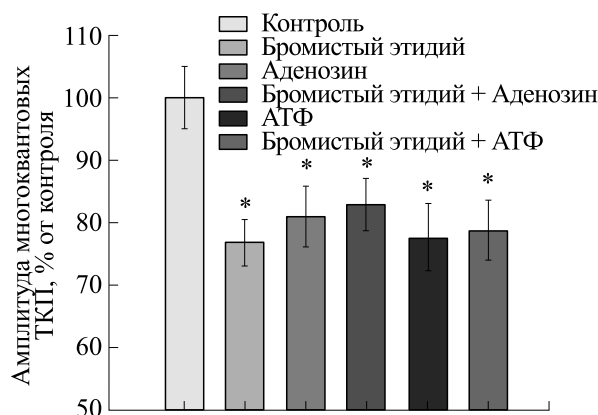


Рис. 2. Влияние бромистого этидия и агонистов пуриновых рецепторов на силу сокращения *m. sartorius* озерной лягушки. Результаты представлены в виде $M \pm m$ в % от исходных величин, принятых за 100%; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

дали снижение до $70.2 \pm 3.1\%$ ($n = 30$, $p < 0.001$, рис. 1). На фоне 5 мкМ бромистого этидия базовый эффект аденозина не изменяется (снижение до $71.9 \pm 3.3\%$ ($n = 12$, $p < 0.05$) от контроля).

Добавление АТФ также обеспечивает снижение амплитуды многоквантовых ТКП. К 15-й минуте своего действия АТФ в концентрации 100 мкМ угнетала амплитуду вызванных постсинаптических ответов до $66.3 \pm 3.7\%$ от контрольного значения ($n = 30$, $p < 0.001$, рис. 1). В присутствии 5 мкМ бромистого этидия АТФ равноэффективно снижала амплитуду ТКП (до $68.2 \pm 4.1\%$ ($n = 12$, $p < 0.05$) от контроля).

Как для АТФ, так и для аденозина падение амплитуды было обратимым после отмывки препарата при помощи физиологического раствора.

Регистрация мышечных сокращений. В следующих сериях экспериментов проводили механомиографическое исследование сокращений портняжной мышцы озерной лягушки. При стимуляции с частотой 1 Гц наблюдались стабильные одиночные сокращения на протяжении всего времени эксперимента силой 2.3 ± 0.29 г.

Бромистый этидий модулировал и силу сокращений портняжной мышцы. По итогу его 20-минутного присутствия в концентрации 5 мкМ в перфузирующем растворе сила сокращения упала до $76.9 \pm 3.7\%$ от значения до его аппликации ($n = 11$, $p < 0.05$).

Аденозин в концентрации 100 мкМ угнетал сокращения до $81.1 \pm 4.9\%$ от контроля ($n = 22$; $p < 0.05$). В присутствии бромистого этидия этот эффект сохранялся ($83.0 \pm 4.2\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$)).

При аппликации 100 мкМ АТФ сила сокращения портняжной мышцы достигала $77.8 \pm 5.4\%$ ($n = 12$) по отношению к контролю, принятому за 100%. На фоне бромистого этидия эффект АТФ сохранялся — сила сокращения снижалась до $78.9 \pm 4.8\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$).

При отмывке от аденозина и АТФ сила сокращения портняжной мышцы лягушки восстанавливалась.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из имеющихся в литературе данных можно сделать вывод о том, что эффекты бромистого этидия на ионофоретические токи концевой пластинки аналогичны другим известным блокирующим каналы препаратам [8, 9]. Однако низкие концентрации этидия не блокируют рецептор в закрытой конформации канала до того, как канал сможет открыться. Аналогично, отсутствие эффекта при низких концентрациях ацетилхолина подразумевает, что при этих концентрациях этидий не ингибирует холинэстеразу [10].

В ряде исследований было показано, что проводимость некоторых демиелинизированных периферических аксонов можно восстановить, продлив потенциал действия с помощью яда скорпиона [11]. Эта группа позже показала, что аналогичный эффект может быть достигнут путем применения 4-аминопиридина — агента, блокирующего калиевые каналы, — непосредственно к экспериментально демиелинизированным аксонам в открытых дорсальных корешках крыс [12, 13], позднее это открытие было распространено на седалищный нерв крыс [14, 15].

Рассеянный склероз — хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся многоочаговостью поражения белого вещества центральной нервной системы вследствие поражения миелиновой оболочки нервных волокон головного и спинного мозга, с вариабельностью неврологических симптомов. Для изучения демиелинизирующих расстройств производят экспериментальную интраспинальную инъекцию бромистого этидия, что имитирует изменения головного и спинного мозга при подобных заболе-

ваниях. Имеются эксперименты по оценке действия 4-аминопиридина при демиелинизирующих расстройствах, при которых препарат вводили в клинических дозах как *in vivo*, так и *in vitro* в аксоны задних столбов спинного мозга. Проведенные после этого исследования как параметров мионевральной передачи, так и силы сокращения продемонстрировали, что блокатор калиевых каналов А-типа 4-аминопиридин облегчает симптоматику у некоторых пациентов с рассеянным склерозом [6] и травмами спинного мозга [16, 17]. К тому же в более ранних экспериментах было продемонстрировано восстановление проводимости в демиелинизированных аксонах.

4-Аминопиридин не оказывает последовательного эффекта в восстановлении проводимости в демиелинизированных аксонах. Однако он имеет выраженные эффекты на периферии, включая потенцирование синаптической передачи и увеличение силы сокращения скелетных мышц. 4-аминопиридин существенно снижает синаптическое ингибиторное действие АТФ и полностью устраняет сонаправленный эффект аденозина [17], что позволяет прийти к решению о полном опосредовании данного эффекта блокируемыми 4-аминопиридином калиевыми каналами А-типа.

Итак, налицо набор наблюдений, что эффекты бромистого этидия в первую очередь затрагивают непосредственно нейроглиососудистые ансамбли при рассеянном склерозе [6], проведении боли [3], нейровоспалении и когнитивных нарушениях [4].

Как известно, скелетная мышца лишена щелевых контактов, образуемых коннексинами, на которые мог бы быть нацелен бромистый этидий. Однако щелевые контакты встречаются в сосудах, питающих мышцы. Известно, под воздействием стресса, провоспалительных медиаторов, при изменении концентрации ионов, температуры кожи закрытые гемиканалы стимулируются, чтобы открыться, высвобождая при этом АТФ из клеток с последующим пуринергическим сигнальным каскадом [18]. По мнению авторов работы [19], такие события влияют на сигнальные пути, которые очень важны для пролиферации и дифференцировки клеток.

В нервно-мышечном синапсе холоднокровных АТФ, выделяясь вместе с основным медиатором, ацетилхолином, ингибирует следующий выброс содержимого синаптических везикул по принципу отрицательной обратной связи [20]. Известно влияние, которое оказывает бромистый этидий на сайт связывания ацетилхолина в везикулярном транспорте ацетилхолина [21]. Но исходя из полученной совокупной информации, место приложения наблюдаемых эффектов бро-

мистого этидия следует искать не на пресинаптическом полюсе.

В ходе проведенных экспериментов по оценке электрофизиологических эффектов бромистого этидия на постсинаптической мембране концевой пластинки *m. cutaneous pectoris* лягушки *Rana esculenta* [7] было выявлено эффективное снижение амплитуды вызванных постсинаптических ответов. Результаты, полученные в ходе наших экспериментов, в целом подтвердили такой характер действия бромистого этидия уже на препарате седалищного нерва портняжной мышцы озерной лягушки, но при этом была выявлена и коррелирующая степень депрессии конечного результата электромеханического сопряжения — силы сокращения мышцы. Также было замечено, что при низких концентрациях бромистый этидий блокирует открытый ионный канал никотинового ацетилхолинового рецептора [7].

На нервно-мышечном синапсе холоднокровных наблюдается только пресинаптическое действие основных модуляторов мионевральной передачи — пуринов. Следует признать, что в синапсах фазных мышц лягушки не происходит взаимодействия угнетающих эффектов бромистого этидия и пуринов. Открытым остается вопрос о подобном в мионевральных синапсах теплокровных, где показано постсинаптическое действие АТФ, опосредованное ацетилхолиновым рецептором [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами выявлено эффективное снижение амплитуды вызванных постсинаптических токов концевой пластинки под действием бромистого этидия с коррелирующей степенью его же депрессии на контрактильный ответ мышцы. Данное действие схоже по результату с подобным при использовании основных модуляторов мионевральной передачи — пуринов. Однако нами не выявлено кросс-взаимодействия угнетающих эффектов бромистого этидия и пуринов в мионевральном синапсе амфибий. Остается открытым вопрос по данной ситуации в синапсах теплокровных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Протокол исследования на животных был одобрен локальным этическим комитетом Казанского Государственного Медицинского Университета (номер протокола 116/2 от 10 октября 2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sigmon J. and Larcom L. L. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **17** (10), 1524–1527 (1996). DOI: 10.1002/elps.1150171003
2. Перечень химических и биологических веществ, прошедших государственную регистрацию. *Токсикологич. вестн.*, **1** (142), 48 (2007).
3. Liu J., Li X., and Ke A. High-mobility group box-1 induces mechanical pain hypersensitivity through astrocytic connexin 43 via the toll-like receptor-4/JNK signaling pathway. *Synapse*, **75** (2), e22184 (2020). DOI: 10.1002/syn.22184
4. Dong R., Han Y., Jiang L., Liu S., Zhang F., Peng L., Wang Z., Ma Z., Xia T., and Gu X. Connexin 43 gap junction-mediated astrocytic network reconstruction attenuates isoflurane-induced cognitive dysfunction in mice. *J. Neuroinflammation*, **19** (1), 64 (2022). DOI: 10.1186/s12974-022-02424-y
5. Komatsu K., Uchida K., and Satoh S. Neurotrophic influences are not affected by miniature end-plate potentials. *Exp. Neurol.*, **83** (1), 33–41 (1984). DOI: 10.1016/0014-4886(84)90043-8
6. Smith K. J., Felts P. A., and John G. R. Effects of 4-aminopyridine on demyelinated axons, synapses and muscle tension. *Brain*, **123** (1), 171–184 (2000). DOI: 10.1093/brain/123.1.171
7. Sterz R., Hermes M., Peper K., and Bradley R. J. Effects of ethidium bromide on the nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **80** (4), 393–399 (1982). DOI: 10.1016/0014-2999(82)90085-1
8. Dreyer F., Peper K., Sterz R., Bradley R. J., and Müller K. D. Drug-receptor interaction at the frog neuromuscular junction. *Prog. Brain Res.*, **49**, 213–223 (1979). DOI: 10.1016/S0079-6123(08)64635-X
9. Peper K., Bradley R. J., and Dreyer F. The acetylcholine receptor at the neuromuscular junction. *Physiol. Rev.*, **62** (4), 1271–1340 (1982). DOI: 10.1152/physrev.1982.62.4.1271
10. Dreyer F., Peper K., and Sterz R. Determination of dose-response curves by quantitative iontophoresis at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.*, **281**, 395–419 (1978). DOI: 10.1113/jphysiol.1978.sp012430
11. Bostock H., Sherratt R. M., and Sears T. A. Overcoming conduction failure in demyelinated nerve fibres by prolonging action potentials. *Nature*, **274** (5669), 385–387 (1978). DOI: 10.1038/274385a0
12. Sherratt R., Bostock H., and Sears T. Effects of 4-aminopyridine on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *Nature*, **283**, 570–572 (1980). DOI: 10.1038/283570a0
13. Bostock H., Sears T. A., and Sherratt R. M. The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *J. Physiol.*, **313**, 301–315 (1981). DOI: 10.1113/jphysiol.1981.sp013666
14. Hansebout R. R., Blight A. R., Fawcett S., and Reddy K. 4-Aminopyridine in chronic spinal cord injury: a controlled, double-blind, crossover study in eight patients. *J. Neurotrauma*, **10** (1), 1–18 (1993). DOI: 10.1089/neu.1993.10.1
15. Hayes K. C., Blight A. R., Potter P. J., Allatt R. D., Hsieh J. T., Wolfe D. L., Lam S., and Hamilton J. T. Pre-clinical trial of 4-aminopyridine in patients with chronic spinal cord injury. *Paraplegia*, **31** (4), 216–224 (1993). DOI: 10.1038/sc.1993.40
16. Hansebout R. R., Blight A. R., Fawcett S., and Reddy K. 4-Aminopyridine in chronic spinal cord injury: a controlled, double-blind, crossover study in eight patients. *J. Neurotrauma*, **10** (1), 1–18 (1993). DOI: 10.1089/neu.1993.10.1
17. Grishin S., Shakirzyanova A., Giniatullin A., Afzalov R., and Giniatullin R. Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *Eur. J. Neurosci.*, **21** (5), 1271–1279 (2005). DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.03976.x
18. Burnstock G., Knight G. E., and Greig A. V. Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *J. Invest. Dermatol.*, **132** (3), 526–546 (2012). DOI: 10.1038/jid.2011.344
19. Burnstock G. Purines and sensory nerves. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **194**, 333–392 (2009). DOI: 10.1007/978-3-540-79090-7_10
20. Khairullin A. E., Grishin S. N., and Ziganshin A. U. Pre-synaptic purinergic modulation of the rat neuro-muscular transmission. *Curr. Issu. Mol. Biol.*, **45**, 8492–8501 (2023). DOI: 10.3390/cimb45100535
21. Bravo D. T., Kolmakova N. G., and Parsons S. M. New transport assay demonstrates vesicular acetylcholine transporter has many alternative substrates. *Neurochem. Int.*, **47** (4), 243–247 (2005). DOI: 10.1016/j.neuint.2005.05.002
22. Khairullin A. E., Teplov A. Y., Grishin S. N., and Ziganshin A. U. ATP causes contraction of denervated skeletal muscles. *Biochemistry (Moscow) – Suppl. Ser. A: Membr. Cell. Biol.*, **17** (1), 73–77 (2023). DOI: 10.1134/s1990747823060065

The Effect of Ethidium Bromide on Purinergic Modulation of Myoneural Transmission and Skeletal Muscle Contraction

A.N. Gorshunova*, A.Yu. Teplov**, S.N. Grishin**,
R.D. Mukhamedzyanov**, and A.E. Khairullin**, ***

*Kazan Law Institute of the Ministry of Internal Affairs of Russia, Magistralnaya ul. 35, Kazan, 420108 Russia

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

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

The problem of changes in myoneural transmission in the presence of an intercalating agent, ethidium bromide, which has a known inhibitory effect on neuromuscular transmission, has been investigated, but the nature of such an effect remains unclear. To solve the question of the possible participation in this process of known modulators of synaptic transmission – purines (ATP and adenosine), we evaluated their effects in the presence of this agent. After holding the neuromuscular frog preparation in a perfusing solution containing ethidium bromide, the amplitude of postsynaptic responses and muscle contraction forces decreased. Under these conditions, both purines additionally exerted their usual suppressive effect on both the amplitude of postsynaptic responses and the strength of skeletal muscle contraction. Thus, the inhibitory effect of ethidium bromide on neuromuscular transmission is not associated with an increase in the inhibitory effect of endogenous purines caused by the quantum release of the neurotransmitter.

Keywords: ethidium bromide, ATP, adenosine, neuromuscular synapse, induced quantum secretion, muscle contraction

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ СТАРЕНИЯ

© 2024 г. О.П. Горшкова*,#, И.Б. Соколова*

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

#E-mail: o_gorshkova@inbox.ru

Поступила в редакцию 20.05.2024 г.

После доработки 29.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

С использованием метода лазерной доплеровской флоуметрии и тканевой оптической оксиметрии проведен комплексный спектральный анализ колебательных компонентов миогенной, нейрогенной и эндотелиальной составляющих тонуса микрососудов и оценка динамики транспорта кислорода в коре головного мозга крыс в возрасте 4, 18 и 23 месяцев. Выявлены регионарные отличия возрастных изменений регуляторных механизмов микрокровотока и эффективности тканевой экстракции кислорода. Установлено, что в возрасте 18 месяцев микроциркуляторные изменения наблюдаются в лобном и теменном участках коры и проявляются в виде снижения симпатической регуляции микрокровотока, уменьшения прекапиллярного миогенного сопротивления, вазодилатации и увеличения вклада капиллярного звена в микроциркуляцию. В теменном участке коры эти изменения способствуют активации тканевого окислительного метаболизма и повышению потребления кислорода из притекающей крови. При дальнейшем старении формируется дисфункция микрососудистого эндотелия и снижается вклад эндотелиального компонента в общий уровень перфузии всех участков коры. Эти нарушения у 23-месячных крыс сопровождаются увеличением вклада симпатической регуляции микрокровотока в лобном участке коры, снижением вклада капиллярного звена в микроциркуляцию в затылочной области и развитием застойных процессов в венозном участке микроциркуляторного русла теменной коры, снижающих эффективность тканевой экстракции кислорода из крови.

Ключевые слова: лазерная доплеровская флоуметрия, микроциркуляция, сатурация крови, старение.

DOI: 10.31857/S0006302924060161, EDN: NKJDDT

Нормальное функционирование головного мозга во многом зависит от адекватного кровотока. С возрастом в цереброваскулярной системе происходят значительные структурные и функциональные изменения, наблюдаемые как в крупных, так и в мелких сосудах [1], которые приводят к изменению мозгового кровотока и могут способствовать развитию различного рода нейродегенеративных процессов. Проведенный нами обзор литературных данных о возрастных изменениях мозгового кровотока выявил заметную вариабельность экспериментальных результатов. Чаще всего исследователи, использующие различные методы изучения мозгового кровотока, указывают на снижение его скорости и общее ухудшение при старении у людей и экспериментальных животных [1–4]. Но имеются сведения и

об отсутствии изменений или усилении кровотока в мозге при старении [5, 6]. Данные наших предыдущих исследований [7], которые были выполнены на сосудах коры головного мозга крыс с использованием метода доплеровской флоуметрии, показали увеличение линейных скоростей кровотока в лобном и теменном участках коры в возрасте 18 месяцев и их снижение во всех участках коры в возрасте 23 месяцев. Это может указывать на то, что возрастные изменения мозгового кровотока могут различаться по регионам и на разных этапах старения. Каскад нарастающих нарушений мозгового кровотока может начинаться в среднем возрасте и постепенно прогрессировать на протяжении всей жизни [8].

Большинство данных наших предыдущих исследований и представленных в литературе были получены на мозговых сосудах больших и средних диаметров. В то же время имеются доказательства того, что старение может вызывать

Сокращения: ЛДФ — лазерная доплеровская флоуметрия, АД — артериальное давление, ПМ — показатель микроциркуляции.

функциональные и структурные изменения в микроциркуляторном звене сосудистой сети головного мозга [2, 3, 9]. Кровоснабжение головного мозга осуществляется через центральные эластичные артерии, которые в молодом возрасте в течение каждого сердечного цикла эффективно ослабляют гемодинамические пульсации и обеспечивают непрерывность кровотока в мелких сосудах головного мозга. Возрастное увеличение жесткости артерий может усиливать церебральный кровоток и гемодинамическую пульсацию [10] и постепенно способствовать возникновению микрососудистых повреждений [11]. Церебральная микроциркуляторная сеть в значительной степени определяет местное и общее периферическое сопротивление, обеспечивает непосредственный приток крови к нейронам и имеет решающее значение для транспортировки питательных веществ и кислорода, обеспечения нейроваскулярной связи и поддержания гематоэнцефалического барьера. Четкое понимание особенностей возрастных изменений церебральной микроциркуляции важно для понимания процессов развития нарушений регуляции кровотока во всем мозге при старении. Между тем в настоящее время этот вопрос остается малоизученным.

Исследования церебрального микрокровоотока проводятся с использованием различных методов. Один из наиболее часто используемых — это перфузионный метод, основанный на визуализации потока крови и определении скорости ее течения. Но результаты, полученные при использовании данного метода, не описывают полную картину изменений, происходящих в микроциркуляторном русле, и не раскрывают особенности изменения механизмов регуляции микрокровоотока. Контроль мозговой микроциркуляции включает в себя широкий спектр перекрывающихся регуляторных механизмов, обеспечивающих поддержание базального тонуса микрососудов [12, 13]. Ключевым механизмом, влияющим на сокращение миоцитов мелких сосудов, считаются эндотелий-опосредованные реакции [12]. Эндотелий может регулировать реакции гладких миоцитов микрососудов с помощью различных вазоактивных веществ. Немаловажным механизмом регуляции сосудистого тонуса также является нейрогенный механизм, который осуществляется путем прямых или опосредованных влияний на сократительные функции гладких миоцитов. Кровеносные сосуды на поверхности и внутри мозга окружены нервными волокнами, которые исходят, соответственно, из периферических нервных ганглиев и внутренних нейронов мозга [13]. Кроме того, регуляция тонуса микрососудов и, следовательно, перфузии мозга определяется химическими сигналами, высвобождаемыми астроцитами [14]. Эндотелиальные клетки микрососудов мозга вместе с гладкомышечными клетка-

ми, астроцитами, перицитами, микроглией, нейронами и внеклеточным матриксом образуют нейроваскулярную единицу, которая регулирует локальный контроль скорости и характера церебрального микрокровоотока [15, 16]. Характер микрокровоотока (скорость, гомогенность, непрерывность течения и др.) значительно влияет на доступность кислорода для мозговой ткани [17, 18]. Возрастные изменения в микрососудистом русле, такие как дисфункция эндотелия, сосудистых гладкомышечных клеток или перицитов, могут влиять на вклад определенных регуляторных компонентов, приводить к динамическим нарушениям и гетерогенности микрокровоотока и нарушению оксигенации ткани мозга [19]. Проведение комплексного исследования функционального состояния церебрального микроциркуляторного русла, включающего в себя изучение изменения регуляции потока крови и оценку динамики транспорта кислорода в микрососудах коры головного мозга на разных этапах нормального старения, по нашему мнению, могло бы способствовать выявлению механизмов изменений оксигенации ткани мозга при старении. Результаты такого исследования могут быть использованы в разработке новых эффективных методов диагностики и коррекции возрастных гипоксических поражений головного мозга. Целью данной работы была комплексная оценка показателей перфузии ткани кровью, сатурации крови в микрососудах, потребления кислорода тканью и колебательных компонентов миогенной, нейрогенной и эндотелиальной составляющих тонуса микрососудов в различных участках коры больших полушарий головного мозга у крыс в возрасте 4, 18 и 23 месяцев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на крысах из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» (Санкт-Петербург). В работе использовали самцов Sprague-Dawley трех возрастных групп: группа 1 — молодые крысы (4 месяца, $n = 14$, массой 405 ± 21 г), группа 2 — крысы в возрасте 18 месяцев ($n = 10$, массой 610 ± 15 г) и группа 3 — 23-месячные крысы ($n = 12$, массой 630 ± 23 г). После рождения и до достижения нужного возраста крыс содержали в виварии в условиях искусственного освещения (цикл: 12 часов свет/12 часов темнота) по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете при свободном доступе к воде и пище (брикетированный комбикорм ЛБК-120 ГОСТ Р 51850-2001 (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Ленинградская область, Россия)). После окончания эксперимента животных усыпляли передозировкой наркоза.

Хирургическая подготовка животных. Крыс наркотизировали золетилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbas, Франция). Достаточность анестезии определяли по отсутствию реакции вибрисс на болевой стимул. Для обеспечения свободного дыхания животному устанавливали трахеостому. В правую бедренную артерию вводили катетер, заполненный гепаринизированным физиологическим раствором (50 ед/мл). Животного располагали на подогреваемом столике, ректальная температура поддерживалась на уровне 38°C. Голову животного плотно фиксировали в стереотаксическом станке в горизонтальном положении. В теменной области черепа высверливали отверстие (5 мм вперед/9 мм назад от брегмы и ± 4 мм от сагиттального шва) твердую мозговую оболочку в пределах которого удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl – 120.4, KCl – 5.9, NaHCO₃ – 15.5, MgCl₂ – 1.2, CaCl₂ – 2.5, NaH₂PO₄ – 1.2, глюкоза – 11.5, pH 7.4), аэрированного карбогеном. Температуру раствора поддерживали на уровне 37°C.

В работе использовали многофункциональный лазерный диагностический комплекс ЛАКК-М (НПП «ЛАЗМА», Россия), совмещающий методы лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) и оптической тканевой оксиметрии.

Регистрация локального мозгового кровотока осуществлялась в красном канале лазерного излучения (длина волны 0.63 мкм) через 15–20 мин после окончания хирургических процедур. Для спектрального вейвлет-анализа колебаний использовали 12-минутные записи. Поверхность обоих полушарий внутри трепанационного отверстия визуально делили на 3 равные зоны и условно определяли их как лобную, теменную и затылочную. Для снятия показаний датчик прибора последовательно помещали в каждую из этих зон на обоих полушариях. Датчик максимально близко приближали к поверхности мозга, не допуская касания с мягкой мозговой оболочкой и сдавливания поверхности мозга. Межполушарная асимметрия показателей микроциркуляции обнаружена не была. Поэтому данные, полученные на правом и левом полушарии, суммировали. Параметры микрокровотока записывали на протяжении 12 мин. В течение этого времени у крыс непрерывно проводили прямое измерение артериального давления (АД) через катетер в бедренной артерии [20]. В течение всего эксперимента показатели среднего АД оставались примерно на одном уровне: у крыс в возрасте 4 месяцев АД составляло в среднем 122 ± 3 мм рт. ст., в возрасте 18 месяцев – 125 ± 4 мм рт. ст., у 23-месячных – 127 ± 5 мм рт. ст.

Методом ЛДФ определяли показатель микроциркуляции крови, характеризующий изменение потока крови (перфузии ткани кровью) в единицу

времени в объеме ткани около 1 мм³. Толщина зондируемого слоя ткани при использовании прибора составляет от 0.5 до 2 мм [21], что обеспечивало исследование нами микрокровотока в коре полушарий головного мозга крыс. Для регистрации ЛДФ-грамм и их последующей обработки применяли прилагаемое к аппарату стандартное программное обеспечение версии 3.0.2.376, работающее в операционной системе Windows XP. Программа автоматически рассчитывала среднюю величину показателя микроциркуляции (ПМ), среднее квадратическое отклонение показателя микроциркуляции ($\sigma_{\text{ПМ}}$) и коэффициент вариации (K_v), показывающий соотношение между перфузией ткани кровью и величиной ее изменчивости ($K_v = \sigma_{\text{ПМ}}/\text{ПМ} \times 100\%$) и характеризующий вазомоторную активность микрососудов. Определяли усредненную по времени амплитуду вазомоторных колебаний по максимальным значениям в соответствующем частотном диапазоне ($A_{i_{\text{max}}}$) для эндотелиального ($A_{e_{\text{max}}}$, частота колебаний микрокровотока 0.01 – 0.04 Гц), нейrogenного ($A_{n_{\text{max}}}$, 0.04 – 0.15 Гц) и миогенного ($A_{m_{\text{max}}}$, 0.15 – 0.40 Гц) механизмов модуляции кровотока [22].

Ввиду разброса колебаний амплитуд ритмов анализировали их нормированные характеристики. Нормирование проводили по формуле:

$$A_{i_{\text{норм}}} = (A_{i_{\text{max}}}/3\sigma_{A_{i_{\text{max}}}}) \times 100\%, \quad (1)$$

где $A_{i_{\text{max}}}$ – максимальная амплитуда колебаний в выбранном частотном диапазоне, $\sigma_{A_{i_{\text{max}}}}$ – среднее квадратическое отклонение амплитуды колебания кровотока. Такое нормирование позволяет перейти к безразмерным величинам и исключить влияние нестандартных условий проведения исследований.

Помимо абсолютных значений амплитуды колебаний оценивали функциональный вклад каждого регуляторного механизма в общий уровень тканевой перфузии по формуле [23]:

$$(A_{i_{\text{max}}}/\text{ПМ}) \times 100\%, \quad (2)$$

где $A_{i_{\text{max}}}$ – максимальная амплитуда колебаний в выбранном частотном диапазоне, ПМ – средняя величина показателя микроциркуляции.

Вклад различных ритмических составляющих в общую мощность спектра оценивался по мощности их спектра (P) в процентном отношении к общему спектру активных колебаний микрокровотока по формуле [23]:

$$PAi = Ai_{\max}^2 / (A_{\Sigma \max}^2 + A_{H \max}^2 + A_{M \max}^2) \times 100\%. \quad (3)$$

На основании данных об амплитудах колебаний соответствующих частот с учетом среднего артериального давления рассчитывали величину нейрогенного тонуса (НТ) прекапиллярных резистивных микрососудов, дающего представление о функциональном состоянии мелких артериол [21]:

$$HT = (\sigma_{A_{H \max}} \times AD_{\text{ср}}) / A_{H \max} \times ПМ, \quad (4)$$

где $ПМ$ — средняя величина показателя микроциркуляции; $\sigma_{A_{H \max}}$ — среднеквадратичное отклонение максимального значения амплитуды колебания кровотока в нейрогенном диапазоне частот; $AD_{\text{ср}}$ — среднее артериальное давление; $A_{H \max}$ — максимальное значение амплитуды колебаний мозгового кровотока крыс в нейрогенном диапазоне частот.

По аналогичным формулам с использованием максимальных значений амплитуд в соответствующем диапазоне частот рассчитывали величины миогенного тонуса метартериол и прекапиллярных сфинктеров и эндотелий-зависимого тонуса микрососудов.

Для тонус—формирующих механизмов модуляции микрокровотока (эндотелиальный, нейрогенный, миогенный) дополнительно рассчитывали показатель их вклада в общий тонус микрососудов по формуле [23]:

$$PT = \sigma_{A_{i \max}} / A_{i \max}, \quad (5)$$

где $A_{i \max}$ — максимальная амплитуда колебаний в выбранном частотном диапазоне, $\sigma_{A_{i \max}}$ — среднеквадратичное отклонение максимальной амплитуды колебания кровотока.

Оптическая тканевая оксиметрия. Методом оптической тканевой оксиметрии оценивали средний относительный уровень сатурации (SO_2) крови микроциркуляторного русла, содержащего артериолы с оксигемоглобином и венулы с дезоксигемоглобином, и показатель объемного кровенаполнения (V_t) ткани в области исследования. На основании полученных значений показателей рассчитывали индексы, определяющие взаимосвязь между перфузией и сатурацией: индекс относительной перфузионной сатурации кислорода в микрокровотоке (Sm) и удельное потребление кислорода тканью (U):

$$Sm = SO_2 / ПМ, \quad (6)$$

$$U = (100\% - SO_2) / V_t. \quad (7)$$

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Проверку экспе-

риментальных данных на нормальное распределение проводили с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. Во всех случаях исследование на нормальность распределения показало его отсутствие хотя бы для одной из сравниваемых выборок, поэтому статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрических методов. Все данные, полученные на крысах групп 2 и 3, сравнивали с соответствующими данными у крыс группы 1 (молодые 4-месячные крысы). Сравнение средних данных независимых выборок при сравнении двух групп проводили с использованием U -критерия Манна—Уитни. Данные в таблице и на графиках представлены как медиана [25 процентиль; 75 процентиль]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатель перфузии. Показатели средних величин перфузии в различных участках коры головного мозга у крыс разных возрастных групп представлены в табл. 1. Сравнение средних величин уровня перфузии у крыс групп 2 и 3 со значениями, полученными на животных 1 группы, выявило изменение ПМ у крыс группы 2 только в лобном участке коры (увеличение в среднем на 21.76%). У крыс группы 3 достоверных изменений средних величин уровня перфузии обнаружено не было.

Значение средних величин ПМ не всегда является информативным, оно может изменяться в широких пределах [21]. Более информативными являются среднеквадратическое отклонение показателя микроциркуляции ($\sigma_{ПМ}$) и коэффициент вариации (K_v), характеризующий соотношение между перфузией ткани и величиной ее изменчивости. Достоверного изменения показателя $\sigma_{ПМ}$ у крыс групп 2 и 3, по сравнению со значениями у молодых крыс не отмечено (табл. 1). Значения коэффициента вариации снижаются. Эти изменения у крыс 2 и 3 групп отмечены в лобной и затылочной области коры (табл. 1).

Амплитудно-частотный спектр микрокровотока. Анализ амплитудно-частотного спектра колебаний кровотока у крыс группы 2 (табл. 2) выявил увеличение амплитуды эндотелиальных колебаний во всех исследованных участках коры головного мозга по сравнению с аналогичными значениями в группе 1 в среднем в 2.0–2.5 раза. Амплитуда миогенных колебаний увеличивается в лобной и теменной области. Величины A_H во всех исследованных участках коры достоверно не изменяются. Вклад в общую мощность спектра ос-

Таблица 1. Показатели изменения перфузии у крыс разного возраста

Участок коры	Группа крыс	ПМ	σ	K_v
Лобный	Группа 1 (4 мес., $n = 14$)	22.52 [15.61;27.26]	0.91 [0.65;1.21]	3.63 [2.73;6.29]
	Группа 2 (18 мес., $n = 10$)	26.98* [20.83;34.21]	0.78 [0.62;1.31]	2.51* [1.92;5.94]
	Группа 3 (23 мес., $n = 12$)	24.23 [21.74;28.21]	1.28 [0.63;1.81]	1.49* [0.93;5.24]
Теменной	Группа 1 (4 мес., $n = 14$)	23.25 [18.35;25.44]	0.83 [0.75;1.85]	3.12 [2.71;4.15]
	Группа 2 (18 мес., $n = 10$)	22.71 [20.78;24.66]	1.11 [0.82;1.35]	3.99 [3.35;5.23]
	Группа 3 (23 мес., $n = 12$)	21.74 [18.39;26.17]	0.85 [0.71;1.12]	2.76 [2.25;6.56]
Затылочный	Группа 1 (4 мес., $n = 14$)	21.24 [15.37;28.21]	1.04 [0.61;1.27]	4.42 [2.45;5.93]
	Группа 2 (18 мес., $n = 10$)	24.92 [19.62;29.05]	0.79 [0.62;1.11]	3.33* [2.21;8.09]
	Группа 3 (23 мес., $n = 12$)	20.45 [17.52;25.24]	0.99 [0.71;2.33]	3.74* [2.95;3.99]

Примечание. Различия достоверны относительно значений у крыс группы 1 (* – $p < 0.05$).

цилляций кровотока изменяется для амплитуд миогенных и нейрогенных колебаний (табл. 2). Увеличение вклада Ам в общую мощность спектра и снижение вклада Ан отмечается в лобной и теменной области коры полушарий.

Во всех исследованных участках коры у крыс группы 2, по сравнению с молодыми крысами, снижаются величины расчетных показателей миогенного и эндотелиального тонуса (рис. 1а,в). Наибольшее изменение обнаруживается в лобном участке. Показатели миогенного и эндотелий-зависимого тонуса в этой области снижаются в среднем на 45–50%. В остальных участках коры снижение составляет в среднем 25–30%. Вклад тонус-формирующих механизмов в общий тонус микрососудов уменьшается (рис. 2). Уменьшение доли миогенного компонента в среднем на 25–35% обнаруживается во всех исследованных участках коры (рис. 2в), а в лобном участке уменьшается также доля эндотелиального (до 2.76 [2.61;3.75] % по сравнению с 4.29 [3.33;5.23] % у крыс группы 1, рис. 2а). Оценка функционального вклада каждого регуляторного механизма в общий уровень тканевой перфузии показала увеличение доли эндотелиального компонента в лобной области коры полушарий

(до 1.39 [0.77;2.26] % по сравнению с 0.95 [0.72;1.17] % у крыс группы 1, рис. 3а). В теменной области отмечалось снижение вклада в перфузию эндотелий-опосредованного и нейрогенного механизма регуляции (до 0.95 [0.81;1.11] % и 0.87 [0.67;0.96] % соответственно по сравнению с 1.24 [0.92;1.45] % и 1.04 [0.88;1.37] % в группе 1) (рис. 3).

У крыс группы 3, по сравнению с молодыми животными, амплитудно-частотный анализ ритмов микрокровотока в теменном участке коры позволил выявить увеличение амплитуд осцилляций во всех диапазонах (табл. 2). В лобном участке в среднем на 47.15% увеличивается амплитуда нейрогенных колебаний. Вклад в общую мощность спектра осцилляций кровотока в лобном участке коры увеличивается для амплитуд нейрогенного диапазона (в среднем на 20%). В затылочном участке коры в среднем на 26.01% увеличивается вклад Ам. Вклад амплитуд эндотелиальных колебаний в общую мощность спектра снижается во всех исследованных участках коры (табл. 2).

Изменение расчетных показателей компонентов сосудистого тонуса у крыс группы 3, по сравнению с молодыми животными, отмечается только в теменном участке коры. Показатели эндоте-

Таблица 2. Нормированные значения усредненных по времени амплитуд вазомотий микрокровотока и их вклад в общую мощность спектра у крыс разного возраста

Участок коры	Группа крыс	Эндотелиальный диапазон (0.01–0.04 Гц)		Нейрогенный диапазон (0.04–0.15 Гц)		Миогенный диапазон (0.15–0.40 Гц)	
		$A_{\text{норм}}$	$PA_{\text{э}}, \%$	$A_{\text{норм}}$	$PA_{\text{н}}, \%$	$A_{\text{мнорм}}$	$PA_{\text{м}}, \%$
Лобный	Группа 1 (4 мес., $n = 14$)	6.91 [5.44;8.54]	35.22 [27.74;41.77]	6.89 [5.73;8.09]	30.26 [24.63;39.11]	6.51 [5.86;9.09]	29.92 [23.66;35.34]
	Группа 2 (18 мес., $n = 10$)	11.77* [6.21;15.18]	38.48 [22.15;54.28]	6.21 [4.62;6.97]	27.56* [20.29;29.89]	7.38* [5.14;11.26]	35.41* [27.61;49.68]
	Группа 3 (23 мес., $n = 12$)	8.23 [3.35;13.21]	24.21* [13.11;38.41]	10.49* [9.83;23.24]	42.58* [19.58;50.12]	10.19 [3.71;18.59]	29.96 [20.31;38.75]
Теменной	Группа 1 (4 мес., $n = 14$)	6.13 [3.71;7.93]	31.94 [25.01;57.54]	5.07 [3.83;5.55]	34.79 [31.72;41.25]	5.29 [4.15;7.36]	30.57 [18.01;33.04]
	Группа 2 (18 мес., $n = 10$)	12.49* [7.25;16.53]	32.33 [26.99;44.29]	5.95 [4.86;19.63]	30.67** [23.94;32.37]	7.17* [5.53;9.32]	34.79* [29.86;41.48]
	Группа 3 (23 мес., $n = 12$)	8.57* [6.89;12.87]	27.79* [22.39;31.55]	6.64* [5.52;7.76]	31.88 [31.01;34.18]	7.15* [5.17;8.58]	34.92 [20.39;43.93]
Затылочный	Группа 1 (4 мес., $n = 14$)	6.22 [3.15;10.61]	31.71 [24.03;42.81]	6.37 [4.23;11.23]	29.89 [26.62;38.63]	9.87 [9.15;18.91]	35.21 [21.41;39.24]
	Группа 2 (18 мес., $n = 10$)	7.89* [4.56;14.61]	31.96 [29.73;33.04]	6.13 [4.86;9.24]	31.72 [27.41;41.11]	8.68 [6.53;13.54]	35.93 [29.59;40.13]
	Группа 3 (23 мес., $n = 12$)	5.51 [3.53;8.43]	15.51* [7.08;35.13]	6.73 [3.87;8.75]	33.54 [25.95;45.74]	7.9 [5.68;14.63]	43.15* [30.69;53.49]

Примечание. Различия достоверны относительно значений у крыс группы 1 (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$).

лиального, миогенного и нейрогенного тонусов снижаются в среднем на 35–40% (рис. 1). В этом же участке коры вклад всех тонус-формирующих механизмов в общий тонус микрососудов уменьшается в среднем на 35–40% (рис. 2) Изменение функционального вклада в общий уровень тканевой перфузии обнаруживается только для эндотелий-опосредованной регуляции. Доля эндотелиального механизма регуляции микрокровотока

уменьшается во всех исследованных участках коры в среднем на 20–30% (рис. 3а).

Показатели тканевой оксиметрии. Обнаруженные нами нарушения тканевого микрокровотока у крыс группы 2 сопровождаются изменением насыщения крови микроциркуляторного русла коры кислородом. Снижение показателя SO_2 в среднем на 6–8% отмечено во всех исследованных участках коры головного мозга (табл. 3). До-

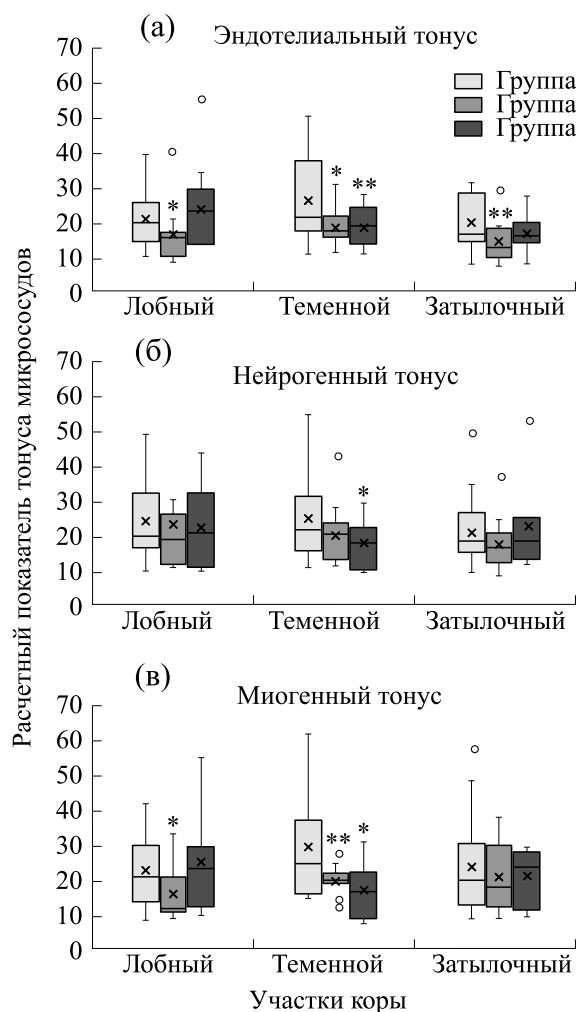


Рис. 1. Расчетные показатели тонуса микрососудов в различных участках коры головного мозга у крыс разных возрастных групп: (а) — эндотелиальный тонус, (б) — нейрогенный тонус, (в) — миогенный тонус. Верхняя и нижняя граница каждого прямоугольника — первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля) соответственно, поперечная линия внутри — медиана (50-й процентиль), крестик внутри — среднее арифметическое, концы отрезков 10-й и 90-й процентиля, точки — выбросы. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс группы 1 (* — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$).

статистически значимые изменения показателя объемного кровенаполнения ткани, индекса перфузионной сатурации кислорода и индекса потребления кислорода во всех исследованных участках коры не были обнаружены (табл. 3).

У крыс группы 3, по сравнению с животными 1 группы, изменения показателей тканевой оксиметрии обнаруживаются только в теменном участке коры. Снижается насыщение крови микроциркуляторного русла кислородом (показатель SO_2 уменьшается в среднем на 5.48%, табл. 3). Индекс перфузионной сатурации кислорода (Sm)

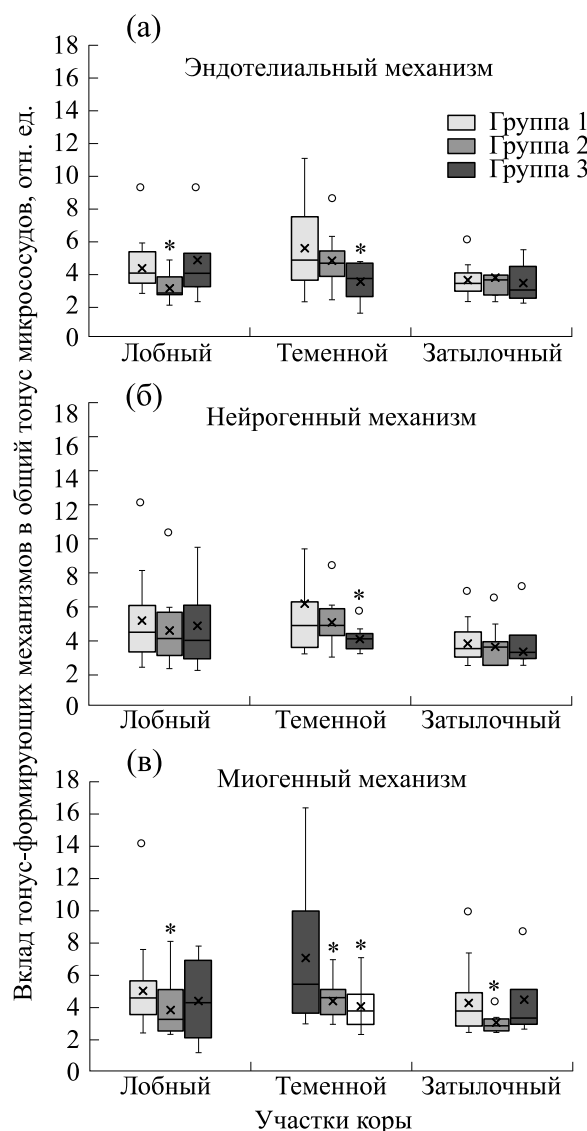


Рис. 2. Вклад тонус-формирующих механизмов в общий тонус микрососудов у крыс разных возрастных групп. Тонус-формирующие механизмы: (а) — эндотелиальный, (б) — нейрогенный, (в) — миогенный. Остальные обозначения как на рис. 1.

увеличивается в среднем на 25% (табл. 3). Эти изменения сопровождаются увеличением показателя объемного кровенаполнения (V_t , табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наше исследование показало, что нормальное старение практически не влияет на величину показателя перфузии (табл. 1), характеризующего средний поток крови в интервале времени [21]. Изменения этого показателя у крыс отмечено только в 18 месячном возрасте в лобном участке коры полушарий головного мозга — увеличение в среднем на 21.76%.

Анализ амплитудно—частотного спектра колебаний кровотока у крыс этого возраста позволил выявить увеличение нормированных значений амплитуды миогенных колебаний и ее вклада в общий спектр микрокровотока в лобном и теменном участках коры и снижение величин расчетных показателей миогенного тонуса (табл. 2, рис. 1в). Также во всех исследованных участках коры отмечено уменьшение вклада миогенного механизма в общий тонус микрососудов (рис. 2в). Такие изменения спектральных характеристик микрокровотока в миогенном диапазоне могут быть связаны с уменьшением при старении числа сократительных компонентов стенок микрососудов: гладкомышечных клеток, эластина, перicyтов [24, 25]. Кроме того, осцилляции миогенного диапазона также отражают активность прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол и являются ведущим механизмом регуляции числа функционирующих капилляров. Снижение показателя миогенного тонуса может указывать на увеличение вклада в микроциркуляцию капилляров [26]. Большинство исследователей сходятся во мнении, что при старении происходит микроциркуляторное разряжение на уровне мелких артерий и артериол коры головного мозга [4, 25, 27]. Однако вопрос об изменении плотности капиллярного русла остается открытым. Имеются сведения, как о возрастном снижении, так и об отсутствии изменений или увеличении плотности капилляров [25, 27]. Высказывается также мнение о том, что изменения числа капилляров коры при старении могут быть многофазными: их плотность увеличивается на ранних этапах старения, но снижается в более позднем возрасте [27]. Косвенным подтверждением увеличения вклада капиллярного звена, в строении которого преобладают эндотелиальные клетки [28], в микроциркуляцию лобного участка коры головного мозга у 18 месячных крыс может служить обнаруженное нами увеличение вклада эндотелиальных механизмов в общий уровень тканевой перфузии в этой области коры (рис. 3а). Однако в теменном участке перфузионный вклад эндотелий-опосредованных механизмов оказался снижен, что позволяет сделать предположение о развитии процессов вазомоторной дисфункции микрососудистого эндотелия, выраженных в теменной области коры полушарий головного мозга в этот возрастной период. В то же время достоверные изменения вклада Аэ в микроциркуляцию затылочного участка коры обнаружены не были (рис. 3а).

Изменение колебательных процессов нейрогенного диапазона обнаружено в лобном и теменном участках коры. В этих областях коры снижается вклад амплитуд нейрогенных колебаний в общий спектр осцилляций (табл. 2). В теменном участке также уменьшается вклад нейрогенного

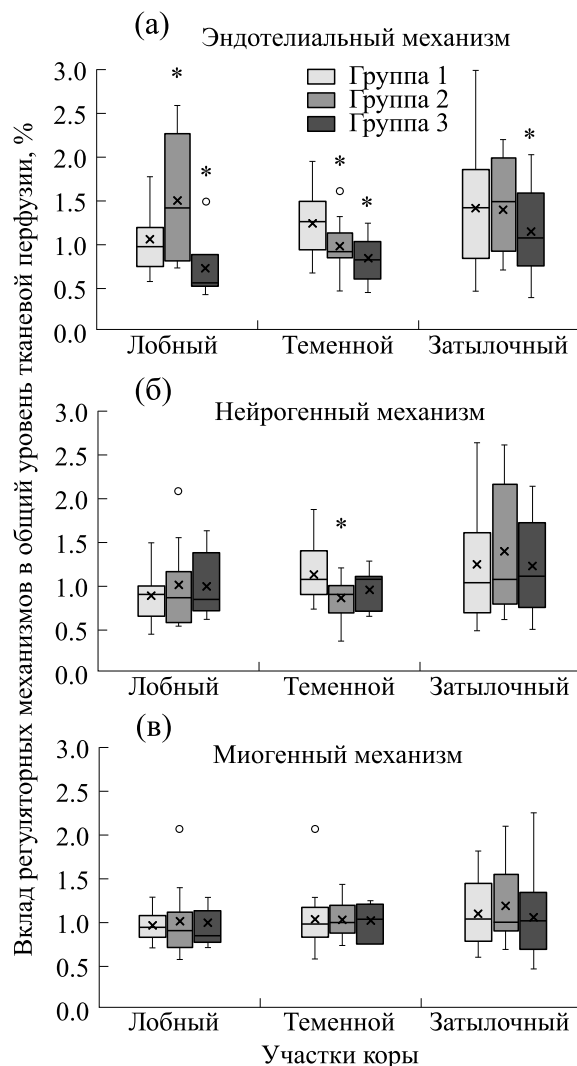


Рис. 3. Функциональный вклад регуляторных механизмов в общий уровень тканевой перфузии в различных участках коры головного мозга у крыс разных возрастных групп. Регуляторные механизмы: (а) — эндотелиальный, (б) — нейрогенный, (в) — миогенный. Остальные обозначения как на рис. 1.

механизма регуляции в общий уровень тканевой перфузии (рис. 3б). Такие изменения являются индикатором снижения симпатической направленности регуляции тканевого микрокровотока [26]. В целом снижение вклада амплитуды нейрогенных колебаний в общий спектр осцилляций и уровень тканевой перфузии на фоне снижения показателей миогенного тонуса и вклада миогенного механизма в общий тонус микрососудов отражает процессы вазодилатации [29]. Снижение симпатической регуляции кровотока в сочетании с уменьшением прекапиллярного миогенного сопротивления, вазодилатацией и увеличением числа капилляров являются факторами, способствующими активации тканевого окислительно-

Таблица 3. Показатели тканевой оксиметрии и индексов потребления кислорода у крыс разного возраста

Участок коры	Группа крыс	SO ₂ , %	V _r , %	Sm	U
Лобный	Группа 1 (4 мес., n = 14)	95.91 [79.91;96.92]	16.73 [16.05;21.03]	3.75 [3.48;5.36]	0.63 [0.51;0.86]
	Группа 2 (18 мес., n = 10)	86.44* [75.81;90.94]	15.91 [14.5;19.55]	4.02 [3.57;4.94]	0.59 [0.47;0.91]
	Группа 3 (23 мес., n = 12)	95.55 [94.91;97.94]	15.8 [14.91;18.11]	3.91 [2.83;4.95]	0.67 [0.54;0.71]
Теменной	Группа 1 (4 мес., n = 14)	91.03 [80.75;96.01]	16.65 [16.01;17.63]	4.23 [3.05;5.81]	0.61 [0.34;0.91]
	Группа 2 (18 мес., n = 10)	83.52* [76.83;88.68]	16.45 [15.73;18.07]	4.25 [3.85;5.05]	0.55 [0.39;0.99]
	Группа 3 (23 мес., n = 12)	84.42* [77.43;94.91]	18.25* [16.92;21.74]	5.85* [4.55;7.53]	0.59 [0.57;0.81]
Затылочный	Группа 1 (4 мес., n = 14)	91.55 [84.93;96.91]	17.35 [15.18;19.61]	5.22 [3.45;6.82]	0.56 [0.34;0.61]
	Группа 2 (18 мес., n = 10)	84.17* [81.16;86.76]	17.11 [14.12;17.74]	4.93 [3.55;5.75]	0.64 [0.41;0.87]
	Группа 3 (23 мес., n = 12)	94.55 [88.95;96.81]	17.43 [16.28;18.75]	5.45 [3.75;8.29]	0.59 [0.48;0.66]

Примечание. Различия достоверны относительно значений у крыс группы 1 (* – $p < 0.05$).

го метаболизма и потребления кислорода из притекающей крови. [26, 29]. Это может приводить к снижению показателя сатурации (SO₂) крови, которое у 18 месячных крыс нами отмечено во всех исследованных участках коры (табл. 3). Низкое насыщение крови кислородом, в свою очередь, может инициировать улучшение местной перфузии ткани посредством активации вазомоторной активности эндотелиальной природы [30, 31], доказательством чему может служить увеличение нормированной амплитуды эндотелиальных колебаний во всех исследованных участках коры (табл. 2).

Изменения амплитуд осцилляций микрокровотока в лобном участке коры головного мозга в 18-месячном возрасте наблюдаются на фоне повышения средних величин показателя перфузии (табл. 1). Этот показатель характеризует средний поток эритроцитов в единице объема ткани в зондируемом участке в интервале времени регистрации. Увеличение ПМ может быть связано с увеличением количества эритроцитов в зондируемом участке коры в результате развития застойных процессов. Но изменений показателя объемного кровенаполнения (V_r), отражающего концентрацию эритроцитов в зондируемом объеме крови, в лобном участке, как и в других исследованных участках коры головного мозга, нами отмечено не было (табл. 3). С другой стороны,

увеличение ПМ может быть связано с ростом скорости кровотока в данном участке коры. Но следует обратить внимание и на то, что увеличение показателя ПМ сопровождаются снижением значений коэффициента вариации (Kv) (табл. 1), что указывает на угнетение вазомоторной активности сосудов и нарушение активной регуляции микрокровотока [21]. Следовательно, вероятнее всего причиной повышения ПМ в данном случае является не увеличение скорости кровотока, а ослабление миогенного сосудистого тонуса, более ярко выраженное в лобном участке коры, и значительное уменьшение его доли в общем тонусе микрососудов. Такие изменения могут приводить к увеличению объема крови и, соответственно, числа эритроцитов в зондируемом участке микроциркуляторного русла в единицу времени.

У крыс в возрасте 23 месяцев достоверные изменения средних величин ПМ обнаружены не были (табл. 1). Анализ амплитудно-частотного спектра колебаний кровотока показал наличие изменений во всех участках коры. В лобном участке увеличивается амплитуда нейрогенных колебаний и вклад Ан в общую мощность спектра осцилляций микрокровотока (табл. 2). Это свидетельствует о преобладании симпатической направленности регуляции тканевого микрокрово-

тока и характеризует его спастический характер [26].

В теменном участке отмечается увеличение амплитуд осцилляций всех диапазонов и, соответственно, уменьшение величин расчетных показателей тонусов (табл. 2, рис. 1), что может отражать процессы вазодилатации, приводящие к увеличению объема крови в микроциркулярном русле и развитию застойных процессов. Косвенным доказательством этого является увеличение показателя объемного кровенаполнения в теменном участке коры. Кроме того, нарушения микрокровотока в теменной области у 23-месячных крыс сопровождаются снижением показателя SO_2 (табл. 3). Использованный нами метод оценки сатурации крови основан на анализе разницы в оптических свойствах оксигенированных и дезоксигенированных фракций гемоглобина, содержащихся в тестируемом объеме крови [21, 32]. Снижение SO_2 свидетельствует о развитии застойных процессов в венозном участке микроциркуляторного русла за счет увеличения в тестируемом объеме ткани доли венозной крови, обедненной кислородом [32]. Однако описанные выше изменения микрокровотока должны приводить к увеличению величины показателя микроциркуляции. Но достоверные изменения средних величин показателя ПМ нами обнаружены не были. Недавние исследования возрастных изменений микрокровотока в коре головного мозга [19] выявили большую неоднородность кровотока по кортикальным капиллярам в базальных условиях. В коре головного мозга старых животных обнаруживаются сосудистые участки как с увеличенным, так и с неизменным диаметром. Это приводит к изменению кровотока, в результате которого существенная доля потока крови поступает в расширившиеся капилляры и в них появляются признаки стаза, а в соседних областях кровоток значительно снижается. Возможно, использованные нами в данном исследовании методы, основанные на измерении величины среднего потока крови в интервале времени регистрации в ограниченном объеме ткани, не позволяют учитывать таких нюансов. Гетерогенность кровотока, вероятно, приводит к нарушению эффективности извлечения кислорода из крови, доказательством чего является обнаруженное нами увеличение индекса перфузионной сатурации в теменном участке коры у 23-месячных крыс (табл. 3).

В затылочном участке коры увеличивается вклад Ам в общую мощность сигнала (табл. 2). Поскольку, как указывалось нами выше, миогенный компонент тонуса является последним звеном контроля микрокровотока перед капиллярным руслом, то увеличение его доли в общей мощности спектра может указывать на уменьше-

ние вклада капиллярного звена в микрокровоток [26]. Доказательством этому также является снижение вклада колебаний эндотелиального диапазона в общую мощность сигнала и общий уровень тканевой перфузии в этом участке коры (табл. 2, рис. 3а).

Все описанные выше изменения микрокровотока в лобном, теменном и затылочном участках коры у крыс в 23-месячном возрасте сопровождаются снижением вклада амплитуд эндотелиального диапазона в общую мощность сигнала и общий уровень тканевой перфузии (табл. 2, рис. 3а), что может указывать на развитие процессов дисфункции микрососудистого эндотелия в этих участках коры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплексный анализ спектральных характеристик физиологических сигналов, отражающих работу регуляторных механизмов микрокровотока, и результатов церебральной оксиметрии, основанной на оценке процентного содержания оксигемоглобина в циркулирующей крови, позволил выявить особенности изменения микрокровотока в различных участках коры головного мозга крыс на разных этапах старения. В возрасте 18 месяцев у крыс отмечается снижение симпатической регуляции микрокровотока, уменьшение прекапиллярного миогенного сопротивления, вазодилатация и увеличение вклада капиллярного звена в микроциркуляцию, преимущественно выраженные в лобном и теменном участке коры. В теменном участке эти изменения способствуют активации тканевого окислительного метаболизма и повышению потребления кислорода из притекающей крови. Дальнейшее старение приводит к снижению вклада эндотелиального компонента в общий уровень перфузии во всех участках коры. У 23-месячных крыс эти процессы сопровождаются увеличением вклада симпатической регуляции микрокровотока в лобном участке коры, развитием застойных процессов в венозном участке микроциркуляторного русла, снижающих эффективность тканевой экстракции кислорода из крови, в теменной области и снижением сопротивления микрососудистого русла и вклада капиллярного звена в микроциркуляцию в затылочном участке коры.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411784-3-3.1.8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные на животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 12/26 от 26.12.2022 г.). Все международные, национальные и/или институциональные принципы содержания и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mandalà M. and Cipolla M. J. Aging-related structural and functional changes in cerebral arteries: caloric restriction (CR) intervention. *J. Vasc. Med. Surg.*, **9** (7), 1000002 (2021).
- Bennett H. C., Zhang Q., Wu Y. T., Chon U., Pi H. J., Drew P. J., and Kim Y. Aging drives cerebrovascular network remodeling and functional changes in the mouse brain. *Nat Commun.*, **15**, 6398 (2024). DOI:10.1038/s41467-024-50559-8
- Sakamuri S. S., Sure V. N., Kolli L., Evans W. R., Sperling J. A., Bix G. J., Wang X., Atochin D. N., Murfee W. L., Mostany R., and Katakam P. V. Aging related impairment of brain microvascular bioenergetics involves oxidative phosphorylation and glycolytic pathways. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **42** (8), 1410 (2022). DOI: 10.1177/0271678X211069266
- Li Y., Choi W. J., Wei W. Song S., Zhang Q., Liu J., and Wang R. K. Aging-associated changes in cerebral vasculature and blood flow as determined by quantitative optical coherence tomography angiography. *Neurobiol. Aging*, **70**, 148 (2018). DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.017
- Alisch J. S. R., Khattar N., Kim R. W., Cortina L. E., Rejimon A. C., Qian W., Ferrucci L., Resnick S. M., Spencer R. G., and Bouhrara M. Sex and age-related differences in cerebral blood flow investigated using pseudo-continuous arterial spin labeling magnetic resonance imaging. *Aging (Albany NY)*, **13** (4), 4911 (2021). DOI: 10.18632/aging.202673
- Claassen J. A. H. R., Thijssen D. H. J., Panerai R. B., and Faraci F. M. Regulation of cerebral blood flow in humans: physiology and clinical implications of autoregulation. *Physiol. Rev.*, **101** (4), 1487 (2021). DOI: 10.1152/physrev.00022.2020
- Gorshkova O. P. Changes in rat cerebral blood flow velocities at different stages of aging. *J. Evol. Biochem. Phys.*, **59**, 569–576 (2023). DOI: 10.1134/S0022093023020229
- Peng S. L., Chen X., Li Y., Rodrigue K. M., Park D. C., and Lu H. Age-related changes in cerebrovascular reactivity and their relationship to cognition: a four-year longitudinal study. *Neuroimage*, **174**, 257–262 (2018). DOI: 10.1016/j.neuroimage.2018.03.033
- Bogorad M. I., DeStefano J. G., Linville R. M., Wong A. D., and Searson P. C. Cerebrovascular plasticity: processes that lead to changes in the architecture of brain microvessels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **39** (8), 1413 (2019). DOI: 10.1177/0271678X19855875
- Bailey T. G., Klein T., Meneses, A. L., Stefanidis K. B., Ruediger S., Green D. J., Stuckenschneider T., Schneider S., and Askew C. D. Cerebrovascular function and its association with systemic artery function and stiffness in older adults with and without mild cognitive impairment. *Eur J Appl Physiol.*, **122**, 1843–1856 (2022). DOI: 10.1007/s00421-022-04956-w
- Pahlavian S. H., Wang X., Ma S., Zheng H., Casey M., D’Orazio L. M., Shao X., Ringman J. M., Chui H., Wang D. J., and Yan L. Cerebroarterial pulsatility and resistivity indices are associated with cognitive impairment and white matter hyperintensity in elderly subjects: A phase-contrast MRI study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **41** (3), 670 (2021). DOI: 10.1177/0271678X20927101
- Houben A. J. H. M., Martens R. J. H., and Stehouwer C. D. A. Assessing microvascular function in humans from a chronic disease perspective. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **28** (12), 3461 (2017). DOI: 10.1681/ASN.2017020157
- Lecrux C. and Hamel E. Neuronal networks and mediators of cortical neurovascular coupling responses in normal and altered brain states. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **371** (1705), 20150350 (2016). DOI: 10.1098/rstb.2015.0350
- Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J. Appl. Physiol.* (1985), **100** (3), 1059 (2006). DOI: 10.1152/japplphysiol.00954.2005
- Brown L. S., Foster C. G., Courtney J.-M., King N. E., Howells D. W., and Sutherland B. A. Pericytes and neurovascular function in the healthy and diseased brain. *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 282 (2019). DOI: 10.3389/fncel.2019.00282
- Grubb S., Cai C., Hald B. O., Khennouf L., Murmu R. P., Jensen A. G. K., Fordsmann J., Zambach S., and Lauritzen M. Precapillary sphincters maintain perfusion in the cerebral cortex. *Nat. Commun.*, **11**, 395 (2020). DOI: 10.1038/s41467-020-14330-z
- Erdener S. E. and Dalkara T. Small vessels are a big problem in neurodegeneration and neuroprotection. *Front. Neurol.*, **10**, 889 (2019). DOI: 10.3389/fneur.2019.00889
- Østergaard L., Jespersen S. N., Engedahl T., Gutiérrez Jiménez E., Ashkanian M., Hansen M. B., Eskildsen S., and Mouridsen K. Capillary dysfunction: its detection and causative role in dementias and stroke. *Curr. Neurol. Neurosci.*, **15** (6), 37 (2015). DOI: 10.1007/s11910-015-0557-x
- Berthiaume A. A., Schmid F., Stamenkovic S., Coelho-Santos V., Nielson C., Weber B., Majesky M., and Shih A. Pericyte remodeling is deficient in the aged brain and contributes to impaired capillary flow and structure. *Nat. Commun.*, **13**, 5912 (2022). DOI: 10.1038/s41467-022-33464-w
- Gorshkova O. P. Age-related changes in the functional activity of ATP-sensitive potassium channels in rat pial arteries. *J. Evol. Biochem. Phys.*, **58**, 345–352 (2022). DOI: 10.1134/S0022093022020041

21. Крупаткин А. И. и Сидоров В. В. *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови* (Медицина, М., 2005).
22. Александрин В. В., Иванов А. В. и Кубатиев А. А. Вейвлет-анализ мозгового кровотока у крыс в терминальном состоянии. *Патогенез*, **20** (1), 69 (2022). DOI: 10.25557/2310-0435.2022.01.69-73
23. Федорович А. А., Горшков А. Ю., Королев А. И., Омеляненко К. В., Дадаева В. А., Михайлова М. А., Чашин М. Г. и Драпкина О. М. Гендерные различия структурно-функционального состояния микроциркуляторного русла кожи у лиц с впервые выявленной артериальной гипертензией. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*, **22** (8), 3696 (2023). DOI: 10.15829/1728-8800-2023-3696
24. Sargent S. M., Bonney S. K., Li Y., Stamenkovic S., Takeno M. M., Coelho-Santos V., and Shih A. Y. Endothelial structure contributes to heterogeneity in brain capillary diameter. *Vasc. Biol.*, **5** (1), e230010 (2023). DOI:10.1530/VB-23-0010
25. Sonntag W. E., Eckman D. M., Ingraham J., and Riddle D. R. Regulation of cerebrovascular aging. In *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*, Ed. by D.R. Riddle (CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2007), chapt. 12.
26. Крупаткин А. И. Колебания кровотока - новый диагностический язык в исследовании микроциркуляции. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*, **13** (1), 83–99 (2014). DOI: 10.24884/1682-6655-2014-13-1-83-99
27. Zimmerman B., Rypma B., Gratton G., and Fabiani M. Age-related changes in cerebrovascular health and their effects on neural function and cognition: A comprehensive review. *Psychophysiology*, **58** (7), e13796 (2021). DOI: 10.1111/psyp.13796
28. Hennigs J. K., Matuszcak C., Trepel M., and Körbelin J. Vascular endothelial cells: heterogeneity and targeting approaches. *Cells.*, **10** (10), 2712 (2021). DOI: 10.3390/cells10102712
29. Чуян Е. Н., Ананченко М. Н. и Трибрат Н. С. Индивидуально-типологические реакции микроциркуляторных процессов на электромагнитное излучение миллиметрового диапазона. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*, **9** (1), 68–74 (2010). DOI: 10.24884/1682-6655-2010-9-1-68-74
30. Фролов А. В., Локтионова Ю. И., Жарких Е. В., Сидоров В. В., Танканаг А. В. и Дунаев А. В. Реакция микроциркуляции крови в коже различных участков тела при выполнении дыхательных упражнений йоги. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*, **22** (1), 72–84 (2023). DOI: 10.24884/1682-6655-2023-22-1-72-84
31. Thorn C. E., Kyte H., Slaff D. W., and Shore A. C. An association between vasomotion and oxygen extraction. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **301** (2), H429–H442 (2011). DOI: 10.1152/ajpheart.01316.2010
32. Рогаткин Д. А. Физические основы оптической оксиметрии. *Медицинская физика*, **2**, 97–114 (2012).

Comprehensive Assessment of the Functional State of the Cerebral Cortex Microcirculatory Bed at Different Stages of Aging

O.P. Gorshkova* and I.B. Sokolova*

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

Using Doppler flowmetry and tissue optical oximetry, a comprehensive spectral analysis of the oscillatory components of the myogenic, neurogenic and endothelial components of microvascular tone and an assessment of the oxygen transport dynamics in the cerebral cortex of rats at the age of 4, 18 and 23 months were performed. Regional differences of age-dependent changes in the regulatory mechanisms of microcirculation and the efficiency of tissue oxygen extraction were revealed. It was found that at the age of 18 months, microcirculatory changes are observed in the frontal and parietal cortical areas and are manifested as a decrease in sympathetic regulation of microcirculation, a decrease in precapillary myogenic resistance, vasodilation and an increase in the contribution of the capillary unit to microcirculation. In the parietal cortical area, these changes contribute to the activation of tissue oxidative metabolism and to an increase in oxygen consumption. With further aging, microvascular endothelial dysfunction develops and the contribution of the endothelial component to the total perfusion level of all cortical areas decreases. These disorders in 23-month-old rats are accompanied by an increase in the contribution of sympathetic regulation of microcirculation in the frontal cortex, a decrease in the contribution of the capillary unit to the microcirculation in the occipital area, and the development of stagnant processes in the venous area of the microcirculatory bed of the parietal cortex, reducing the efficiency of tissue oxygen extraction from the blood.

Keywords: laser Doppler flowmetry, microcirculation, blood saturation, aging

ПРОТИВОВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ В ОТНОШЕНИИ SARS-CoV-2 РАСТВОРОВ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА ПРИ ИНГАЛЯЦИИ СИРИЙСКИМ ХОМЯЧКАМ В «NOSE-ONLY»-КАМЕРЕ

© 2024 г. А.В. Шиповалов*, А.Ф. Ванин**, #, Н.А. Ткачев**, О.В. Пьянков*, Н.Б. Асанбаева***, С.В. Аньков***, Е.Г. Багрянская***, А.М. Бакланов****, С.В. Валиулин****, М.Е. Стеклёнова****

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора РФ, Кольцово, Новосибирск, 630559, Россия

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

***Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, просп. Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск, 630090, Россия

****Институт химической кинетики и горения СО РАН, Институтская ул., 3, Новосибирск, 630090, Россия

#E-mail vanin@polymer.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 07.10.2024 г.

Принята к публикации 16.10.2024 г.

Не обнаружено заметного изменения противовирусного эффекта ингаляции сирийским хомячкам, инфицированным вирусом SARS-CoV-2, растворов биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) и диэтилдитиокарбамата натрия (ДЭТК) при их последовательном введении животным в «nose-only»-камере или «whole-body»-камере. Ингаляция в «whole-body»-камере, приводившая к намоканию тела животных, приводила только к снижению регистрируемого методом ЭПР в легких уровня моноядерных динитрозильных комплексов железа с тиоловыми группами белков без изменения общего содержания биядерной и моноядерной формы динитрозильных комплексов железа. Предполагается, что противовирусное действие Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в отношении вируса SARS-CoV-2 было обусловлено катионами нитрозония (NO^+), высвобождающимися из Б-ДНКЖ-GSH в результате его разрушения молекулами ДЭТК. Аналогичное противовирусное действие на модели сирийских хомячков оказывал и менее стабильный, чем Б-ДНКЖ-GSH, комплекс с меркаптосукцинатом, без дополнительной аэрозольной обработки раствором животных ДЭТК.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, диэтилдитиокарбамат натрия, меркаптосукцинат, катион нитрозония.

DOI: 10.31857/S0006302924060176, EDN: NKJCHT

Ранее мы показали, что ингаляция сирийским хомячкам, инфицированным вирусом SARS-CoV-2, распыленного раствора биядерного динитрозильного комплекса железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH), в особенности с последующей ингаляцией тем же животным распыленного раствора диэтилдитиокарбамата (ДЭТК), приводит к заметному подавлению репликации вируса SARS-CoV-2 в органах-мишенях экспериментальных животных [1]. Тем самым было подтвер-

ждено ранее высказанное предположение о том, что катионы нитрозония (NO^+), высвобождающиеся в соответствии со схемой 1 под действием ДЭТК из Б-ДНКЖ-GSH, могут подавлять репликацию вирусов SARS-CoV-2 в живых организмах [2]. Предполагается, что этот эффект достигается вызванным катионами нитрозония S-нитрозированием критически важных для вируса SARS-CoV-2 тиолсодержащих белков.

Особенность использованного в нашей работе [1] способа ингаляции сирийским хомячкам распыленных растворов Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК состояла в том, что эти растворы (вместе с воздухом) подавались в камеру с находившимися в ней

Сокращения: Б-ДНКЖ-GSH — биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат натрия, Б-ДНКЖ-MSH — биядерные динитрозильные комплексы железа с меркаптосукцинатом.

животными («whole-body»-камера). За время экспозиции происходило заметное намокание тела хомячков и, как следствие этого, переохлаждение животных, которое могло инициировать активацию защитных систем организма, в том числе иммунной системы, что и могло приводить к снижению или отсутствию у сирийских хомячков про-

явлений коронавирусной инфекции. Что касается усиления этого эффекта при ингаляции животным сначала динитрозильных комплексов железа, а затем ДЭТК — оно могло быть обусловлено увеличением времени увлажнения животных и тем самым более эффективным функционированием защитных систем организма.

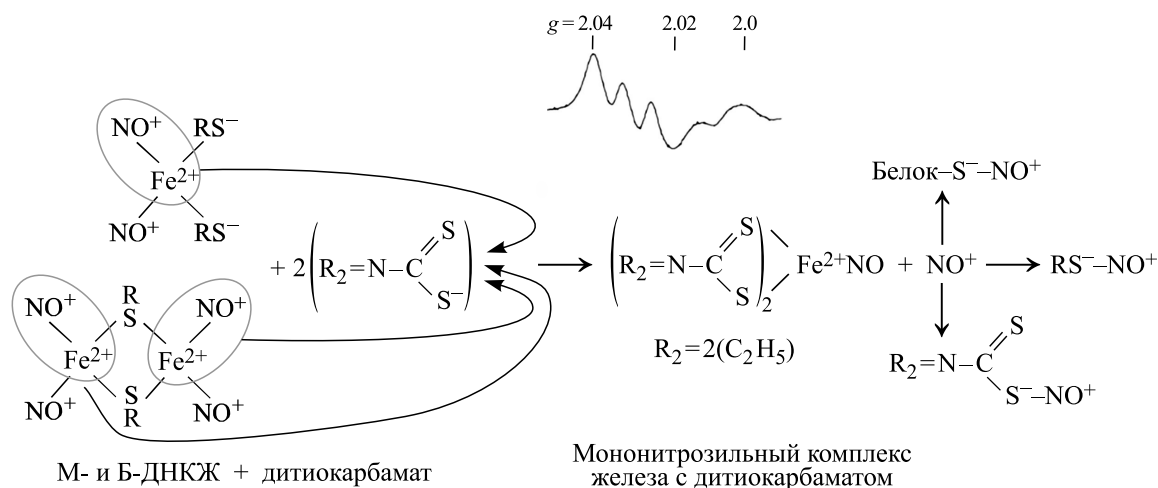


Схема 1. Высвобождение NO^+ из биядерных и моноядерных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (Б- и М-ДНКЖ) под действием производных дитиокарбамата с последующим включением катионов нитрозония в реакцию S-нитрозилования. В верхней части схемы показан зарегистрированный при 77K сигнал ЭПР моноснитрозильного комплекса железа (МНКЖ) с дитиокарбаматом, возникающего при связывании дитиокарбамата с железомоноснитрозильным фрагментом, входившем в железодинитрозильную группу ДНКЖ.

Для того, чтобы проверить, не обусловлен ли обнаруженный нами ранее эффект ослабления коронавирусной инфекции сирийских хомячков при ингаляции им растворов динитрозильных комплексов железа и ДЭТК увлажнением их тела, в настоящей работе мы проверили действие аналогичной процедуры ингаляции сирийским хомячкам в режиме, не допускающем заметного увлажнения тела животных. Для этого была использована «nose-only»-камера для обработки мелких животных, сконструированная в Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН [3]. В этой установке распыленные растворы динитрозильных комплексов железа и ДЭТК могли приходить в соприкосновение с животным только в области носа (в «nose-only»-камере) (рис. 1). Тем самым могла быть достигнута полная имитация возможной процедуры лечения пациентов аэрозольной формой растворов Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК, полученной с помощью небулайзера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы нитрит натрия (Sigma, США), ферросульфат ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fluka, Швейцария), органические компоненты — восстановленный глутатион, меркаптосукцинат и диэтилдитиокарбамат натрия (все — Sigma, США).

Культура клеток. Культура клеток *Vero E6* была получена из Коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора РФ (коллекционный шифр 221) и выращена на минимальной среде, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США), пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл, Gibco, США) при 37°C и 5%-м содержании CO_2 . После инфицирования клеток использовали аналогичную (поддерживающую) среду, только с добавлением 2% фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

Вирусы. В работе с сирийскими хомячками использовали штамм вируса SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/Vologda-171613-1208/2020, высоко гомологичный оригинальному штамму Wuhan-Hu-1

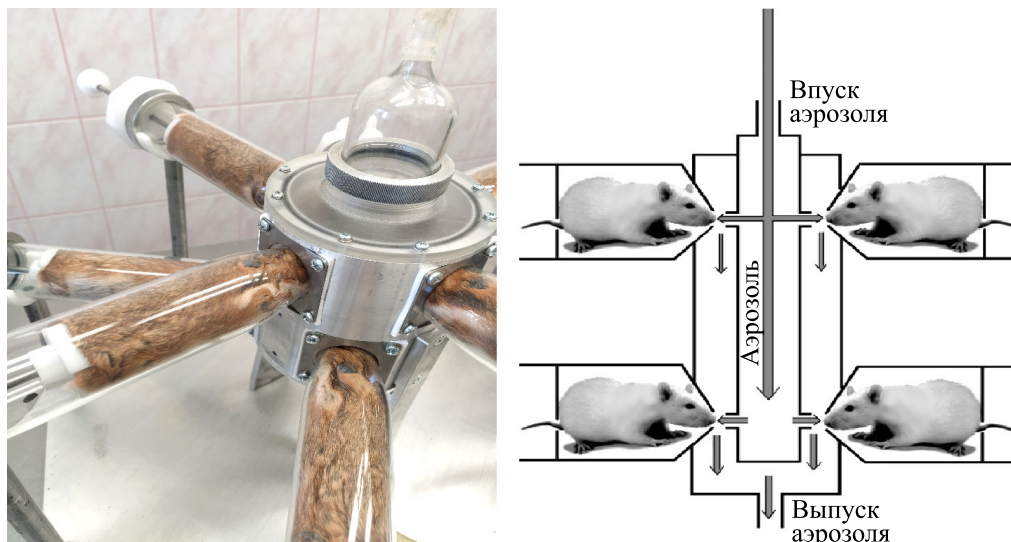


Рис. 1. Используемая в экспериментах «nose-only»-камера для обработки сирийских хомячков распыленными растворами ДНКЖ и ДЭТК, справа — общая схема аэрозольной камеры по [4].

(идентификатор GISAID: EPI_ISL_406844, линии В). Данный штамм был получен из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора РФ. Вирус культивировали в клетках *Vero E6*. Вирусные стоки хранили при температуре -80°C до начала экспериментальных исследований.

Титрование вируса. Инфекционную активность вируса определяли методом конечных разведений на клетках *Vero E6* по методу Рида и Менча (значения указаны в единицах 50%-й тканевой цитопатогенной дозы $ТЦД_{50}/\text{мл}$).

Клетки *Vero E6* высевали за 24 ч до заражения в 96-луночные планшеты с посевной дозой $1.5 \cdot 10^4$ кл/лунку. В день эксперимента были сделаны последовательные 10-кратные разведения вируса, в общей сложности от шести до восьми лунок были заражены каждым разведением вируса. После 72-часовой инкубации клетки фиксировали 4%-м раствором пара формальдегида с последующим окрашиванием 0.1% кристаллическим фиолетовым. Инфекционный титр был рассчитан по формуле: $\lg(TЦД_{50}) = \lg(d_0) + \lg(R) \cdot (f + 1)$, где d_0 — наибольшее разведение, дающее цитопатическое действие во всех лунках, f — число, полученное из числа положительных лунок, рассчитанных как среднее арифметическое, а R — коэффициент разведения.

Тестируемые соединения. Биядерные динитрозильные комплексы железа (Б-ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами были синтезированы в Федеральном исследовательском центре химической физики им. Н.Н. Семенова РАН и Новоси-

бирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН по методике, использованной в работе [4]. В исследовании была оценена противовирусная активность трех соединений: Б-ДНКЖ-GSH — динитрозильный комплекс железа с глутатионовым лигандом и Б-ДНКЖ-MSH — динитрозильный комплекс железа с меркаптосукцинатом в качестве тиолсодержащего лиганда; а также ДЭТК, вводившийся животным после Б-ДНКЖ-GSH.

Модельные животные. В экспериментах использовали самцов аутбредных сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) с массой тела 80–100 г и самцов инбредной линии мышей BALB/c (*Mus musculus strain BALB/c*) с массой тела 18–20 г. Животные были получены из Питомника лабораторных животных ИЦИГ СО РАН. Акклиматизация к условиям эксперимента была проведена в течение 7 суток до заражения. Во время экспериментов температура в клетках поддерживали температуру $22\text{--}24^{\circ}\text{C}$ и относительную влажность 40–55%, животные имели неограниченный доступ к пище и воде.

Исследование противовирусной активности соединений на животных. В эксперименте использовали 4 группы животных (3 опытных и 1 контрольная) по 8 сирийских хомячков в каждой. Под внутримышечным наркозом Zoletil 100 (Virbax, Франция) всем животным была проведена интраназальная инокуляция в оба носовых хода по 50 мкл среды, содержащей суммарно 30–50 $ИД_{50}$ (50% инфицирующих доз) вируса SARS-CoV-2.

Через 120 ч после заражения сирийских хомячков подвергали эвтаназии внутривенным введением 500 мкл долетала (200 мг/мл пентобарбитала натрия, Vétoquinol SA). Ткани легких и носовых раковин забирали с соблюдением правил асептики. Из образцов тканей с помощью гомогенизатора FastPrep-24 (MP Biomedicals, США) подготавливали 10%-е гомогенаты на среде MEM, освещали путем центрифугирования (MiniSpin plus, Eppendorf, Германия), после чего проводили отбор аликвот от каждого образца для ПЦР-анализа и определения инфекционного титра вируса в пробах (вирусной нагрузки) на культуре клеток *Vero E6*. Затем гомогенаты подвергали немедленной заморозке и хранению при температуре -70°C .

Противовирусную эффективность соединений оценивали по снижению вирусной нагрузки в тканях носовой полости и легких животных из экспериментальной группы по отношению к аналогичным показателям животных из контрольной группы.

Определение РНК вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для выделения РНК использовали набор «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Синтез кДНК из выделенной РНК проводили реагентами для реакции обратной транскрипции «Реверта-L» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Набор реагентов «Вектор-ПЦРРВ-COVID19-RG» (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) использовали для амплификации фрагментов кДНК вируса SARS-CoV-2. Вирусная нагрузка была определена по значениям порога цикла (Ct). В качестве стандарта использованы серийные разведения стандартизованного положительного контроля, поставляемого с набором реагентов для ПЦР.

Определение инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах на перевиваемой культуре клеток Vero E6. Клетки *Vero E6* высевали за 24 ч до заражения в 96-луночные планшеты с посевной дозой $1.5 \cdot 10^4$ кл/лунку. В день эксперимента были сделаны последовательные 10-кратные разведения вируса в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 2% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Hyclone, США) и комплексного антибиотика (Gibco, США), в общей сложности от шести до восьми лунок были заражены каждым разведением вируса. После 72-часовой инкубации клетки фиксировали 4%-м раствором забуференного формалина с последующим окрашиванием 0.1%-м кристаллическим фиолетовым. Специфическое поражение монослоя культуры клеток в лунке учитывали как цитопатическое действие. Расчет титра вируса проводили по формуле Риды–Менча и выражали в $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$.

Введение соединений/препаратов. Аэрозольное введение соединений проводили в «nose-only» камере в течение 20 мин. Рабочий расход воздуха через камеру составлял 10 л/мин. В стаканы-держатели камеры одновременно помещали 8 хомячков. Диспергирование проводили распылителем «Омрон» с расходом воздуха 6 л/мин. В распылитель заливали 10 мл 10 мМ водного раствора препаратов. Отбираемый аэрозоль улавливали с помощью пробоотборника (МЦ-2), соединяемого с выходным штуцером камеры. Объемная скорость отбора проб аэрозоля в пробоотборнике составляла 10 ± 0.5 л/мин, объем сорбирующей жидкости (дистиллированная вода) – 10 мл.

Измерение спектров ЭПР изолированных тканей нативных (незараженных) животных. После аэрозольной обработки нативных (незараженных) животных (сирийских хомячков и мышей) растворами Б-ДНКЖ-GSH, ДЭТК или Б-ДНКЖ-MSH проводили эвтаназию методом трансцервикальной дислокации для последующего определения методом ЭПР концентрации парамагнитной моноядерной формы динитрозильных комплексов железа (М-ДНКЖ) и МНКЖ-ДЭТК в изолированных образцах крови, легких и печени. Эти образцы помещали в пластмассовые трубочки диаметром 4 мм и замораживали их в жидком азоте. Для последующих ЭПР-измерений препаратов замороженных тканей трубочки с замороженными в них тканями извлекали из жидкого азота и постепенно, нагревая в руках, поршнем выдавливали ткани из трубочек в жидкий азот с последующим их введением в жидком азоте в палец кварцевого сосуда Дьюара соответствующей формы. ЭПР-измерения проводили на ЭПР-радиоспектрометре фирмы Bruker (Германия) при следующих параметрах: центр поля 3280 Гс, мощность 2 мВт, амплитуда модуляции 5 Гс, частота модуляции 100 кГц. В качестве эталонного образца (стандарта) при определении концентрации М-ДНКЖ, возникающих в тканях животных, использовали замороженный раствор М-ДНКЖ-GSH с известной концентрацией. Поскольку плотность ткани легких в два раза меньше плотности воды, после оценки в соответствии со стандартом содержания М-ДНКЖ в этой ткани полученную величину удваивали.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica v13.0. Достоверность различий между группами оценивали при помощи непараметрических методов сравнения. Для сравнения межгрупповых различий использован *H*-критерий Краскела–Уоллиса. При выявлении статистической неоднородности значений, полученных для животных экспериментальных групп по сравнению с группой контроля, применяли критерий Данна и *U*-критерий Манна–Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

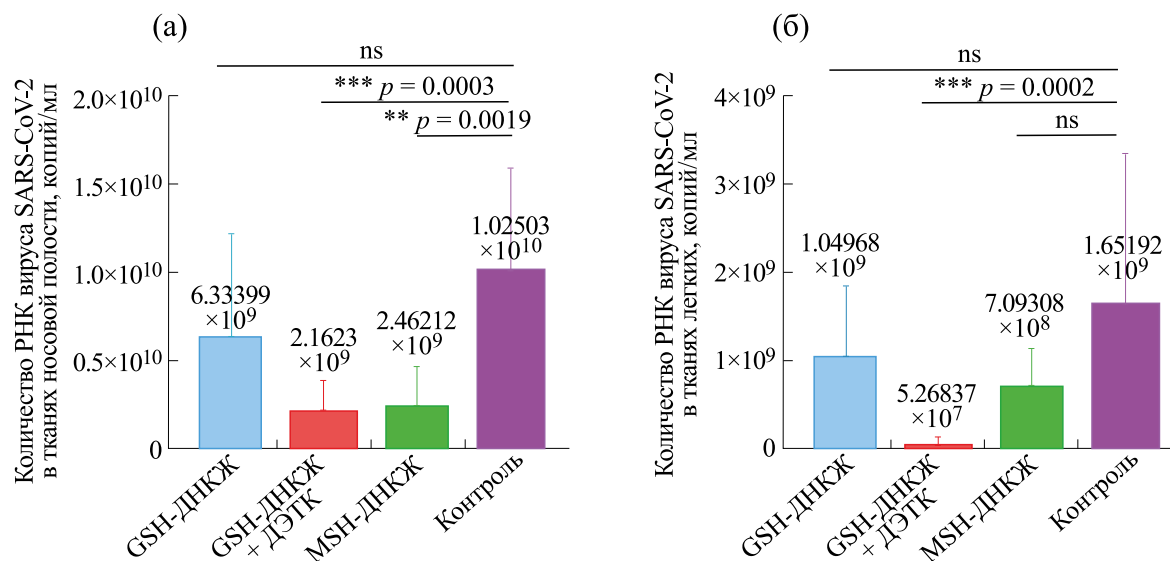


Рис. 2. Вирусная нагрузка в тканях полости носа и легких сирийских хомячков после интраназального заражения SARS-CoV-2. Гистограммы медианных значений пороговых циклов (Ct) в гомогенатах тканей носовой полости (а) и легких (б), в которых вершиной гистограммы представлены медианы, вертикальной линией – 95%-й доверительный интервал. Сокращения: * – статистически значимо при $p < 0.05$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ** – статистически значимо при $p < 0.01$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ns (not significant) – незначимые различия.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Противовирусное действие растворов Б-ДНКЖ-GSH, Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК и Б-ДНКЖ-MSN в отношении вируса SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка (ингаляция в камере «nose-only»). Противовирусную активность исследовали по степени снижения вирусной нагрузки в тканях органов-мишеней (полость носа и легкие) животных групп лечения относительно группы контроля. Сравнение вирусной нагрузки осуществляли по значениям порогового цикла (Ct) реакции ОТ-ПЦР реального времени с мишенью на ген *Iab* вируса SARS-CoV-2.

На рис. 2 приведены результаты оценки противовирусной активности Б-ДНКЖ-GSH самого по себе и при последующем действии на животных ДЭТК, а также одного Б-ДНКЖ-MSN в отношении вируса SARS-CoV-2 в тканях легких и полости носа.

Для всех групп лечения наблюдали снижение количества РНК в тканях носовой полости. Межгрупповые сопоставления по критерию Краскела–Уоллиса выявили статистическую неоднородность ($p = 0.0064$). Тест Данна показал достоверное различие значений вирусной нагрузки в группе GSH-ДНКЖ+ДЭТК ($p = 0.0109$) в сравнении с группой контроля. В тесте Манна–Уитни для групп Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0003$) и Б-ДНКЖ-MSN ($p = 0.0019$) различия носили достоверный характер, концентрация вирусной РНК снижалась в 9,11 и 8,35 раз соответственно.

В тканях легких также регистрировали снижение концентрации вирусной РНК для всех групп лечения. По критерию Краскела–Уоллиса были выявлены статистически значимые различия между группами ($p = 0.0008$). В тесте множественных сравнений Данна значения, полученные для группы GSH-ДНКЖ+ДЭТК, достоверно отличались ($p = 0.0009$) от контроля.

При межгрупповом сравнении с использованием *U*-критерия Манна–Уитни в группе Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0002$) значения вирусной нагрузки в легких были достоверно ниже контроля в 183.46 раза.

Инфекционный титр вируса в гомогенатах тканей полости носа (рис. 3а) и легких (рис. 3б) определяли методом титрования на культуре клеток *Vero E6*. Межгрупповые сопоставления значений титра вируса в тканях носовой полости по критерию Краскела–Уоллиса выявили статистическую неоднородность групп ($p = 0.0079$).

Тестом Данна показаны достоверные различия значений вирусной нагрузки в группах Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0231$) и Б-ДНКЖ-MSN ($p = 0.0167$) по сравнению с группой контроля в сторону снижения вирусной нагрузки в полости носа у животных групп лечения.

Значения инфекционного титра, определенные в тканях носовой полости сирийских хомячков, для животных групп Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0059$, тест Манна–Уитни) и ДНКЖ-MSN ($p = 0.0053$, тест Манна–Уитни) достоверно отли-

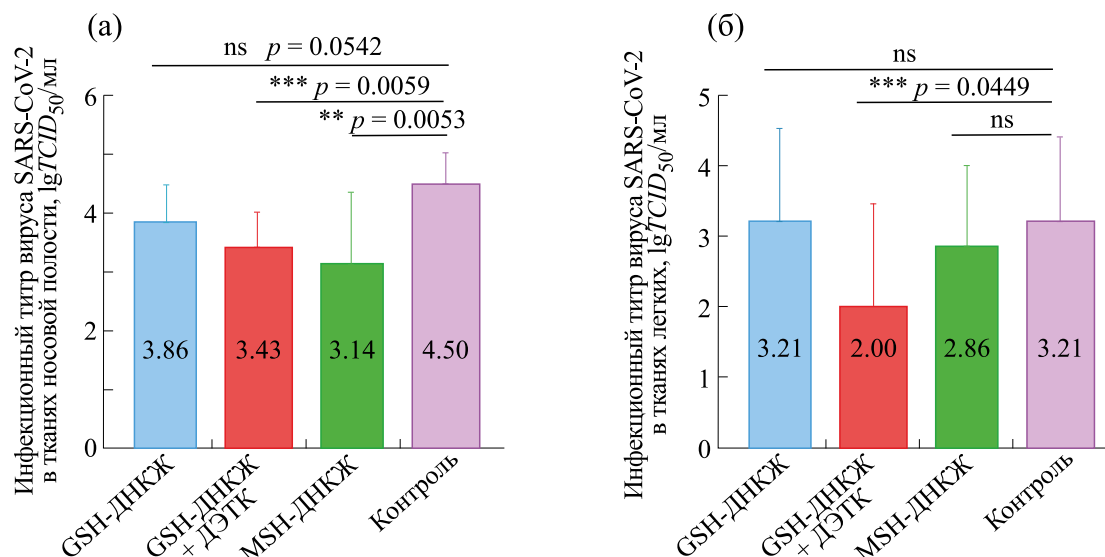


Рис. 3. Инфекционный титр в тканях полости носа и легких сирийских хомячков после интраназального заражения SARS-CoV-2. Гистограммы медианных значений инфекционных титров ($\lg TCID_{50}/\text{мл}$) в гомогенатах тканей носовой полости (а) и легких (б), в которых вершиной гистограммы представлены медианы, вертикальной линией — 95% доверительный интервал. Сокращения: * — статистически значимо при $p < 0.05$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ** — статистически значимо при $p < 0.01$ по сравнению с данными, полученными на животных контрольной группы; ns — (not significant) незначимые различия.

чались от контроля на 1.07 и 1.36 $\lg TCID_{50}/\text{мл}$ соответственно. В группе Б-ДНКЖ-GSH также наблюдали снижение концентрации инфекционного вируса на 0.64 $\lg TCID_{50}/\text{мл}$, но с низким уровнем достоверности ($p = 0.0542$, тест Манна–Уитни).

Достоверное снижение инфекционного титра в тканях легких на 1.21 $\lg TCID_{50}/\text{мл}$ по сравнению с данными, полученными для животных контрольной группы, регистрировали только в группе Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК ($p = 0.0449$, тест Манна–Уитни).

Таким образом, эксперименты на сирийских хомячках с ингаляцией в «nose-only» камере показали, что сочетанное действие Б-ДНКЖ-GSH+ДЭТК приводит к ингибированию репликации коронавируса SARS-CoV-2, что выражается в достоверном снижении количества РНК в тканях носовой полости и легких, уменьшению значений инфекционного титра в тканях носовой полости и тенденции к снижению количества коронавируса в тканях легких сирийского хомячка.

Полученные нами результаты полностью снимают высказанное выше предположение о том, что обнаруженный нами ранее в работе [1] противовирусный эффект обработки сирийских хомячков раствором Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в «whole-body»-камере мог быть обусловлен увлажнением тела животных. Поскольку такого увлажнения не

было в режиме ингаляции «nose-only», можно уверенно утверждать, что в обоих режимах ингаляции обнаруженный нами на сирийских хомячках противовирусный эффект был обусловлен катионами нитрозония высвобождающимися как из Б-ДНКЖ-GSH, так и из Б-ДНКЖ-MSH.

Определение концентрации динитрозильных комплексов железа в органах сирийских хомячков, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH, Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК и Б-ДНКЖ-MSH в «nose-only»-камере методом ЭПР. Как и в экспериментах с ингаляцией в «whole-body»-камере [1], в аналогичных опытах с ингаляцией тем же животным распыленных растворов динитрозильных комплексов с глутатионом или меркаптосукцинатом в режиме «nose-only» только в легких регистрировался интенсивный сигнал ЭПР с $g_{\text{ср}} = 2.03$ (сигнал 2.03 с $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$), характерный для М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [5]. В крови и печени этот сигнал не обнаруживался. В печени регистрировался только симметричный сигнал ЭПР эндогенных свободных радикалов при $g = 2.0$

Появление в легких М-ДНКЖ, характеризующихся сигналом 2.03, было обусловлено переходом железо-динитрозильных групп из Б-ДНКЖ-GSH или Б-ДНКЖ-MSH на тиоловые группы белков. О белковой природе этих комплексов свидетельствовало сохранение формы сигнала

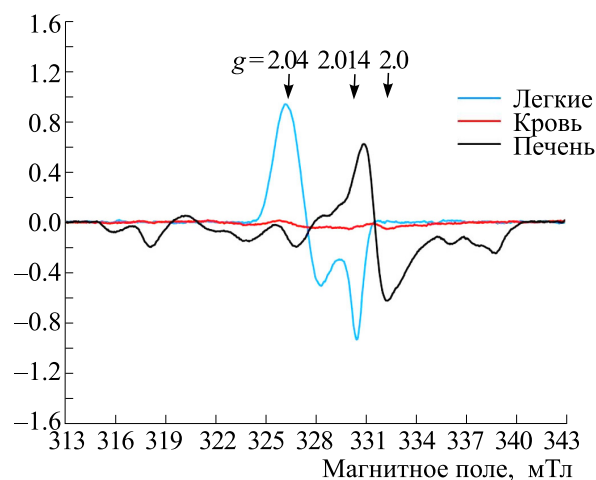


Рис. 4. Спектры ЭПР легких, печени и крови сирийских хомячков после ингаляции распыленными растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в режиме «nose-only». Регистрацию спектров проводили при 77 К и одинаковом усилении радиоспектрометра.

2.03 при повышении температуры его регистрации от 77 К до комнатной температуры. При этой температуре подвижность белков была недостаточной для усреднения анизотропии g -фактора, что приводило бы к сужению и симметризации сигнала 2.03, как это имело бы место для низкомолекулярных М-ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, как например, для М-ДНКЖ-GSH [6].

Судя по интенсивности сигнала 2.03 в тканях легких концентрация М-ДНКЖ в этой ткани достигала 40 мкмоль/кг, т. е. того же уровня, полученного в работе [1] для ткани легких сирийских хомячков, обработанных только растворами Б-ДНКЖ-GSH в «whole-body»-камере. При последующей ингаляции сирийским хомячкам раствора ДЭТК, судя по интенсивности сигнала 2.03, в легких наблюдалось небольшое снижение в 1.5–2.0 раза концентрации М-ДНКЖ, что резко контрастировало с 3–4-кратным увеличением концентрации этих комплексов в аналогичных опытах в «whole-body»-камере [1]. В крови и печени хомячков, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в «nose-only»-камере сигнал 2.03 не регистрировался. Как сказано выше, он наблюдался у этих животных только в легких (рис. 4).

Как и в работе [1], в настоящем исследовании не удалось зарегистрировать в легких приведенный на схеме 1 триплетный сигнал ЭПР, обусловленный мононитрозильными комплексами железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК). В соответствии со схемой 1, обнаружение этих комплексов могло бы служить однозначным свидетельством того, что в легких действительно появляются катионы нитрозония, вызывающие подавление репликации вируса SARS-CoV-2 в легких. Как и в нашей

предыдущей работе [1], мы полагаем, что приведенные на схеме 1 превращения в легких действительно имели место, однако зарегистрировать появление МНКЖ-ДЭТК в легких оказалось невозможным из-за быстрого исчезновения этих комплексов в результате обнаруженного в работе [7] губительного действия на них анионов супероксида. Последнее представляется вполне вероятным, поскольку в легких из-за их контакта с атмосферным кислородом уровень анионов супероксида мог существенно превышать содержание этих анионов в тканях других органов животных, в которых методом ЭПР в работах удалось зарегистрировать появление МНКЖ-ДЭТК при воздействии ДЭТК *in vivo* и *in vitro* как на Б-, так и на М-ДНКЖ [8, 9].

При ингаляции в «nose-only»-камере распыленными растворами Б-ДНКЖ-MSH (без ДЭТК) количество М-ДНКЖ, появившихся в легких животных, было на порядок ниже, чем при ингаляции растворов Б-ДНКЖ-GSH без ДЭТК. Это различие, очевидно, было обусловлено низкой стабильностью Б-ДНКЖ-MSH [10], быстро распадавшихся в ходе их прохождения по дыхательным путям. Тем не менее, благодаря способности этих комплексов высвобождать при распаде катионы нитрозония, они обнаруживали более заметное снижение как вирусной нагрузки, так и титра вируса в носовой полости хомячков, чем это имело место при обработке животных Б-ДНКЖ-GSH (без ДЭТК) (рис. 2а и 3а).

В легких это различие было менее выраженным, что, очевидно, было обусловлено тем, что в легких из-за низкой стабильности Б-ДНКЖ-MSH доходило лишь небольшое количество этих комплексов (рис. 2б и 3б). Более того, даже при

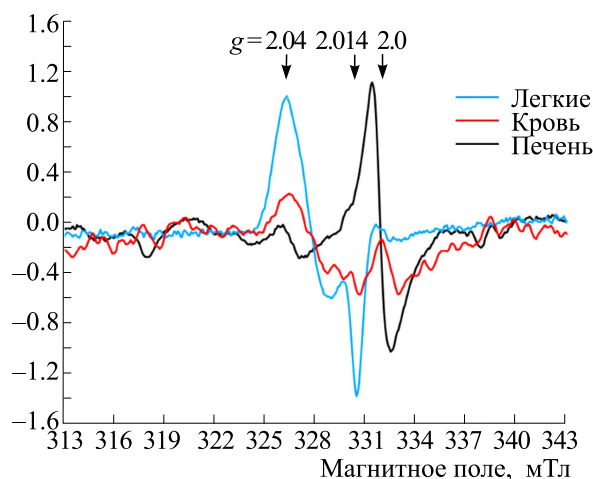


Рис. 5. Спектры ЭПР легких, печени и крови мышей, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в «nose-only»-камере. Регистрацию спектров проводили при 77 К и одинаковом усилении радиоспектрометра.

дополнительной после Б-ДНКЖ-GSH ингаляции хомячкам раствора ДЭТК, разрушавшего Б-ДНКЖ-GSH с выделением из них значительного количества катионов нитрозония, вирусная нагрузка и титр вируса в носовой полости у этих животных были не ниже, чем у хомячков, обработанных раствором Б-ДНКЖ-MSH (без ДЭТК) (рис. 2а и 3а). И только в легких при ингаляции растворов Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК противовирусный эффект был более выраженным, чем при ингаляции раствора Б-ДНКЖ-MSH (без ДЭТК) (рис. 2б и 3б).

Определение концентрации динитрозильных комплексов железа в органах мышей, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH в «nose-only»-камере методом ЭПР. При ингаляции мышам растворов Б-ДНКЖ-GSH с ДЭТК и без ДЭТК, как и в аналогичных опытах на сирийских хомячках, обнаружено лишь одно отличие от результатов таких же опытов в «whole-body»-камере. В этом случае дополнительная ингаляция мышам раствора ДЭТК не приводила к заметному повышению уровня М-ДНКЖ, возникающих в легких. При ингаляции в «nose-only»-камере комплексы М-ДНКЖ также появлялись в крови и печени, но их уровень после ингаляции раствора ДЭТК не повышался, как в режиме ингаляции «whole-body» [1], а снижался. Спектры ЭПР легких, печени и крови мышей, обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК, приведены на рис. 5.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной результат проведенных исследований состоит в том, что они полностью снимают предположение о том, что полученные нами ра-

нее данные о противовирусном действии в опытах на сирийских хомячках, последовательно обработанных растворами Б-ДНКЖ-GSH и ДЭТК, могут определяться увлажнением тела животных. Мы не обнаружили достоверных различий в снижении вирусной нагрузки в тканях органов мышной животных при ингаляционном введении им растворов Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК в «nose-only»-камере, не приводящем к увлажнению поверхности тела животных, и в «whole-body»-камере, приводившем к такому увлажнению. В связи с этим есть основание утверждать что причиной противовирусного действия Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК действительно является высвобождение из Б-ДНКЖ-GSH соответствия со схемой 1 катионов нитрозония, которые и подавляют репликацию коронавируса SARS-CoV-2.

Более того, оказалось, что существенно менее стабильные, чем Б-ДНКЖ-GSH, их аналоги, содержащие в качестве тиоловых лигандов меркаптосукцинат, способны оказывать противовирусное действие на хомячков без дополнительной их обработки раствором ДЭТК. Концентрация катионов нитрозония, образовавшихся в результате самопроизвольного распада Б-ДНКЖ-MSH, оказалось достаточной для появления, особенно в верхних дыхательных путях — носовой полости — противовирусного эффекта, даже более значительного, чем аналогичное действие Б-ДНКЖ-GSH с дополнительной ингаляцией раствора ДЭТК (рис. 2а и 3а).

Что касается легких, то подавление в них репликации вируса SARS-CoV-2 было наиболее

резко выраженным только при обработке животным раствором Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК (рис. 26 и 36). При этом оно практически не проявлялось при обработке хомячков в камере «nose-only» как раствором Б-ДНКЖ-MSH, так и раствором Б-ДНКЖ-GSH без ДЭТК (рис. 26 и 36). Очевидно, причиной такого ослабления в первом случае было снижение количества Б-ДНКЖ-MSH из-за распада этих комплексов на пути к легким, а во втором случае, наоборот, — из-за высокой стабильности Б-ДНКЖ-GSH, распад которых с высвобождением из этих комплексов значительного количества достигался только при действии на них ДЭТК.

Это предположение полностью согласуется с фактом резкого различия в интенсивности сигнала 2.03 при обработке животных растворами этих комплексов: она была существенно выше при ингаляции хомячкам раствора Б-ДНКЖ-GSH.

Тем не менее Б-ДНКЖ-MSH (без ДЭТК), как и Б-ДНКЖ-GSH, но уже в комбинации с ДЭТК, могут в перспективе явиться основой для разработки лекарств для купирования COVID-19 у человека.

В настоящее время получены данные, позволяющие предполагать, что репликация коронавируса SARS-CoV-2 в организме животных и человека может подавляться также в результате ингаляции потока газообразного NO с концентрацией 1000 ppm и выше [11]. Дело в том, что при такой ингаляции нейтральные молекулы, попадая через легкие в кровь, практически полностью трансформируются в ней в катионы нитрозония, которые, как мы полагаем, исходя из полученных в нашей настоящей и предыдущей [1] работах, могут вызвать подавление репликации коронавируса SARS-CoV-2.

Таким образом можно говорить о двух возможных способах генерации катионов нитрозония, способных эффективно подавлять репликацию коронавируса в тканях респираторного тракта. Первый способ — введение в дыхательные пути животных и человека распыленных растворов динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами, способными высвободить катионы нитрозония, в особенности, при их распаде под действием производных дитиокарбамата. Второй способ — ингаляция животным и человеку газообразного NO, практически полностью превращающегося в крови в катионы нитрозония.

Не исключено, что оба эти способа могут явиться основой для создания метода лечения COVID-19, а возможно и других респираторных

вирусных инфекций, а также такого социально опасного заболевания, как туберкулез.

В заключение остановимся на факте резкого повышения уровня М-ДНКЖ в легких, крови и печени хомячков и мышей при дополнительной (после Б-ДНКЖ-GSH) обработке животных в «whole-body»-камере раствором ДЭТК. Наиболее вероятной причиной этого повышения могло быть повышение в тканях этих животных уровня тиолов, обеспечивающих в соответствии с характерным для моно- и биядерных динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами химическим равновесием между этими формами динитрозильных комплексов превращение диамагнитных, ЭПР-неактивных биядерных комплексов в парамагнитные, ЭПР-активные моноядерные [5]. Спрашивается, почему дополнительная ингаляция раствора ДЭТК могла приводить к повышению уровня тиолов в легких, крови и печени, которые были выбраны нами для ЭПР измерений? Вероятнее всего, этот эффект мог быть обусловлен антиоксидантной активностью возникающих при взаимодействии динитрозильных комплексов железа с ДЭТК МНКЖ-ДЭТК, конкретно, их способностью связывать анионы супероксида [7]. Есть все основания полагать, что увлажнение — намокание тела животных при их обработке в «whole-body»-камере, приводившее к их охлаждению, должно было инициировать у животных окислительный стресс, как способ нагрева тела животных. Это стресс и мог вызывать снижение уровня тиолов в организме животных, которое блокировалось в результате антиоксидантного действия МНКЖ-ДЭТК на этих животных.

Длительный окислительный стресс, вызванный переохлаждением животных при ингаляции в «whole-body»-камере мог инициировать и распад обеих форм динитрозильных комплексов, в результате, как это было показано в [12], атаки анионов супероксида не только на МНКЖ-ДЭТК, но и на М- и Б-ДНКЖ. Только более слабое сродство последних к анионам супероксида не приводило к заметному снижению динитрозильных комплексов в тканях хомячков и мышей, подвергавшихся в течение суммарно часа увлажняющему действию ингаляции. Не исключено, что при большей длительности этой процедуры она могла приводить к снижению содержания динитрозильных комплексов железа в тканях животных, и тем самым к ослаблению их противовирусного действия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00009) и в рамках выполнения Государственного задания ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ ПРИ РАБОТЕ С ЖИВОТНЫМИ.

Эксперименты с сирийским хомячками и мышами проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18.III.1986). Неукоснительно соблюдались положения Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Washington D.C., 2011) и другие нормы международного права, регулирующие содержание и использование лабораторных животных с точки зрения гуманного обращения с животными и их рационального использования.

Авторы подтверждают соблюдение национальных, и международных руководящих принципов по уходу и гуманному использованию животных. Все процедуры экспериментов in vivo были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (заявка ГНЦ ВБ «Вектор»/11-10.2023, утверждена протоколом БЭК № 8 от 31.10.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Пьянков О. В., Багрянская Е. Г., Микоян В. Д., Ткачев Н. А., Асанбаева Н. А. и Попкова В. Я. Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка. *Биофизика*, **67**, 969–981 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050167
2. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами как доноры катиона нитрозония могут подавлять вирусные инфекции (гипотеза). *Биофизика*, **65**, 818–823 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920040250
3. Onischuk A. A., Tolstikova T. G., Sorokina I. V., Zhukova N. A., Baklanov A. M., Karasev V. V., Borovkova O. V., Dultseva G. G., Boldyrev V. V., and Fomin V. M. Analgesic effect from Ibuprofen nanoparticles inhaled by male mice. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, **22** (3), 245–254 (2009). DOI: 10.1089/jamp.2008.0721
4. Borodulin R. R., Kubrina L. N., Shvydkiy V. O., Lakomkin V. L., and Vanin A. F. A simple protocol for the synthesis of dinitrosyl iron complexes with glutathione: EPR, optical, chromatographic and biological characterization of reaction products. *Nitric Oxide*, **35**, 110–115 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2013.08.007
5. Vanin A. F., Poltorakov A. P., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., and Burbaev D. S. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide*, **23**, 136–149 (2010). DOI: 10.1016/j.niox.2010.05.285
6. Vanin A. F., Serezhenkov V. A., Mikoyan V. D., and Genkin M. V. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*, **2**, 224–234 (1998). DOI: 10.1006/niox.1998.0180
7. Vanin A. F., Huisman A., Stroes E. S., de Ruijter-Heijstek F. C., Rabelink T. J., and van Faassen E. E. Antioxidant capacity of mononitrosyl-iron-dithiocarbamate complexes: implications for NO trapping. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 813–824 (2001). DOI: 10.1016/S0891-5849(01)00466-X
8. Ванин А. Ф., Микоян В. Д., Кубрина Л. Н., Бородулин Р. Р. и Бургова Е. Н. Моно- и биядерные динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами в различных биосистемах. *Биофизика*, **60**, 735–747 (2015).
9. Mikoyan V. D., Burgova E. N., Borodulin R. R., and Vanin A. F. The binuclear form of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in animal tissues. *Nitric Oxide*, **62**, 1–10 (2017). DOI: 10.1016/j.niox.2016.10.007
10. Ванин А. Ф. и Ткачев Н. А. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами как источник универсальных цитотоксинов – катионов нитрозония. *Биофизика*, **68**, 421–434 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923030018
11. Ванин А. Ф., Абрамов А. А., Вагапов А. Б., Тимошин А. А., Пекшев А. В., Лакомкин В. Л. и Рууге Э. К. Почему вдыхание газообразного оксида азота не влияет на системное артериальное давление у человека и животных, *Биофизика*, **68**, 1259–1264 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923060170
12. Shumaev K. B., Gubkin A. A., Serezhenkov V. A., Lobyshva 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**, 37–46 (2008). DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.085

Antiviral Activity of the Solutions of Dinitrosyl Iron Complex Delivered to SARS-CoV-2-Infected Syrian Hamsters Placed in a Nose-Only Inhalation Exposure Chamber

A.V. Shipovalov*, A.F. Vanin**, N.A. Tkachev**, O.V. Pyankov*, N.B. Asanbaeva***, S.V. An'kov***, E.G. Bagryanskaya***, A.M. Baklanov****, S.V. Valiulin****, and M.E. Stekleneva****

*State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Rospotrebnadzor of the Russian Federation, Koltsovo, Novosibirsk 630559 Russia

**N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

***N.N. Vorozhtsov Institute for Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrentieva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

****V.V. Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Novosibirsk, 630090 Russia

No differences were found in antiviral action of the solutions of binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione (B-DNIC-GSH) and sodium diethyldithiocarbamate (DETC) delivered sequentially to SARS-CoV-2-infected Syrian hamsters in nose-only (the present study) inhalation or whole-body exposure chambers. In a whole-body exposure chamber, the animal became wet and it led only to a decrease in the level of mononuclear DNIC (M-DNIC) with thiol-containing proteins in lungs resulting in diminished EPR signal while the total B- and M-DNIC pool remained unchanged. It is suggested that antiviral activity of D-DNIC-GSH + DETC against SARS-CoV-2 virus is due to nitrosonium cations released from B-DNIC-GSH in its decomposition induced by DETC. Without additional aerosol inhalation delivery of the solutions of DETC to animals, complex with mercaptosuccinate that is less stable than B-DNIC-GSH exerted similar antiviral effect on Syrian hamster model.

Keywords: SARS-CoV-2, binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione, sodium diethyldithiocarbamate, mercaptosuccinate, nitrosonium cation

ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ЛИГАНДОМ НА ОСНОВЕ *N*-АЦЕТИЛ-*L*-ЦИСТЕИНА ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ ЭТИХ КОМПЛЕКСОВ В ОРГАНИЗМ КРЫС

© 2024 г. А.А. Тимошин^{*, #}, К.Б. Шумаев^{*, **}, В.Л. Лакомкин^{*}, А.А. Абрамов^{*}, Э.К. Рууге^{*, ***}

^{*}Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова
Минздрава России, ул. Акад. Е.И. Чазова, 15А, Москва, 121552, Россия

^{**}Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Ленинский просп., 33/2, Москва, 119071, Россия

^{***}Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/2, Москва, 119991, Россия

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

Поступила в редакцию 21.08.2024 г.

После доработки 21.08.2024 г.

Принята к публикации 18.09.2024 г.

Целью работы являлось исследование действия динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с лигандом на основе *N*-ацетил-*L*-цистеина при его длительном введении в организм крыс путем ингаляции. Установлено, что в результате этого происходит эффективный перенос стабилизированных форм NO через стенку альвеолы в ткань легких. В результате этого регистрируется накопление динитрозильных комплексов железа с белковыми лигандами в легких и в других органах, увеличение в них общего уровня NO, а также существенный и продолжительный гипотензивный эффект.

Ключевые слова: *N*-ацетил-*L*-цистеин, динитрозильные комплексы железа, оксид азота, спиновая ловушка, ингаляционное введение, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302924060181, EDN: NJUWPO

Известно, что динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами (ДНКЖ) являются одной из основных природных форм депонирования NO в биосистемах [1–7]. Такие стабилизированные формы NO осуществляют перенос и накопление NO в организме, обеспечивают его гипотензивное, эндокринное и паракринное действия, а также обладают антиоксидантными и цитопротекторными свойствами, и многими другими биологическими активностями [2, 6, 8–13].

Такие комплексы с низкомолекулярными тиол-содержащими лигандами (глутатион, цистеин, *N*-ацетил-*L*-цистеин и др.) могут быть легко синтезированы в лабораторных или промышленных условиях для их дальнейшего введения в организм. В организме происходит их быстрый

переход с низкомолекулярных на белковые лиганды с их дальнейшим медленным распадом и высвобождением NO, S-нитрозотиолов и ионов двухвалентного железа [6, 7].

В данной работе предпринята попытка анализа биологической активности препарата ДНКЖ, в котором тиол-содержащим лигандом является *N*-ацетил-*L*-цистеин (ДНКЖ-Ацц). Известно, что данное соединение является нетоксичным и широко используется как муколитическое лекарственное средство, которое легко проникает через клеточные мембраны. Можно предположить, что аналогичными свойствами будет обладать и ДНКЖ-Ацц.

Ранее нами уже было показано, что данные комплексы и/или продукты их полураспада проникают в организм в результате трансдермального [14] или сублингвального введения [15] и выступают, как источники NO в органах и тканях. Кроме того, в работе [16] нами было показано, что в результате ингаляции крыс раствором ДНКЖ-Ацц происходит накопление ДНКЖ с белковыми лигандами в ткани легких животных.

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, ДНКЖ-Ацц — динитрозильные комплексы железа с лигандом *N*-ацетил-*L*-цистеином, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, САД — среднее артериальное давление, ЧСС — частота сердечных сокращений, Fe-DETC₂ — комплексы ионов железа и диэтилдитиокарбамата.

Целью данной работы являлось комплексное исследование действия ДНКЖ-Ацц при его длительном ингаляционном введении в организм крыс.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Синтез ДНКЖ-Ацц проводили в соответствии с методикой, описанной нами ранее [14]. Формирование данных комплексов контролировали методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [14]. Далее полученный водный раствор ДНКЖ-Ацц замораживали и хранили в жидком азоте, а размораживали непосредственно перед началом экспериментов. После размораживания в него добавляли глицерин (1 : 1 по объему), и после этого в полученный препарат добавляли физиологический раствор в соотношении 1 : 5.

Другие реактивы, использованные в работе, были получены от фирмы Sigma-Aldrich (США).

Эксперименты проводили на нормотензивных крысах линии Wistar (самцы массой 350–450 г). Животных содержали в биоклинике НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России в клетках по 5 особей со свободным доступом к сухим кормам и воде. Световой режим контролировался (12 : 12 ч свет : темнота) при достаточной смене объемов воздуха и температуре 19–23°C.

В начале опыта животных анестезировали препаратом Золетил-100 (5 мг/кг массы тела). Далее для регистрации среднего артериального давления (САД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) в левую сонную артерию вводили полиэтиленовый катетер PE-50, который подключали к манометрическому датчику P23 Db (Gould Statham, США). Полученный сигнал артериального давления через усилитель Biograph-4 (СПб-ГУ аэрокосмического приборостроения, Россия) подавали на АЦП NI-USB 6210 (National Instruments, США) и обрабатывали на компьютере с помощью специальных программ записи и обработки сигналов физиологических параметров работы сердца (разработка д.б.н. Е.В. Лукошковой). Через тот же катетер проводили забор образцов цельной крови после ингаляции крыс препаратом ДНКЖ-Ацц. Кроме того, животным ставили трахеотомическую трубку.

Далее всех животных произвольным образом делили на 3 экспериментальные группы по 4–5 особей в каждой. Животным из первой группы после установки артериального катетера и трахеотомической трубки регистрировали исходные значения САД и ЧСС. Далее крысам через трубку проводили 30-минутную ингаляцию раствором ДНКЖ-Ацц, в ходе которой проводили мониторинг параметров общей гемодинамики организма. Дозировка препарата ДНКЖ-Ацц,

применяемая для всего периода ингаляции, составляла 2.5 мкмоль.

После этого всех животных из этой группы забивали передозировкой уретана, потом у них забирали образцы ткани органов (сердце, легкое, печень, почка), а также цельной крови. Пробы ткани измельчали механически и промывали в физиологическом растворе. После этого полученные образцы помещали в пластиковые трубки диаметром 5.0 мм, которые сразу же замораживали и хранили в жидком азоте. Далее регистрировали их спектры ЭПР.

В других экспериментальных группах методом ЭПР проводили исследование общего уровня NO в ткани органов. Для этого применяли липофильные спиновые ловушки оксида азота, такие как комплексы ионов железа и диэтилдитиокарбамата (Fe-DETC_2), с регистрацией образующихся спиновых аддуктов NO-Fe-DETC₂ методом ЭПР. При этом животным из второй экспериментальной группы после установки артериального катетера и трахеотомической трубки с последующей регистрацией исходных значений САД и ЧСС также проводили 30-минутную ингаляцию раствором ДНКЖ-Ацц. В то же время животным из этой группы через 10 мин после начала ингаляционного введения ДНКЖ-Ацц путем инъекций вводили компоненты спиновой ловушки NO: диэтилдитиокарбамат (620 мг/кг массы тела в 1.0 мл физиологического раствора, внутривенно) и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с цитратом натрия (25 и 125 мг/кг массы тела соответственно в 1.0 мл физиологического раствора, подкожно в область левого плеча).

Далее через 20 мин после этих инъекций животных из этой группы забивали, изолировали их сердце, легкие, печень и почки. Далее по стандартной методике готовили образцы измельченной ткани этих органов, которые также сразу же замораживали, хранили в жидком азоте и использовали далее для регистрации их спектров ЭПР.

Животным из третьей группы (контроль) ингаляцию не проводили, им только по стандартной методике путем инъекций вводили компоненты спиновой ловушки Fe-DETC₂, через 20 мин после этого их также забивали и получали образцы ткани органов (сердце, легкие, печень и почки), как было описано выше.

Спектры ЭПР всех полученных образцов ткани органов регистрировали на ЭПР-спектрометре X-диапазона E-109E (Varian, США) при температуре жидкого азота. Амплитуда высокочастотной модуляции магнитного поля составляла 0.4 мТл (при регистрации образцов тканей органов и крови без Fe-DETC₂) или 0.2 мТл (при регистрации сигналов спиновых аддуктов в ткани

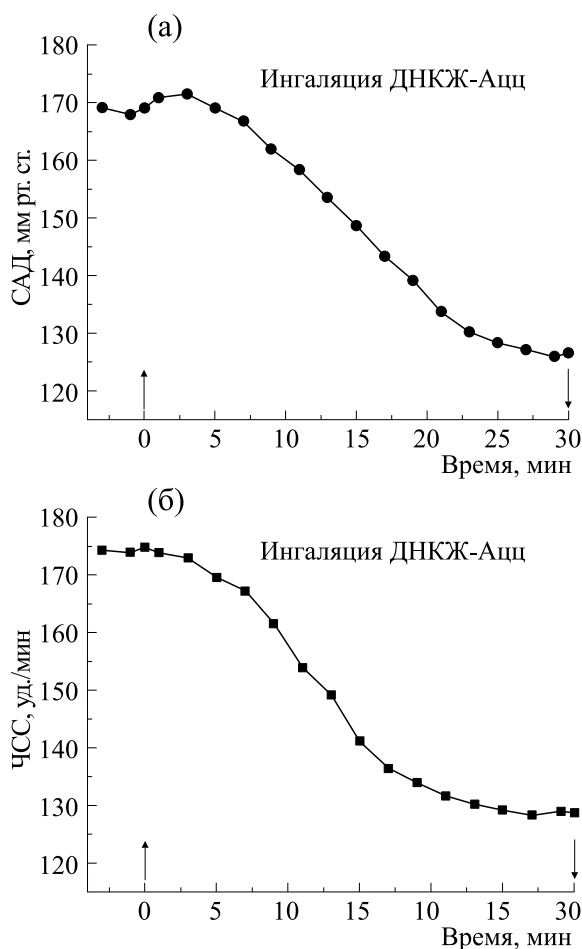


Рис. 1. Характерные кинетики САД (а) и ЧСС (б), соответствующие животным, получавшим ингаляцию ДНКЖ-Ацц. Ингаляцию проводили в период 0–30 мин.

органов) при частоте 100 кГц. Мощность сверхвысокочастотного поля спектрометра устанавливали на уровне 10 мВт, его частота составляла 9.33 ГГц. Сканирование магнитного поля при записи сигналов ЭПР таких образцов осуществляли с центром при $g = 2.03$. После записи сигналов все образцы размораживали и определяли их массу в активной зоне резонатора спектрометра.

Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с использованием пакета программ Origin 8 (OriginLab Corp., США). Все данные в статье представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. Кратность повторения опытов составляла не менее 5–6 экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе проводили комплексное исследование действия длительной ингаляции препарата ДНКЖ-Ацц на организм, в ходе которого регистрировали влияние этого соединения на па-

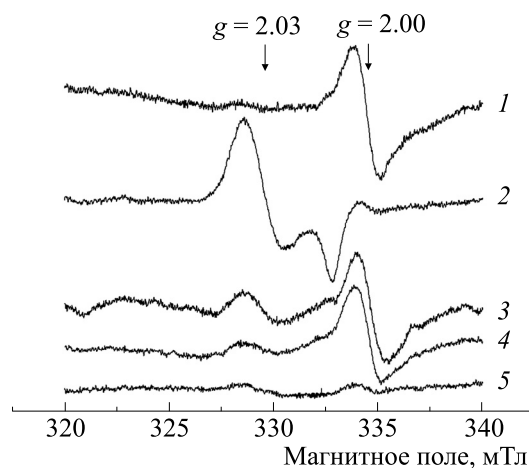


Рис. 2. Спектры ЭПР образцов ткани органов и цельной крови крыс, полученных после 30-минутной ингаляции ДНКЖ-Ацц: 1 – сердце, 2 – легкое, 3 – печень, 4 – почка, 5 – кровь. Спектры сняты при температуре жидкого азота.

раметры общей гемодинамики организма, а также проводили анализ тканей органов животных методом ЭПР.

Установлено, что в начале опыта у животных регистрировались следующие усредненные значения параметров общей гемодинамики: САД = 163 ± 10 мм рт.ст. и ЧСС = 438 ± 15 уд/мин. При этом не наблюдалось достоверных различий значений этих параметров между разными экспериментальными группами крыс, и такие значения соответствовали результатам, полученным другими авторами в аналогичных экспериментальных условиях.

На рис. 1а,б представлены характерные кинетики САД и ЧСС, полученные у животных, принадлежащих к первой экспериментальной группе. Из этого рисунка видно, что в результате ингаляции ДНКЖ-Ацц регистрировалось снижение САД, величина которого в среднем по группе составляла $25 \pm 4\%$, а ЧСС снижалась на $20 \pm 5\%$. Следовательно, в результате введения данного препарата происходил эффективный перенос NO в депонированной и/или свободной форме через стенку альвеолы легких в кровоток животного, что далее инициировало активацию гуанилатциклазы, и, как следствие, вазодилаторное действие в организме. В результате этого происходило снижение САД, начиная с 4–5 до 25–30 мин от начала ингаляции ДНКЖ-Ацц.

Для регистрации формирования и накопления в органах животных парамагнитных стабилизированных форм NO через 30 мин ингаляции ДНКЖ-Ацц проводили формирование образцов замороженной ткани органов для их дальнейшего анализа методом ЭПР. Характерные спектры ЭПР исследуемых образцов, записанные при -196°C , представлены на рис. 2. Из этого рисунка

видно, что в образцах ткани органов в высокопольной части спектров при $g = 2.00$ регистрировались свободнорадикальные сигналы, которые представляют собой суперпозицию спектров уби-семихинона и флавосемихинонов [17]. Кроме того, в спектрах ткани органов и цельной крови при $g = 2.03$ наблюдались уширенные сигналы, принадлежащие парамагнитным моноядерным ДНКЖ с белковыми лигандами [2]. Из этого рисунка видно, что наиболее интенсивные сигналы при $g = 2.03$ наблюдались в легких животного, а самые слабые регистрировались в образцах миокарда и цельной крови.

Из рис. 2 также видно, что в спектре цельной крови после ингаляции не регистрировался сигнал от комплексов NO с железом гемовой группы гемоглобина [2, 18]. Это могло свидетельствовать об отсутствии избытка свободного NO в кровотоке после введения ДНКЖ-Ацц.

Исходя из спектров ЭПР парамагнитных ДНКЖ с белковыми лигандами, определяли содержание этих комплексов в образцах ткани органов и крови животного. Для этого проводили двойное интегрирование их сигналов с нормировкой на массу ткани в активной зоне резонатора спектрометра и последующее сравнение полученных значений с аналогичными величинами, полученными для стандартных образцов с известной концентрацией спинов. Полученные в результате этого результаты представлены в табл. 1. Видно, что наиболее интенсивное накопление связанных с белками ДНКЖ регистрировалось в легких и печени животных, причем в ткани легких его содержание было почти в 10 раз выше, чем в печени.

Следует отметить, что низкие значения содержания связанных с белками моноядерных ДНКЖ в образцах ткани сердца и цельной крови не могут служить доказательством того, что в них низкий общий уровень оксида азота, так как NO в этих случаях мог присутствовать также в форме диамагнитных биядерных ДНКЖ, S-нитрозотиолов и других метаболитов NO [7, 19–21].

В другой части работы в обеих экспериментальных группах проводили оценку общего уровня NO с применением метода ЭПР и использованием спиновой ловушки Fe-DETC₂. Как известно [22], эта ловушка обладает гидрофобными свойствами и способна эффективно взаимодействовать как со свободным NO, так и с его депонированными формами, с образованием стабильных парамагнитных спиновых аддуктов NO-Fe-DETC₂, регистрируемых методом ЭПР.

Как и ранее [14, 15, 22], для определения содержания NO-Fe-DETC₂ регистрировали сигналы ЭПР образцов ткани животных, получавших компоненты спиновой ловушки Fe-DETC₂, и

Таблица 1. Содержание ДНКЖ с белковыми лигандами в ткани органов и крови после ингаляции ДНКЖ-Ацц

Тип образца	Содержание ДНКЖ, нмоль/г
Сердце	0.11 ± 0.07
Легкие	8.57 ± 0.82
Печень	0.89 ± 0.11
Почки	0.35 ± 0.10
Кровь	0.13 ± 0.08

принадлежащих к двум экспериментальным группам, — получавшим ингаляцию ДНКЖ-Ацц, а также контрольным. Во всех случаях в полученных спектрах присутствовали узкие эквидистантные триплетные сигналы, принадлежащие спиновым аддуктам NO-Fe-DETC₂ ($g = 2.036$) [14, 15]. Содержание этих монокислородных комплексов, как отмечалось выше, отражало общий уровень NO, включая его депонированные формы.

Исходя из этих сигналов, также определяли содержание NO-Fe-DETC₂ во всех образцах ткани органов. Для оценки эффекта вводимого ингаляционно ДНКЖ-Ацц на общий уровень NO в ткани органов на рис. 3 представлены усредненные значения содержания NO-Fe-DETC₂, соответствующие животным, получавшим ДНКЖ-Ацц (параметр $N_{\text{ДНКЖ-Ацц}}$) с нормировкой на

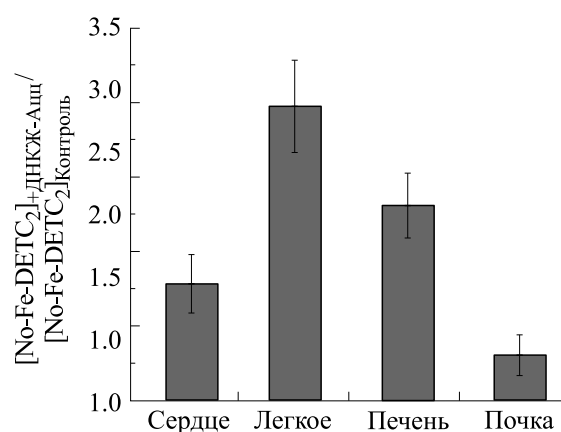


Рис. 3. Усредненные значения содержания NO-Fe-DETC₂ в ткани органов животных, получавших ДНКЖ-Ацц (параметр $N_{\text{ДНКЖ-Ацц}}$), с нормировкой на аналогичные параметры, соответствующие контрольной группе ($N_{\text{Контроль}}$).

аналогичные параметры, соответствующие контрольной группе ($N_{\text{Контроль}}$). Из этого рисунка видно, что в результате действия ДНКЖ-Ацц в ткани всех органов увеличивался общий уровень NO, причем наиболее существенный эффект был получен в образцах легких животного. Этот факт согласуется с интенсивным накоплением в легких парамагнитных ДНКЖ, связанных с белками (см. рис. 2 и табл. 1).

Вместе с тем из представленных на рис. 3 данных видно, что в ткани сердца в результате ингаляции ДНКЖ-Ацц также регистрировался 1.78-кратный рост общего уровня NO, несмотря на то, что в этом органе наблюдалось лишь очень слабое формирование и накопление ДНКЖ с белковыми лигандами (см. рис. 2 и табл. 1). Вероятно, рост общего уровня NO в сердце происходил в результате накопления в ткани этого органа при ингаляции не только парамагнитных ДНКЖ с белковыми лигандами, но также S-нитрозотиолов и диамагнитных биядерных ДНКЖ, что вносило вклад в общий уровень NO в миокарде.

Из рис. 2 и табл. 1 также видно, что в цельной крови регистрировалось относительно слабое накопление моноядерных ДНКЖ, в то время как во время ингаляции наблюдался существенный и пролонгированный гипотензивный эффект. Это также заставляло думать о том, что в крови кроме парамагнитных ДНКЖ, регистрируемых методом ЭПР, могли присутствовать непарамагнитные метаболиты NO, в том числе биядерные динитрозильные комплексы железа, а также S-нитрозотиолы. Нужно отметить, что ДНКЖ участвуют в образовании S-нитрозотиолов и находятся с ними в динамическом равновесии [7, 20–23].

Таким образом, в результате длительной ингаляции животных ДНКЖ-Ацц происходит эффективный перенос стабилизированных форм NO через стенку альвеолы в ткань легких. В результате этого регистрируется накопление ДНКЖ с белковыми лигандами в легких и в других органах, увеличение в них общего уровня NO, а также существенный и продолжительный гипотензивный эффект.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность проф. А.Ф. Ванину (Институт химической физики РАН, Москва) за ценные советы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования выполняли в соответствии с директивой 2010/63/еу Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, и принципами национального стандарта ГОСТ Р 53434-2009. Экспериментальный протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России (регистрационный номер протокола заседания № ЛЭПС/18.07.23 от 18 июля 2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ke C.-H., Chen C.-H., Tsai M.-L., Wang H.-C., Tsai F.-T., Chiang Y.-W., Shih W.-C., Bohle D. S., and Liaw W.-F. $\{Fe(NO)_2\}^9$ dinitrosyl iron complex acting as a vehicle for the NO radical. *J. Am. Chem. Soc.*, **139** (1), 67–70 (2017). DOI: 10.1021/jacs.6b11454
2. Shumaev K. B., Kosmachevskaya O. V., Timoshin A. A., Vanin A. F., and Topunov A. F. Dinitrosyl iron complexes bind with hemoglobin as markers of oxidative stress. *Methods Enzymol.*, **436**, 445–461 (2008). DOI: 10.1016/S0076-6879(08)36025-X
3. Suryo Rahmanto Y., Kalinowski D. S., Lane D. J., Lok H. C., Richardson V., and Richardson D. R. Nitrogen monoxide (NO) storage and transport by dinitrosyl-dithiol-iron complexes: long-lived NO that is trafficked by interacting proteins. *J. Biol. Chem.*, **287** (10), 6960–6968 (2012). DOI: 10.1074/jbc.R111.329847
4. Tsai M.-L., Tsou C.-C., and Liaw W.-F. Dinitrosyl iron complexes (DNICs): From biomimetic synthesis and spectroscopic characterization toward unveiling the biological and catalytic roles of DNICs. *Acc. Chem. Res.*, **48**, 1184–1193 (2015). DOI: 10.1021/ar500459j
5. Vanin A. F., Poltorakov A. P., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., and Burbaev D. C. Polynuclear water-soluble Dinitrosyl Iron Complexes with cysteine and glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide*, **23** (2), 136–149 (2010). DOI: 10.1016/j.niox.2010.05.285
6. Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*, **54**, 15–29 (2016). DOI: 10.1016/j.niox.2016.01.006
7. Vanin A. F. Physico-chemistry of dinitrosyl iron complexes as a determinant of their biological activity. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (19), 10356 (2021). DOI: 10.3390/ijms221910356
8. Dungal P., Perlinger M., Weidinger A., Redl H., and Kozlov A. V. Cytoprotective effect of nitrite is based on the formation of dinitrosyl iron complexes. *Free Radic. Biol. Med.*, **89**, 300–310 (2015). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.012
9. Shumaev K. B., Dudylyna A. L., Ivanova M. V., Pugachenko I. S., and Ruuge E. K. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria. *BioFactors*, **44** (3), 237–244 (2018). DOI: 10.1002/biof.1418
10. Shumaev K. B., Gorudko I. V., Kosmachevskaya O. V., Grigoryeva D. V., Panasenko O. M., Vanin A. F., Topun-

- ov A. F., Terekhova M. S., Sokolov A. V., Cherenkevich S. N., and Ruuge E. K. Protective effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione in red blood cell lysis induced by hypochlorous acid. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, e2798154 (2019). DOI: 10.1155/2019/2798154
11. Timoshin A. A., Lakomkin V. L., Abramov A. A., Ruuge E. K., Kapel'ko V. I., Chazov E. I. and Vanin A. F. The hypotensive effect of the nitric monoxide donor Oxa-com at different routs of its administration to experimental animals. *Eur. J. Pharmacol.*, **765**, 525–532 (2015). DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.09.011
 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). EDN: ORCNP
 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. *Биомед. химия*, **67** (2), 162–168 (2021). DOI: 10.18097/PBMC20216702162
 14. Тимошин А. А., Шумаев К. Б., Лакомкин В. Л., Абрамов А. А. и Рууге Э. К. Исследование методом электронного парамагнитного резонанса транслокации стабилизированных форм NO через кожный покров крыс. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **170** (9), 290–295 (2020). DOI: 10.47056/0365-9615-2020-170-9-290-295
 15. Тимошин А. А., Шумаев К. Б., Лакомкин В. Л., Абрамов А. А. и Рууге Э. К. Действие динитрозильных комплексов железа с лигандом на основе N-ацетил-L-цистеина при сублингвальном введении этих комплексов в организм крыс. *Биофизика*, **67** (3), 581–586 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922030188
 16. Ванин А. Ф., Пекшев А. В., Вагапов А. Б., Шарапов Н. А., Лакомкин В. Л., Абрамов А. А., Тимошин А. А. и Капелько В. И. Газообразный оксид азота и динитрозильные комплексы с тиолсодержащими лигандами как предполагаемые лекарственные средства, способные купировать COVID-19. *Биофизика*, **66** (1), 183–194 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921010208
 17. Timoshin A. A., Pisarenko O. I., Lakomkin V. L., Studneva I. M., and Ruuge E. K. Free radical intermediates in isolated rat heart during perfusion, ischemia, and reperfusion: effect of ischemic preconditioning. *Exp. Clin. Cardiol.*, **5** (2), 59–64 (2000). EDN: LFYTAF
 18. Ванин А. Ф., Абрамов А. А., Вагапов А. Б., Тимошин А. А., Пекшев А. В., Лакомкин В. Л. и Рууге Э. К. Почему вдыхание газообразного оксида азота не влияет на системное артериальное давление у человека и животных? *Биофизика*, **68** (6), 1259–1264 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923060170
 19. Freeman B. A., O'Donnell V. B., and Schopfer F. J. The discovery of nitro-fatty acids as products of metabolic and inflammatory reactions and mediators of adaptive cell signaling. *Nitric Oxide*, **77**, 106–111 (2018). DOI: 10.1016/j.niox.2018.05.002
 20. Vanin A. F. What is the mechanism of nitric oxide conversion into nitrosonium ions ensuring S-nitrosating processes in living organisms. *Cell Biochem. Biophys.*, **77** (4), 279–292 (2019). DOI: 10.1007/s12013-019-00886-1
 21. Massa C. M., Liu Z., Taylor S., Pettit A. P., Stakheyeva M. N., Korotkova E., Popova V., Atochina-Vasserman E. N., and Gow A. J. Biological Mechanisms of S-Nitrosothiol Formation and Degradation: How Is Specificity of S-Nitrosylation Achieved? *Antioxidants*, **10** (7), 1111 (2021). DOI: 10.3390/antiox10071111
 22. Vanin A. F. and Timoshin A. A. Determination of in vivo nitric oxide levels in animal tissues using a novel spin trapping technology. *Methods Mol. Biol.*, **704**, 135–149 (2011). DOI: 10.1007/978-1-61737-964-2_11
 23. Bosworth C. A., Toledo J. C., Zmijewski J. W., Li Q., and Lancaster J. R. Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (12), 4671–4676 (2009). DOI: 10.1073/pnas.0710416106

The Action of Dinitrosyl Iron Complexes with a Ligand Based on N-acetyl-L-cysteine upon Inhalation Delivery of These Complexes to Rats

A.A. Timoshin*, K.B. Shumaev*, **, V.L. Lakomkin*, A.A. Abramov*, and E.K. Ruuge*, ***

*National Medical Research Center of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akademika E.I. Chazova 15A, Moscow, 121552 Russia

**A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia

***Department of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

The objective of the present research was to study the action of dinitrosyl iron complexes (DNIC) with a ligand based on N-acetyl-L-cysteine upon long-term inhalation exposure of rats to this substance. It has been shown that as a result, NO stabilized forms pass efficiently through the alveolar membrane into the lung tissue leading to the accumulation of dinitrosyl iron complexes with protein ligands and to an increase in the total NO level in the lungs and other organs thereby inducing a significant and long-lasting hypotensive effect.

Keywords: N-acetyl-L-cysteine, dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, spin trap, inhalation exposure, electron paramagnetic resonance

УДК 577.346

РАДИОЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 ПРИ ТОТАЛЬНОМ ОБЛУЧЕНИИ МЫШЕЙ ИОНИЗИРУЮЩИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ РАЗЛИЧНОЙ МОЩНОСТИ

© 2024 г. Е.Е. Карманова*, Р.Г. Гончаров*, В.И. Брусков**,
В.И. Новоселов*, М.Г. Шарапов*,#

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

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

#E-mail: sharapov.mg@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.04.2024 г.

После доработки 25.04.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Поиск эффективных и безопасных радиомодулирующих соединений для снижения радиорезистентности рака и/или минимизации сопутствующего радиационного поражения нормальных тканей остается актуальной проблемой в рамках лучевой терапии. Представитель семейства тиол-зависимых пероксидаз пероксиредоксин 6 является перспективным кандидатом для решения этой проблемы. Однако в исследованиях зачастую уделяется недостаточно внимания параметрам излучения, а для экзогенного пероксиредоксина 6 сведения о влиянии различных параметров излучения на радиозащитный эффект вовсе отсутствуют. В работе показаны особенности радиозащитного эффекта пероксиредоксина 6 и его мутантной формы Prx6-C47S (не обладающей пероксидазной активностью) при внутривенном введении (20 мкг/г) мышам незадолго до облучения рентгеновским или γ -излучением с различной мощностью дозы и временем воздействия. Выживаемость животных в группах «10 Гр γ -облучение, 0.125 Гр/мин» и «7 Гр рентгеновское облучение, 1 Гр/мин» (разница в 8 раз по мощности дозы и по времени воздействия) была сопоставима как для контрольных, так и для опытных групп.

Ключевые слова: Prx6, радиопротектор, рентгеновское излучение, γ -излучение, мощность дозы.

DOI: 10.31857/S0006302924060195, EDN: NJUUBA

Лучевая терапия уже длительное время является одним из основных методов лечения различных видов рака, а 98% дозы радиации, получаемой населением от всех искусственных источников, приходится на медицинское воздействие [1]. Однако как проблема сопутствующего радиационного поражения нормальных тканей при лучевой терапии, так и проблема радиорезистентности рака остаются нерешенными [2–6]. Кроме того, несмотря на обширные исследования одобренных общих радиозащитных препаратов по-прежнему крайне мало, они имеют ряд клини-

чески значимых ограничений и далеки от идеала [4, 7].

Значительная часть радиобиологических исследований сосредоточена на эффектах, индуцированных гамма-излучением или рентгеновскими лучами, имеющими низкую линейную передачу энергии (ЛПЭ) [7]. Исследования проводятся при различных параметрах облучения [8–11], среди которых мощности дозы зачастую уделяется недостаточно внимания. При этом в контексте лучевой терапии данный параметр может оказаться критически важным для эффективного лечения [12].

Одними из широко исследуемых потенциальных радиопротекторов и модификаторов реакции на лучевую терапию являются пероксиредоксины (Prx) – эволюционно древнее семейство широко распространенных тиол-зависимых пероксидаз. У млекопитающих обнаружено шесть различных

Сокращения: ЛПЭ – линейная передача энергии, Prx – пероксиредоксин, aiPLA2 – Ca^{2+} -независимая фосфолипаза A2, X-ray – рентгеновское облучение с мощностью дозы 1 Гр/мин, γ – гамма-облучение с мощностью дозы 0.125 Гр/мин, ЛД100/30 – абсолютно летальная доза, ЛД_{50/30} – полумлетальная доза, ОБЭ – относительная биологическая эффективность.

изоформ Prx (Prx1–6), которые представлены практически во всех тканях и клеточных органоидах [3]. В нормальных физиологических условиях Prx1–6 защищают клетки от окислительного стресса [13, 14]. В раковых клетках наблюдается повышенный уровень экспрессии генов PRDX, что коррелирует с устойчивостью опухолей к лучевой терапии. Кроме того, раковые клетки аномальным образом секретируют некоторые изоформы Prx в межклеточное пространство, оказывая тем самым влияние на опухолевое микроокружение [15]. Подавление экспрессии PRDX в раковых клетках зачастую приводит к снижению их радиорезистентности [8–11, 13, 15]. Следует отметить, что некоторые изоформы Prx могут проявлять как проонкогенные, так и антионкогенные свойства, что обусловлено вовлеченностью этих белков во многие клеточные процессы и активацией ими различных сигнально-регуляторных каскадов [13, 15].

Пероксиредоксин 6 (Prx6) интересен тем, что способен восстанавливать самый широкий спектр перекисных субстратов среди известных пероксидаз, для него обнаружена секреторная форма [16], а также он обладает активностью Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A2 (aiPLA2), которая может участвовать в регенерации окисленной формы белка [15, 17, 18]. О роли эндогенного Prx6 в радиорезистентности известно крайне мало [3, 13], а эффекты экзогенного Prx6 при ионизирующем облучении в основном описаны в цикле работ нашего коллектива [14, 15, 17, 19]. Ранее нами были показаны радиопротекторные свойства экзогенного Prx6, а также его мутантной формы Prx6-C47S, лишенной пероксидазной активности [19]. Кроме того, был продемонстрирован вклад сигнально-регуляторных функций Prx6 с участием толл-подобного рецептора TLR4 [14, 17], а также его фосфолипазной активности в радиозащитном эффекте [17]. В обзоре [15] мы обсудили потенциал экзогенного Prx6 как радиомодулятора, в том числе и при лучевой терапии. Однако сведения о его эффектах при различных параметрах облучения в литературе отсутствуют. Поэтому, целью данной работы было изучение влияния различной мощности дозы и, соответственно, времени облучения на радиопротекторный эффект экзогенного Prx6 и Prx6-C47S, что может найти применение в дальнейших прикладных разработках, а также понимании роли этого белка в развитии радиорезистентности рака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пероксиредоксин 6. Получение генно-инженерных конструкций, выделение, очистка и характеристика Prx6 человека дикого типа [20] и его мутантной формы Cys47Ser (Prx6-C47S), с инак-

тивированным пероксидазным центром [19], было описано нами ранее.

Облучение животных. Тотальное рентгеновское облучение (X-гау) животных в дозах 7 и 10 Гр проводили на рентгеновской терапевтической установке РУТ-15 («МосРентген», Россия) при мощности дозы 1 Гр/мин (фокусное расстояние 0.375 м, 20 мА, 200 кВ). Рентгеновское облучение проводили в Центре коллективного пользования ИБК РАН. Тотальное γ -облучение животных в дозах 7, 9, 10 и 12 Гр проводили на гамма-установке радиационного облучения ГУР-120 (ВНИИРАЭ, Обнинск, Калужская обл., Россия) с источником γ -излучения ^{60}Co ГИК-7-4 (ПО «Маяк», Россия) при мощности дозы 0.125 Гр/мин в УНУ ГУР-120 ВНИИРАЭ.

Выживаемость животных. Для стандартного теста на 30-суточную выживаемость использовали самцов аутбредных мышей Kv:SHK в возрасте 6–8 недель и массой 29 ± 4 г (питомник «Крюково» РАН). Животных содержали в виварии при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$ в вентилируемом помещении с автоматизированной системой регулирования светового режима (12 ч день и 12 ч ночь). У мышей был постоянный доступ к гранулированному корму для грызунов («Лабораторкорм», Россия) и питьевой воде. Животных случайным образом разделяли на опытные группы по 10 особей, кроме группы «Prx6-C47S 20 мкг/г + 10 Гр X-гау» в 5 особей. Непосредственно перед началом эксперимента Prx6 и Prx6-C47S растворяли при 37°C в 0.9%-м растворе NaCl. Раствор Prx6 или Prx6-C47S вводили мышам внутривенно за 15 мин до облучения в объеме 0.1 мл из расчета 20 мкг/г белка на мышь. В контрольных группах были интактные животные и облученные мыши, которым вводили физиологический раствор. Учет павших животных проводили ежедневно на протяжении 30 суток в одно и то же время. Выживших животных после окончания опыта умерщвляли методом цервикальной дислокации.

Статистическая обработка данных. Для математической и графической обработки данных применяли программное обеспечение Origin 8.1 (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выживаемость мышей при различном типе источника и мощности дозы излучения. Тест на 30-суточную выживаемость является стандартным радиобиологическим методом исследования. Он позволяет на модели острого облучения животных в летальных и сублетальных дозах оценить радиомодулирующий эффект исследуемого вещества. Ранее нами для мышей Kv:SHK уже была определена минимальная абсолютно летальная доза ($\text{ЛД}_{100/30}$), составляющая 7 Гр при облуче-

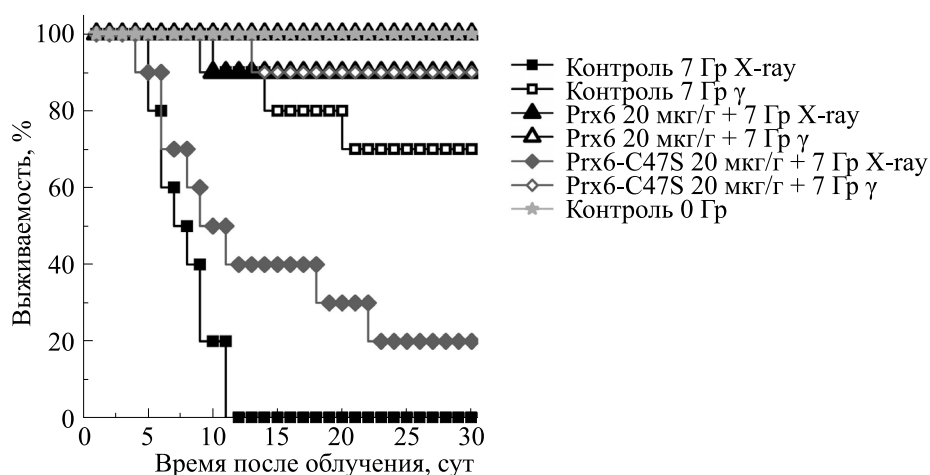


Рис. 1. Влияние Prx6 и его лишённой пероксидазной активности мутантной формы Prx6-C47S на выживаемость мышей Kv:SHK при внутривенном введении за 15 мин до тотального рентгеновского облучения (X-ray) с мощностью 1 Гр/мин или γ -облучения с мощностью 0.125 Гр/мин в дозе 7 Гр.

нии рентгеновским излучением с мощностью дозы 1 Гр/мин (далее — X-ray). Поэтому в первом эксперименте мы сравнили воздействие на мышей дозы 7 Гр X-ray и γ -облучения с мощностью дозы 0.125 Гр/мин (далее — γ) с разницей мощности дозы в 8 раз и соответствующей разницей во времени воздействия (7 мин и 56 мин).

Результаты теста на выживаемость при дозе 7 Гр показаны на рис. 1, а средняя продолжитель-

ность жизни и процентная доля выживаемости указаны в табл. 1. Результаты облучения X-ray соответствуют предыдущим полученным нами результатам [19]. При этом в случае облучения γ наблюдалось увеличение выживаемости животных: в облученных контрольных группах с 0 до 70%, в опытных группах с применением Prx6-C47S — с 20 до 90%. В группах с применением Prx6 наблюдалась разница всего в 10% из-за изначально высоких показателей выживаемости, что обусловле-

Таблица 1. Влияние пероксиредоксина-6 и его лишённой пероксидазной активности мутантной формы Prx6-C47S на выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей Kv:SHK при внутривенном введении за 15 мин до тотального рентгеновского облучения (X-ray) с мощностью 1 Гр/мин или γ -облучения с мощностью 0.125 Гр/мин в дозе 7 Гр

№ группы	Группа	Средняя продолжительность жизни, сут	Выживаемость, %
1	Контроль 0 Гр	30.0	100
2	Контроль 7 Гр X-ray	7.7	0
3	Контроль 7 Гр γ	25.4	70
4	Prx6 20 мкг/г + 7 Гр X-ray	27.9	90
5	Prx6 20 мкг/г + 7 Гр γ	30.0	100
6	Prx6-C47S 20 мкг/г + 7 Гр X-ray	13.6	20
7	Prx6-C47S 20 мкг/г + 7 Гр γ	28.3	90

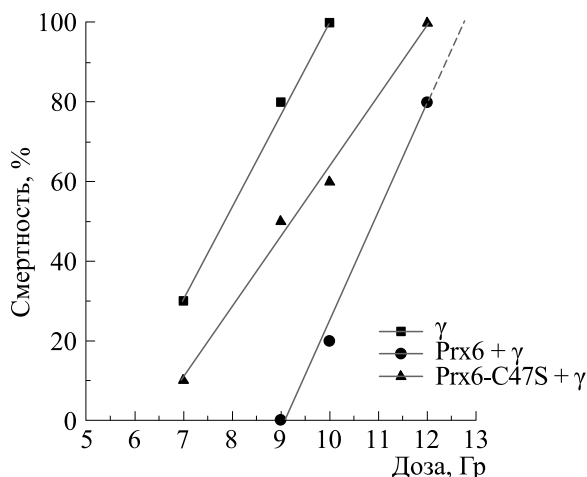


Рис. 2. Смертность мышей Kv:SHK при тотальном однократном γ -облучении с мощностью 0.125 Гр/мин в диапазоне доз от 7 до 12 Гр и влияние на этот процесс Prx6 и его лишенной пероксидазной активности мутантной формы Prx6-C47S. Данные линейно аппроксимированы.

но его сильными радиопротекторными свойствами — полученный ранее фактор изменения дозы Prx6 равен 1.4 [19]. Таким образом, снижение мощности дозы (с пропорциональным увеличением времени облучения) приводит к снижению степени летальности одной и той же дозы.

Влияние Prx6 и Prx6-C47S на смертность мышей при γ -облучении в диапазоне доз. Поскольку в предыдущем тесте при дозе 7 Гр радиопротекторный эффект Prx6 и Prx6-C47S демонстрировался некорректно и не позволил сделать однозначных

выводов, то в следующем эксперименте были получены кривые «доза — эффект» при γ -облучении в дозах 7, 9, 10 и 12 Гр (рис. 2). Таким образом, были либо получены, либо рассчитаны на основе аппроксимации сублетальная доза ($LD_{50/30}$) и минимальная абсолютно летальная доза ($LD_{100/30}$). Для облученных контрольных животных $LD_{50/30} \approx 8$ Гр, $LD_{100/30} = 10$ Гр. В случае применения Prx6 $LD_{50/30} \approx 11$ Гр, $LD_{100/30} \approx 12.7$ Гр, а для Prx6-C47S $LD_{50/30} = 9$ Гр, $LD_{100/30} = 12$ Гр. Рассчитанный на основании этих данных фактор изменения дозы для Prx6 равен 1.32, а для Prx6-C47S — 1.16. Отметим, что различие между $LD_{100/30}$ для Prx6 и для Prx6-C47S составило всего около 1 Гр, тогда как ранее нами было показано [15], что при облучении X-ray это различие превышало 2 Гр. При этом для $LD_{50/30}$ разница в 2 Гр осталась неизменной, тогда как различие между $LD_{100/30}$ контроля и Prx6 показало уменьшение на <1 Гр, а для Prx6-C47S — увеличение на 1 Гр.

Влияние Prx6 и Prx6-C47S на смертность при различном типе источника и мощности дозы излучения. По результатам предыдущих работ и полученных дозовых зависимостей для сравнительной оценки радиопротекторного эффекта Prx6 была выбрана доза 10 Гр, так как при ней наблюдается ненулевая смертность при γ , но при этом она еще не является $LD_{100/30}$ в случае X-ray [19]. Поскольку доза 10 Гр X-ray значительно превышает минимальную абсолютно-летальную дозу для мышей Kv:SHK, подвергнутых только облучению или получивших до облучения инъекцию Prx6-C47S [15], то облученный контроль не был сделан, а в группе Prx6-C47S 20 мкг/г было всего 5 особей по биоэтическим соображениям. Результаты показаны на рис. 3 и в табл. 2. В X-ray-облученных

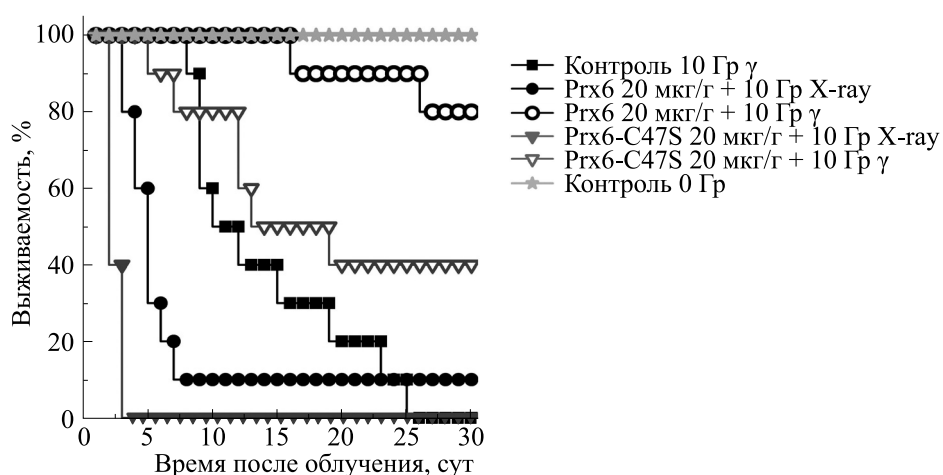


Рис. 3. Влияние Prx6 и его лишенной пероксидазной активности мутантной формы Prx6-C47S на выживаемость мышей Kv:SHK при внутривенном введении за 15 мин до тотального рентгеновского облучения (X-ray) с мощностью 1 Гр/мин или γ -облучения с мощностью 0.125 Гр/мин в дозе 10 Гр.

Таблица 2. Влияние пероксиредоксина-6 и его лишенной пероксидазной активности мутантной формы Prx6-C47S на выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей Kv:SHK при внутривенном введении за 15 мин до тотального рентгеновского облучения (X-ray) с мощностью 1 Гр/мин или γ -облучения с мощностью 0.125 Гр/мин в дозе 10 Гр

№ группы	Группа	Средняя продолжительность жизни, сут	Выживаемость, %
1	Контроль 0 Гр	30	100
2	Контроль 10 Гр γ	14,1	0
3	Prx6 20 мкг/г + 10 Гр X-ray	7,2	10
4	Prx6 20 мкг/г + 10 Гр γ	28,2	80
5	Prx6-C47S 20 мкг/г + 10 Гр X-ray	2,4	0
6	Prx6-C47S 20 мкг/г + 10 Гр γ	18,8	40

группах Prx6 и Prx6-C47S выживаемость животных составила 10 и 0% соответственно, что согласуется с предыдущими результатами [15, 19]. Выживаемость в γ -облученных группах контроля, Prx6 и Prx6-C47S распределилась следующим образом: 0, 80 и 40% соответственно. Возвращаясь к первому опыту, видим, что выживаемость в 7 Гр X-ray-облученных группах контроля, Prx6 и Prx6-C47S была 0, 90 и 20% соответственно. Таким образом, в рамках эксперимента 10 Гр γ и 7 Гр X-ray были сопоставимы по воздействию на животных. Отметим, что средняя продолжительность жизни в группах 7 Гр γ Prx6-C47S и 10 Гр γ Prx6 почти равны (28.3 и 28.2), а выживаемость составляет 90 и 80% соответственно. С учетом того, что в Prx6-C47S отсутствует только пероксидазная активность, то разница в 3 Гр γ – вклад пероксидазой активности этого белка в повышение радиорезистентности, который соотносится с таковым для ранее полученных данных при облучении X-ray [19].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биологические эффекты, вызванные ионизирующим излучением, определяются такими факторами, как мощность дозы, общая доза, ЛПЭ, а также фракционирование и продление общих доз [7, 12]. Они также определяются другими факторами, такими как механизмы восстановления, «эффект свидетеля» и воздействие различных хи-

мических радиомодуляторов [7, 12, 21]. Известно, что ЛПЭ напрямую влияет на относительную биологическую эффективность (ОБЭ) конкретного типа излучения [22], но для излучения с низкой ЛПЭ X-ray или γ ОБЭ составляет 1.0, что позволяет оценивать дозы в Гр, тогда как для излучения с высокой ЛПЭ ОБЭ может широко варьироваться [7]. Таким образом, в условиях нашего эксперимента разницу ЛПЭ и ОБЭ между γ и X-ray можно не учитывать, а значит, все наблюдаемые эффекты обусловлены различной мощностью дозы и соответствующим временем облучения.

Увеличение ЛД_{50/30} и ЛД_{100/30} для γ -излучения с мощностью 0.125 Гр/мин как в опытных, так и в контрольной группах (рис. 1 и 3), по-видимому, обусловлено эффектом мощности дозы («спарринг-эффект»), который ранее был показан как для здоровых тканей, так и для раковых клеток [23, 24]. Пролонгированное воздействие ионизирующего излучения с низкой ЛПЭ в 5–10 раз менее эффективно, чем однократное острое воздействие [25]. При длительном облучении низкой мощностью наблюдается активация механизмов репарации клетки, включая системы антиоксидантной защиты, репарации ДНК, наблюдаются процессы перераспределения клеток по фазам клеточного цикла, репопуляция клеток и реоксигенация тканей [26–30]. Все эти процессы влияют на радиочувствительность тканей и клеток [31]. Адаптивный ответ, который проявляется в акти-

рации репарационных процессов клетки в ответ на множественные небольшие острые дозы ионизирующего излучения (или низкую мощность дозы, хроническое облучение), носит название радиационного гормезиса [6, 13]. По-видимому, в нашей работе увеличение ЛД_{100/30} для мышей kv:SHK на 3 Гр при γ -облучении (по сравнению с X-ray) обусловлено именно таким гормезис-подобным механизмом, в том числе из-за длительной процедуры облучения (10 Гр γ за 80 мин против 7 Гр X-ray за 7 мин).

Сведения о радиационном гормезисе противоречивы, а роль Prx в его реализации не изучена [13]. Помимо пероксидазной активности, Prx выполняют множество других функций в клетке: сенсоры уровня внутриклеточных пероксидов, регуляторы редокс-гомеостаза и шапероны [13, 32]. Роль Prx в предотвращении окислительного повреждения ДНК и неопластической трансформации не ограничивается нейтрализацией гидропероксидов. Они также напрямую участвуют в регуляции и защите процесса репликации [13] и необходимы для сборки веретена деления, организации хромосом и поляризации при клеточном делении [33]. Роль пероксидазной активности Prx двояка. Сверхэкспрессия Prx1 была способна снизить апоптоз в облученных клетках рака легких за счет подавления пути JNK (NH₂-концевой киназы c-Jun) и тот же эффект был отмечен с мутантом Cys52Ser, неактивным по пероксидазному центру [34]. Наоборот, с использованием мутантной формы Prx2 (не имеющей пероксидазной активности) на клетках гепатоцеллюлярной карциномы было показано, что пероксидазная активность Prx2 играет ведущую роль в контроле метастазирования раковых стволовых клеток [35]. Метаболическое перепрограммирование жирных кислот в опухоли может выступать регулятором как про-, так и противоопухолевых иммунных ответов [36]. Prx6 играет решающую роль в восстановлении окисленных фосфолипидов клеточных мембран, что обеспечивает устойчивость к действию окислительных факторов [3, 37], а aiPLA2 способствует метастазированию раковых клеток [15] и передаче провоспалительных сигналов, опосредованных арахидоновой кислотой [18]. Кроме того, Prx6 образует ионные каналы в мембране [38], что также может влиять на жизнеспособность клетки.

Во внеклеточном пространстве пероксиредоксина, включая Prx6, могут функционировать как молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMPs), активируя провоспалительные пути через рецептор TLR4 [17, 18]. Концентрация Prx6 в клетке/межклеточном пространстве (крови) и уровень экспрессии гена PRDX6 образуют систему регуляции с отрицательной обратной связью [19]. Prx6 потенциально может рецирку-

лировать между клеткой и внеклеточным пространством благодаря aiPLA2. По-видимому, окисленный экзогенный Prx6 (с увеличенной активностью aiPLA2) попадая в клетку восстанавливается и вновь секретируется, благодаря чему эффективно нейтрализует пероксиды как в клетке, так и во внеклеточном пространстве [17]. Благодаря пероксидазной и сигнально-регуляторной активности экзогенный Prx6 оказывает влияние на апоптоз, пролиферацию клеток, системы антиоксидантного ответа и репарации ДНК, что может найти практическое применение, например, для защиты здоровых тканей при лучевой терапии [15]. Однако сложность и неоднозначность радиозащитных/радиомодулирующих свойств экзогенного Prx6 затрудняют его практическое применение на данном этапе, несмотря на многообещающие результаты. В этом исследовании, как и в предыдущих [15, 19], мы продемонстрировали радиозащитный эффект экзогенных Prx6 и Prx6-C47S, и влияние на него различных параметров облучения. Выживаемость в γ -облученных группах 10 Гр и 7 Гр X-ray была соотносима по воздействию на животных как для контрольных, так и для опытных животных. Это предполагает пропорциональное увеличение степени летальности дозы и отсутствие явного модулирующего эффекта экзогенных Prx6 и Prx6-C47S на адаптивную реакцию. Наблюдаемое при этом небольшое снижение эффективности Prx6-C47S (относительно Prx6) при оценке ЛД_{100/30} для γ -облучения предполагает увеличение вклада пероксидазно-независимых радиозащитных свойств белка при уменьшении мощности дозы и увеличении времени воздействия фотонного ионизирующего излучения.

ВЫВОДЫ

Экзогенный Prx6 является одним из перспективных кандидатов для решения проблемы радиорезистентности рака и/или сопутствующего радиационного поражения нормальных тканей при лучевой терапии. В этой работе мы продемонстрировали, что, во-первых, мощность дозы и время облучения могут значительно изменять степень летальности дозы, несмотря на схожие ЛПЭ и ОБЭ, что, вероятно, обусловлено адаптивной реакцией. Во-вторых, впервые показано, что радиозащитный эффект внутривенного введения 20 мкг/г Prx6 и его пероксидазно-неактивного мутанта Prx6-C47S относительно пропорционален этому изменению. Выживаемость в группах «10 Гр γ -облучение» с мощностью дозы 0.125 Гр/мин и «7 Гр рентгеновское облучение» с мощностью дозы 1 Гр/мин (разница в 8 раз по мощности дозы и по времени воздействия) была соотносима по воздействию на животных, как для контрольных, так и для опытных. В-третьих,

небольшое снижение эффективности Prx6-C47S по сравнению с Prx6 предполагает увеличение вклада пероксидазно-независимых радиозащитных путей при уменьшении мощности дозы и увеличении времени воздействия фотонного излучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00070).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам Всероссийского научно-исследовательского института радиологии и агроэкологии Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Обнинск, Калужская область) Е.И. Карпенко, В. О. Кобылко, А. Н. Павлову за помощь с гамма-облучением животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с мышами проводились с учетом международных правил работы с лабораторными животными и требований Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИБК РАН. Протокол экспериментов одобрен Комиссией по биоэтике ИБК РАН (№ 39 от 04.12.2018).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. L. Martinez Marignac, L. Mondragon, and Favant J. L. Sources of ionizing radiation and their biological effects: An interdisciplinary view, from the physics to cell and molecular biology. *Clin. Cancer Investig. J.*, **8** (4), 129–138 (2019).
2. Hirota Y., Masunaga S., Kondo N., Kawabata S., Hirakawa H., Yajima H., Fujimori A., Ono K., Kuroiwa T., and Miyatake S. High linear-energy-transfer radiation can overcome radioresistance of glioma stem-like cells to low linear-energy-transfer radiation. *J. Radiat. Res.*, **55** (1), 75–83 (2014). DOI: 10.1093/jrr/rrt095
3. Fischer J., Eglinton T. W., Frizelle F. A., and Hampton M. B. Peroxiredoxins in colorectal cancer: predictive biomarkers of radiation response and therapeutic targets to increase radiation sensitivity? *Antioxidants (Basel)*, **7** (10), 136 (2018). DOI: 10.3390/antiox7100136
4. Checker R., Bhilwade H. N., Nandha S. R., Patwardhan R. S., Sharma D., and Sandur S. K. Withaferin A, a steroidal lactone, selectively protects normal lymphocytes against ionizing radiation induced apoptosis and genotoxicity via activation of ERK/Nrf-2/HO-1 axis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **461**, 116389 (2023). DOI: 10.1016/j.taap.2023.116389
5. Zhou T., Zhang L.-Y., He J.-Z., Miao Z.-M., Li Y.-Y., Zhang Y.-M., Liu Z.-W., Zhang S.-Z., Chen Y., Zhou G.-C., and Liu Y.-Q. Review: mechanisms and perspective treatment of radioresistance in non-small cell lung cancer. *Front. Immunol.*, **14**, 1133899 (2023). DOI: 10.3389/fimmu.2023.1133899
6. Porrazzo A., Cassandri M., D'Alessandro A., Morciano P., Rota R., Marampon F., and Cenci G. DNA repair in tumor radioresistance: insights from fruit flies genetics. *Cell Oncol. (Dordr.)*, **47** (3), 717–732 (2024). DOI: 10.1007/s13402-023-00906-6
7. Obrador E., Salvador R., Villaescusa J. I., Soriano J. M., Estrela J. M., and Montoro A. (2020). Radioprotection and radiomitigation: from the bench to clinical practice. *Biomedicines*, **8** (11), 461 (2020). DOI: 10.3390/biomedicines8110461
8. Cerda M. B., Lloyd R., Batalla M., Giannoni F., Casal M., and Policastro, L. Silencing peroxiredoxin-2 sensitizes human colorectal cancer cells to ionizing radiation and oxaliplatin. *Cancer Lett.*, **388**, 312–319 (2017). DOI: 10.1016/j.canlet.2016.12.009
9. Hao J., Song Z., Su J., Li L., Zou L., and Zou K. The PRX-1/TLR4 axis promotes hypoxia-induced radiotherapy resistance in non-small cell lung cancer by targeting the NF- κ B/p65 pathway. *Cell. Signal.*, **110**, 110806 (2023). DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110806
10. Li J., Sun Y., Zhao X., Y. Ma, Y. Xie, S. Liu, B. Hui, X. Shi, X. Sun, and Zhang X. Radiation induces IRAK1 expression to promote radioresistance by suppressing autophagic cell death via decreasing the ubiquitination of PRDX1 in glioma cells. *Cells Death Dis.*, **14** (4), 259 (2023). DOI: 10.1038/s41419-023-05732-0
11. Ding N., Jiang H., Thapa P., Hao Y., Alshahrani A., Allison D., Izumi T., Rangnekar V. M., Liu X., and Wei Q. Peroxiredoxin IV plays a critical role in cancer cell growth and radioresistance through the activation of the Akt/GSK3 signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **298** (7), 102123 (2022). DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102123
12. Аклев А. В. Радиобиологические закономерности реакции нормальных тканей при лучевой терапии опухолей. *Радиац. биол. Радиоэкол.*, **54** (3), 241 (2014).
13. Forshaw T. E., Holmila R., Nelson K. J., Lewis J. E., Kemp M. L., Tsang A. W., Poole L. B., Lowther W. T., and Furdul C. M. Peroxiredoxins in cancer and response to radiation therapies. *Antioxidants*, **8** (1), 11 (2019). DOI: 10.3390/antiox8010011
14. Novoselova E. G., Sharapov M. G., Lunin S. M., Parfenyuk S. B., Khrenov M. O., Mubarakshina E. K., Kuzekova A. A., Novoselova T. V., Goncharov R. G., and

- Glushkova O. V. Peroxiredoxin 6 applied after exposure attenuates damaging effects of X-ray radiation in 3T3 mouse fibroblasts. *Antioxidants* **10** (12), 1951 (2021). DOI: 10.3390/antiox10121951
15. Sharapov M. G., Novoselov V. I., and Gudkov S. V. Radioprotective role of peroxiredoxin 6. *Antioxidants*, **8** (1), 15 (2019). DOI: 10.3390/antiox8010015
 16. Новоселов В. И. Роль пероксиредоксинов при окислительном стрессе в органах дыхания. *Пульмонология*, **1**, 83–87 (2012).
 17. Sharapov M. G., Goncharov R. G., Parfenyuk S. B., Glushkova O. V., and Novoselov V. I. The role of phospholipase activity of peroxiredoxin 6 in its transmembrane transport and protective properties. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (23), 15265 (2022). DOI: 10.3390/ijms232315265
 18. Salovska B., Kondelova A., Pimkova K., Liblova Z., Pribyl M., Fabrik I., Bartek J., Vajrychova M., and Hodny Z. Peroxiredoxin 6 protects irradiated cells from oxidative stress and shapes their senescence-associated cytokine landscape. *Redox Biol.*, **49**, 102212 (2022). DOI: 10.1016/j.redox.2021.102212
 19. Sharapov M. G., Novoselov V. I., Fesenko E. E., Bruskov V. I., and Gudkov S. V. The role of peroxiredoxin 6 in neutralization of X-ray mediated oxidative stress: Effects on gene expression, preservation of radiosensitive tissues and postradiation survival of animals. *Free Rad. Res.*, **51** (2), 148–166 (2017). DOI: 10.1080/10715762.2017.1289377
 20. Sharapov M. G., Novoselov V. I., and Ravin V. K. The cloning, expression, and comparative analysis of peroxiredoxin 6 from various sources. *Mol. Biol.*, **43**, 465–471 (2009). DOI: 10.1134/S0026893309030145
 21. Nagataki S. and Takamura N. Radioactive doses – predicted and actual – and likely health effects. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*, **28** (4), 245–254 (2016). DOI: 10.1016/j.clon.2015.12.028
 22. Jeon J. Review of therapeutic applications of radiolabeled functional nanomaterials. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2323 (2019). DOI: 10.3390/ijms20092323
 23. Down J. D., Easton D. F., and Steel G. G. Repair in the mouse lung during low dose-rate irradiation. *Radiation Oncol.*, **6** (1), 29–42 (1986). DOI: 10.1016/s0167-8140(86)80107-4
 24. Thames H. D. An “incomplete-repair” model for survival after fractionated and continuous irradiations. *Int. J. Radiat. Biol.*, **47** (1), 319–339 (1985). DOI: 10.1080/09553008514550461
 25. Richardson R. B. Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea. *Aging (Albany NY)*, **1** (11), 887–902 (2009). DOI: 10.18632/aging.100081
 26. Kang H., Kim B., Park J., Youn H.-S., and Youn B.-H. The Warburg effect on radioresistance: Survival beyond growth. *Biochim. Biophys. Acta*, **1878** (6), 188988 (2023). DOI: 10.1016/j.bbcan.2023.188988
 27. Mao G., Yao Y., and Kong Z. Long term exposure to γ -rays induces radioresistance and enhances the migration ability of bladder cancer cells. *Mol. Med. Rep.*, **18** (6), 5834–5840 (2018). DOI: 10.3892/mmr.2018.9605
 28. Chen N., Wu L., Yuan H., and Wang J. ROS/Autophagy/Nrf2 pathway mediated low-dose radiation induced radio-resistance in human lung adenocarcinoma A549 cell. *Int. J. Biol. Sci.*, **11** (7), 833–844 (2015). DOI: 10.7150/ijbs.10564
 29. Abad E., Graifer D., and Lyakhovich A. DNA damage response and resistance of cancer stem cells. *Cancer Lett.*, **474**, 106–117 (2020). DOI: 10.1016/j.canlet.2020.01.008
 30. Fan M., Ahmed K. M., Coleman M. C., Spitz D. R., and Li J. J. Nuclear factor- κ B and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells. *Cancer Res.*, **67** (7), 3220–3228 (2007). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2728
 31. Steel G. G., McMillan T. J., and Peacock J. H. The 5Rs of radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.*, **56** (6), 1045 (1989). DOI: 10.1080/09553008914552491
 32. Villar S. F., Ferrer-Sueta G., and Denicola A. The multifaceted nature of peroxiredoxins in chemical biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **76**, 102355 (2023). DOI: 10.1016/j.cbpa.2023.102355
 33. Jeon H.-J., Park Y. S., Cho D.-H., Kim J.-S., Kim E., Chae H. Z., Chun S.-Y., and Oh J. S. Peroxiredoxins are required for spindle assembly, chromosome organization, and polarization in mouse oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **489** (2), 193 (2017). DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.127
 34. Kim Y. J., Lee W. S., Ip C., Chae H. Z., Park E. M., and Park Y. M. Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex. *Cancer Res.*, **66** (14), 7136–7142 (2006). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4446
 35. Son Y. W., Cheon M. G., Kim Y., and Jang H. H. Prx2 links ROS homeostasis to stemness of cancer stem cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **134**, 260–267 (2019).
 36. M. De Martino, C. Daviaud, E. Hajjar, and C. Vanpouille-Box, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **376**, 121 (2023). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.001
 37. Li H., Benipal B., Zhou S., Dodia C., Chatterjee S., Tao J. Q., Sorokina E. M., Raabe T., Feinstein S. I., and Fisher A. B. Critical role of peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes following oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **87**, 356–365 (2015). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.009
 38. Григорьев П. А., Шаратов М. Г. и Новоселов В. И. Потенциал-зависимые катионные каналы, формируемые пероксиредоксином-6 в липидном бислое. *Биофизика*, **60** (4), 696–699 (2015).

Radioprotective Effect of Exogenous Peroxiredoxin 6 in Mice Exposed to Different Doses of Whole-Body Ionizing Radiation

E.E. Karmanova*, R.G. Goncharov*, V.I. Bruskov**, V.I. Novoselov*, and M.G. Sharapov*

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

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

The search for effective and safe radio-modulating compounds that reduce cancer cell radioresistance and/or the concomitant damage to normal tissues caused by radiation remains a significant challenge in radiation therapy. Peroxiredoxin 6, a member of the thiol-specific peroxidase family, is a promising candidate to solve this problem. However, often in studies, insufficient attention is paid to radiation parameters, and there is no information about how different radiation parameters influence the radioprotective effect of exogenous peroxiredoxin 6. This article shows the peculiarities of the radioprotective effects of intravenous peroxiredoxin 6 at a concentration of 20 µg/g body weight and its mutant form Prx6-C47S (without peroxidase activity) administered shortly before X-ray or γ-irradiation with different dose rates and exposure times. Survival rates of the “10 Gy γ-irradiation 0.125 Gy/min” and “7 Gy X-ray irradiation 1 Gy/min” animal groups (8-fold difference in dose rate and exposure time) were correlated both for control and experimental animals.

Keywords: Prx6, radioprotector, X-ray radiation, γ-radiation, dose rate

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКИХ ЧАСТОТ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ДИСБАКТЕРИОЗА КИШЕЧНИКА У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

© 2024 г. А.Б. Гапеев^{*,#}, Т.П. Кулагина^{*}, Е.С. Жукова^{**},
А.В. Ариповский^{***}, М.А. Позднякова^{**}

^{*}Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

^{**}Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и пропатографии Роспотребнадзора,
ул. Семашко, 20, Нижний Новгород, 603005, Россия

^{***}Научно-производственная компания «А-БИО»,
Институтская ул., 4, Пушкино Московской области, 142290, Россия

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

Поступила в редакцию 14.06.2024 г.

После доработки 08.07.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

На экспериментальной модели дисбактериоза, вызванного антибиотиком гентамицин сульфатом, исследовано действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот (42.2 ГГц, 100 мкВт/см², импульсная модуляция меандром с частотой 1 Гц, экспозиция по 30 мин в сутки в течение 10 последовательных суток, начиная с четвертых суток после индукции дисбактериоза) на жирнокислотный состав тимуса, плазмы крови, активность антиоксидантных ферментов, количество малонового диальдегида и лактата в крови лабораторных крыс. Показано достоверное снижение количества миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, пальмитолеиновой, олеиновой и линолевой жирных кислот в тимусе животных. Активность антиоксидантных ферментов, количество жирных кислот и малонового диальдегида в крови не изменялись. Количество лактата в плазме крови снижалось. Облучение животных с дисбактериозом нормализовало жирнокислотный состав тимуса и количество лактата в плазме. Высокая эффективность низкоинтенсивного крайневыхсо-частотного электромагнитного излучения с определенными параметрами при дисбактериозе открывает принципиально новые возможности использования излучения этого диапазона для профилактики и терапии целого ряда патологических состояний, связанных с дисбактериозом.

Ключевые слова: низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высоких частот, дисбактериоз кишечника, тимус, жирные кислоты, лактат, антиоксидантный статус.

DOI: 10.31857/S0006302924060208, EDN: NJPUAD

Дисбактериоз кишечной микрофлоры играет ключевую роль в патогенезе многих заболеваний. Исследования показали, что дисбаланс кишечной флоры является критическим фактором прогрессирования воспалительных заболеваний кишечника. Хотя точное происхождение этих заболеваний до сих пор неясно, оно считается болезнью современного общества, вызванной

сложным взаимодействием между окружающей средой, геномом, иммунной системой и микрофлорой кишечника (микробиотой) [1, 2]. Разработка терапевтических подходов для лечения заболеваний, связанных с дисбактериозом, и выяснение биохимических процессов, сопровождающих это заболевание в организме, возможна при использовании животных моделей, представляющих собой основной доклинический подход для изучения и тестирования новых потенциальных терапевтических схем. Важным является поиск факторов, восстанавливающих нормальную микрофлору кишечника, которые не имеют тяжелых побочных эффектов.

Сокращения: ЭМИ КВЧ – электромагнитное излучение крайне высоких частот, ЖК – жирные кислоты, МДА – малоновый диальдегид, НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – моновенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

Уже в первых исследованиях было обнаружено выраженное влияние электромагнитного излучения крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ) на различные микроорганизмы [3–5]. Было показано резонансное двух-трехкратное изменение коэффициента индукции синтеза колицина у бактерий *E. coli* C600(E1) в диапазоне длин волн излучения 6.5–6.6 мм [6]. При исследовании действия ЭМИ КВЧ (6.45–6.51 мм) на пенициллин-резистентные штаммы *E. coli* и *Staphylococcus aureus* наблюдалось уменьшение синтеза β -лактамазы на 15–21% в клетках *Staphylococcus aureus* на длинах волн 6.47 и 6.48 мм и отсутствие эффекта на длине волны 6.475 мм [6]. Было показано, что ЭМИ КВЧ усиливает потребление кислорода клетками морских бактерий *Photobacterium leiognathi*, приводит к изменению интенсивности их биолюминесценции, что связано со структурными перестройками на мембране вблизи эмиттерного центра [7, 8]. Возможность регулирования жизнедеятельности микроорганизмов при воздействии на них ЭМИ КВЧ была исследована в работе [9]. Определяли изменение синтеза амилолитических ферментов α -амилазы и глюкоамилазы для плесневого гриба *Aspergillus awamory*–466 и протеолитических ферментов фибрина и казеина для *Aspergillus oryzae* под действием ЭМИ КВЧ с частотами 42.8–48.7 ГГц.

К настоящему времени получены убедительные данные о том, что ЭМИ КВЧ низкой интенсивности эффективно влияет на различные физиологические показатели многоклеточных организмов. Мы показали, в частности, что ЭМИ КВЧ с определенными параметрами способно оказывать выраженное иммуномодулирующее [10–13], противовоспалительное [14] и противоопухолевое [15] действие. Эти и другие результаты позволяют надеяться на наличие выраженных терапевтических эффектов ЭМИ КВЧ при дисбактериозе.

Ранее в экспериментах, выполненных в Нижегородском научно-исследовательском институте гигиены и профпатологии Роспотребнадзора на экспериментальной модели дисбактериоза, было показано количественное изменение состава микрофлоры кишечника [16]. Воздействие ЭМИ КВЧ с эффективными параметрами (42.2 ГГц, 100 мкВт/см², импульсная модуляция меандром с частотой 1 Гц, экспозиция по 30 мин в сут в течение 10 последовательных суток) на животных с дисбактериозом показало восстановление состава микрофлоры до уровня контрольных животных.

Цель настоящей работы состояла в исследовании действия низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ с определенными параметрами на жирнокислотный состав тимуса и плазмы крови крыс, биохимические показатели крови (содержание гемо-

глобина, активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, количество малонового диальдегида и лактата) при экспериментальном антибиотико-индуцированном дисбактериозе кишечника крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на самцах рандомбредных крыс-альбиносов, разделенных на три группы ($n \geq 7$): «контроль», «дисбактериоз», «дисбактериоз + ЭМИ КВЧ». Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным освещением, получали полнорационный комбикорм ПК-120-2_243 (АО «Гатчинский ККЗ», Россия) и без ограничений питьевую водопроводную воду. Для создания репрезентативных групп оценивали поведение подопытных животных в тесте «открытое поле» [17] с использованием установки, описанной в работе [18]. Условия содержания крыс соответствовали СП 3.3686-21 (ветеринарное заключение №52-005858 от 21.06.2021).

Для моделирования дисбактериоза кишечника у крыс использовали антибиотик гентамицин сульфат («ВИК – здоровье животных», Россия, Беларусь), который вводили с помощью инсулинового шприца без иглы перорально по 30 мг в сутки на протяжении 5 суток [16]. Воздействие ЭМИ КВЧ (42.2 ГГц, 100 мкВт/см², импульсная модуляция меандром с частотой 1 Гц, экспозиция по 30 мин в сутки) осуществляли в течение 10 последовательных суток, начиная с четвертых суток после первого введения гентамицин сульфата. Использовали параметры и режимы воздействия электромагнитного сигнала, высокая эффективность которых в отношении иммунных реакций, воспалительных процессов и опухолевого роста были показаны нами ранее [19]. Определяли содержание жирных кислот (ЖК) в тимусе и плазме крови, количество лактата в плазме крови, активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах и содержание малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах и плазме крови животных. Кровь (~5 мл) собирали на 18-е сутки при выводе крыс из эксперимента декапитацией (гильотина для крыс, НПК «Открытая наука», Россия) [20]. В качестве антикоагулянта использовали 200 мкл 10%-го раствора ЭДТА-Na₂ (PanReac AppliChem, Испания). При определении содержания лактата в кровь дополнительно добавляли натрия фторид для ингибирования гликолиза. Плазму получали осаждением форменных элементов крови при 3000 об/мин в течение 15 мин (1050 g, центрифуга Z206A, HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). Эритроциты отмывали путем трехкратного повторного добавления 0.9% изотонического раствора хлорида натрия (в соотношении 1 : 3) и удаления надосадочной жидкости после центри-

фугирования (10 мин при 3000 об/мин (центрифуга Z206A, HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). Извлекали тимусы, промывали в охлажденном во льду 0.9% изотоническом растворе хлорида натрия (ООО «Мосфарм», Россия) и гомогенизировали в этом же растворе. К образцам плазмы и гомогенатам ткани тимуса (≈ 0.15 мл) добавляли 0.15 мл 95% этанола с 0.3 мг антиоксиданта ионола (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол) для стабилизации и хранили при $-(18-20)^{\circ}\text{C}$ до определения жирнокислотного состава [21]. Измерение лактата в плазме крови проводили спектрофотометрическим методом с использованием коммерческого набора реагентов «Молочная кислота – Ольвекс» (ООО «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург, Россия) согласно инструкции. Измерения проводили на спектрофотометре УФ-1200 (ТМ ЭКОВЬЮ, Китай). Для исследования активности антиоксидантных ферментов эритроциты гемолизировали в 0.015 М трис-НСI буфере (рН 8.0), а для исследования содержания МДА – в дистиллированной воде в разведении 1 : 20.

Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы. Активность супероксиддисмутазы определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзиматической системе феназинметасульфата и никотинамидадениндинуклеотида, каталазы – по изменению оптической плотности в области поглощения пероксида водорода [22]. Концентрацию гемоглобина в эритроцитах определяли гемиглобинцианидным методом с помощью коммерческого набора «Гемоглобин Агат» (ООО «Агат-Мед», Россия) согласно инструкции. Содержание МДА в плазме и эритроцитах крови определяли по тесту с тиобарбитуровой кислотой [22].

Жирнокислотный состав образцов определяли методом газовой хроматографии на аналитическом газовом хроматографе GC 3900 (Varian, США), как описано ранее [21]. Концентрацию индивидуальных ЖК в образцах определяли с использованием внутреннего стандарта (с предварительным вычислением соответствующих калибровочных коэффициентов из хроматограмм смеси определяемых ЖК с маргариновой кислотой C17:0 (Sigma, США)).

Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента–Ньюмена–Кейлса при нормальном распределении данных по тесту Шапиро–Уилка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воспроизведение модели антибиотико-индуцированного дисбактериоза кишечника крыс было подтверждено культуральным методом. После воздействия ЭМИ КВЧ наблюдалось восстановление общего количества жизнеспособных микроорганизмов ($p < 0.03$ по сравнению с уровнем в группе «гентамицин» по множественному критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса). Статистически значимые изменения концентрации индивидуальных ЖК были выявлены в тимусе на 18 сутки после вызванного дисбактериоза. Происходило снижение количества насыщенных миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, моновенасыщенных пальмитолеиновой, олеиновой и полиненасыщенной линолевой кислот, а также снижение общего количества насыщенных ЖК (НЖК), моновенасыщенных ЖК (МНЖК) и полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) (табл. 1). Статистически значимые изменения количества ЖК в плазме крови животных не выявлены (табл. 2). Экспериментальный дисбактериоз не повлиял на состояние антиоксидантной системы крови ни в один из периодов исследования (табл. 3). Однако на 18 сутки наблюдалось снижение количества лактата в плазме крови у животных после воздействия гентамицин сульфата, которое восстанавливалось до уровня контроля после воздействия ЭМИ КВЧ (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кишечная микробиота является основой для развития иммунной системы хозяина, которая участвует в поддержании гомеостаза кишечника путем стимуляции иммунного ответа. Нездоровые «дисбалансы» в микробиоте, называемые дисбиозом, связаны с множеством заболеваний различной этиологии, включая воспалительные заболевания кишечника, аутоиммунные заболевания, ожирение, метаболический синдром и даже нарушения развития нервной системы. Многочисленные исследования свидетельствуют о наличии тесной связи между микробиотой кишечника и иммунитетом. Одним из основных механизмов влияния микробиоты на такие заболевания является ее хроническое взаимодействие и воздействие на иммунную систему хозяина [23–25]. Вопрос о том, каким образом происходит запуск микробиотой кишечника хронических врожденных и адаптивных иммунных реакций, остается открытым [26–28].

Тимус наряду с селезенкой являются основными иммунными органами. Тимус участвует в созревании и развитии Т-клеток в ответ на воспалительный процесс, иммунный ответ или злокачественные новообразования. На мышинной модели рака предстательной железы показана сложная

Таблица 1. Содержание ЖК в ткани тимуса крыс при моделировании дисбактериоза и воздействии ЭМИ КВЧ через 18 суток после индукции дисбактериоза

Жирные кислоты	Контроль	Дисбактериоз	Дисбактериоз + ЭМИ КВЧ
Миристиновая (C14:0)	0.42 ± 0.11	0.22 ± 0.02*	0.38 ± 0.11
Пальмитиновая (C16:0)	5.33 ± 0.55	3.44 ± 0.26*	6.22 ± 0.66
Стеариновая (C18:0)	4.43 ± 0.87	1.46 ± 0.05*	3.26 ± 0.61
Пальмитолеиновая (C16:1, <i>n</i> -7)	0.77 ± 0.11	0.44 ± 0.05*	0.92 ± 0.11
Олеиновая (C18:1, <i>n</i> -9)	6.10 ± 0.90	3.98 ± 0.26*	7.36 ± 0.91
Линолевая (C18:2, <i>n</i> -6)	7.63 ± 1.66	3.10 ± 0.28*	7.90 ± 1.95
α-линоленовая (C18:3, <i>n</i> -3)	0.15 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.18 ± 0.04
Эйкозодиеновая (C20:2, <i>n</i> -6)	0.20 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.19 ± 0.02
Эйкозатриеновая (C20:3, <i>n</i> -6)	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Арахидоновая (C20:4, <i>n</i> -6)	1.63 ± 0.09	1.66 ± 0.10	3.55 ± 1.59
Докозопентаеновая (C22:5, <i>n</i> -3)	0.050 ± 0.005	0.042 ± 0.006	0.039 ± 0.004
Докозагексаеновая (C22:6, <i>n</i> -3)	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
НЖК	10.18 ± 1.17	5.12 ± 0.25*	9.87 ± 1.23
МНЖК	6.87 ± 0.89	4.42 ± 0.30*	8.28 ± 0.94
ПНЖК	9.86 ± 1.70	5.11 ± 0.37*	12.40 ± 2.96
Сумма ЖК (мкг/мг ткани)	26.91 ± 3.39	14.65 ± 0.88*	30.55 ± 4.88
Масса тимусов, г	0.47 ± 0.02	0.38 ± 0.03*	0.47 ± 0.03

Примечание. Жирные кислоты обозначаются следующим образом: тривиальное название (IUPAC формула), в формуле первая цифра — число атомов углерода в молекуле кислоты, цифра после двоеточия — число двойных связей, цифры после символа *n* указывает на атомы углерода, при которых располагается первая двойная связь от метильного конца молекулы кислоты; * $p < 0.015$ относительно контроля и ЭМИ КВЧ по множественному критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

Таблица 2. Жирнокислотный состав плазмы крови при моделировании дисбактериоза и воздействии ЭМИ КВЧ через 18 суток после индукции дисбактериоза

Жирные кислоты	Контроль	Дисбактериоз	Дисбактериоз + ЭМИ КВЧ
Пальмитиновая (C16:0)	3.66 ± 0.51	3.31 ± 0.24	4.01 ± 0.30
Стеариновая (C18:0)	2.02 ± 0.12	2.44 ± 0.21	2.40 ± 0.18
Пальмитолеиновая (C16:1, <i>n</i> -7)	0.26 ± 0.06	0.16 ± 0.03	0.31 ± 0.06
Олеиновая (C18:1, <i>n</i> -9)	3.68 ± 0.54	3.28 ± 0.30	4.13 ± 0.54
Линолевая (C18:2, <i>n</i> -6)	5.72 ± 0.91	5.16 ± 0.43	6.54 ± 0.83
α-линоленовая (C18:3, <i>n</i> -3)	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Эйкозодиеновая (C20:2, <i>n</i> -6)	0.11 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.02
Эйкозатриеновая (C20:3, <i>n</i> -6)	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Арахидоновая (C20:4, <i>n</i> -6)	3.73 ± 0.29	4.22 ± 0.17	4.53 ± 0.27
Эйкозопентаеновая (C20:5, <i>n</i> -3)	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Докозопентаеновая (C22:5, <i>n</i> -3)	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Докозагексаеновая (C22:6, <i>n</i> -3)	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.35 ± 0.03
НЖК	5.68 ± 0.56	5.75 ± 0.36	6.40 ± 0.18
МНЖК	3.94 ± 0.60	3.44 ± 0.32	4.44 ± 0.59
ПНЖК	10.33 ± 1.18	10.26 ± 0.71	12.10 ± 1.36
Сумма ЖК (мкг/мл)	19.95 ± 2.33	19.45 ± 1.07	22.94 ± 1.38

Примечание. Жирные кислоты обозначаются следующим образом: тривиальное название (IUPAC формула), в формуле первая цифра — число атомов углерода в молекуле кислоты, цифра после двоеточия — число двойных связей, цифры после символа *n* указывает на атомы углерода, при которых располагается первая двойная связь от метильного конца молекулы кислоты.

Таблица 3. Биохимические показатели крови крыс при моделировании дисбактериоза и воздействии ЭМИ КВЧ через 18 суток после индукции дисбактериоза

Показатели	Контроль	Дисбактериоз	Дисбактериоз + ЭМИ КВЧ
Содержание гемоглобина, г/л	251.0 ± 13.0	249.0 ± 12.0	247.0 ± 15.0
Активность супероксиддисмутазы в эритроцитах, ед.акт./г гемоглобина	48.0 ± 12.0	50.0 ± 13.0	52.0 ± 15.0
Активность каталазы в эритроцитах, ед.акт./г гемоглобина	25.5 ± 4.1	25.1 ± 4.6	22.0 ± 4.4
Содержание МДА в эритроцитах, мкМ	42.6 ± 3.0	42.5 ± 3.2	41.2 ± 1.5
Содержание МДА в плазме крови, мкМ	4.7 ± 0.4	4.7 ± 0.4	4.6 ± 0.2
Содержание лактата в плазме крови, мМ	2.3 ± 0.8	1.5 ± 0.4*	2.4 ± 1.2

Примечание. * $p < 0.015$ относительно контроля и ЭМИ КВЧ по множественному критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

взаимосвязь между микробиотой кишечника, опухолью и функцией тимуса, взаимоотношение между тимус-зависимыми Т-лимфоцитами и кишечной микробиотой [29]. Один из основных иммунорегуляторных ответов на микробиоту включает индукцию кишечных регуляторных Т-клеток. Важным механизмом, с помощью которого микробиота кишечника, по-видимому, влияет на здоровье хозяина, является стимуляция хронического ответа клеток Th1 и/или Th17 [25], которые мигрируют из тимуса к месту патологии. Наблюдаемое в наших экспериментах статистически значимое снижение массы тимусов через 18 суток после индукции дисбактериоза дает основание полагать, что это снижение обусловлено миграцией Т-клеток к месту воспаления. Наряду со снижением массы тимусов наблюдалось снижение количества ЖК. Жирные кислоты играют важную роль в иммунологических реакциях [30]. Показано, что миристиновая кислота наряду с пальмитиновой, стеариновой и линолевой кислотами дозозависимо снижали пролиферацию лимфоцитов из крови быка и усиливали клеточную гибель, а также значительно снижали секрецию гамма-интерферона и IL-4 [31]. Насыщенная пальмитиновая кислота способна индуцировать экспрессию COX-2 и способствовать образованию PGE2/D2, которые, в свою очередь, являются причиной нарушения фагоцитоза, индуцированного пальмитиновой кислотой. С использованием альвеолярных макрофагов показано, что простагландины, включая PGE 2, снижают фагоцитоз [32, 33]. Эти наблюдения согласуются с данными о том, что насыщенные ЖК подавляют активность макрофагов [34]. Однако механизм стимулирования пальмитиновой кислотой провоспалительных реакций недостаточно

изучен. Стеариновая кислота наряду с пальмитиновой кислотой обладает провоспалительными свойствами, усиливает воспаление, индуцируя супероксид-анион [35]. Полученные нами ранее данные указывают на существенное влияние ЭМИ КВЧ на активность иммунной системы лабораторных животных [36].

МНЖК, количество которых также снижалось в тимусе через 18 суток, обладают про- и противовоспалительными свойствами. Вакциновая кислота вызывала воспаление эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Эта кислота значительно активировала TLR4, которые стимулируют воспалительные клетки к выработке провоспалительного фактора, который управляет воспалительными реакциями [37]. Кроме того, пальмитолеиновая кислота снижала количество макрофагов в печени и уменьшала воспалительную реакцию, ингибируя фосфорилирование ядерного фактора NF-κB p65 [38].

Линолевая кислота может снижать функцию иммунных клеток. С использованием изолированных CD4+Т-клеток человека и мыши показано ингибирование линолевой кислотой дифференцировки клеток Th1 и Th17 и снижение выработки IL-17 и IFN-γ. Аналогичным образом линолевая кислота индуцировала гибель CD4+Т-клеток [39]. Исследования *in vitro* показали, что линолевая кислота усиливала некоторые реакции нейтрофилов, такие как окислительный стресс, выработка активных форм кислорода, тромбосана, TNF-α, COX-2, IL-8, IL-1β. Кроме того, линолевая кислота увеличивала продукцию активных форм кислорода в клетках THP-1, образующихся из макрофагов, и уменьшала количество мРНК, кодирующих антиоксидантные ферменты — каталазу, глутатионпероксидазу и

супероксиддисмутазу-1. Однако снижение количества этих мРНК не влияло на активность самих ферментов [40]. Снижение содержания НЖК и МНЖК в клетках тимуса через 18 суток после индукции экспериментального дисбактериоза свидетельствует о сложных взаимоотношениях клеток тимуса и микробиома кишечника. В наших экспериментах не обнаружено изменений количества длинноцепочечных ЖК в плазме крови животных с дисбактериозом в этот период исследования. Вероятно, это связано с тем, что кишечная флора может регулировать иммунные реакции и устраняет воспаление, увеличивая секрецию метаболически активных короткоцепочечных ЖК [41,42].

Отсутствие изменений активности антиоксидантных ферментов и количества МДА в эритроцитах и плазме крови, вероятно, связано с тем, что дисбактериоз является стадией, предшествующей развитию тяжелых заболеваний кишечника, и не вызывает значимых изменений окислительно-восстановительного баланса в организме животных. Однако при дисбактериозе происходило значительное снижение количества лактата в плазме крови. Обычно лактат повышен в плазме крови при различных тяжелых заболеваниях, сопровождающихся воспалительными заболеваниями кишечника, такими как острый панкреатит [43] и церебральный инфаркт [44] у экспериментальных животных. Ранее повышение уровня лактата в биосредах организма интерпретировали как неблагоприятный метаболический фактор. В настоящее время полагают, что лактат выступает в качестве ключевого фактора метаболического перепрограммирования организма, опосредующего цепь обменных процессов, представляющих собой важную адаптивную реакцию в условиях стресса [45]. Вероятно, снижение его количества в плазме крови на 18 сутки после индукции дисбактериоза связано с уменьшением количества микроорганизмов в кишечнике. Восстановление его количества до контрольного уровня после воздействия ЭМИ КВЧ с выбранным режимом способно оказывать терапевтический эффект при экспериментальном дисбактериозе кишечника у крыс.

Таким образом, показано, что воздействие низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на животных с дисбактериозом восстанавливает содержание ЖК в тимусе и количество лактата в плазме крови до контрольных уровней. Высокая эффективность низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ при дисбактериозе открывает принципиально новые возможности использования ЭМИ КВЧ для профилактики и терапии целого ряда патологических состояний, связанных с изменениями микробиома.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем глубокую признательность д.б.н., профессору Т. Г. Щербатюк за идею, научное консультирование и содействие в организации и проведении работы. Благодарим за активную помощь к.ф.-м.н. Р. Н. Храмова, ведущего научного сотрудника ИТЭБ РАН, которую он оказал при обсуждении способов моделирования дисбактериоза у лабораторных животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075–00609–24–02 на 2024–2026 гг.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили согласно рекомендациям, установленным Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях. Исследование одобрено комиссией по регулированию проведения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных ННИИГП Роспотребнадзора (протокол № 1 от 19 июня 2023 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gagliardi M., Monzani R., Clemente N., Fusaro L., Saverio V., Grieco G., Pańcyszyn E., Yissachar N., Boccafroschi F., and Corazzari M. A gut-ex-vivo system to study gut inflammation associated to inflammatory bowel disease (IBD). *Biology (Basel)*, **10** (7), 605 (2021). DOI: 10.3390/biology10070605
2. Focchi C. and Iliopoulos D. What's new in IBD therapy: an "omics network" approach. *Pharmacol. Res.*, **159**, 104886 (2020). DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104886
3. Виленская Р. П., Севастьянова Л. А. и Фалеев А. С. Исследование поглощения ММ-волн в коже экспериментальных животных. *Электроника СВЧ*, **7**, 97–103 (1971).
4. Виленская Р. П., Гельвич Э. А., Голант М. Б. и Смолянская А. З. О характере воздействия ММ-излучения на синтез колицина. *Научн. докл. высш. шк. Сер. биол. науки*, **7**, 69–71 (1972).
5. Смолянская А. З., Виленская Р. Л. и Голант М. Б. Действие электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на функциональную активность

- некоторых генетических элементов бактериальных клеток. *Успехи физ. наук*, **110** (3), 458–460 (1973).
6. Смолянская А. З., Гельвич Э. А., Голант М. Б. и Махов А. М. Резонансные явления при действии электромагнитных волн миллиметрового диапазона на биологические объекты. *Успехи совр. биологии*, **87** (3), 381–392 (1979).
 7. Бержанская Л. Ю., Белоплотова О. Ю. и Бержанский В. Н. Влияние электромагнитного излучения КВЧ-диапазона на биолюминесценцию бактерий. *Миллиметровые волны в биологии и медицине*, **2**, 63–67 (1993).
 8. Дрокина Т. В. и Попова Л. Ю. Действие миллиметровых электромагнитных волн на люминесценцию бактерий. *Биофизика*, **43** (3), 522–525 (1998).
 9. Голант М. Б., Брюхова А. К., Двадцатова Е. А., Ландау Н. С., Реброва Т. Б. и Охохонина Г. М. Возможность регулирования жизнедеятельности микроорганизмов при воздействии на них электромагнитных колебаний миллиметрового диапазона. В сб. *Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты*, под ред. Н. Д. Девяткова (ИРЭ АН СССР, М., 1983), сс. 115–122.
 10. Лушников К. В., Гапеев А. Б., Садовников В. Б. и Чемерис Н. К. Влияние крайневых высокочастотного электромагнитного излучения низкой интенсивности на показатели гуморального иммунитета здоровых мышей. *Биофизика*, **46** (4), 753–760 (2001).
 11. Лушников К. В., Гапеев А. Б. и Чемерис Н. К. Влияние электромагнитного излучения крайне высоких частот на иммунную систему и системная регуляция гомеостаза. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **42** (5), 533–545 (2002).
 12. Лушников К. В., Гапеев А. Б., Шумилина Ю. В., Шибаев Н. В., Садовников В. Б. и Чемерис Н. К. Снижение интенсивности клеточного иммунного ответа и неспецифического воспаления при действии электромагнитного излучения крайне высоких частот. *Биофизика*, **48** (5), 918–925 (2003). EDN: OOKAXD
 13. Коломыцева М. П., Гапеев А. Б., Садовников В. Б. и Чемерис Н. К. Подавление неспецифической резистентности организма при действии крайневых высокочастотного электромагнитного излучения низкой интенсивности. *Биофизика*, **47** (1), 71–77 (2002).
 14. Гапеев А. Б., Лушников К. В., Шумилина Ю. В. и Чемерис Н. К. Фармакологический анализ противовоспалительного действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот. *Биофизика*, **51** (6), 1055–1068 (2006). EDN: OPRJEZ
 15. Гапеев А. Б., Швед Д. М., Михайлик Е. Н., Корыстов Ю. Н., Левитман М. Х., Шапошникова В. В., Садовников В. Б., Алехин А. И., Гончаров Н. Г. и Чемерис Н. К. Исследование противоопухолевого действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот на модели солидной карциномы Эрлиха. *Биофизика*, **54** (6), 1128–1136 (2009). EDN: LOZDTH
 16. Жукова Е. С., Шербатюк Т. Г., Позднякова М. А. и Умнягина И. А. *Способ моделирования физической нагрузки для оценки работоспособности лабораторных крыс при дисбиотических нарушениях кишечника*. Патент РФ № 2796316 от 22.05.2023.
 17. Буреш Я., Бурешова О. и Хьюстон Д. П. *Методика и основные эксперименты по изучению мозга и поведения* (Высш. шк., М., 1991).
 18. Жукова Е. С., Шербатюк Т. Г. и Позднякова М. А. Взаимосвязь между ростом злокачественной опухоли и особенностями поведения лабораторных животных. *Природные ресурсы Земли и охрана окружающей среды*, **2** (1), 44–47 (2021). DOI: 10.26787/nydha-2713- 203X-2021-2-1-44-47
 19. Гапеев А. Б. Исследование механизмов биологического действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот: успехи, проблемы и перспективы. *Биомедицинская радиоэлектроника*, **6**, 20–30 (2014). EDN: SEAPHZ
 20. Clarkson J. M., Martin J. E., and McKeegan D. E. F. A review of methods used to kill laboratory rodents: issues and opportunities. *Lab. animals*, **56** (5), 419–436 (2022). DOI: 10.1177/00236772221097472
 21. Кулагина Т. П., Ариповский А. В. и Гапеев А. Б. Изменение жирнокислотного состава клеток тимуса, печени, плазмы крови и мышечной ткани у мышей с солидной формой карциномы Эрлиха. *Биохимия*, **77** (2), 231–239 (2012). EDN: OWXONN
 22. Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е. и Зыбина Н. Н. *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма* (ИКФ «Фолиант», СПб., 2000).
 23. Kamada N. and Núñez G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology*, **146** (6), 1477–1488 (2014). DOI: 10.1053/j.gastro.2014.01.060
 24. Littman D. R. and Pamer E. G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe*, **10** (4), 311–323 (2011). DOI: 10.1016/j.chom.2011.10.004
 25. Palm N. W., De Zoete M. R., Flavell R. A., and Haven N. Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clin Immunol.*, **159**, 122–127 (2016). DOI: 10.1016/j.clim.2015.05.014
 26. Zegarra-Ruiz D. F., Kim D. V., Norwood K., Kim M., Wu W. H., Saldana-Morales F. B., Hill A. A., Majumdar S., Orozco S., Bell R., Round J. L., Longman R. S., Egawa T., Bettini M. L., and Diehl G. E. Thymic development of gut-microbiota-specific T cells. *Nature*, **594** (7863), 413–417 (2021). DOI: 10.1038/s41586-021-03531-1
 27. Ennamorati M., Vasudevan C., Clerkin K., Halvorsen S., Verma S., Ibrahim S., Prosper S., Porter C., Yeliseyev V., Kim M., Gardecki J., Sassi S., Tearney G., Cherayil B. J., Bry L., Seed B., and Jain N. Intestinal microbes influence

- development of thymic lymphocytes in early life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117** (5), 2570–2578 (2020). DOI: 10.1073/pnas.1915047117
28. Cheng H.-Yu., Ning M.-X., Chen D.-K., and Ma W.-T. Interactions between the gut microbiota and the host innate immune response against pathogens. *Front Immunol.*, **10**, 607 (2019). DOI: 10.3389/fimmu.2019.00607
29. Terrisse S., Goubet A. G., Ueda K., Thomas A. M., Quiniou V., Thelemaque C., Dunsmore G., Clave E., Gamat-Huber M., Yonekura S., Ferrere G., Rauber C., Pham H. P., Fahrner J. E., Pizzato E., Ly P., Fidelle M., Mazzenga M., Costa Silva C. A., Armanini F., Pinto F., Asnicar F., Daillère R., Derosa L., Richard C., Blanchard P., Routy B., Culine S., Opolon P., Silvin A., Ginhoux F., Toubert A., Segata N., McNeel D. G., Fizazi K., Kroemer G., and Zitvogel L. Immune system and intestinal microbiota determine efficacy of androgen deprivation therapy against prostate cancer. *J. Immunother. Cancer*, **10** (3), e004191 (2022). DOI: 10.1136/jitc-2021-004191
30. Rosa Neto J. C., Calder P. C., Curi R., Newsholme P., Sethi J. K., and Silveira L. S. The immunometabolic roles of various fatty acids in macrophages and lymphocytes. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (16), 8460 (2021). DOI: 10.3390/ijms22168460
31. Vanacker N., Blouin R., Ster C., and Lacasse P. Effect of different fatty acids on the proliferation and cytokine production of dairy cow peripheral blood mononuclear cells. *J. Dairy Sci.*, **105** (4), 3508–3517 (2022). DOI: 10.3168/jds.2021-21296
32. Aronoff D. M., Canetti C., and Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J. Immunol.*, **173** (1), 559–565 (2004). DOI: 10.4049/jimmunol.173.1.559
33. Serezani C. H., Chung J., Ballinger M. N., Moore B. B., Aronoff D. M., and Peters-Golden M. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **37** (5), 562–570 (2007). DOI: 10.1165/rcmb.2007-0153OC
34. Li S., Sun Y., Liang C.-P., Thorp E. B., Han S., Jehle A. W., Saraswathi V., Pridgen B., Kanter J. E., Li R., Welch C. L., Hasty A. H., Bornfeldt K. E., Breslow J. L., Tabas I., and Tall A.R. Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet. *Circ. Res.*, **105** (11), 1072–1082 (2009). DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.199570
35. Lan W., Ren Y., Wang Z., Liu J., and Liu H. metabolic profile reveals the immunosuppressive mechanisms of methionyl-methionine in lipopolysaccharide-induced inflammation in bovine mammary epithelial cell. *Animals (Basel)*, **11** (3), 833 (2021). DOI: 10.3390/ani11030833
36. Гапеев А. Б., Сирота Н. П., Кудрявцев А. А. и Чеме-рис Н. К. Реакции тимоцитов и спленоцитов мыши на действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот в норме и при си-
стемном воспалительном процессе. *Биофизика*, **55** (4), 645–651 (2010). EDN: MVKVDH
37. Li J., Hu S. B., He Y. M., Zhuo C. F., Zhou R. L., Chen F., Li H. Y., and Deng Z. Y. 9c11tCLA modulates 11t18:1 and 9t18:1 induced inflammations differently in human umbilical vein endothelial cells. *Sci. Rep.*, **8** (1), 1535 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-19729-9
38. Guo X., Li H., Xu H., Halim V., Zhang W., Wang H., Ong K. T., Woo S.-L., Walzem R. L., Mashek D. G., Dong H., Lu F., Wei L., Huo Y., and Wu C. Palmitoleate Induces Hepatic Steatosis but Suppresses Liver Inflammatory Response in Mice. *PLoS ONE*, **7** (6), e39286 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0039286
39. Huang X., Yi S., Hu J., Du Z., Wang Q., Ye Z., Su G., Kijlstra A., and Yang P. Linoleic acid inhibits in vitro function of human and murine dendritic cells, CD4(+)T cells and retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **259** (4), 987–998 (2020). DOI: 10.1007/s00417-020-04972-6
40. Hidalgo M. A., Carretta M. D., and Burgos R. A. Long chain fatty acids as modulators of immune cells function: contribution of FFA1 and FFA4 receptors. *Front Physiol.*, **12**, 668330 (2021). DOI: 10.3389/fphys.2021.668330
41. Niu W., Yang F., Fu Z., Dong Y., Zhang Z., and Ju J. The role of enteric dysbacteriosis and modulation of gut microbiota in the treatment of inflammatory bowel disease. *Microb. Pathog.*, **165**, 105381 (2021). DOI: 10.1016/j.mic-path.2021.105381
42. Fan S.-T., Nie S.-P., Huang X.-J., Wang S., Hu J.-L., Xie J.-H., Nie Q.-X., and Xie M.-Y. Protective properties of combined fungal polysaccharides from cordyceps sinensis and ganoderma atrum on colon immune dysfunction. *Int. J. Biol. Macromol.*, **114**, 1049–1055 (2018). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.004
43. Wan Y. D., Zhu R. X., Bian Z. Z., and Pan X. P. Improvement of gut microbiota by inhibition of P38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in rats with severe acute pancreatitis. *Med. Sci. Monit.*, **25**, 4609–4616 (2019). DOI: 10.12659/MSM.914538
44. Chen Y., Liang J., Ouyang F., Chen X., Lu T., Jiang Z., Li J., Li Y., and Zeng J. Persistence of gut microbiota dysbiosis and chronic systemic inflammation after cerebral infarction in cynomolgus monkeys. *Front Neurol.*, **10**, 661 (2019). DOI: 10.3389/fneur.2019.00661
45. Чепур С. В., Плужников Н. Н., Чубарь О. В., Фатеев И. В., Бакулина Л. С., Литвиненко И. В. и Ширяева А. И. Молочная кислота: динамика представлений о биологии лактата. *Успехи соврем. биологии*, **141** (3), 227–247 (2021). DOI: 10.31857/S0042132421030042

Protective Effect of Low-Intensity Extremely High-Frequency Electromagnetic Radiation on an Experimental Model of Intestinal Dysbacteriosis in Laboratory Rats

A.B. Gapeyev*, T.P. Kulagina*, E.S. Zhukova, A.V. Aripovsky***, and M.A. Pozdnyakova****

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

***Nizhny Novgorod Scientific Research Institute for Hygiene and Occupational Pathology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, ul. Semashko 20, Nizhny Novgorod, 603005 Russia*

****Research and Production Company "A-BIO", Institutskaya ul. 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

An experimental model of dysbacteriosis caused by gentamicin sulfate, an antibiotic, was used to investigate the effect of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high-frequencies (42.2 GHz, 0.1 mW/cm², pulse modulation by a meander with a frequency of 1 Hz, exposure duration 30 min per day for 10 consecutive days, starting from the fourth day after the induction of dysbacteriosis) on the fatty acid composition of the thymus, blood plasma, activity of antioxidant enzymes, the amount of malondialdehyde and lactate in blood of laboratory rats. A significant decrease in the amount of myristic, palmitic, stearic, palmitoleic, oleic and linoleic fatty acids in the thymus in animals was shown. The activity of antioxidant enzymes, the amount of fatty acids and malondialdehyde in the blood remained unchanged. Lactate level in blood plasma decreased. Irradiation was shown to result in normalization of the fatty acid composition of the thymus and the amount of lactate in plasma in animals with dysbacteriosis. Due to its high efficacy, low-intensity extremely high-frequency electromagnetic radiation knowing certain parameters in dysbiosis opens up fundamentally new possibilities that could use these frequency spectrum bands to prevent and treat a number of pathological conditions associated with dysbiosis.

Keywords: low-intensity extremely high-frequency electromagnetic radiation, intestinal dysbiosis, thymus, fatty acids, lactate, antioxidant status

ГИБРИДНЫЕ МОДЕЛИ ТРАНСФОРМАЦИЙ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВОЛН

© 2024 г. А.Ю. Переварюха*,#

*Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр РАН,
14-я линия, 39, Санкт-Петербург, 199178, Россия

#E-mail: temp_elf@mail.ru

Поступила в редакцию 09.04.2024 г.

После доработки 18.04.2024 г.

Принята к публикации 25.04.2024 г.

Анализируются специфические варианты развития современной эпидемической ситуации из-за регулярно обновляющихся штаммов SAR-CoV-2 и сравниваются методы моделирования особых сценариев распространения этой инфекции. Актуальность развития методологии моделирования обусловлена возобновившимися в 2024 г. в ряде регионов волнами роста случаев COVID как необычного варианта пульсирующего эпидемического процесса. Очередные всплески заражений определены активностью успевшей разделиться эволюционной ветви штаммов BA.2.86 Pirola, более эффективных по аффинности и по избеганию антител, чем доминировавшие ранее линии Omicron EG.5 или XBB.1.5. Штаммы в 2024 г. сохраняли достаточную трансмиссивность при сниженной аффинности с рецептором ACE2 и меньшей скорости репликации по сравнению с Delta, но при этом увеличивалось время персистенции вируса. В ситуации иммунизации популяции поменялся тренд эволюции вируса с акцентом на усложнение филогенетического древа и с отбором обеспечивающих сбалансированные характеристики для репликации и уклонения от антител вариантов Spike-белка. Потенциал изменчивости белков коронавируса явно не исчерпан, а методы прогнозирования их перспективных мутаций находятся в стадии разработки. Обсуждаются методики вычислительного исследования эпидемических сценариев на основе модифицированных путем расширения набора статусов особей в камеральных «SIR-моделях». Варианты систем уравнений на основе SIR не описывают возобновление COVID-волн, что наблюдалось уже в 2020 г. Схемы перехода статусов по принципиальным аспектам плохо подходят для описания нелинейных колебательных режимов эпидемии даже при включении в линейную SIR-схему осцилляционных уравнений второго порядка. Разработанные автором модели для затухающих COVID-волн на основе уравнений с запаздыванием и с пороговыми эффектами получили модификацию, учитывающую, что новые линии Omicron изменяют режимы флуктуаций. Выявленные нами изменения режимов колебаний с ростом повторных случаев не описываются только перестройкой параметров уравнений с демпфирующими функциями. По наблюдаемому эпидемическим графикам COVID-волн в моделях требуется перестроение функций регуляции. Предлагается моделировать аспекты переходных фаз современной эпидемии специальными вычислительными средствами, исходя из характера нелинейных осцилляций. Обоснован оригинальный метод формирования структуры для гибридной модели на основе набора правых частей дифференциальных уравнений с разнородными параметрами запаздывающей регуляции, генерирующими релаксационные колебания и переопределяемых при нарушении критериев истинности предикатов. Показано, что изменение аффинности связи вариантов S-белка с ACE2 — ключевой показатель для моделирования связанных с эволюцией вируса периодов затухания и активации волн, как наблюдалось в 2024 г. у штамма JN.1. Гибридная модель описывает событийные трансформации формы эпидемических волн, связанные с возмущением мутационного ландшафта коронавируса, что сейчас можно установить мониторингом мутаций и частоты встречаемости штаммов.

Ключевые слова: модели эпидемических колебаний, расширение камеральных моделей эпидемии, новые SIR-модели, факторы возобновления волн COVID-19, гибридные модели массовых заражений, анализ эволюции SAR-CoV-2, уравнения осцилляций в биофизике.

DOI: 10.31857/S0006302924060211, EDN: NJNNIS

Статья продолжает нашу серию работ [1] по сравнительному анализу и вычислительному мо-

Сокращение: ОРВИ — острая респираторная вирусная инфекция.

делированию переходных и неравновесных биофизических процессов с пороговым характером развития. Последовательно развиваемые модели строятся исходя из общности принципов стадийности, механизмов запаздывания нелинейной ре-

гуляции и на основе разработки оригинальных методик формализации механизмов их трансформаций [2]. Исследуемые явления отличаются не только быстрыми переходами между альтернативными равновесными состояниями или стадиями развития [3], но способны реализовываться различными колебательными режимами [4]. Схожие по аспектам нелинейности триггерные процессы наблюдаются в экодинамике инвазивных популяций, иммунологических реакциях и распространении нового и быстро мутирующего вируса.

Спустя 4 года исследований понятно, что болезнь COVID — не просто опасная острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ), осложненная повреждением органов и сосудов за счет синдрома высвобождения цитокинов («цитокиновый шторм», ведущий к состоянию полиорганной недостаточности). SARS-CoV-2 отличается от гриппа эффектом дисрегуляции выработки медиаторов воспаления, отсроченной индукции синтеза интерферонов и непосредственным заражением иммунных клеток (макрофагов, моноцитов) [5]. Ряд исследований [6] говорит об ACE2-независимой стадии инфекции при активном заражении миелоидных клеток, что ведет к abortивной репликации вирусной РНК, но гиперактивации NF- κ B-сигнального пути и стремительной продукции воспалительных цитокинов. По новым данным, SARS-CoV-2 использует для проникновения в макрофаги рецептор CD209. В ACE2-зависимой стадии инфекции синтез медиаторов воспаления, наоборот, блокирован вспомогательным белком вируса ORF6.

Для значительной группы повышенно восприимчивых индивидуумов перенесенный COVID стал системным заболеванием с отложенными последствиями. Описываются массовые случаи с длительной персистенцией вируса либо регулярными реинфекциями на фоне признаков иммуносенции [7] в итоге истощения популяций отдельных типов иммунных клеток.

Коронавирус обладает гибкой стратегией уклонения от иммунного ответа. Специфика высокого тропизма SARS-CoV-2 в настоящее время еще не полностью исследована [8], но именно вскрытие иммунологической механики принципов накопления мутаций — ключевая задача для прогнозирования патогенности новых штаммов и создания специальных методов вакцинации, ориентированных на Т-клеточную память. Исследования показали [9], что надежные и устойчивые иммунные реакции против SARS-CoV-2 характеризуются длительными многофункциональными субпопуляциями Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, которые распознают отдельные «холодные» участки вирусных антигенов, так как достаточная когорта

долгоживущих плазматических клеток памяти вакцинами не формируется.

Значительный вклад в понимание факторов разнородного течения COVID и роли взаимодействия коронавируса с компонентами иммунной системы в патогенезе заболевания внесли отечественные авторы журнала «Биофизика» [10–13], рассмотрев аспекты иммунной дисфункции, в том числе с применением математических методов прогнозов распространения [14].

Необычные свойства течения заболевания, отсутствие пожизненного стерилизующего иммунитета от вакцинации мРНК-препаратами [15] и серийные мутации трансмембранных белков возбудителя приводят к особому осциллирующему течению эпидемической ситуации в регионах. При современном уровне понимания нозологии COVID целесообразно разрабатывать специальные методики анализа эпидемических ситуаций с целью обосновать эволюцию всего комплекса проблем, вызванных присутствием в популяции коронавируса. Трудно получить оценки новых волн на основе данных о ранних штаммах, требуется прогностический сценарный подход с перепределением параметров и с сопутствующими аспектами ожидаемой летальности и предположительной доли требующих госпитализации случаев при следующей волне после затухания всплеска Pirola. Филогенетическое древо эволюции SARS-CoV-2 регулярно пополняется новыми ветвями [16].

Цель работы — описание экстремального варианта эпидемической динамики на основе моделей, демонстрирующих переходные колебательные режимы. Модифицированные методом включения функций регуляции уравнения позволят провести сравнительный анализ сценариев эпидемического тренда с образованием и серии волн, и резкого пика. Модели представят варианты особых изменений в развитии анализируемых автором эпидемических ситуаций. Процесс представим в форме нетривиальной колебательной системы с трансформацией характеристик циклов, отличных от классических осциллирующих решений из-за направленной эволюции основных регуляторов процесса.

Актуальность работы по совершенствованию новых методов моделирования на основе гибридных структур, объединяющих новые данные об эволюции вируса и уравнения эпидемических колебаний определена тем, что активность изменчивых штаммов оказалось сложно прогнозировать известными формальными методами. Модели на основе регрессионного анализа данных или мультиагентных алгоритмов много раз предсказали окончательный конец эпидемии при видимом снижении количества заражений в неделю. Экспертами ожидался переход в 2023 г. в эндемиче-

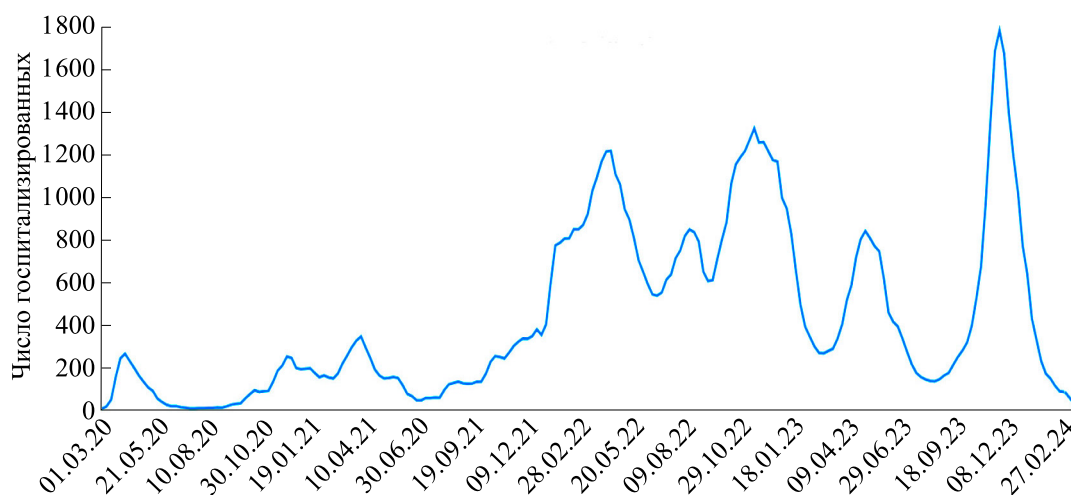


Рис. 1. Волны госпитализаций с COVID в Финляндии (по www.koronatilastot.fi/fi/sairaala/).

скую фазу в регионах — сезонные ограниченные вспышки локально циркулирующих штаммов, но вместо этого мы видим волны реинфекций. Несмотря на рост числа сложных случаев и реинфекций «локдауны» давно уже не вводятся.

В данной работе на основе анализа современной эпидемической динамики сравним описательные и прогностические возможности построения расширенных эпидемических камеральных SIR-моделей. Отдельно рассмотрим включение в схему вида SIRS уравнений физических осцилляторов и идею формата гибридных структур. Обсудим классификацию сценариев распространения волн из-за обновленной инфекции или массовых заражений. Предложим альтернативный метод моделирования с использованием переопределения уравнений в формате гибридных систем, где алгоритмом ситуативно выбираются наиболее математически соответствующие для меняющейся ситуации функции в правых частях уравнений с запаздыванием, определяющие режимы всплеска/затухания волн заражений.

АКТУАЛЬНЫЕ ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ SAR-CoV-2 в 2024 г.

Автор регулярно сравнивает эпидемическую обстановку в регионах мира. Интересно выделить события, когда тренды резко меняются (с 2023 г. по данным о госпитализации с COVID) и понять факторы этих событий. О том, что проблема COVID не исчерпана, говорит, например, очередная волна госпитализаций в Финляндии зимой 2024 (рис. 1) значительно превысившая начальную вспышку весны 2020 г. Финляндия относилась к группе стран с изоляционной антиэпидемической стратегией и строгими мерами карантинных, где быстрый эпидемический процесс

COVID начался только после Рождества 2021 г. с волны штамма Omicron.

Сравнивая развитие эпидемических ситуаций по набору характеристик колебаний в сериях волн заражений, мы можем классифицировать наблюдаемые сценарии эпидемии с точки зрения нелинейной динамики. Проблема в том, что эти явления флуктуаций не выглядят ни едиными по закону изменений, ни явно стохастическими. Серия COVID-волн в регионах представляется событийной версией нестационарного колебательного процесса. Определим динамику эволюции COVID-волн как процесс распространения с не полностью детерминированным событийным переопределением характеристик колебаний заражений.

Анализ текущих трендов COVID-госпитализаций подтверждает наш прогноз в работе [17] — если серии быстрых волн заражений чередуются перерывами, то новые возобновившиеся колебания после долгого минимума будут отличны от предшествующих, так как их вызовет штамм, прошедший отбор на уклонение от значительной доли присутствующих в популяции антител, включая гомогенные вакцинные. В регионах и штамм Omicron BA.1 в 2022 г. и ветвь Pirola в 2024 г. решительно изменили качественные характеристики фаз нарастания заражений и затухания амплитуды эпидемических волн. Во время пандемии процесс колебаний дважды менялся качественно — по группе параметров. Появление первых тревожных вариантов Gamma и Delta изменяло показатель трансмиссивности и попутно летальности. Направление отбора у ветви BA далее менялось. Эволюция SAR-CoV-2 после продуцирования наиболее заразного из всех возможных вариантов BA.2 перешла к формированию избегающего антител антигенного разнообразия, в экспериментах было отмечено снижение виру-

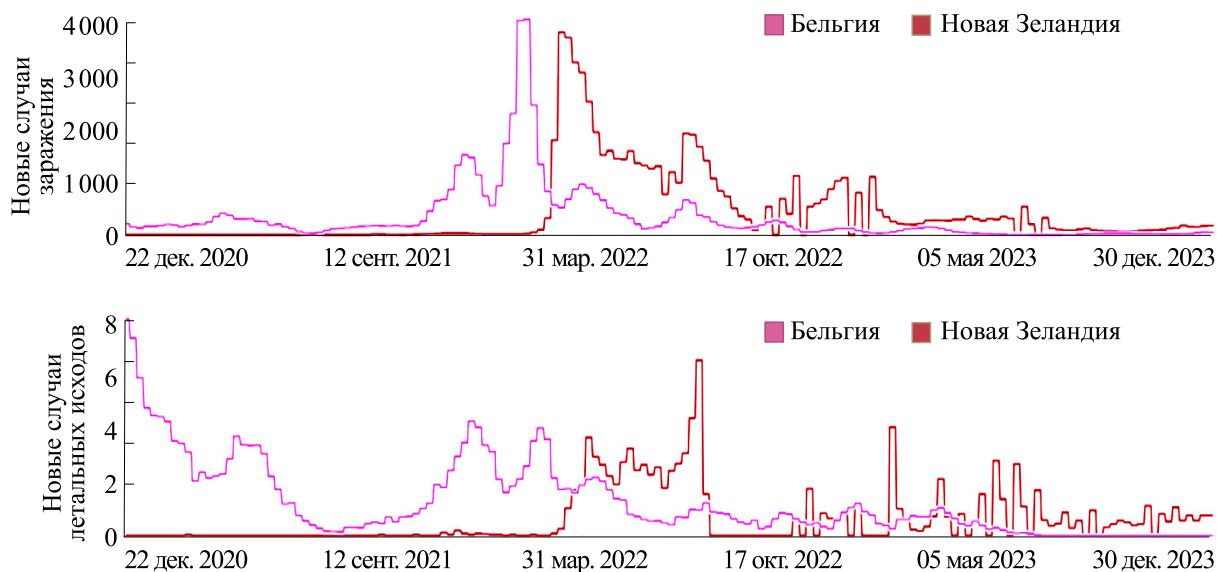


Рис. 2. Динамика числа заражений и летальных исходов COVID в Бельгии и в Новой Зеландии на 1 млн. населения в 2021–2023 гг. (<https://ourworldindata.org/covid-deaths>).

лентности уже у ХВВ.1.5 [18]. Отметим, что тренд эволюции штаммов может снова резко измениться в конце 2024 г. с новым конвергентным вариантом. Задача — предсказать, какая из ветвей даст доминирующие штаммы в 2025 г. актуальна, так как, установив опытным путем их характеристики, можно сказать, будет ли новая волна опасной.

Автор за 4 года проанализировал множество региональных ситуаций, волн и вспышек COVID, сравнил эпидемические тренды и выделил отдельные закономерности. Необычным новым аспектом при пандемии COVID становится ситуация, когда тренды увеличения числа летальных случаев даже с появлением менее трансмиссивных вариантов вируса могут не совпадать с тенденциями изменения ежедневных заражений. Интересно сравнение числа заражений в изолированной Новой Зеландии и в Бельгии, где были 12 COVID-волн — кратковременных 1.5-месячных локальных повышений заболеваемости. В жившей в условиях карантинных барьеров Новой Зеландии эпидемия началась только в марте 2022 г., но с лавинообразной волны штамма Omicron, когда в Бельгии эта волна уже затухала. На графиках из двух стран видно, что динамика летальных исходов и числа случаев заражений становятся несинхронизированными (рис. 2). Волны по показателю числа смертей тут проходили иначе, чем по числу заражений. Различие в показателях летальности по ходу эпидемических волн не объяснить только очевидным двухнедельным запаздыванием исхода острого течения COVID. Доля смертельных исходов начала различаться в новых волнах. По всей видимости, летальность COVID теперь зависит от числа пороговым образом уволившихся случаев хронизации и реинфек-

ций болезни, часто протекающих в более сложной форме. Это явление не описать в модели с простым параметром априорной частоты летальных исходов.

Ни одна страна не смогла избежать волны штамма Omicron. В Новой Зеландии, не дожидаясь завершения волны Omicron, отменили антиковидные карантины и ограничения, признав их неэффективными. Весной 2024 г. там прошла пятая, значительная для населения в 5 млн. человек с 98%-й вакцинацией, и отстающая на 2 месяца по сравнению с Европой сезонная волна с новым штаммом JN. В среднем в марте регистрировали 557 случаев в день и весьма важно, что 56% — это реинфекции.

Показательна динамика госпитализаций в обособленном регионе, например в Уэльсе из пяти регулярных затухающих волн с апреля 2022 г. по май 2023 г. и после еще две волны штамма Pirola на рис. 3. Сейчас ориентируемся по отчетам о случаях госпитализации, так как массового ПЦР-тестирования не проводили, но такая информация при анализе эпидемии информативнее. В Уэльсе 7 волн эпидемии с 2022 г. прошли по принципу: пики заражений меньше, но в среднем число больных за год больше; летом 2023 г. был достигнут минимум с начала эпидемии, что многие, но не автор статьи, посчитали окончательным затуханием. В октябре 2023 г. эпидемия возобновилась с двумя новыми волнами, но отличными на взгляд математика. Волны возникли с иной формой колебаний — скорости возрастания больных и плавности снижения числа заражений после пика. У новых волн конца 2023 г. увеличился интервал между пиком и минимумом, но и фаза роста заболевших происходила медленнее.

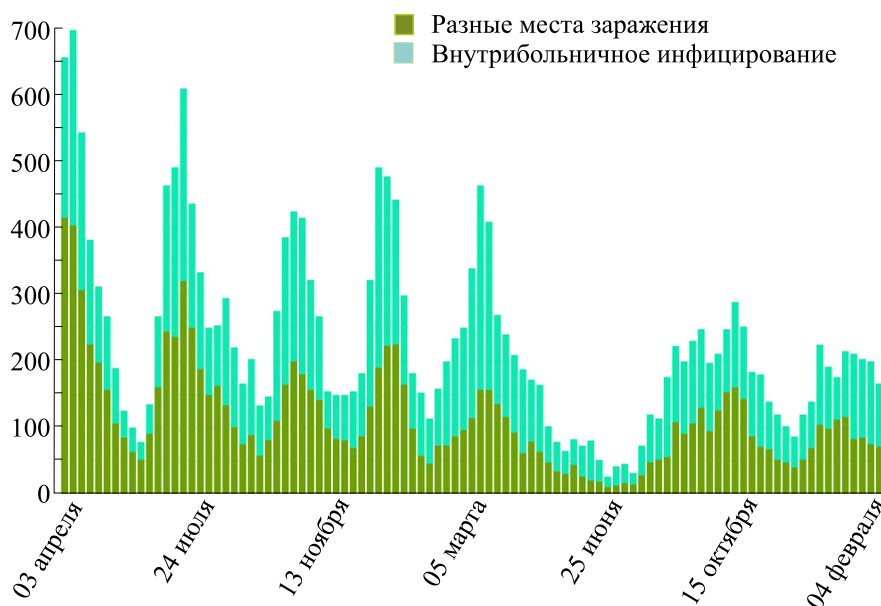


Рис. 3. Динамика госпитализаций во время COVID-волн в Уэльсе с апреля 2022 г.

Требуется провести совершенствование способов анализа эпидемических ситуаций и методов моделирования, исходя из новых волн и сведений об эволюции коронавируса. Как отмечено в нашей предыдущей работе [17], произошел пороговый рост реинфекций, которые в 2024 г. составляют основную когорту требующих госпитализации случаев. Популяция разделилась на группы: не болевших, испытавших инapparантную сероконверсию, переболевших с побочными явлениями, но с компетентным иммунным ответом и регулярно болеющих с иммунной дисфункцией. Именно наличие группы людей с признаками иммуносупрессии приводит к непрерывной эволюции вируса. После минимума летом 2023 г. с появлением штамма BA.2.86+JN произошла вторая после Omicron BA.1 «перезагрузка параметров» и в отношении активности передачи вируса (трансмиссивность складывается из ряда аспектов) и восприимчивости к нему в популяции. Колебания в Европе вновь стабилизируются в окрестности ненулевого равновесия, но только до новой осенней волны.

Сопутствующая проблема «постковидной эпохи» — распространение редких грибковых инфекций и резкий рост случаев туберкулеза в регионах, где эти болезни ранее не были характерными [19]. После сопоставления сведений все очевиднее вывод, что каждая COVID-волна истощает пул иммунных Т-клеток у восприимчивых индивидуумов, способствует развитию эффекта иммунного импринтинга в субпопуляциях. Возобновляясь, COVID-волны эры штамма Omicron ослабляют общую устойчивость к распространению в популяции ряда заболеваний (причем отмечен рост не только инфекционных). Так, социально значи-

мым новым явлением стали вспышки кори и коклюша из-за навязчивой пропаганды от «антиваксеров».

ПРОБЛЕМЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И ФАКТОРЫ РЕАКТИВАЦИИ ВОЛН COVID

Формальные методы прогнозирования нужны для задач планирования потребностей системы здравоохранения. Модели применялись в том числе для обоснования выработки мер противодействия вирусу и оценки эффективности разных антиэпидемических стратегий и принятых решений, в том числе последствий для экономики. По обычной практике регулирования уполномоченные эксперты обосновывают решение на основе своего понимания обстановки — неформальной когнитивной модели. Прошлый опыт не всегда ставится благом при прогнозах беспрецедентных ситуаций. Часто выбор стратегии определяет опыт и ожидания экспертов, что создает петлю рефлексии для анализа сценариев и прогнозов. Правительства многих стран не раз уже объявляли об окончании эпидемии COVID-19, но режим ограничений им приходилось водить снова и в 2021 г., и в ряде стран в 2022 г., но по экономическим причинам японцы отказались от ограничительных мер весной 2023 г.

Объективные проблемы для прогнозирования, в том числе разнообразными средствами моделирования, долго не были решены, во многом из-за волны публикаций непроверенных сведений. Фигурировали несогласованные оценки важных характеристик возбудителя и иммунитета. Было определено в 2024 г. в работе [20], что вырабатываемых нейтрализующих штамм Omi-

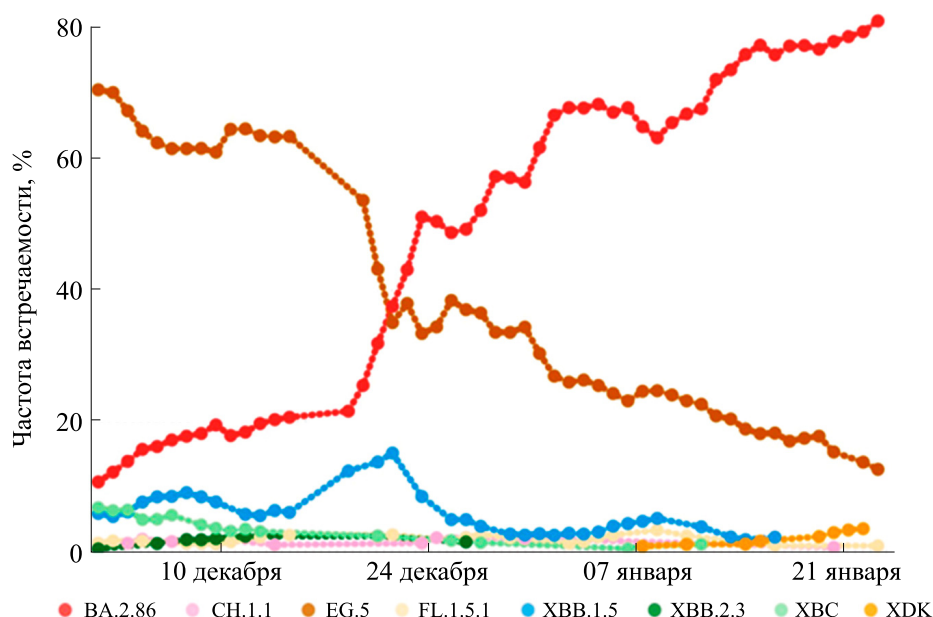


Рис. 4. Динамика доли заражения у различных штаммов в Новой Зеландии за 2022–2024 г.

сгон ВА антител IgG в среднем в Европе хватает для защиты на 400 дней после их появления. Обсуждается кампания по вакцинации новыми препаратами, так как микро-РНК-вакцины на основе одного быстро мутирующего Spike-белка не оправдали надежд по длительности защиты в популяции и повлияли на тренд эволюции вируса. Теперь развиваются иные методы вакцинации, например, на основе деоптимизации РНК всех белков коронавируса.

Публиковалась разная информация о длительностях латентной стадии и о персистенции после заражения, доле бессимптомных распространителей в регионах, но причины были не только в некорректности методик, но и в различиях адаптации населения к коронавирусам. Сведения о генетически обусловленной восприимчивости к вирусу и риску взрывообразного иммунного ответа и сейчас противоречивы. Необходимо уточнить факторы перехода в хроническое течение «Long COVID», приводящего к накоплению разнообразия антигенов вируса. Проверяются новые требующие подтверждения данные о механизме заражения вирусом клеток иммунной системы и случаях массовой гибели здоровых лимфоцитов в организме некоторых людей с выявленным иммунодефицитом. Состояние иммунного кризиса нужно учитывать в прогнозах и методах моделирования.

Неэффективность методов оценки ситуации и недостоверность получаемых моделями прогнозов в первые два года пандемии признана многими авторами [21]. Импульсная эволюция вируса регулярно опровергает прогнозы, но уже в 2020 г.

в ряде регионов наблюдалось образование трех эпидемических волн. Восприимчивость населения к исходному коронавирусу в мире сильно отличалась [22], а ситуация резко изменилась с появлением самого летального штамма Delta и ветвей из россыпи подвариантов Omicron.

Ожидалось в 2023, что не глобально доминирующий штамм Omicron XBB.1.5 станет итогом адаптации коронавируса к человеку, наибольшее число работ в Nature было посвящено этому варианту, но базовый Omicron BA.1 уже ранее разделился на несколько независимо эволюционирующих (назовем их тихими) сосуществующих линий. Omicron отличался от предшественников (штаммы Gamma, Delta) не только сохранением высокой трансмиссивности при более плавном росте вирусной нагрузки, но и тем, что породил куст расходящихся ветвей на дереве эволюции. У успешного варианта скоро появятся потомки.

Прогноз не оправдался, штаммы везде в регионах снова меняются. Новые волны связаны с новыми лидерами. Переход между вариантами BA.1→XBB.1.5→EG.5 прошел значительно плавнее. Зимой 2024 г. мировым лидером среди штаммов повсеместно стал представитель ранее тихой линии BA.2, которая с появлением версии BA.2.86 дала уже несколько вариантов успешных побочных линий JN.1.x, продемонстрировавших роль отдельных точечных мутаций в эффективности связывания с рецептором клеток. Интересна смена долей у разных штаммов в общем числе случаев заражения в удаленной Новой Зеландии (рис. 4), где эпидемия резко началась только с волны штамма Omicron. Начало смены домини-

рования штаммов предшествует очередной волне заражений. Это наблюдение для нас перспективно использовать при моделировании переменчивого процесса, но при этом модель нужно делать сценарной и с включением реакции на внешние факторы, выбрав при этом количественную характеристику, связанную с активностью штаммов помимо базового репродуктивного числа. Такая модель предполагает сшивание кусочно-гладких процессов.

Проект cov-spectrum.org ведет отслеживание новых линий. Штаммы Omicron можно разделить на доминантные с долей >80%, субдоминанты (уже более не опасные «сбитые летчики») составляют ≈10%. Сложность для изучения представляют ≈1–5%, «тихие», но при этом стабильно присутствующее. Тихие штаммы исполняют роль запасных линий эволюции SAR-CoV-2 как дублирующего состава игроков, но среди запасных имеется своя конкуренция. Глобально доминирующего штамма временно могло не быть, что отмечено во время эпидемической паузы летом 2023 г., когда в регионах несколько месяцев сосуществовали до дюжины линий Omicron, но потом один вновь становится глобально доминирующим. В Новой Зеландии в 2023 г. доминировал не XBB, а EG.5 «Eris», теперь же лидер стала, как и везде в мире, растущая ветвь BA.2.86 с активным кустом JN.1.10 на древе Omicron, а НК и HV остались «запасными побегими» (рис. 5).

В эволюционном сценарии не наблюдается длительно колеблющегося равновесия 50/50 у двух равно доминантных штаммов, как бывает у вируса Денге. Новый глобальный доминант из линии Pirola быстро захватывает лидерство заражений даже в изолированных регионах. Исходя из динамики смены доминирования штаммов, в полиэпитопной вакцине на основе ряда вариантов участков S-белка нет смысла. В вакцины необходимо включать структурные иммуногенные белки коронавируса. Вакцинировать целесообразно людей, регулярно перемещающихся между регионами, например, экипажи авиалайнеров и кораблей.

Эволюционный марафон для SAR-CoV-2 далеко не на финише. Отбор лучше приспособленных форм S-белка продолжается [23]. Уже найден эндемичный пока вариант BA.2.87.1, но не само число случайных мутаций определяет успех штамма, а баланс их функциональности. Однако появление значительно отдаленной от ранее доминировавшей группы штаммов новой ветви означает и новые волны с региональными вариантами.

Для прогнозирования эволюции необходимо понимать, что коронавирус сейчас должен решать сразу несколько задач. Вирусу нужно уклоняться от иммунного ответа, снижать вероятность связывания с индуцированными вакцина-

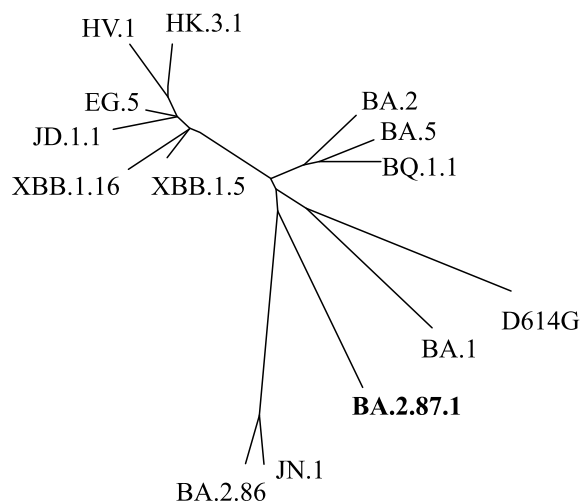


Рис. 5. Эволюционная диаграмма линий Omicron с расхождением ветвей подвариантов (по [biorxiv.org/content/10.1101/2024.03.07.583823v1](https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.03.07.583823v1)).

ми антителами, при этом сохраняя должную вероятность связывания с рецептором ACE2 для проникновения и репликации в клетках. Вирусу не обязательно достигать предельной вирусной нагрузки и стремиться к максимизации скорости репликации. Важнее для успеха любого вируса более длительное поддержание только необходимого уровня присутствия в нашем организме. Потому вирусу нужно поддерживать достаточную концентрацию вирионов в организме для его дальнейшей передачи, а одновременное число копий вирусных РНК в крови не обязательно должно быть максимально допустимым для состояния организма. Другой агрессивный коронавирус, MERS, хотя много раз передавался от животных к человеку, но, к счастью, пока не способен вызвать пандемию. MERS летален и слишком быстро выводит из строя организм человека [24]. Неуровновешенные по всему набору характеристик формы станут тупиковыми ветвями, а останутся кажущиеся не особо эффективными штаммы, ведь более высокая вирусная нагрузка создает большую вероятность дальнейшей его передачи [25].

Эволюция коронавируса при адаптации к человеку не стремится к максимизации эффективности его репликации, так как при этом ухудшаются другие важные свойства, такие как бессимптомное распространение, в котором «скрывается дьявол» COVID, как оказалось, больной может не ощущать симптомов, но быть активным распространителем, а его иммунная система при этом истощается. Повышенная трансмиссивность, проявляемая штаммом Omicron, может быть объяснена не только его уклонением от вызванного вакциной адаптивного иммунитета, но также его

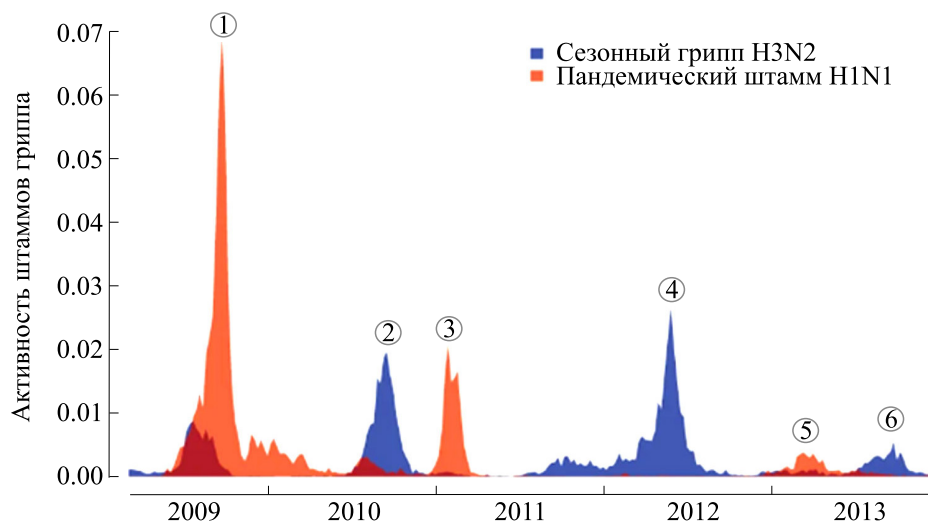


Рис. 6. Сравнительная динамика волн двух штаммов гриппа в Гонконге ([nature.com/articles/s41467-022-29310-8](https://www.nature.com/articles/s41467-022-29310-8)).

лучшей инвазией в назальный эпителий и устойчивостью к присутствующим в нем клеточным барьерам. Потому можно было предвидеть в 2021 г., что штаммы Gamma и Delta станут тупиковыми вариантами. Не исключен на некоторой отдаленной итерации возврат к исходным формам S-белка. Эволюция всегда ищет баланс. Она не стремится сделать что-то отдельное лучшим из лучших, но обеспечить существование вида в приемлемом комплексе для конкурентной среды необходимого набора опций.

Мы можем проследить динамику доминирования линий штаммов и эволюционной борьбы близких ветвей коронавируса. Труднее предсказать нового лидера и чем будет отличаться распространенный штамм через полгода, например, в октябре 2024 г.? Сейчас нет «эндемической стадии» у пандемии со стабильными локальными штаммами-лидерами. По нашему анализу, не полнота информации о текущем числе активных распространителей и не различия в средних оценках показателей (трансмиссивности, вирулентности, летальности) были основной проблемой модельного прогнозирования волн пандемии. Важная задача для метода построения модели — обосновать подходящие описательные инструменты модели для многообразия переходных режимов именно для случаев COVID.

ОТЛИЧИЯ ОСЦИЛЛЯЦИЙ COVID ОТ ПОВТОРНЫХ ВОЛН ДРУГИХ ЭПИДЕМИЙ

Волны ОРВИ логично сравнивать отдельно. Графики динамики других эпидемий с повторными вспышками демонстрируют, что череда волн COVID за 4 года качественно не похожа на другие изученные эпидемические процессы, для кото-

рых применяли SIR-модели. Для сравнения приводим динамику заболеваемости гриппом за 2009–2013 гг. в Гонконге (рис. 6).

Регион Юго-Восточной Азии считается очагом образования новых штаммов гриппа, включая сезонный в регионе H3N2 и пандемически знаменитый H1N1 («swine flu» 2009 г., по официальной номенклатуре — штамм *A/California/7/2009(H1N1)pdm*; хотя вирус гриппа происходил из центральной Мексики, но название дано по месту выделения штамма). Три пика «swine flu» строго убывали в 3 раза. По сравнению с коронавирусом у вируса гриппа отличаются фаза роста заболеваемости и фаза затухания. Волна гриппа демонстрирует гораздо более резкий Л-образный пик. Даже у «swine flu» было не более трех волн за 4 года [26]. У COVID нет аналогов среди известных нам эпидемических процессов. Возможно, «русский грипп» (коронавирус OC43) развивался аналогичным образом, но мы сейчас живем в гораздо более связанном пространстве, чем в 1896 и 1918 гг., когда прокатились две волны «испанки».

Распространение инфекций в структурированной популяции — это разнородные переходные процессы. Считается [27], что волны COVID являются следствием эволюции вируса, но такая быстрая эволюция невозможна без новых массовых заражений — образовался процесс с обратной связью, который можно было бы назвать «саморегулируемым» если бы не одно важное отличие — масштабная кампания по вакцинации. Ранее эпидемии ОРВИ проходили без фактора массовой вакцинации, но при этом завершались за конечный срок. Предыдущий пандемический коронавирус HCoV-OC43 конца XIX века спорадически вспышками присутствует в популяции. Вакцинация оказалась воздействием, безусловно

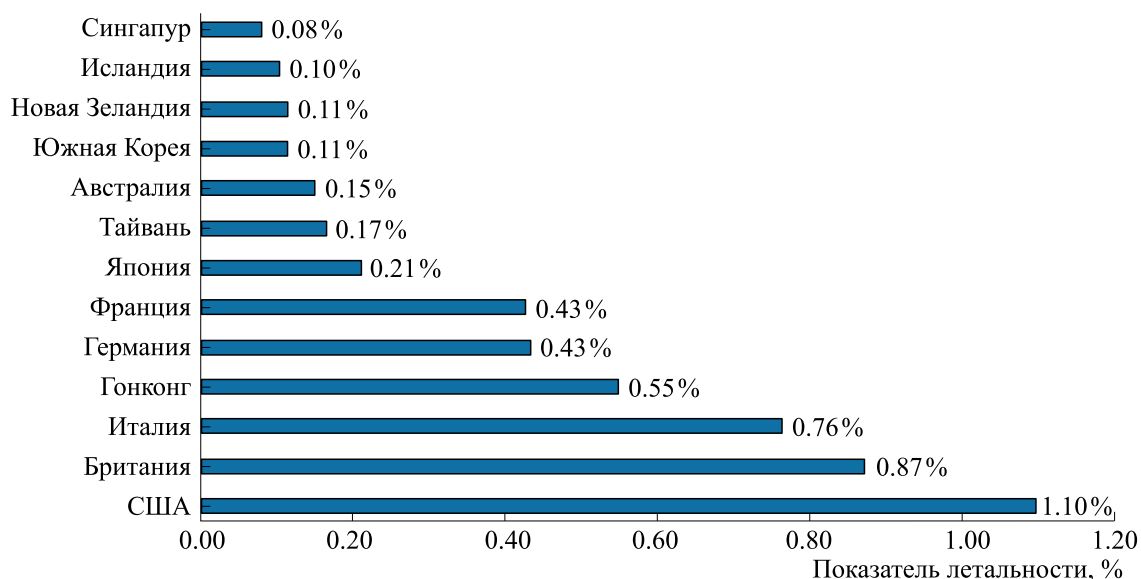


Рис. 7. Показатель летальности CFR для COVID в регионах (по данным <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0300303>).

изменившим форму переходного режима эпидемического процесса, перестроившим направление эволюции коронавируса, но в итоге вакцины мало повлияли на асимптотическое состояние колебаний в системе вирус vs популяционный иммунитет — колебания перезапускаются с появлением новых штаммов, а субоптимальные антитела несут для нас опасность [28].

Последствия заражения SAR-CoV-2 в разных регионах статистически различаются. Показатель летальности (CFR — case fatality rate) в США выше на порядок, чем в Азии (рис. 7).

Отличия классифицируемых вариантов динамики роста и снижения летальности в регионах образовались из-за комплекса факторов, в том числе не только иммунологических. Интересно ранжировать гипотетические аспекты по степени их значимости. Так, обсуждались роль иммуногенетических различий — в какой субпопуляции лучшие аллели генов HLA, что действительно является важным фактором для многих инфекций; разная социальная контактность населения; эффект от антиэпидемических мер; частоты случаев массовых заражений; степень изоляции регионов. Отмена эпидемических мер в ряде ранее изолированных ими стран не повлияла на динамику новых волн. Наиболее объективно влияющим на начальных стадиях пандемии нам представляется сохранение перекрестно действующей иммунной защиты.

КРИЗИС КОНЦЕПЦИИ КАМЕРАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭПИДЕМИЙ В ЭПОХУ COVID

Мы рассмотрим некоторые основные методы формализации состояния популяции при взаимодействии с вирусом. В предыдущих работах [2, 3] мы уделяли мало внимания концептуальным проблемам известных методик моделирования распространения различных инфекций и не проводили аналитического обзора проблем формализации эпидемической динамики. Анализ соответствия описательных возможностей моделей интересная для истории математической биофизики проблема и с методологической стороны вопроса и показательная с практической точки зрения, так как на *математических* свойствах поведения моделей базировались экспертные решения об антиэпидемических мерах.

Обсудим, сколько из обсуждаемых выше аспектов COVID учитывали известные методы моделирования эпидемического процесса и сколько их принципиально можно учесть при допустимой модификации моделей на основе статусов, а также что нельзя включать в SIR-модель, поскольку далеко не все биофизические факторы можно формализовать в стандартных уравнениях. У нас есть традиционный аппарат моделирования на основе SIR-схем и теперь есть представления о развитии эпидемии. Возникает ключевой вопрос: можно ли согласовать долго развиваемую концепцию SIR-уравнений состояний особей «compartmental models» со свойствами передачи коро-

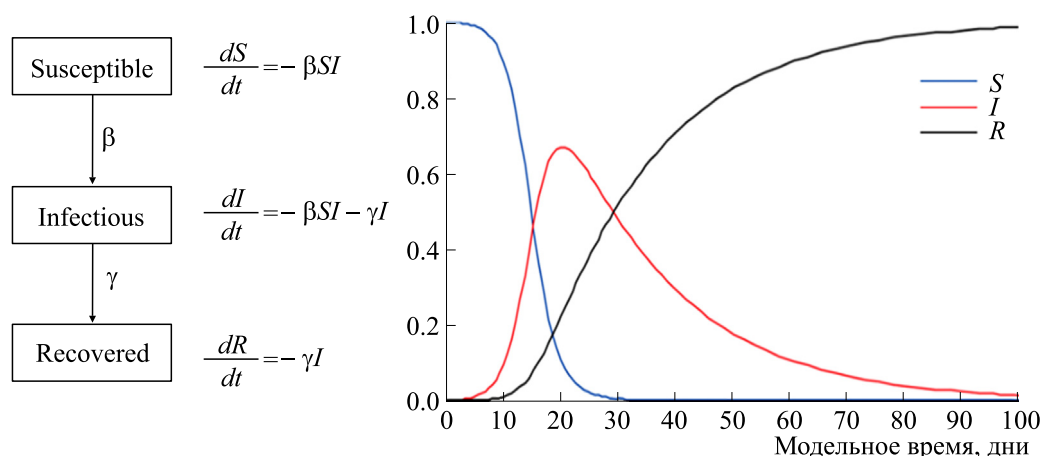


Рис. 8. Схема уравнений системы SIR-модели эпидемии и ее решение, где β – скорость передачи возбудителя ($\beta = 0.0005$), γ – скорость выздоровления ($\gamma = 0.05$).

навируса, и как ее модифицировать для описания серий вспышек?

Рассмотрим возможности развития метода математической формализации состояния популяции при распространении эпидемии. Классическая концепция «SIR models» в форме схемы смены трех статусов основана на балансовых уравнениях эпидемий [29] для статусов заболевших особей SIR: susceptible (S) \rightarrow infectious (I) \rightarrow recovered (R), при $I + S + R = K = \text{const}$. Исходно SIR-схема моделировала ограниченные во времени локальные вспышки и без повторных волн (рис. 8), с какими регулярно сталкивались эпидемиологи:

Представление $S \rightarrow I \rightarrow R$ заведомо не подходит для инфекций, когда нозологические формы не предполагают статуса R «иммунный после выздоровления» (исход летальный, либо иммунитет не образуется). Модель описывает ограниченные во времени локальные эпизоды распространения болезни с малой летальностью, как вспышки ОРВИ в учебных заведениях. Для описания волн в ходе пандемии COVID это решение принципиально неактуально, ведь волны возникли во многих странах до появления там штамма Gamma.

Называть такую SIR-схему «моделью Кермака–МакКендрика» некорректно, в исходных работах с 1927 г. [30] в уравнениях в частных производных рассматривали еще возрастную структуру и коэффициент передачи инфекции изменялся от возраста. Исходной математической моделью сейчас не пользуются, эта система оказалась слишком сложна для анализа. Решение модели не было полностью исследовано до сих пор и про модель забыли. Модели для задач биофизики должны быть доступны для решения известными методами.

ВАРИАНТЫ РАЗВИТИЯ КАМЕРАЛЬНЫХ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ SIR-МОДЕЛЕЙ

Естественная форма с замыканием схемы SIRS в переходах $S \rightarrow I \rightarrow R \rightarrow S$ с включением доли выбывания в итоге заболевания μ и рождающихся ιK в популяции с $K \neq \text{const}$:

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = \frac{-\beta S(t)I(t)}{K} + \iota K - \mu S(t) + \pi R(t), \\ \frac{dI}{dt} = \frac{\beta S(t)I(t)}{K} - (\gamma + \mu)I(t), \\ \frac{dR}{dt} = \gamma I(t) - \mu R(t) - \pi R(t). \end{cases}$$

Интересно понять, насколько развитие способа формации имеет сейчас перспективы. Необходимо сопоставить возможности моделей и сценарии эпидемий. Камеральным моделям посвящено много работ и известны разнообразные уточнения базовой системы для разных ситуаций [31]. В SEIR-схеме включен статус E («exposed») – индивидум уже инфицирован, но еще не распространитель. В SEIS-схеме иммунитет от заболевания не формируется и $I \rightarrow S$. Сценарий с генерацией эпидемических волн не удалось получить в модели схемы SEIRD в отечественной работе А.В. Никитиной [32] с отдельным статусом мертв D («dead»), что более актуально было бы для более разрушительных пандемий, таких как «испанский грипп» 1918 г. Как мы отметили ранее, доля смертельных исходов COVID не постоянна даже у смежных волн Omicron, коррелируя с изменчивой трансмиссивностью.

Другим способом актуализации схемы рассматривалось [33] представление уравнений для динамики статусов на основе расширенного набора системы уравнений MSEIRS, так как при многих инфекциях, таких как корь, дети часто

имеют иммунитет к заболеванию в течение первых нескольких месяцев жизни благодаря защите материнских антител, полученных при ее вакцинации, но потом они медленно утрачивают защиту.

Один из необычных вариантов набора статусов предложен [34] для описания вспышек лихорадки Эбола в Западной Африке — это SEIHFR, где включены состояния: E («латентный»), I («зараженный»), H («госпитализированный») с коэффициентом перехода от «зараженного», а также статус F («умерший, но еще не погребенный»), так как во время похоронных процессий часто происходило заражение близких. Вспышка медленно и полностью асимптомически затухает в модели SEIHFR, что для большого эпидемического ареала распространения Эбола не совсем реалистично. Возбудитель лихорадки скрыто присутствует у бессимптомных после болезни носителей, а возобновление его передачи по цепочке — случайный процесс.

Ситуация длительного сосуществования локальной популяции с естественным очагом смертоносного вируса генерирует иной по регуляции стадий активации и затухания очередной вспышки процесс, чем при инвазии нового возбудителя. Классический эпидемический сценарий с плато — чума на юге Франции в 1720 г. Это была локальная эпидемия по «классическому» экстремальному сценарию с плато (измерено по количеству летальных исходов) из-за случайно завезенной чумы в крупном городе Марселе в XIX веке. Хорошо документированная, эпидемия чумы в Марселе 1720–1721 гг. [35] развивалась с фазами взрывообразного роста, выраженного «плато» и со стремительным затуханием при 40% смертности среди локальной популяции. Чуму тогда удалось локализовать на юге Франции и более подобных вспышек в Европе, за исключением чумы в Москве в 1771 г., не происходило. Чумной сценарий полугодовой эпидемии описывается SI(R)D-схемой, когда шансы на выживание зараженного составляют порядка 10%. Сценарий с длинным (более трех месяцев) плато совершенно не схож с динамикой серий коротких волн коронавируса, как и других пандемических ОРВИ. Возвратные волны сравнимой амплитуды были и у «испанского гриппа», и у свиного гриппа.

Ни один локальный сценарий эпидемии COVID не демонстрировал классического эпидемического «плато» — длительной стабилизации числе заражений, был только длительный летний минимум 2023 г. между пиками. Мнимую стабильность искусственно создавали в ряде регионов при внесении данных о больных в отчеты, однако мы можем при сравнении легко установить, где злонамеренно искажали эпидемическую статистику.

Модели для анализа эпидемии бактериальных инфекций не годятся для респираторных РНК-вирусов, и не только потому, что заражение ОРВИ у нас не вызывает пожизненного иммунитета. У гриппа тоже бывают эпидемические волны, но не более трех волн, а у вируса Эбола — спорадические вспышки, которые пока не перерастают в полноценный эпидемический процесс.

МЕТОД РАСШИРЕНИЯ СОСТАВА УРАВНЕНИЙ ДЛЯ SIR СИСТЕМ И ПЕРЕЧНЯ СТАТУСОВ ИНДИВИДУУМОВ С COVID

SARS-CoV-2 проявил необычные свойства динамики заражений уже в 2020 г., которые во многом предопределили дальнейшее использование эволюционного потенциала. Для моделирования сценариев новых эпидемий перспективным подходом долго считался экстенсивный путь — подбор состояний индивидуумов и направлений в схемы переходов между набором статусов, которые может получить индивид в ситуации новой эпидемии. Можно сказать, что новые волны заражений порождены быстрой эволюции, но ведь без волн эволюция сразу замедлится. После появления коронавируса в 2019 г. предлагали разные варианты списка обновленных уравнений системы в расширенной схеме состояний при определении параметров уравнений включая пространственную неоднородность. В 2020 г. не были известны ключевые особенности болезни, потому модели оказались бесполезными.

Эффективность метода прогнозирования оказалась низкой, что отметили в США [36]. В работе [37] показана неэффективность настройки обновленных SIRS-схем, не показавших прогноза осциллирующего решения на примере серии вспышек COVID в Иране, где в 2020 г. 3 нарастающие волны прошли до распространения штаммов Gamma и Delta. Волны в Иране были с возрастающей амплитудой смертности (рис. 9), в отличие от рассмотренного ранее случая гриппа. В данном специфическом региональном сценарии в 2021 г., после паузы, волны в Иране № 4 и № 5 возобновились с распространением штамма Delta. Волна № 6 весной 2022 г. (штаммы Omicron), в отличие от общей мировой динамики и по числу заражений и смертельных случаев была в Иране меньшей по амплитуде, чем предшествующая. Последующие три волны убывали так же значительно. Сценарий наиболее близок к ситуации в Южной Африке. Очевидно, что для COVID нет универсальных эпидемических сценариев, что было отмечено нами еще в 2020 г. Необходимо проводить классификацию динамики волн.

Стало очевидно по ходу пандемии, что все существовавшие ранее модели эпидемических схем нужно было расширять и модифицировать; было предложено множество частных вариантов. От-

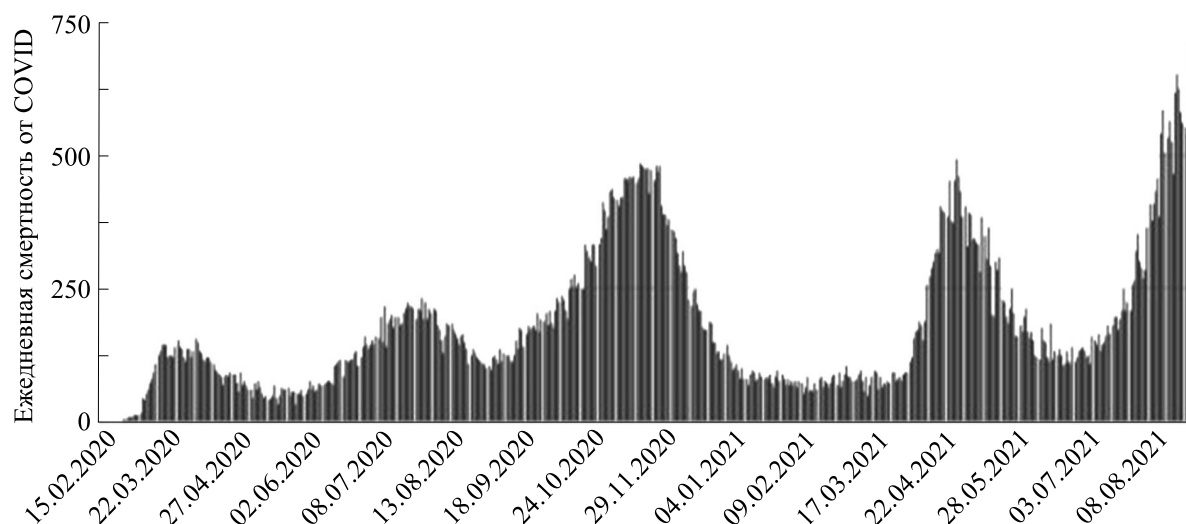


Рис. 9. Смертность в Иране за 5 COVID-волн (ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9509792).

метим среди модификаций принципиальные направления. Уточненный вариант развития модели переходов состояний индивидов при заражении SARS-CoV-2 предложен в работе [38] в модификации схемы из шести статусов θ –SI(R)D с $K \neq \text{const}$, где введена доля θ для бессимптомных инфицированных (I_a), а умирают только симптоматические (I_s) с долей w_s или становятся резистентными (R_s) с коэффициентом $(1-w_s)$. На рис. 10 показана модель с динамикой всех своих статусов, имеющей асимптотически равновесный характер. Число восприимчивых по модели θ –SI(R)D медленно возрастает после резкого сокращения, но в реальности это не так, в первую коронавирусную волну заболевает не более четверти популяции в худшем случае, а не 90%, как в этой модели.

Модель θ –SI(R)D в вычислительном исследовании показывает асимптотическую стабилизацию даже быстрее, чем в более простых упомянутых выше альтернативных моделях. Авторы модели θ –SI(R)D неточно учли специфику еще не полностью исследованного COVID. Для коронавируса обычно распространение бессимптомными зараженными (часто детьми). Болевшие бессимптомно быстрее утрачивают иммунитет и снова получают статус восприимчивый, чем перенесшие заболевание в симптоматической форме и выработавшие и В- и Т-клетки иммунной памяти, сохраняющие большее разнообразие эпитопов разных белков вируса [39]. Переболевшие сохраняют резистентность индивидуально. Болевшие могут стать распространителями снова менее чем через полгода и даже этим же штаммом. Из-за проблем иммунной активации часть из них становится хроническими носителями, либо особо восприимчивыми из-за развития им-

муносупрессии после гибели Т-клеток CD4+ [40].

Коэффициент заражений α тоже не общий для групп больных, так как зависит от концентрации выделяемого вируса и времени его персистенции (помимо активности социальных контактов), больших у симптоматических, но это уточнение не повлияет на динамику системы, если схема переходов схемы задана по линейным коэффициентам.

Уравнений и статусов для разных ситуаций предлагалось много, и мы тоже можем совершенствовать SIR-схему, но какой из статусов ключевой для прогноза будущих волн? Автор может расширить схему до 12 обоснованных статусов. Логично в их число включить и вакцинированных, инфицированных в изоляции (карантине, больнице). Эффективность антител IgG утрачивается у привитых мРНК-вакцинами, не ставшими решением проблемы (их недостатки были хорошо предсказуемыми), но успешно тестируются полиэпитопные и аттенуированные вакцины, полученные методом деоптимизации кодоновых пар. Эволюция коронавируса — импульсный процесс с резким появлением ветвей штаммов, который нельзя назвать полностью случайным. Вакцинация влияла на механизм отбора наиболее приспособленных вариантов S-белка. Целесообразно зараженных делить не по симптоматическому признаку, а разбить на три группы по продолжительности выделения больными вируса. Особый вариант — переход болезни в хроническое течение «Long COVID» по схеме $S \rightarrow I_a \rightarrow I_s \rightarrow I_L \rightarrow D$. Часть зараженных остаются хроническими носителями вируса и инкубаторами мутации штаммов. Вариант Delta в 2023 г. вышел из распространения, но встречается в пробах

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_n S - \mu_m S - \theta \alpha S I_s - (1 - \theta) \alpha S I_a + \rho(R_a + R_s)$$

$$\frac{dI_a}{dt} = (1 - \theta) \alpha S I_a - \beta_a I_a$$

$$\frac{dI_s}{dt} = \theta \alpha S I_s - \beta_s I_s$$

$$\frac{dR_a}{dt} = \beta_a I_a - \rho R_a$$

$$\frac{dR_s}{dt} = (1 - \omega_s) \beta_s I_s - \rho R_s$$

$$\frac{dD}{dt} = \omega_s \beta_s I_s$$

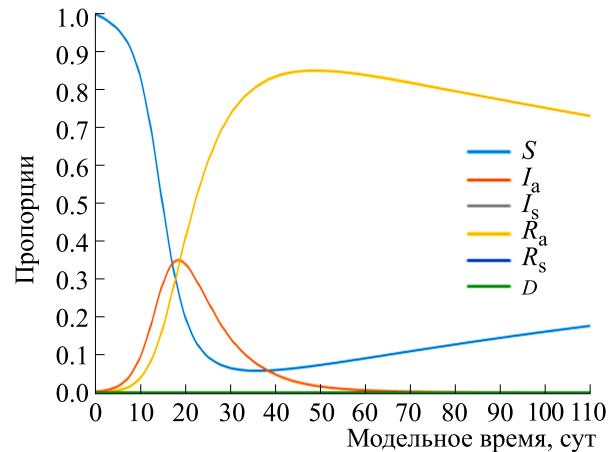


Рис. 10. Модель θ -SI(R)D и динамика решения системы, где β_a , β_s — параметры выздоровления симптомных и бессимптомных, α — коэффициент распространения, ρ — утраты иммунизации; ω_s — утраты смертности в I_s , μ_n и μ_m — коэффициенты рождаемости и смертности [38].

сточных вод 2024 г. Системное заболевание «Long COVID» и долгая иммуносупрессия — это проблемы, не встречавшиеся ранее даже у пандемического гриппа.

Для COVID логично предлагалось добавить в схему модели статус и «исходно резистентный» M, как в схеме MSEIRS, однако эта группа начинает терять свои статусы при появлении новых штаммов. Дополнение схемы потребует предикативного событийного переопределения уравнений, но не исчерпывает все актуальные варианты. Явления локальных стремительных вспышек отмечали и до высокотрансмиссивного штамма Omicron, это объяснимо гипотезой, что появление сверхраспространителей коронавируса становится фактором пульсирующего характера эпидемии и без новых штаммов. В схеме это можно учесть, допустив только *постоянную* долю I_{sup} от текущего числа зараженных SARS-CoV-2 с показателем распространения в уравнении $10\alpha S I_{sup}$ и возможный переход $I_a \rightarrow I_{sup}$.

ИДЕЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В SIR-МОДЕЛИ ФИЗИЧЕСКИХ ОСЦИЛЛЯТОРОВ

На основе обзора многих модификаций схемы статусов при COVID обоснован вопрос, действительно ли актуальна для понимания причин смены трендов эпидемии задача скрупулезного включения всех вариантов статусов индивидов с COVID в наиболее подробной системе уравнений модели? Важнее формализовать нелинейные зависимости, резко меняющие тренд эпидемии COVID. Весной 2022 г. стремительно увеличилось число повторных заражений, что объясняет не реализуемый в SIR-моделях пороговый вариант включения обратной связи, когда достижение большой доли хронических больных в популяции

приводит из-за импульса эволюции вируса к потере статуса R большой группы иммунных.

Эпидемические характеристики COVID не постоянны у новых штаммов, потому параметры SIR-моделей приходилось бы вручную перенастраивать для каждой волны, но и это бы не помогло для имитации разной формы затухающих колебаний. Эффект массовых заражений — отдельный аспект проблемы. Базовое репродуктивное число R_0 новых больных, заражаемых в среднем одним инфицированным в полностью неиммунизированном окружении, для SARS-CoV-2 не было постоянным даже на полугодовом промежутке. Оценка в среднем ключевого, но вторичного по отношению к свойствам связывания с ACE2, показателя — скорости репликации вируса и длительности виремии — не помогла в прогнозах из-за серии массовых заражений, начиная с исходного очага. После футбольных матчей Атланта—Валенсия лавина COVID моментально захлестнула Южную Европу.

Увеличение размерности фазового пространства модели не всегда ведет к появлению сложного поведения ее решения. Вариативности нелинейных режимов и бифуркаций нужно добиваться целенаправленно. Расширением набора статусов в линейных схемах переходов не удалось увеличить качественное разнообразие поведения решения помимо затухающих гармонических колебаний для $I(t)$ даже при возмущении параметров. Для реализации сценариев с переходными режимами требуется, чтобы равновесное положение траектории теряло устойчивость при малом изменении параметра. В работе [41] показан пример мультистабильности для нелокальной SIR-модели с учетом стохастической миграции особей, но мы наблюдаем, что волновые сценарии эпидемий не стохастичны.

Альтернативный подход к имитации распространения инфекции в популяции на основе смены статусов исходит из приближения свойств решения системы уравнений для целевого $I(t)$ к наблюдаемой эпидемической картине новых волн заболеваемости после длительных минимумов с позиций результатов нелинейной динамики. Модель эпидемии лучше строить не только из свойств жизненного цикла вируса (полностью неясных) и нозологии нового заболевания, но из уже известных свойств распространения как циклического процесса.

Бегущие волны и хаотические режимы предсказуемо получены в решении модели «KdV–SIR» из двух уравнений, составленной на основе преобразованной путем сведения системы SIR до одного уравнения для $R(t)$ и при включении аппроксимации известного в математической физике уравнения — осциллятора Кортевега-де-Фриза (KdV) для одной пространственной координаты, приведенного без обоснования модели в работе [42] к форме уравнений второго порядка для динамики числа зараженных $I(t)$. Выбор KdV не объяснен для задачи и включенные при преобразованиях параметры сложно сущностно интерпретировать. Более обоснованно включать осциллятор Дуффинга с внешней периодической силой для имитации колебаний заражений с возможностью получения скачкообразного резонанса и хаотического режима, но который не является для нас приемлемым. Как мы ранее отмечали, часто генерируемые многими моделями нелинейные эффекты оказываются избыточными и проблемными для их интерпретации в биофизике. Избыточность режимов хаоса и фрактальные аттракторы — другая крайность по сравнению с базовой линейной SIR-схемой. Цикличность биосистем не может усложняться бесконечно, в отличие от моделей с появлением асимптотических множеств всюду плотных траекторий.

МЕТОД ГИБРИДНОГО ПРЕДСТАВЛЕНИЯ МОДЕЛЕЙ ПУЛЬСИРУЮЩЕЙ ЭПИДЕМИИ

Анализ региональных эпидемий COVID подтверждает общий методологический принцип автора — для специфических ситуаций в биофизических процессах требуется конструировать уравнения с необходимыми свойствами поведения их решений. Наша задача грамотно использовать свойства решения ситуационных уравнений как набор описательных средств, так как модели в эпидемиологии сценарные и имитационные, а в физике — фундаментальные. У любого метода моделирования биосоциальных процессов есть ограничения в его применимости. По опыту автора при построении модели понять важнее, какими свойствами и обязательно согласующимися с положениями теории динамических систем дол-

жен обладать аппарат математической формализации в биофизике, достоверно имитирующий сценарии в исследуемой ситуации. Концепция эволюционирующей ситуации в модели задается параметрами и начальными условиями уравнений. Если на современном этапе мы не полностью понимаем механизмы и роли всех факторов, то средства имитации и сценарии изменения заданной условиями модели ситуации в вычислительном эксперименте, качественно отражающей реальные изменения процесса, — это способ оценить варианты развития по сходству перемен состояний у набора сценариев.

Теперь мы знаем о COVID значительно больше и представляем, что в принципе должна демонстрировать модель динамики заражений коронавирусом, но нужно выбрать метод формализации. Сложно верифицировать даже необходимые параметры. Так, указываемое базовое репродуктивное число есть результат усреднения для многих различных ситуаций, Драйвером большинства эпидемий на первом этапе не самых трансмиссивных вирусов (ВИЧ, оспа обезьян) стали случаи массового заражения и суперраспространители, так как ограниченность их возможностей передачи компенсируется длительной персистенцией. Вклад в процесс генерации эпидемических волн комплекса мутаций трудно прогнозировать и описать математическими функциями и SIR-схемой, но мы можем имитировать формы трансформирующейся колебательной активности COVID гибридными уравнениями.

В арсенале теории динамических систем мы выберем более обоснованные для моделирования биофизических взаимодействий уравнения как средства описания режимов возникших вновь естественных колебаний. Для уравнений волн распространения нужно включать аналоги нелинейного трения и диссипации энергии, так как любая серия волн эпидемий в итоге затухает даже если при ее исходе популяция полностью погибает.

Как мы показали, эпидемический процесс COVID пульсирующий с разными по признакам сериями волн и географически вариативных. В случае с SARS-CoV-2 неуклонное увеличение генетического разнообразия, произошедшее во время пандемии из-за огромного количества репликаций вирусного генома в значительном количестве инфицированных среди популяции, привело к дивергентной и непрерывной эволюции вируса. Меняется не только трансмиссивность вируса и, как следствие, R_0 — базовое репродуктивное число заражений *в среднем* по популяции. Непостоянна частота летальных исходов и бессимптомных случаев, как и продолжительность латентной стадии выделения коро-

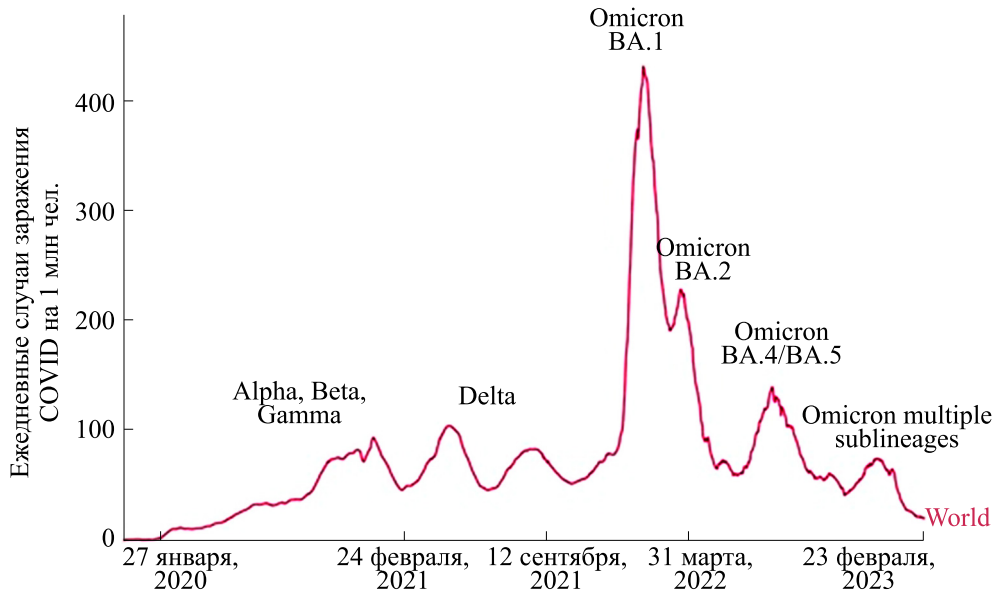


Рис. 11. Глобальная эпидемическая статистика подтвержденных случаев COVID.

навируса. В работе [43] исследована скорость накопления мутаций у образовавшейся в больнице одной новой сублинии штамма Omicron BQ.1.10, где 3 нуклеотидные замены образовались за 12 дней. Это быстрая и наглядная эволюция. Однако появление новых научных статей на тему изучения SARS-CoV-2 измеряется величиной порядка 300 за 1 день.

Доминирование новой ветви будем рассматривать как событие, которое изменяет характеристики у следующей серии волн заражений, так как эпидемия с 2020 г. форма сложно регулируемого колебательного процесса. Переходные эффекты, смена интервалов и формы пиков (пульсации можно сравнить с рваным ритмом *tempo rubato*) отчетливо видны в глобальной эпидемической статистике после пика весны 2023 г. с появлением штамма Omicron (рис. 11) — затухание сменилось пиком и новой формой Λ -образных волн заражений.

В некоторых туристических регионах и в Нью-Йорке пик пришелся на январь 2021 г., а в Японии запаздывал, но через событийные трансформации прошли все эпидемические ситуации, включая обсуждавшуюся ранее нами отдельно Новую Зеландию. Omicron BA.1 исчерпал себя, но в 2024 г. возникла серия изменившихся волн заражений JN.1. Развитие метода моделей с перепределяемыми параметрами для COVID требует формирования гибридных структур уравнений соответствующим процессу форматом непрерывно-дискретного представления времени и алгоритмом определения событийных изменений. Задача вычисления моментов изменений параметров и/или форм уравнений представляет ряд

принципиальных проблем для метода SIR-схем и требует иных средств решений.

Уравнения с запаздыванием при их грамотной настройке [44] и выборе регулирующих функций могут демонстрировать решения с разнообразными нетривиальными формами колебательных режимов. Запаздывание в эпидемическом процессе естественно и более того при формировании иммунного ответа работает алгоритм с запаздыванием на каждом этапе. Для моделирования эпидемии необходимо описывать не только затухание волн, но и их возможное появление снова из-за эволюции коронавируса, которая происходит наглядно и событийно.

Для моделирования за основу возьмем разработанные нами уравнения экодинамики с запаздыванием и с пороговой регуляцией $F(N(t - \tau))$, описывающие возникновение и разрушение режимов колебаний в биологических процессах [45]. Подобные (1) известные уравнения [46] генерируют после бифуркаций циклы $N_*(t; r\tau)$ негармонической формы:

$$\frac{dN}{dt} = R_0 N(t - \tau) \exp(-bN(t - \tau)) - \rho N(t). \quad (1)$$

Главное условие для нашей задачи — при росте параметров $r\tau$ решение не должно стать релаксационным циклом с большой амплитудой и глубокими минимумами со свойством $\lim_{r\tau \rightarrow \infty} \min N_*(t; r\tau) = 0$ (рис. 12), как это происходит в моделях Хатчинсона и Николсона.

Дополним уравнения осцилляционного режима нужного нам типа демпфирующими колебания

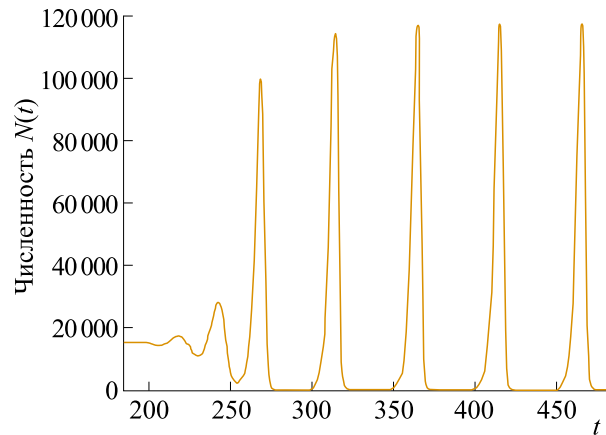


Рис. 12. Недопустимый для моделирования вариант бифуркации в модели (1) Николсона.

триггерными функциями, определяющими режим затухания волн $\Psi(N^k(t - \tau_1))$:

$$\frac{dN}{dt} = R_0 F(N(t - \tau)) - \Psi(N^k(t - \tau_1)). \quad (2)$$

Первое слагаемое в правой части (2) должно обеспечивать бифуркацию рождения цикла с необходимыми свойствами без снижения их минимумов (как на рис. 13), что можно получить в предложенном нами уравнении пилообразных колебаний вспышки вредителей:

$$\frac{dN}{dt} = R_0 F(N(t - \tau)) = R_0 N(t) \left(\frac{K - N^2(t - \tau)}{K + \chi N^3(t - \tau_1)} \right), \tau_1 > \tau, \chi < 1. \quad (3)$$

Если эволюция исследуемого в вычислительной модели биофизического взаимодействия сопровождается событийными изменениями процесса, отражающегося в перезапуске волн эпидемии, то изменять приходится не только параметры модели. В соответствии с эволюцией характеристик процесса функции Ψ должны претерпевать изменения. Для описания переходов форм у колебательных эпидемических режимов числа заражений целесообразно использовать действия при выполнении условий, реализующих

предикативное переопределение демпфирующих функций в правой части уравнений.

Сценарное моделирование строится на имитации метаморфозов поведения процесса как бифуркации траекторий динамических систем, что позволит оценить факторы различия сценариев, задав условия смены функционирования процесса на основе логики эволюции. Представим гибридную вычислительную структуру с предикатами, определяющими моменты переключений логическими функциями $P_i(U)$, содержащими набор условий:

$$\frac{dN}{dt} = \begin{cases} R_0 N(t) \left(1 - \frac{N(t - \tau)}{K} \right) (H - N(t - \tau_2)) - q \frac{N^2(t - 2\tau)}{A - N^3(t - \tau)}, P_1(U) \\ \hat{R}_0 N(t) \left(1 - \frac{N(t - \tau)}{K} \right) (H - N(t - \tau_2)) - \frac{q N(t - 2\tau)}{A - N(t - \tau_1)}, P_2(U). \end{cases} \quad (4)$$

При переопределении (4) логично изменить значение базового репродуктивного числа R_0 , при этом в частичном переопределении формы пороговые значения зараженных H и иммунных в популяции A можно оставлять неизменными, как и величины запаздывания τ .

Переопределение правой части (4) происходит при нарушении истинности логических выражений $P_i(U) = 1$, определенных на характеристиках эпидемического процесса, которые не включаются в саму вычислительную структуру. Вопрос о том, какие именно сопутствующие характери-

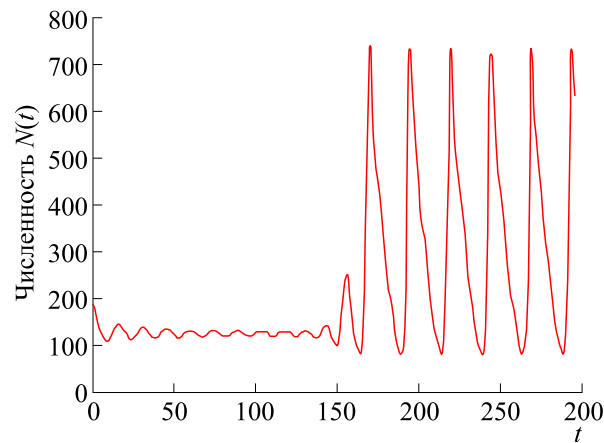


Рис. 13. Допустимый вариант бифуркации рождения цикла в нашей модели (3).

ки возможно и целесообразно включать в предикаты может иметь несколько решений. Наиболее советующим в ситуации эволюции коронавируса использовать для переключения число мутаций, отличающих текущий доминирующий штамм-лидер от предшествующего: этот показатель коррелирует с уклонением вируса от выработанного ранее в популяции естественного и вакцинного иммунного ответа [47].

Гибридная вычислительная структура (4) с частичным переопределением включает исследованное нами уравнение [48], решение которого описывает одну из возможных форм колебательного развития эпидемического процесса с возможностью перехода к вспышке на основе моди-

фицированной логистической регуляции с включением емкости всех доступных для заражения K . Квадратичная регуляция с емкостью ниши, как мы отмечали в предыдущих статьях, представляется далеко не единственным и лучшим вариантом описания колебаний биосистем [49]. Возможно использовать логарифмическую или экспоненциальную форму регуляции с включением дополнительных пороговых величин.

Предложим использовать для имитации сценария смены режима колебаний при появлении нового штамма гибридную структуру с полным переопределением формы правой части с двумя разными функциями регуляции с сохранением величин запаздывания:

$$\frac{dN}{dt} = \begin{cases} R_0 N(t - \tau) \exp(-bN(t - \tau)) (H - N(t - \xi)) - \Psi_1(N^k(t - \tau_1)), P_1(U) \\ R_0 N(t) \ln\left(\frac{K - \sqrt{N(t)}}{N(t - \tau)}\right) - \Psi_2(N^k(t - \tau_1)), P_2(U). \end{cases} \quad (5)$$

Предложенный метод сценарного моделирования ситуаций на основе выбора режимов изменения состояний на основе формализмов гибридных автоматов является развитием концепции структур с разрывными нелинейностями с непрерывно-дискретным временем, которое мы формализуем на основе формализма вложенных кортежей событий [50].

Переходы осуществляются между различными формами колебательных процессов, где триггером выступает эволюция. Событийное переопределение в схеме (5) позволит описывать различия форм колебательных режимов, следующих за эволюцией важной, но не включаемой из-за сложностей формализации в саму модель характеристики, которую в вычислительном экспери-

менте приходится задавать отдельно на каждом шаге.

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ТРАНСФОРМАЦИЙ ГИБРИДНОЙ МОДЕЛИ

В модели (3) эволюция ведет к трансформации затухающего режима колебаний при выполнении условия. Корректировки параметров для имитации наблюдаемых изменений недостаточно. В структуре (5) появление нового штамма полностью перезапускает эпидемические волны. Обоснование компоновки сложной структуры модели, для которой потребуется расчет дополнительного показателя, вместо традиционных расширенных SIR-схем в особенностях понятия мутационного ландшафта SARS-CoV-2, что представляет собой многомерное пространство, включающего сово-

купность ключевых генетических мутаций в геноме вируса, влиявших на его заразность. При ошибках репликации во время волн распространения вирус накапливает случайные изменения в своем генетическом материале РНК, но отбор вариаций не случаен, а формируется при его взаимодействии с иммунной системой хозяина. Сейчас возможно определять появление нового опасного штамма, изучая разнообразие циркулирующих вариантов SARS-CoV-2. В современных условиях потенциал имеют штаммы, отличающиеся значительно, имеющие не менее 30 замен в участке RBD.

Эпидемический процесс определяет комплекс факторов в противоборстве «иммунитет—возбудитель». При алгоритмической реализации можно настраивать гибридную модель в имитационных экспериментах при прогнозировании новой волны задолго до состояния, когда новый штамм станет глобально доминирующим. Однако для практики вычислительного моделирования трансформаций в формате гибридной структуры необходима одна включенная в набор условий измеримая характеристика. Базовое репродуктивное число R_0 вируса слишком усредненный показатель передачи для оценки ситуаций всплеск по типу произошедшей в Нью-Йорке. Свойство «избегание иммунного ответа» трудно отразить в модели вычислимой переменной, и это вероятностная характеристика частоты событий связывания «вирион—антитело». Требуется определить ключевой показатель для модели, количественно отражающий происходящие изменения.

Из возможных вариантов наиболее нам подходит аффинность Spike-белка с целевым рецептором, ведь эту характеристику можно измерить, сравнив у разных штаммов. На рис. 14 показана измеренная аффинность связывания с ACE2 в наномолях у RBD разных штаммов, средние значения коэффициента диссоциации K_D этих вирусов указаны над столбцами: чем выше сродство белка к своему лиганду, тем ниже константа диссоциации комплекса. Из диаграммы видно, что одиночная замена в рецептор-связывающем домене (RBD) L455F значительно ослабляет связывание с рецептором. При этом комбинация L455F и F456L приводит и к повышенной устойчивости к NAbs и аффинности связывания с ACE2. Развивая описанный в работе [51] метод оценки аффинности вариантов замен в RBD, можно прогнозировать другие характеристики эпидемического процесса для тревожных штаммов.

Сравнение по обратному показателю эффективного связывания K_D (чем ниже это значение, чем лучше связывание) парадоксально объясняет нарастающее региональное доминирование сублиний JN/KP в весной 2024 г., быстро вытеснив-

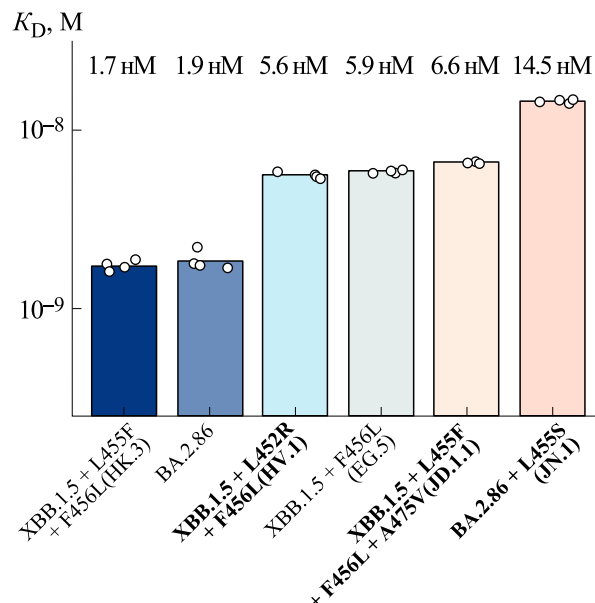


Рис. 14. Аффинность связывания с ACE2 у разных штаммов SARS-CoV-2 по коэффициенту диссоциации (по threadreaderapp.com/thread/1714694253530804588.html).

ших варианты EG, XBB Omicron и базовый Pirola BA.2.86, вызвавший волну зимой 2023-2024 гг. Они превосходили JN.1 аффинности, но оказались хорошими мишенями для нейтрализующих антител. Однако, линия JN образовала уже дюжину альтернативных вариантов единичных замен.

В процессе эволюции для следующих после особо заразных вариантов при адаптации к иммунному ответу аффинность временно начинает снижаться, это вызовет более чем полугодовой перерыв между волнами. Рост аффинности у следующего тревожного штамма будет означать перезапуск процесса после эпидемического минимума. Однако новые штаммы не смогут превзойти максимальный показатель связывания (который на самом деле был не у XBB.1.5, а у BF.7 — но этот штамм быстро исчез) и максимум в циклах будет снижаться. В пределе последовательности должны образовываться штаммы с низкой аффинностью (с высокой константой диссоциации), что не будут способны к быстрым всплескам и значит последует завершение активной эпидемической фазы COVID-волн.

В первой стадии пандемии аффинность возрастала, но далее у новых вариантов из-за цели ухода от вакцинных антител этот показатель стал плавающим с преобладающим трендом на снижение. Существует мнение, что дальнейшая эволюция на уклонение от иммунитета приведет к меньшей вероятности связывания вируса с мембраной клетки и, следовательно, увеличению необходимой дозы для заражения, убыванию кон-

центрации вирионов в крови у носителей и в результате к снижению среднего коэффициента репродукции. Низкая аффинность — это путь превращения инфекции в нишевую для иммуносупрессивных больных, но мы не видим этого сценария. Эпидемия переходит в стадию импульсных волн, где тренд снижения способности к связыванию с ACE2 оказывается временным в цикле трансформаций. Отметим, что эволюция после вынужденного снижения сродства с ACE2 «по спирали» может вернуть ранние эффективно связывающиеся с ACE2 и, что важнее, более патогенные из-за скорости репликации варианты двух поверхностных S- и E-белков, так как присутствие антител снижается, но специалисты теперь могут предвидеть и предсказать возможную волну за два месяца до ее первой фазы.

Уравнения феноменологически описывают наблюдаемую эволюцию комплекса процессов. Метод моделирования исходит из реальности, что в результате мутационный ландшафт коронавируса будет состоять из хорошо отличимых «пиков» с высоким числом мутаций и долин с низкими. Есть два принципиальных типа организации мутационного ландшафта — последовательное развитие доминирующего направления, либо конкурентное противоборство многих параллельных ветвей. Человеческий вид долго идет последовательно строго вверх, тогда как микроорганизмы предпочитают сложный рельеф — им не позволяет среда остановиться на одном варианте и развивать его, нужны запасные и неактивные формы, как в компьютерной игре осуществляют сохранение в архив при переходе на более сложный уровень.

Исходя из обобщения современных данных, новые современные модели должны связывать эпидемические волны с трендом эволюции вируса в многомерном пространстве факторов, где важна эвристика. Очевидно, что одни вирусы эволюционируют быстро, другие медленно, а некоторые стабильны в нашу эпоху. У вирусов разный эволюционный потенциал, что тоже необходимо учесть в модельных прогнозах, однако не все вирусы реализуют потенциал, как коронавирусы летучих мышей [52]. Гораздо чаще вирусу, к нашему счастью, для перехода в новое качество в человеческой популяции нужно накопить множество мутаций, что не смог пока сделать более смертоносный коронавирус MERS.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ИДЕИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ВОЛН

Использовать модели на основе предыдущего опыта оказалось бесперспективно при столкновении с принципиально иной эпидемической угрозой, какой оказался коронавирус, по сравне-

нию даже с пандемическими «испанкой» и «свиным» гриппом. Спустя 4 года не завершены исследования нового возбудителя, который уже не исчезнет из популяции и активизируется иначе, чем привычные нам осенне-весенние волны у сезонного гриппа. Помимо давно применяемых камеральных «SIR-схем» и регрессионных моделей развиваются альтернативные методы моделирования мультиагентных, стохастических и многомерных клеточных автоматов, нейронных сетей [53]. Разработки доступны как интернет-сервисы прогноза эпидемической обстановки, но текущие результаты не показали их явного преимущества в прогнозировании внезапных волн эпидемии уже зимой 2024 г.

Интересные практические результаты получены методом отслеживания контактов с помощью геолокации мобильных устройств в Англии, что позволило уточнить оценки неравномерной вероятности передачи вируса в различных условиях поведения в социуме [54]. Важнее для предсказания локальной вспышки анализ частоты контактов зараженных, связность групп индивидуумов и действие суперраспространителей, выявление которых главная задача мер противодействия. На примере небольших городов Италии [55], где все жители знакомы со всеми оказалось, что средняя плотность населения и начальное число зараженных далеко не полностью определяют потенциальную скорость распространения вируса, так как единица эпидемического процесса ОРВИ — активная цепочка заражений, число узлов в средних цепочках важнее, чем распределение популяции по статусам [56].

Непосредственное построение интенсивности контактов зараженных требует иначе формализовать среду распространения, где возможно будет включить в модель такие характеристики, как связность популяции и плотность окружения. Предполагается, что особи с высокой плотностью социальных контактов заражаются в первую очередь, а некоторые становятся суперраспространителями вируса. Актуально разрабатывать алгоритм модели с вероятностной компонентой как полудетерминированный [57]. Перспективный метод построения модели на основе связности сети контактов — алгоритм смены состояний индивидуумов, о вариантах которых мы писали выше, на основе многомерных клеточных автоматов. Ранее мы исследовали для инвазионных процессов автоматную модель с включением трех уровней запаздывания [58]. Для построения разнородного окружения можно задать клетки решетки со стохастично заданным соседством [59], равномерным распределением от одной до ста соседствующих клеток, но с постоянным коэффициентом передачи заражения между клетками и с запаздыванием при потере иммунного статуса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методология формализации распространения инфекции на основе разнообразных вариантов камеральных SIR-систем с переходом между эпидемическими статусами индивидуумов по схеме сопоставлена нами со свойствами распространения обновленного коронавируса и анализом стремительно возникшей волны Pirola. Способом модификации эпидемических моделей считалось включение в SIR-систему осцилляторов нелинейных уравнений второго порядка, но их сложные режимы и хаотизация не соответствуют ходу эпидемии. Результаты вычислительных экспериментов модели нельзя рассматривать как достаточный результат. Показано, что расширение на основе выраженности симптомов набора возможных статусов в SIR-системе дифференциальных уравнений, описывающих переходы между характерными для COVID состояниями членов популяции, не приводит к появлению затухающих колебательных режимов, которые прерываются новой вспышкой.

В области прогнозирования распространения новых инфекций далеко не все факторы будут установлены в ближайшее время. Традиционные модели эпидемий даже с принципиальным расширением линейной схемы типа SIR не подходят для аспектов нелинейности и импульсных генераций цепочек заражений COVID, если не включают пороговых значений зараженных и иммунных и фактор запаздывания [60]. Нами обосновано, что метод расширения SIR-систем не имеет прогностических перспектив. Для имитации смен трендов нелинейных эффектов биофизических процессов, испытывающих пульсирующие изменения вследствие эволюции вируса, применены подходы на основе модификации моделей с гибридной структурой [61]. Автор классифицировал вариативное развитие колебательного процесса, импульсно реагирующего на эффект массовых заражений, меняющего свою форму из-за неполностью детерминированной, но и не стохастической эволюции независимых ветвей SAR-CoV-2. Отмечено на примерах, что появление новых ветвей штаммов Omicron BA в 2021 г. и JN в 2023 г. приводило к качественной трансформации формы колебаний, а не только амплитуды пиков. Увеличился интервал между пиком и минимумом, это значит менялся не только один из параметров модели. Согласно нашему анализу данных, зимой 2023–2024 гг. реализован переход к третьему по счету за период пандемии режиму формы колебаний числа заражений. Продемонстрировано на модельных ситуациях, что COVID генерирует не отдельный сценарий, а целый набор форм ситуативного развития локальных волн заболеваемости. В большинстве стран весной 2023 г. полностью отменили антиэпидемические

ограничения, что позволило нам на основе статистики новых COVID-волн 2024 г. анализировать влияние факторов масочного режима и «локдауна». Подтверждено на примерах обособленных стран (Новой Зеландии, Японии), что изоляционные меры не контролировали эпидемическую ситуацию, когда показатель среднего числа заражений одним типичным больным резко превышает пороговое значение.

Обоснован метод формирования гибридных структур из вариантов форм уравнения с осциллирующими решениями [62], но с переопределяемыми функциями демпфирования. Предложено сценарное представление эпидемических моделей на основе предикативно переопределяемых систем уравнений с запаздыванием, описывающих ход эволюции SAR-CoV-2, где учтена импульсная эволюция коронавируса. Важнее описания нюансов нозологии болезни качественные свойства выбранного для формализации процесса распространения свойства вычислительного аппарата и расширение описательных возможностей, имевших успешное применение для описания стадийного онтогенеза [63].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда № 23-21-00339 РНФ в СПб ФИЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Переварюха А. Ю. Гибридная модель коллапса промысловой популяции краба *Paralithodes camtschaticus* (Decapoda, Lithodidae) Кадьякского архипелага. *Биофизика*, **67** (2), 386–408 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922020223
2. Переварюха А. Ю. Непрерывная модель трех сценариев инфекционного процесса при факторах запаздывания иммунного ответа. *Биофизика*, **66** (2), 384–407 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921020204
3. Переварюха А. Ю. Моделирование сценариев глубокого популяционного кризиса быстро растущей популяции. *Биофизика*, **66** (6), 1144–1163 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921060107

4. Соловьева Т. Н. Динамическая модель деградации запасов осетровых рыб со сложной внутривидовой структурой. *Информационно-управляющие системы*, № 4 (83), 60–67 (2016). DOI: 10.15217/issn1684-8853.2016.4.60
5. Minkoff J. M. and Oever B. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2. *Nature Rev. Microbiol.*, **21**, 178–190 (2023). DOI: 10.1038/s41579-022-00839-1
6. Duan T., Xing C., and Chu J. ACE2-dependent and -independent SARS-CoV-2 entries dictate viral replication and inflammatory response during infection. *Nature*, **26**, 628–644 (2024). DOI: 10.1038/s41556-024-01388-w
7. Costa G., Lacerda S., and Figueiredo A. High SARS-CoV-2 tropism and activation of immune cells in the testes of non-vaccinated deceased COVID-19 patients. *BMC Biol.*, **21**, 36–48 (2023). DOI: 10.1186/s12915-022-01497-8
8. Flerlage T., Boyd D., and Meliopoulos V. Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract. *Nature Rev. Microbiol.*, **19**, 425–441 (2021). DOI: 10.1038/s41579-021-00542-7
9. Yang M., Meng Y., and Hao W. A prognostic model for SARS-CoV-2 breakthrough infection: Analyzing a prospective cellular immunity cohort. *Int. Immunopharmacol.*, **131** (20), 111829 (2024). DOI: 10.1016/j.intimp.2024.111829
10. Нечипуренко Ю. Д., Анашкина А. А. и Матвеева О. В. Изменение антигенных детерминант S-белка вируса SARS-COV-2 как возможная причина антителизависимого усиления инфекции и цитокинового шторма. *Биофизика*, **65** (4), 824–832 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920040262
11. Ванин А. Ф., Пекшев А. В. и Вагапов А. Б. Газообразный оксид азота и динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как предполагаемые лекарственные средства, способные купировать COVID-19. *Биофизика*, **66** (1), 183–194 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921010208
12. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут как доноры катионов нитрозония подавлять вирусные инфекции (гипотеза). *Биофизика*, **65** (4), 818–823 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920040250
13. Ершов П. В., Яблоков Е. О., Мезенцев Ю. В., Чуев Г. Н., Федотова М. В., Кручинин С. Е., Иванов А. С. Папаиноподобная протеаза PLPRO коронавируса SARS-COV-2 как противовирусная мишень для ингибиторов активного центра и белок-белковых взаимодействий. *Биофизика*, **67** (6), 1109–1121 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922060084
14. Пал Д., Гхош Д., Сантра К. и Махапатра Г. Математический анализ модели эпидемии COVID-19 с использованием данных эпидемиологических параметров болезней, распространенных в Индии. *Биофизика*, **67** (2), 301–318 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922020132
15. Louie J. and Agraz-Lara R. Tuberculosis-associated hospitalizations and deaths after COVID-19 shelter-in-place, San Francisco, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.*, **27** (8), 2227–2229 (2021). DOI: 10.3201/eid2708.210670
16. Planas D., Staropoli I., and Michel V. Distinct evolution of SARS-CoV-2 Omicron XBB and BA.2.86/JN.1 lineages combining increased fitness and antibody evasion. *Nat. Commun.*, **15**, 2254–2265 (2024). DOI: 10.1038/s41467-024-46490-7
17. Переварюха А. Ю. Анализ развития трендов современной эпидемической ситуации и факторов их локальной дифференциации. *Биофизика*, **68** (5), 1057–1073 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923050277
18. Tamura T., Irie T., and Deguchi S. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron XBB.1.5 variant. *Nature Commun.*, **15**, 1176–1188 (2024). DOI: 10.1038/s41467-024-45274-3
19. Kojima N. and Klausner J. Protective immunity after recovery from SARS-CoV-2 infection. *Lancet Infect. Dis.*, **22** (1), 12–14 (2022). DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00676-9
20. Swartz M. D. Antibody Duration After Infection From SARS-CoV-2 in the Texas coronavirus antibody response survey. *J. Infect. Dis.*, **227** (2), 193–201 (2023). DOI: 10.1093/infdis/jiac167
21. Ioannidis J., Cripps S., and Tanner M. Forecasting for COVID-19 has failed. *Int. J. Forecasting*, **423**, 423–438 (2022). DOI: 10.1016/j.ijforecast.2020.08.004
22. Wang Q., Guo Y., and Liu L. Antigenicity and receptor affinity of SARS-CoV-2 BA.2.86 spike. *Nature*, **624**, 639–644 (2023). DOI: 10.1038/s41586-023-06750-w
23. Nussenblatt V. Year-long COVID-19 infection reveals within-host evolution of SARS-CoV-2 in a patient with B cell depletion. *J. Infect. Dis.*, **225**, 1118–1124 (2022). DOI: 10.1101/2021.10.02.21264267
24. Cevik M. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*, **2** (1), e13–e22 (2021). DOI: 10.1016/S2666-5247(20)30172-5
25. Puhach O., Meyer B., and Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat. Rev. Microbiol.*, **21**, 147–161 (2023). DOI: 10.1038/s41579-022-00822-w
26. Tsang K., Perera R., and Fang J. Reconstructing antibody dynamics to estimate the risk of influenza virus infection. *Nat. Commun.*, **13**, 1557–1568 (2022). DOI: 10.1038/s41467-022-29310-8
27. Wilke C. O. The biophysical landscape of viral evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **121**, e2409667121 (2024). DOI: 10.1073/pnas.2409667121
28. Hay J. A. Quantifying the impact of immune history and variant on SARS-CoV-2 viral kinetics and infection rebound: A retrospective cohort study. *eLife*, **11**, e81849 (2022). DOI: 10.7554/eLife.81849
29. Bacaër N. The model of Kermack and McKendrick for the plague epidemic in Bombay and the type reproduction

- number with seasonality. *J. Math. Biol.*, **64**, 403–422 (2012). DOI: 10.1007/s00285-011-0417-5.
30. Kermack W. O. and McKendrick A. G. A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Papers Math. Phys.*, **115**, 700–721 (1927). DOI: 10.1098/rspa.1927.0118
 31. Bakare E., Nwagwo A., and Danso-Addo E. Optimal Control Analysis of an SIR Epidemic Model with Constant Recruitment. *Int. J. Appl. Math. Res.*, **3**, 273–285 (2014). DOI: 10.14419/ijamr.v3i3.2872
 32. Nikitina A. V., Lyapunov I. A., and Dudnikov E. A. Study of the spread of viral diseases based on modifications of the SIR model. *Comput. Math. Inform. Technol.*, **4** (1), 19–30 (2020). DOI: 10.23947/2587-8999-2020-1-1-19-30
 33. Almeida R., Cruz B., and Martins N. An epidemiological MSEIR model described by the Caputo fractional derivative. *Int. J. Dynam. Control.*, **7**, 776–784 (2019). DOI: 10.1007/s40435-018-0492-1
 34. Drake J., Bakach I., and Just M. Transmission models of historical Ebola outbreaks. *Emerg. Inf. Dis.*, **21**, 1447–1459 (2015). DOI: 10.3201/eid2108.141613
 35. Spyrou M.A., Keller M., and Tukhbatova R. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes. *Nat. Commun.*, **10**, 4470–4478 (2019). DOI: 10.1038/s41467-019-12154-0
 36. Chin V., Samia I., and Marchant R. A case study in model failure? COVID-19 daily deaths and ICU bed utilisation predictions in New York state. *Eur. J. Epidemiol.*, **35**, 733–742 (2020). DOI: 10.1007/s10654-020-00669-6
 37. Moein S., Nickaeen N. and Roointan A. Inefficiency of SIR models in forecasting COVID-19 epidemic: a case study of Isfahan. *Sci. Rep.*, **11**, 4725–4733 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-84055-6
 38. Rocchi E., Peluso S., Sisti D., and Carletti M. New epidemic model for the COVID-19 pandemic: The θ -SI(R)D model. *BioMedInformatics*, **2** (3), 398–404 (2022). DOI: 10.3390/biomedinformatics2030025
 39. Swadling L. and Maini K. T cells in COVID-19 – united in diversity. *Nature Immunol.*, **21**, 1307–1308 (2020). DOI: 10.1038/s41590-020-0798-y
 40. Ghafari M., Hall M., and Golubchik T. Prevalence of persistent SARS-CoV-2 in a large community surveillance study. *Nature*, **626**, 1094–1101 (2024). DOI: 10.1038/s41586-024-07029-4
 41. Billong S., Kouamou G., Bouetou T., and Tagoudjeu J. A hybrid epidemiological model based on individual dynamics. *J. Algorithms Comput. Technol.*, **17**, 345–349, 2023. DOI: 10.1177/17483026231186009
 42. Paxson W. and Shen B. A KdV-SIR equation and its analytical solutions: An application for COVID-19 data analysis. *Chaos, Solitons and Fractals*, **173**, e113610 (2023). DOI: 10.1016/j.chaos.2023.113610
 43. Choi H. and Hwang M., Evolution of a Distinct SARS-CoV-2 Lineage Identified during an Investigation of a Hospital Outbreak. *Viruses*, **16** (2), 337–343 (2024). DOI: 10.3390/v16030337
 44. Mikhailov V. V. and Spesivtsev A. V. Evaluation of the dynamics of phytomass in the Tundra zone using a fuzzy-opportunity approach. Intelligent distributed computing XIII (ISC 2019), *Studies in Computational Intelligence*, **868**, 449–454 (2020). DOI: 10.1007/978-3-030-32258-8_53
 45. Переварюха А. Ю. Итерационная непрерывно-событийная модель вспышки численности полужесткокрылого фитофага. *Биофизика*, **61** (2), 395–404 (2016). DOI: 10.31857/S0006302923050277
 46. Perevaryukha A. Y. Scenario modeling of regional epidemics of SARS-COV-2 and analysis of immunological aspects of new expected COVID waves. *Tech. Phys.*, **68**, 205–217 (2023). DOI: 10.1134/S1063784223060038
 47. Cao Y., Wang J., and Jian F. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*, **602**, 657–663 (2022). DOI: 10.1038/s41586-021-04385-3
 48. Perevaryukha A. Y. Modeling abrupt changes in population dynamics with two threshold states. *Cybern. Syst. Anal.*, **52**, 623–630 (2016). DOI: 10.1007/s10559-016-9864-8
 49. Perevaryukha A. Y. Hybrid model of bioresources' dynamics: Equilibrium, cycle, and transitional chaos. *Aut. Control Comp. Sci.*, **45**, 223–232 (2011). DOI: 10.3103/S0146411611040067
 50. Perevaryukha A. Y. Uncertainty of asymptotic dynamics in bioresource management simulation. *J. Comput. Syst. Sci. Int.*, **50**, 491–498 (2011). DOI: 10.1134/S1064230711010151
 51. Jian F., Feng L., and Yang S. Convergent evolution of SARS-CoV-2 XBB lineages on receptor-binding domain 455–456 synergistically enhances antibody evasion and ACE2 binding. *PLoS Pathogens*, **19** (12), e1011868 (2023). DOI: 10.1371/journal.ppat.1011868
 52. Cui J. and Li F. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 181–192 (2019). DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9
 53. Lu G. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*, **500**, 227–231 (2013). DOI: 10.1038/nature12328
 54. Ferretti L., Wymant C., and Petrie J. Digital measurement of SARS-CoV-2 transmission risk from 7 million contacts. *Nature*, **626**, 145–150 (2024). DOI: 10.1038/s41586-023-06952-2
 55. Fabiano N. and Radenovic S. On covid-19 diffusion in italy: data analysis and possible outcome. *Military Technical Courier*, **69** (1), 15–21 (2021). DOI: 10.5937/vojtehg68-25948
 56. Carreño J., Alshammary H., and Tcheou J. Activity of convalescent and vaccine serum against SARS-CoV-2 Omicron. *Nature*, **602**, 682–688 (2022). DOI: 10.1038/s41586-022-04399-5
 57. Perevaryukha A. Y. Cyclic and unstable chaotic dynamics in models of two populations of sturgeon fish. *Numer. Analys. Appl.*, **5**, 254–264 (2012). DOI: 10.1134/S199542391203007X

58. Mikhailov V. V. and Trofimova I. V. Computational modeling of the nonlinear metabolism rate as a trigger mechanism of extreme dynamics of invasion processes. *Tech. Phys. Lett.*, **48**, 301–304 (2022). DOI: 10.1134/S1063785022110013
59. Trofimova I. V., Perevaryukha A. Y., and Manvelova A. B. Adequacy of interpretation of monitoring data on biophysical processes in terms of the theory of bifurcations and chaotic dynamics. *Tech. Phys. Lett.*, **48**, 305–310 (2022). DOI: 10.1134/S1063785022110025
60. Perevaryukha A. Y. Predicative computing structures and hybrid automates in modeling invasive processes and epidemic COVID waves. *Tech. Phys.*, **68**, 8–17 (2023). DOI: 10.1134/S1063784223010048
61. Borisova T. Y. On the physicochemical method of analysis of the formation of secondary immunodeficiency as a bio-indicator of the state of ecosystems using the example of seabed biota of the Caspian Sea. *Tech. Phys. Lett.*, **48**, 251–257 (2022). DOI: 10.1134/S1063785022090012
62. Mikhailov V. V., Perevaryukha A. Y., and Trofimova I. V. Principles of simulation of invasion stages with allowance for solar cycles. *Tech. Phys. Lett.*, **49**, 97–105 (2023). DOI: 10.1134/S1063785023700049
63. Perevaryukha A. Y. Continuous model for the devastating oscillation dynamics of local forest pest populations in Canada. *Cybern. Syst. Anal.*, **55**, 141–152 (2019). DOI: 10.1007/s10559-019-00119-6

Hybrid Models of Transformations of Epidemic Waves

A.Yu. Perevaryukha*

*St. Petersburg Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 14-ya Linia 39, St. Petersburg, 199178 Russia

We analyze specific options for the development of the current epidemic situation due to regularly updated SAR-CoV-2 strains and compare methods for modeling the spread of infection. The relevance of the development of scenario modeling methodology is due to the renewed waves of growth in COVID cases in a number of regions in 2024 as an unusual variant of a pulsating epidemic process. The next surges of infections are determined by the activity of the evolutionary branch of the BA.2.86 Pirola strains, which have managed to split, which are better in affinity and antibody avoidance than the previously dominant Omicron EG.5 or XBB.1.5 lines. Strains in 2023 retained sufficient transmissibility with reduced affinity for the ACE2 receptor and a lower replication rate compared to Delta, but the persistence time of the virus increased. In the situation of immunization of the population, the trend of virus evolution has changed with an emphasis on the complication of the phylogenetic tree and with the selection of Spike protein variants that provide balanced characteristics for replication and evasion of antibodies. The potential for variability of coronavirus proteins is clearly not exhausted, and methods for predicting their promising mutations are under development. Methods for computational research of epidemic scenarios based on those modified by expanding the set of statuses of individuals in office “SIR” models are discussed. Variants of systems of equations based on SIR do not describe the resumption of COVID waves, which was already observed in 2020. Status transition schemes based on fundamental aspects are poorly suited for describing nonlinear oscillatory regimes of the epidemic, even when second-order oscillatory equations are included in the linear SIR scheme. The models developed by the author for decaying COVID waves based on equations with delay and with threshold effects were modified to take into account that the new Omicron lines change fluctuation regimes. The changes in oscillation modes that we have identified with an increase in repeated cases are not described only by restructuring the parameters of the equations with damping functions. According to the observed epidemic graphs of COVID waves, the models require a restructuring of regulatory functions. We propose to model aspects of the transition phases of the modern epidemic using special computational tools and based on the nature of nonlinear oscillations. An original method for forming a structure for a hybrid model is substantiated based on a set of right-hand sides of differential equations with heterogeneous delayed regulation parameters that generate relaxation oscillations and are redefined when the criteria for the truth of predicates are violated. It has been shown that changes in the binding affinity of S-protein variants with ACE2 are a key indicator for modeling periods of attenuation and activation of waves associated with the evolution of the virus, as in 2024 for the JN.1 strain. The new hybrid model with event time describes event-based transformations in the shape of epidemic waves associated with disturbances in the mutational landscape of the coronavirus, which can now be established by monitoring mutations and the frequency of occurrence of strains.

Keywords: models of epidemic fluctuations, expansion of office epidemic models, new SIR models, factors for renewed waves of COVID-19, hybrid models of mass infections, analysis of the evolution of SAR-CoV-2, oscillator equations in biophysics

ПОЛИСАХАРИД ИЗ *Solanum tuberosum* L. КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПРОТИВОЯЗВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

© 2024 г. Л.В. Генералова*, К.А. Крицкая**, Д.П. Ларюшкин**, Е.А. Генералов***, #

*Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы,
ул. Миклухо-Маклая, 6, Москва, 117198, Россия

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

***Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/2, Москва, 119991, Россия
#E-mail: generals1179@gmail.com

Поступила в редакцию 27.09.2024 г.

После доработки 27.09.2024 г.

Принята к публикации 02.10.2024 г.

Проведено исследование противоязвенной активности полисахарида из *Solanum tuberosum* L. на моделях хронической и острой язвы по методам Селье и Окабэ. Противоязвенный эффект оценивали по изменению язвенного индекса леченых животных в сравнении с контрольными. Применение полисахарида в обеих группах (с ежедневным введением в течение 7 и 3 суток) привело к значительному снижению язвенного индекса по сравнению с контрольными группами, где вводился физиологический раствор. При применении полисахарида частота патологических состояний (гиперемия, отек и внутреннее кровотечение) значительно снижалась вне зависимости от дозы введения. Это позволяет сделать вывод о том, что полисахарид эффективно предотвращает развитие язвенных изменений у крыс линии Август в модели язвы по методу Селье. В модели Окабэ при введении полисахарида в дозировке 0.5 мг на животное приводило к значительному, а в некоторых случаях практически полному заживлению язв даже при однократном введении.

Ключевые слова: полисахарид из *Solanum tuberosum* L., язвенная болезнь, язва по Селье, язва по Окабэ, противоязвенная активность.

DOI: 10.31857/S0006302924060229, EDN: NJKCQE

Язва — это глубокий воспалительный дефект эпителия кожи или слизистой оболочки, поражающий также базальную мембрану. Пептическая язвенная болезнь является одним из наиболее распространенных заболеваний в гастроэнтерологической практике. Ежегодно в мире язвенная болезнь выявляется у четырех миллионов человек, и ее распространенность составляет 5–10% от всего населения, варьируясь в зависимости от региона [1]. Высокая частота рецидивов заболевания (до 31%) и побочные эффекты стандартной терапии обуславливают необходимость поиска новых методов лечения, включая разработку препаратов с меньшим количеством побочных эффектов, а также превентивной терапии для пациентов из группы риска.

В последние десятилетия полисахариды стали объектом внимания исследователей как актив-

ные биологические соединения [2]. Полисахариды, выделенные из грибов, водорослей и высших растений, показали широкий терапевтический потенциал: они могут выступать в качестве радиопротекторов [3–6], противоопухолевых [7, 8], ранозаживляющих и противоязвенных агентов [9], а также обладать противовирусной [10–12] и антиатеросклеротической активностью [13]. Стимуляция врожденного иммунитета с помощью таких иммуномодуляторов может повысить устойчивость организма к патогенным угрозам. При этом большинство растительных полисахаридов относительно нетоксичны и не вызывают серьезных побочных эффектов, что делает их перспективными кандидатами для разработки иммуномодулирующих и ранозаживляющих препаратов.

Одним из таких потенциальных средств является полисахарид, выделенный из *Solanum tuberosum* L. (STP) [14]. Хотя его активность изучена недостаточно, в некоторых странах его уже используют для лечения желудочно-кишечных

Сокращение: STP — полисахарид, выделенный из *Solanum tuberosum* L.

заболеваний и как противовоспалительное средство [15]. Ранее было показано, что полисахариды обладают противоязвенными свойствами, и данное исследование является логическим продолжением этих результатов [16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали крыс линии Август массой 110–130 г, полученных из питомника ФИБХ (Пушино, Московская обл.). Животных содержали в стандартных условиях вивария с режимом освещения 12/12 ч и свободным доступом к пище и воде.

Для изучения специфической активности STP по методу Г. Селье использовали крыс, по 10 животных в каждой группе. Животных фиксировали на спине на протяжении 22 ч. STP вводили однократно в хвостовую вену за 1 ч до начала иммобилизации в дозах 0.1, 0.25, 0.5 и 1 мг на животное в виде стерильного 0.9% раствора NaCl. Контрольная группа получала физиологический раствор, а экспериментальные группы – STP в указанных дозах. По завершении 22 ч проводили гуманный забой животных и описывали состояние слизистой стенки желудка.

Для исследования специфической активности STP в моделях острой и хронической «ацетатной» язвы по методу Окабэ [17] использовали крыс по 10 животных в каждой группе. В острой модели STP вводили крысам однократно в первый день и ежедневно в течение трех суток подряд. В хронической модели полисахарид вводили ежедневно в течение трех и семи дней в дозе 0,5 мг на животное. Режим введения был выбран на основе динамики язвообразования и ранее полученных данных.

За 18 ч до начала эксперимента животным прекращали подачу пищи, сохраняя свободный доступ к воде. После завершения оперативных вмешательств животных возвращали на обычное питание. Оперированные животные с острой язвой жили в течение 3 суток и умерщвлялись на 4-е сутки, тогда как с хронической язвой животные жили после операции 9 суток и забивались на 10-е сутки.

После гуманной эвтаназии животных под эфирным наркозом выполняли биторакотомию, рассекали брюшную стенку и извлекали желудок. Желудок через пищевод наполняли 1% нейтральным формалином, перевязывали с обоих концов и погружали на 5 мин в 1% формалин. Вскрытие желудка проводили по большой кривизне и изучали макроскопическую картину слизистой оболочки. Измерение площади повреждения проводили с использованием пакета программ ImageJ, определяли «язвенный индекс», который выражали в см². Воспаление оценивали визуально и с

использованием пакета программ ImageJ, как процент «красного» по нормировке от контрольной ткани желудка без воспаления (по методу Йо с соавторами [18]).

Для анализа биномиальных распределений, представленных в виде бинарных данных (0 или 1), был использован χ^2 -тест (тест «хи-квадрат»). Этот метод позволил оценить наличие статистически значимых различий в частоте возникновения гиперемии между контрольной и экспериментальными группами. Для каждой группы строились таблицы сопряженности, на основе которых вычислялись значения χ^2 -статистики и соответствующие p -значения. Анализ данных проводили с использованием Python и библиотеки SciPy.

Для небиномиальных распределений сначала проводили тест на нормальность и использовали непараметрический критерий Крускала–Уоллиса с поправкой Бонферрони для множественных сравнений при уровне значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вначале мы решили проверить, может ли полисахарид, выделенный из *Solanum tuberosum* L., защищать слизистую оболочку желудка в модели язвы по методу Селье. Мы исследовали такие параметры, как гиперемия, отек и внутреннее кровотечение, чтобы оценить воспалительные изменения в слизистой. На рис. 1 представлены пирамидальные графики и таблицы значений, демонстрирующие влияние по сравнению с контрольной группой различных доз полисахарида STP на три показателя – гиперемию (рис. 1а), отек (рис. 1б) и внутреннее кровотечение (рис. 1в) у экспериментальных животных. Как видно из рис. 1, при применении STP частота всех трех патологических состояний заметно снижалась вне зависимости от дозы введения, что подтверждается статистической значимостью $p \leq 0.05$. Это позволяет сделать вывод о том, что полисахарид STP эффективно предотвращает развитие язвенных изменений у крыс линии Август в модели язвы по методу Селье.

Затем мы изучили влияние STP в модели острой язвы у крыс, используя метод Окабэ. На рис. 2 представлены значения язвенного индекса, выраженные в см². Полисахарид вводили в течение трех дней с дозировкой 0.5 мг на животное, дозировка была выбрана на основании предыдущих экспериментов, продемонстрировавших ее оптимальную эффективность. Как видно из данных, применение STP способствовало значительному, а в некоторых случаях и практически полному заживлению язв. Интересно отметить, что даже однократное введение полисахарида также способствовало значительному снижению язвен-

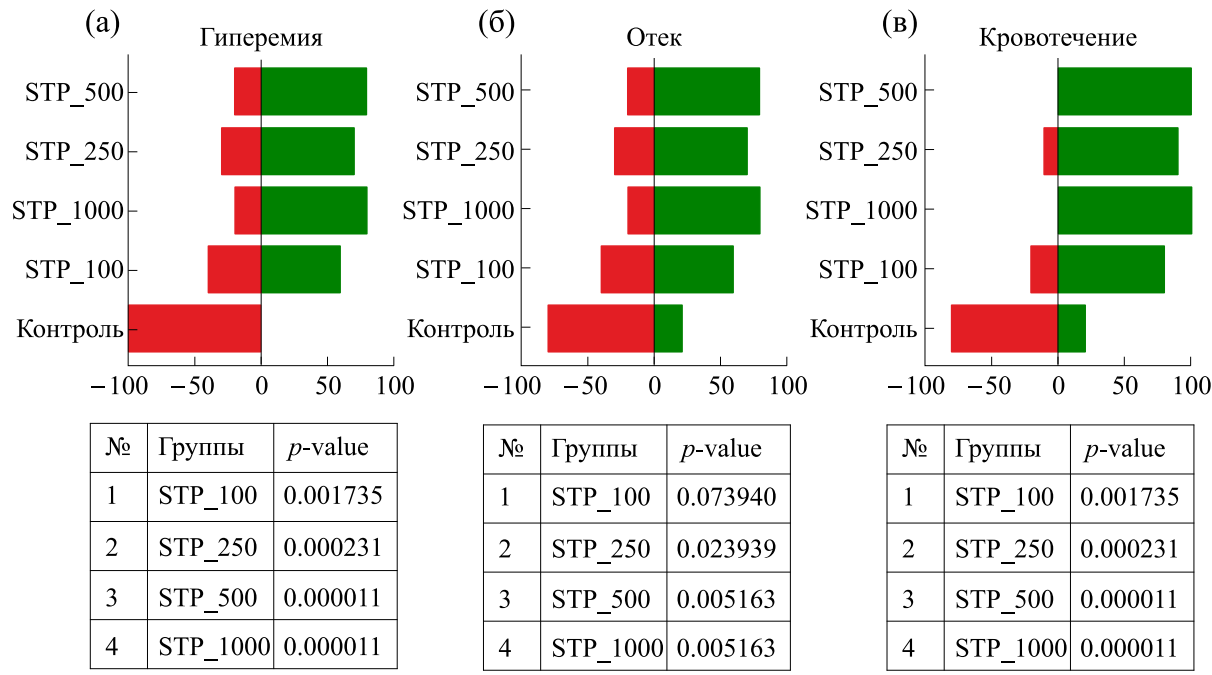


Рис. 1. Влияние полисахарида STP на гиперемию (а), отек (б) и внутреннее кровотечение (в) у экспериментальных животных. Зеленые графики показывают процент животных без патологических изменений, а красные — с патологическими изменениями. В таблицах продемонстрирована статистическая значимость изменений по каждому показателю по сравнению с контрольной группой, с использованием χ^2 -статистики и уровня значимости $p \leq 0,05$.

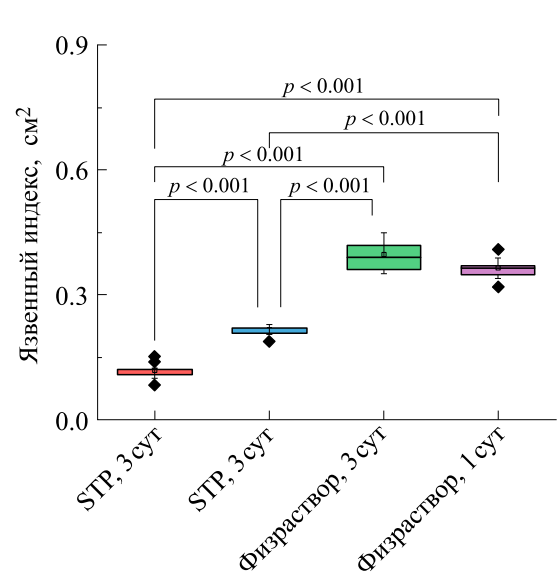


Рис. 2. Сравнение язвенного индекса у крыс в четырех экспериментальных группах: 1) введение STP ежедневно в течение 3 суток, 2) однократное введение STP в первые сутки, 3) ежедневное введение физиологического раствора в течение 3 суток, 4) однократное введение физиологического раствора в первые сутки. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Крускала–Уоллиса с поправкой Бонферрони для множественных сравнений и уровнем значимости $p \leq 0.05$.

ного индекса по сравнению с контрольной группой. Введение физиологического раствора не оказало значительного влияния на патологический процесс.

В дополнение к этому, мы исследовали влияние STP в модели хронической язвы. На рис. 3 представлены значения язвенного индекса для четырех экспериментальных групп. Применение полисахарида в обеих группах (с ежедневным введением в течение 7 и 3 суток) привело к значительному снижению язвенного индекса по сравнению с контрольными группами, где вводился физиологический раствор. Это подтверждает эффективность полисахарида STP не только в модели острой, но и хронической язвы.

Таким образом, можно сделать вывод, что полисахарид STP эффективно предотвращает развитие язв как в острой, так и в хронической моделях

В данной работе было продемонстрировано, что полисахарид STP не только предотвращает развитие язвы в модели Селье, но и может быть эффективным в качестве лекарственного средства в моделях язвы как острой, так и хронического типа, в достаточно широком диапазоне применяемых дозировок.

Одним из ключевых факторов, объясняющих эффективность полисахаридов в данных моделях, является их способность снижать оксидативный стресс. В условиях язвенных поражений, вызванных стрессом или агрессивными химическими агентами, как в случае с резерпином, оксидативное повреждение клеток слизистой оболочки желудка играет важную роль в патогенезе заболевания. Полисахариды, благодаря своим антиоксидантным свойствам, способны нейтрализовать свободные радикалы и снижать уровень окислительного стресса, что способствует уменьшению повреждения клеток и ускоряет процессы регенерации.

Кроме того, полисахариды обладают выраженным противовоспалительным эффектом. В условиях язвенной болезни воспаление слизистой оболочки желудка приводит к дальнейшему ее повреждению и замедляет заживление. Полисахарид STP может модулировать активность иммунной системы, регулируя выработку про- и противовоспалительных цитокинов, таких как IL-1 и IL-4, что было показано ранее [16]. Это позволяет снизить воспаление и способствует ускоренной регенерации тканей [19].

Помимо этого, полисахариды могут оказывать влияние на микробиоту кишечника, что имеет важное значение для поддержания здоровья желудочно-кишечного тракта. Они способствуют росту полезных бактерий, таких как *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, которые укрепляют барьерную функцию слизистой оболочки желудка и защищают ее от агрессивного воздействия внешних факторов.

Полисахарид STP может усиливать продукцию защитных факторов слизистой оболочки желудка, таких как муцин, который формирует барьер, защищающий ткани от повреждающего действия желудочного сока и других агентов.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что полисахарид STP может проявлять свое защитное действие за счет комплексного воздействия на механизмы воспаления, оксидативного стресса, микробиоты и барьерной функции слизистой оболочки желудка. Эти механизмы могут объяснить эффективность полисахарида как в моделях острой, так и хронической язвы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта 23-Ш06-08 междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» и при финансовой поддержке ООО НПФ «Гемма-

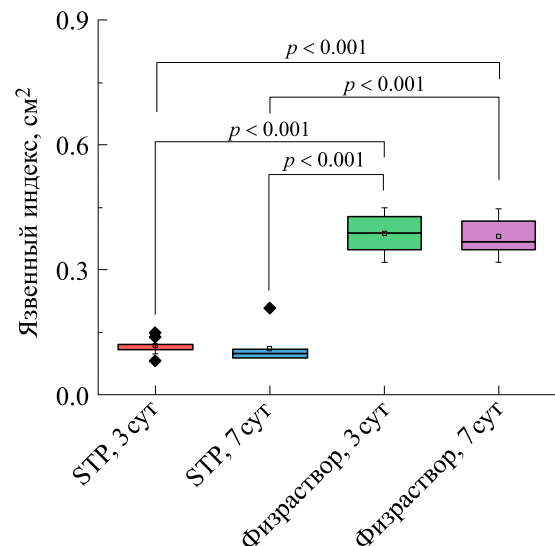


Рис. 3. Сравнение язвенного индекса у крыс в четырех экспериментальных группах: 1) введение STP ежедневно в течение 7 суток, 2) введение STP ежедневно в течение 3 суток, 3) введение физиологического раствора ежедневно в течение 7 суток, 4) введение физиологического раствора ежедневно в течение 3 суток. Статистический анализ проводился с использованием непараметрического критерия Крускала–Уоллиса с поправкой Бонферрони для множественных сравнений и уровнем значимости $p \leq 0.05$.

Б» и ИБФ РАН № 075-01512-22-02/004-00 по теме: «Нейропротекторные препараты нового поколения» (№ 1022080100047-5-1.6.4, регистрационный номер 122112800049-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Все эксперименты на животных проводились по стандартам FELASA (FELASA Guidelines and Recommendations) [20], в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых Институтом для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 18 марта 1986), с требованиями законодательства и одобрены Комитетом по этике Института биофизики клетки РАН (Разрешение № 4 от 14 марта 2022 г.; Разрешение № 3 от 12 марта 2023 г.). Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках в соответствии с Директивой 2010/63/EU

Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [21].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abbasi-Kangevari M., Ahmadi N., Fattahi N., Rezaei N., Malekpour M. R., Ghamari S. H., Moghaddam S. S., Azadnajafabad S., Esfahani Z., Kolahi A. A., Roshani S., Rezazadeh-Khadem S., Gorgani F., Naleini S. N., Naderimagham S., Larijani B., and Farzadfar F. Quality of care of peptic ulcer disease worldwide: A systematic analysis for the global burden of disease study 1990–2019. *PLoS One*, **17** (8), (2022). DOI: 10.1371/journal.pone.0271284
- Mohammed A. S. A., Naveed M., and Jost N. Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). *J. Polymers Environ.*, **29** (8), 2359–2371 (2021). DOI: 10.1007/s10924-021-02052-2
- Генералов Е. А. Структура и радиопротекторные свойства нетоксичного полисахарида из *Helianthus Tuberosus* L. *Биофизика*, **59** (3), 439–445 (2014).
- Wang W., Xue C., Mao X. Radioprotective effects and mechanisms of animal, plant and microbial polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromolecules*, **153**, 373–384 (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.203
- Генералов Е. А. Водно-растворимый полисахарид из *Helianthus tuberosus* L.: радиозащитная, колониестимулирующая и иммуномодулирующая активность. *Биофизика*, **60** (1), 73–79 (2015).
- Generalov E., Dyukina A., Shemyakov A., Mytsin G., Agapov A., Kritskaya K., Kosenkov A., Gaidin S., Maiorov S., Generalova L., and Laryushkin D. Polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. as a potential radioprotector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **733**, 150442 (2024). DOI: 10.1016/j.bbrc.2024.150442
- Jin H., Li M., Tian F., Yu F., and Zhao W. An overview of antitumour activity of polysaccharides. *Molecules*, **27** (22), 8083 (2022). DOI: 10.3390/molecules27228083
- Генералов Е. А., Левашова Н. Т., Сидорова А. Э., Чумаков П. М. и Яковенко Л. В. Автоволновая модель бифуркационного поведения трансформированных клеток под действием полисахарида. *Биофизика*, **62** (5), 660–668 (2017).
- Wang X.-Y., Yin J.-Y., Hu J.-L., Nie S.-P., and Xie M.-Y. Gastroprotective polysaccharide from natural sources: Review on structure, mechanism, and structure–activity relationship. *Food Front.*, **3**, 560–591 (2022). DOI: 10.1002/fft2.172
- Генералов Е. А. Спектральные характеристики и моносакхаридный состав противовирусного полисахаридного индуктора интерферона из *Helianthus Tuberosus* L. *Биофизика*, **60** (1), 65–72 (2015).
- Генералов Е. А., Симоненко Е. Ю., Кульченко Н. Г. и Яковенко Л. В. Молекулярные основы биологической активности полисахаридов при ассоциированных с COVID-19 состояниях. *Биомед. химия*, **68** (5), 403–418 (2022). DOI: 10.18097/PBMC20226806403
- Generalova L. V., Laryushkin D. P., Leneva I. A., Ivanina A. V., Trunova G. V., Dolinnyi S. V., and Generalov E. A. Evaluation of the polysaccharide “immeran” activity in syrian hamsters’ model of SARS-CoV-2. *Viruses*, **16**, 423 (2024). DOI: 10.3390/v16030423
- Claus-Desbonnet H., Nikly E., Nalbantova V., Karcheva-Bahchevanska D., Ivanova S., Pierre G., Benbassat N., Katsarov P., Michaud P., Lukova P., and Delattre C. Polysaccharides and their derivatives as potential antiviral molecules. *Viruses*, **14** (2), 426 (2022). DOI: 10.3390/v14020426
- Генералов Е. А. и Яковенко Л. В. Состав и митогенная активность полисахарида из *Solanum tuberosum* L. *Биофизика*, **68** (5), 856–862 (2023). DOI: 10.1134/S0006350923050093
- Vlachojannis J. E., Cameron M., and Chrubasik S. Medicinal use of potato-derived products: a systematic review. *Phytotherapy Res.*, **24**, 159–162 (2010). DOI: 10.1002/ptr.2829
- Генералов Е. А. Влияние полисахаридного препарата «Иммеран» на течение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **4** (1), 85–89 (2019).
- Tsukimi Y. and Okabe S. Effect of anterior unilateral vagotomy on healing of kissing gastric ulcers induced in rats. *Jap. J. Pharmacol.*, **66**, 105–114 (1994).
- Yoo C. Y., Son H. U., Kim S. K., Kim S. O., and Lee S. H. Improved image analysis for measuring gastric ulcer index in animal models and clinical diagnostic data. *Diagnostics (Basel)*, **12**(5), 1233 (2022). DOI: 10.3390/diagnostics12051233
- Schultz G. S., Chin G. A., Moldawer L., and Diegelmann R. F. Principles of wound healing. In: Mechanisms of vascular disease: A reference book for vascular specialists. Ed. by R. Fitridge and M. Thompson (University of Adelaide Press, Adelaide, Australia, 2011). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534261/>
- Guillen J. FELASA guidelines and recommendations. *J. Am. Association for Laboratory Animal Sci.*, **51**, 311–321 (2012).
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. FAOLEX n.d. <https://www.fao.org/faolex/results/details/ru/c/LEX-FAOC098296/> (accessed August 20, 2024).

Polysaccharide from *Solanum tuberosum* L. as a Potential Antiulcer Drug**L.V. Generalova*, K.A. Kritskaya**, D.P. Laryushkin**, and E.A. Generalov*******The Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia****Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*****M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1/2, Moscow, 119991 Russia*

A study was conducted to investigate the antiulcer activity of the polysaccharide from *Solanum tuberosum* L. in chronic and acute ulcer models proposed by Selye and Okabe. The antiulcer effect was assessed by determining and comparing the ulcer index in the treated animals and a control. The groups of treated animals that received a daily administration of polysaccharide for 7 and 3 days showed a significant decrease in the ulcer index when compared with that of the control group of animals given physiological saline. In presence of polysaccharide, the incidence of pathological conditions (hyperemia, edema, and internal bleeding) decreased substantially regardless of the dose. This provides the conclusion that the polysaccharide may effectively prevent changes associated with the development of ulcerative colitis in "August" line rats in the ulcer model adduced by Selye. According to Okabe, polysaccharide dose (0.5 mg/animal) even in a single administration led to significant and in some cases almost complete healing of ulcers.

*Keywords: polysaccharide from *Solanum tuberosum* L., peptic ulcer disease, Selye ulcer, Okabe ulcer, antiulcer activity*

КАТИОН НИТРОЗОНИЯ КАК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ КОМПОНЕНТ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ

© 2024 г. А.Ф. Ванин^{*,#}, Л.А. Островская^{**,##}, Д.Б. Корман^{**}, В.А. Рыкова^{**},
Н.В. Блюхтерова^{**}, М.М. Фомина^{**}, В.Д. Микоян^{*}, Н.А. Ткачев^{*}

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

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

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

^{##}E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

После доработки 23.04.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Сочетанное применение двух соединений — биядерной формы динитрозильных комплексов железа с глутатионом (100 мкМ/кг, подкожно) и диэтилдитиокарбамата натрия (500 мкМ/кг, внутривенно), вводившихся восьмикратно, вызывает полное ингибирование развития солидной опухоли мышей на протяжении двух недель после перевивки (карцинома легких Льюис). Однако при оценке противоопухолевого эффекта на 20-е сутки после окончания введения препаратов максимальная активность — торможение роста опухоли на 60% — наблюдается при введении препаратов в последовательности «диэтилдитиокарбамат, а затем через час биядерные динитрозильные комплексы железа», тогда как при применении препаратов в обратной последовательности ингибирование роста опухоли не превышает 30%. На основе анализа данных ЭПР-измерений тканей опухоли (15-е сутки развития опухоли) сделан вывод о том, что торможение роста опухолей было вызвано катионами нитрозония, высвобождающимися из биядерных динитрозильных комплексов железа с глутатионом в ходе распада этих комплексов под действием диэтилдитиокарбамата натрия.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, дитиокарбамат, катионы нитрозония, карцинома легких Льюис.

DOI: 10.31857/S0006302924060231, EDN: NJJOIL

Ранее мы показали, что распад динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами при их контакте с производными дитиокарбамата приводит, как это схематически показано на рис. 1, к образованию мононитрозильного комплекса железа с производными дитиокарбамата (МНКЖ-ДЭТК) в результате перехода железо-мононитрозильной группы из железо-динитрозильного фрагмента моно- и биядерной формы ДНКЖ на дитиокарбаматные лиганды и высвобождению из ДНКЖ катиона нитрозония (NO^+) [1, 2].

Сокращения: ДНКЖ — динитрозильные комплексы железа, МНКЖ-ДЭТК — мононитрозильные комплексы железа с производными дитиокарбамата, Б-ДНКЖ-Г — биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, ДЭТК — диэтилдитиокарбамат натрия, п/к — подкожно, в/б — внутривенно, ТРО — коэффициент торможения роста опухоли.

Появляющиеся в ходе этого распада мононитрозильные комплексы железа с производными дитиокарбамата достаточно устойчивы и не выступают в отличие от ДНКЖ качестве эффективных доноров нейтральных молекул NO , о чем свидетельствует факт отсутствия какого-либо заметного снижения артериального давления у животных при введении в их организм мононитрозильных комплексов с производными дитиокарбамата [3].

Что касается NO^+ , высвобождающихся из ДНКЖ, эти катионы, связываясь с различными тиолсодержащими белками, критически важными для жизнедеятельности клеток и тканей, как правило, инициируют их гибель.

Такого рода исход процедуры обработки культуры опухолевых клеток, бактерий и коронавируса SARS-CoV-2 в организме сирийских хомячков сначала биядерными динитрозильными ком-

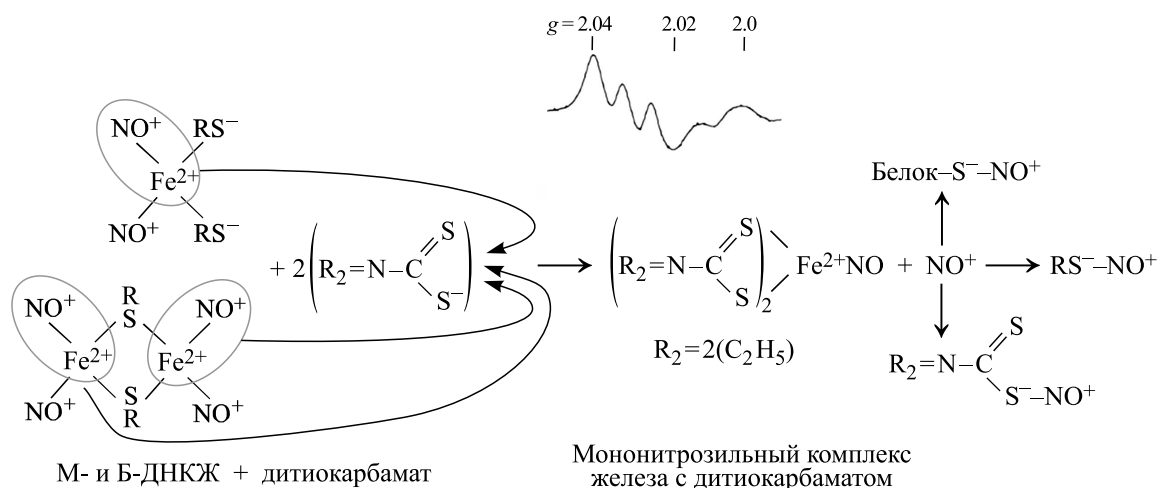


Рис. 1. Превращение моно- и биядерных ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в МНКЖ-дитиокарбамат, сопровождаемое высвобождением в среду катиона нитрозония. В центре приведен триплетный сигнал ЭПР МНКЖ-дитиокарбамата, зарегистрированный при 77 К.

плексами железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-Г), а затем производными дитиокарбамата (N-метил-D, L-глуканин-дитиокарбаматом или диэтилдитиокарбаматом) мы продемонстрировали в наших предыдущих исследованиях [2, 4, 5].

Была предпринята попытка проверить эффект такой же процедуры — последовательного действия Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК — на развитие ряда перерываемых опухолей мышей [6]. Заметного влияния на этот процесс в такого рода опытах мы не обнаружили. Не исключено, что эта неудача была обусловлена использованием низких доз Б-ДНКЖ-Г (2 мкМ/кг) против 250 мг/кг ДЭТК. В этих условиях высвобождавшиеся из Б-ДНКЖ-Г катионы нитрозония могли связываться преимущественно с тиоловой группой самого ДЭТК и не влиять на функционирование внутриклеточных тиолсодержащих белков. Поэтому в настоящей работе мы резко подняли дозу Б-ДНКЖ-Г (до 100 мкМ/кг) против 500 мкМ/кг ДЭТК. Это повышение, как будет показано ниже, существенно усилило противоопухолевое действие Б-ДНКЖ-Г+ДЭТК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. В экспериментах использовали сульфат железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Fluka, Швейцария), восстановленный глутатион, диэтилдитиокарбамат натрия (ДЭТК) и нитрит натрия (Sigma, США).

Биядерная форма ДНКЖ с глутатионом. Комплекс синтезировали по методу, описанному в работе [7]. В соответствии с этим методом синтез 10 мМ раствора Б-ДНКЖ-Г проводили следующим образом. К 10 мл дистиллированной воды на

воздухе добавляли 124 мг глутатиона (40 мМ), приводившего к снижению pH раствора до 4.0, с последующим введением в него 56 г сульфата железа (20 мМ), приводившего к дальнейшему снижению pH раствора до 3.8. После этого в раствор добавляли 14 мг нитрита натрия (20 мМ), что приводило к розовому окрашиванию раствора, обусловленному образованием S-нитрозоглутатиона. Судя по интенсивности оптического поглощения на 334 нм, характерн После этого, добавляя каплями крепкий раствор щелочи (NaOH), pH раствора повышали до 7.2–7.4, что приводило к оранжевому окрашиванию раствора, обусловленному начавшимся синтезом Б-ДНКЖ-Г при участии S-нитрозоглутатиона, Fe^{2+} и глутатиона. Для полного превращения S-нитрозоглутатиона в Б-ДНКЖ-Г требовалось не менее 4–5 ч. Полученный раствор после удаления путем фильтрования через бумагу образовавшегося за это время осадка гидроокиси железа замораживали в жидком азоте и использовали (после размораживания) в экспериментах на животных. Концентрацию полученного Б-ДНКЖ-Г (с молекулярной массой 846 Да) оценивали оптическим методом по интенсивности характерных для этого комплекса полос поглощения на 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции, равными соответственно 4600 и $3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ в пересчете на один железо-динитрозильный фрагмент комплекса [8]. Согласно этой оценке концентрация синтезированного Б-ДНКЖ-Г в растворе составляла 10 мМ.

Диэтилтиокарбамат натрия. Применяли конвенционный препарат диэтилдитиокарбамата натрия $[\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N-CS}_2]$ (Sigma, США).

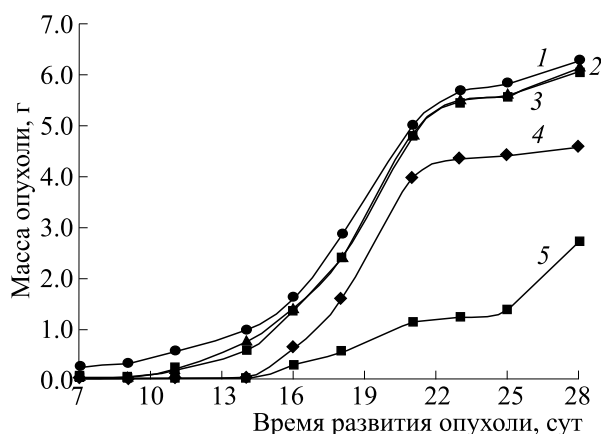


Рис. 2. Влияние Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг, п/к) и ДЭТК (500 мкМ/кг, в/б) на кинетику развития карциномы легких Льюис: 1 — контроль, 2 — Б-ДНКЖ-Г, 3 — ДЭТК, 4 — Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК с интервалом 1 ч, 5 — ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г с интервалом 1 ч. Препараты вводили с 1 по 8 сутки после перевивки опухоли.

Противоопухолевая активность *in vivo*. Эксперименты проведены на 80 инбредных мышах линии BDF₁ — гибридах первого поколения f₁(C₅₇Bl/6[DBA₂]) с массой тела 18–20 г разведения питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России». В качестве тест-системы служила солидная опухоль мышей — карцинома легких Льюис, перевиваемая подкожно (п/к) в соответствии со стандартной методикой [9].

Препараты вводили в водных растворах с 1 по 8 сутки после перевивки опухоли: Б-ДНКЖ-Г в суточной дозе 100 мкМ/кг, п/к, а ДЭТК — в суточной дозе 500 мкМ/кг внутривенно (в/б). При сочетанном применении препаратов была изучена их эффективность при альтернативной последовательности введения соединений с интервалом в 1 ч.

Оценка противоопухолевой активности препаратов проведена путем сопоставления кинетики роста опухоли в группах контрольных и леченых животных. В качестве показателя ретардирующего эффекта препаратов служил коэффициент торможения роста опухоли ТРО (%), который определяли из соотношения $TPO = (P_C - P_T) / P_C (\%)$, где P_C и P_T — объем (или масса) опухоли в группах контрольных и леченых животных соответственно. С этой целью проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как $V = ab^2/2$, где a — длина, b — высота опухолевого узла. При оценке массы опухоли объем перемножали на плотность опухолевой ткани, равную 1 г/см³ [9].

ЭПР-измерения биоматериала. ЭПР-измерения проводили в тканях опухоли и печени, полученных от мышей-опухоленосителей (по две мы-

ши в группе) на 15-е сутки после перевивки опухоли. Образцы биологического материала отбирали через 1 ч после введения препаратов в следующих группах:

- Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг, п/к);
- ДЭТК (100 мг/кг, в/б);
- Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг, п/к) + ДЭТК (100 мг/кг, в/б) с интервалом 1 ч;
- ДЭТК (100 мг/кг, в/б) + Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг, п/к) с интервалом 1 ч.

Биоматериал помещали в цилиндрические ампулы диаметром 4 мм и замораживали в жидком азоте. Масса извлеченных затем из этих ампул, замороженных образцов составляла не менее 0.5 г при длине образца 3 см. При такой длине образец полностью заполнял рабочий объем резонатора радиоспектрометра. Измерения спектров ЭПР проводили на модифицированном радиоспектрометре «Радиопан» (Польша) при температуре жидкого азота.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка оценок массы опухолей проведена с использованием пакета компьютерных программ «Statistica 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК на развитие карциномы Льюис при их индивидуальном и сочетанном (в альтернативной последовательности) применении характеризуют данные, представленные на рис. 2 и в табл. 1.

Как видно из представленных данных, индивидуальное применение Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) практически не влияет на развитие опухоли, о чем свидетельствует совпадение соответствующих кривых 2 и 3 с контрольной кривой 1 на рис. 2.

Таблица 1. Влияние Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК при индивидуальном и сочетанном применении на развитие карциномы легких Льюис

Препарат	Суточная доза и способ введения	Средняя масса опухоли, г	ТРО, %
Б-ДНКЖ-Г	100 мкМ/кг, п/к	6.11 ± 0.4	0
ДЭТК	500 мкМ/кг, в/б	6.10 ± 0.4	0
Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК	100 мкМ/кг, п/к + 500 мкМ/кг, в/б	4.55 ± 0.3	30
ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г	500 мкМ/кг, в/б + 100 мкМ/кг, п/к	2.71 ± 0.3	60
Контроль	—	6.26 ± 0.4	—

Примечание. Введение препаратов Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б) с 1 по 8 сутки после перевивки опухоли. Оценка эффекта проведена на 28-е сутки развития опухоли.

Сочетанное применение препаратов в любой последовательности приводит к полному ингибированию роста опухоли на протяжении 14 суток ее развития, то есть в течение всего периода введения препаратов на протяжении 8 суток и еще в течение 6 суток после окончания воздействия (рис. 2, кривые 4 и 5).

В дальнейшем, начиная с 15 суток, развитие опухолей у мышей, получавших комбинацию препаратов, возобновляется, однако наблюдаются весьма существенные различия в кинетике их развития в зависимости от последовательности введения препаратов.

Так, при оценке противоопухолевого эффекта комбинации препаратов на 28-е сутки развития опухоли (20-е сутки после окончания введения препаратов) показано, что торможение роста опухоли у мышей, получавших ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-Г, составляет 60%, в то время как введение этих соединений в альтернативной последовательности приводит к ингибированию роста опухоли лишь на 30% по сравнению с контролем (рис. 2, кривые 4 и 5; табл. 1).

Результаты ЭПР-измерений образцов тканей опухолей и печени, взятых через 1 ч после индивидуального и сочетанного (в альтернативной последовательности) воздействия препаратов Б-ДНКЖ-Г (п/к) и ДЭТК (в/б), а также у контрольных животных (15-е сутки развития опухоли) представлены на рис. 3.

В опухолевом образце, как и ожидалось, был зарегистрирован триплетный ЭПР-сигнал нитрозильного комплекса гем-содержащего белка, очевидно, гемоглобина (рис. 3а, спектр 1).

Такого рода сигнал был впервые обнаружен еще в 1960-х годах группой А. Саприна при ЭПР-измерениях ими тканей злокачественных опухолей [10]. Естественно, в то время невозможно было предположить, какие процессы, развивающиеся в организме животных и человека, ответственны за появление этих комплексов и чем

конкретно обусловлено появление в опухоли оксида азота, связывающегося с гем-содержащими белками с образованием ЭПР-активных нитрозильных гем-содержащих комплексов. Только сейчас, когда оксид азота признан в качестве одного из фундаментальных регуляторов метаболических процессов, можно предполагать, что этот агент может вырабатываться иммунокомпетентными клетками с защитной целью в ответ на злокачественное перерождение тканей организма. Исходя из этого, можно предположить, что источником оксида азота, ответственного за образование гем-нитрозильного комплекса в опухоли, могли быть активированные макрофаги, в которых индуцибельная NO-синтаза начинала синтезировать NO [11].

Характерно, что триплетный сигнал ЭПР гем-нитрозильных комплексов, зарегистрированный нами в опухоли, не обнаруживался в печени мышей-опухоленосителей (рис. 3б, спектр 1') и тем самым в крови, поскольку в образце печени сохранялось достаточно большое количество крови. В спектре ЭПР этой ткани регистрировались сигналы ЭПР свободных радикалов при $g = 2.0$, сигнал комплексов молибдена при $g = 1.97$ и сигнал восстановленных железо-серных белков при $g = 1.94$, характерные для печени интактных животных [12].

После введения мышам-опухоленосителям Б-ДНКЖ-Г в опухоли регистрировался интенсивный сигнал ЭПР с $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$ (рис. 3а, спектр 2), называемый в соответствии со средним значением g -фактора, равным 2.03 — сигналом 2.03 [13]. Сохранение анизотропной формы этого сигнала при повышении температуры его регистрации от 77 К до комнатной температуры позволяет, в соответствии с работой [14], отнести его к моноядерным ДНКЖ, связанным с тиоловыми группами белков. Появление этих комплексов, очевидно, было обусловлено переносом железо-динитрозильных фрагментов из

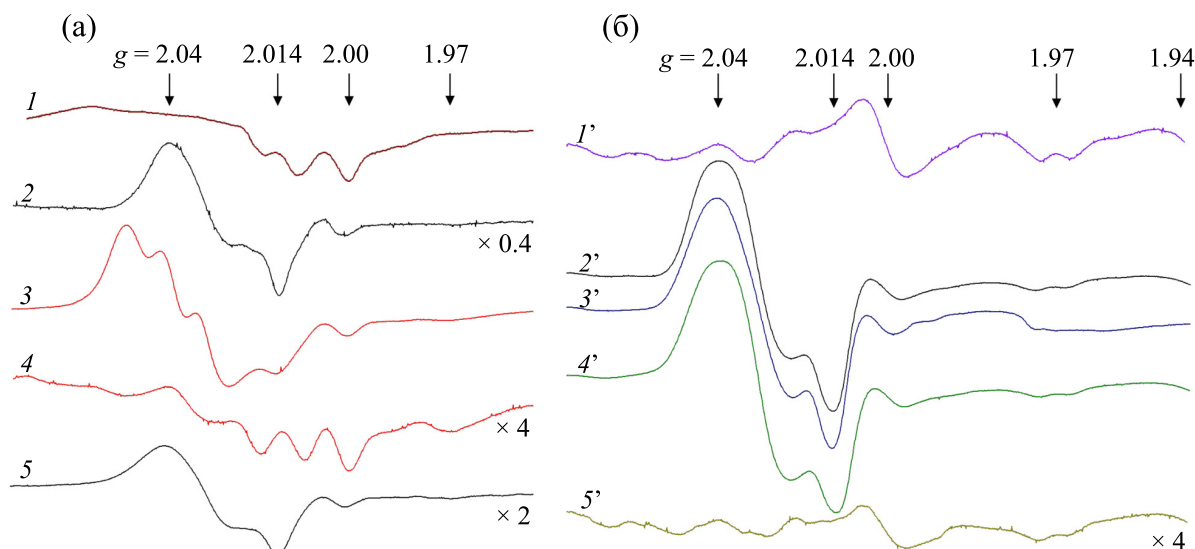


Рис. 3. Спектры ЭПР опухоли (а) и печени (б) мышей-опухоленосителей (карцинома легких Льюис, 15-е сутки после перевивки): 1 – контроль, 2 – Б-ДНКЖ-Г, 3 – Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК, 4 – ДЭТК, 5 – ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г; 1' – контроль, 2' – Б-ДНКЖ-Г, 3' – Б-ДНКЖ-Г + ДЭТК, 4' – ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г, 5' – ДЭТК. Спектры зарегистрированы при 77 К, большинство при одном усилении спектрометра. Усиление спектрометра для спектров 2, 4, 5 и 5' отличается на величину, указанную с правой стороны.

ЭПР-неактивных диамагнитных Б-ДНКЖ-Г на тиоловые группы белков ткани опухоли.

При последовательном введении мышам Б-ДНКЖ-Г, а затем ДЭТК вместо сигнала 2.03 в опухоли наблюдался триплетный сигнал ЭПР, характерный для МНКЖ-ДЭТК (рис. 3а, спектр 3), появление которого было, очевидно, обусловлено процессом, показанным на рис. 1. Это означает, что ткань опухоли должна была подвергнуться атаке катионов нитрозония, что и могло привести к подавлению роста опухоли в первые две недели после ее перевивки, как это показано на рис. 2.

Как было показано, рост опухоли в течение первых двух недель после ее перевивки полностью блокировался и в условиях альтернативной последовательности введения препаратов: ДЭТК, а затем ДНКЖ-Г (рис. 2). ЭПР-измерения показали, что в этом случае наблюдался сигнал 2.03 без заметной его трансформации в триплетный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК (рис. 3а, спектр 5).

Что касается сигнала ЭПР в опухоли после введения животным только одного ДЭТК, он был идентичен сигналу ЭПР гем-нитрозильных комплексов, зарегистрированному в контрольной опухоли (рис. 3а, спектр 4).

В печени животных-опухоленосителей как после введения им Б-ДНКЖ-Г, так и после сочетанного введения им последовательно Б-ДНКЖ-

Г+ДЭТК регистрировался только сигнал 2.03 (рис. 3б, спектры 2' и 3' соответственно).

Таким образом в отличие от опухоли, в которой ДЭТК реагировал с ДНКЖ с образованием МНКЖ-ДЭТК, этот процесс не имел места в печени животного-опухоленосителя.

При введении этим животным только ДЭТК в печени регистрировался спектр ЭПР (рис. 3б, спектр 5'), идентичный спектру 1', приведенному на рис. 3б. После дополнительного введения ДНКЖ в спектре ЭПР печени регистрировался интенсивный сигнал 2.03 (рис. 3б, спектр 4').

ОБСУЖДЕНИЕ

Среди изложенных выше результатов нашей работы наиболее интересными, требующими обсуждения представляются следующие факты.

Во-первых, это факт резкой активации роста опухолей при сочетанной обработке мышей Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК после двух недель полного подавления развития опухолей. Данный факт, часто наблюдаемый при различных видах химиотерапии злокачественных опухолей, объясняется обычно наличием в опухолях двух клонов злокачественных клеток, характеризующихся слабой и высокой устойчивостью к химиотерапевтическим агентам. При этом первый клон составляет основную массу опухоли, препятствуя конкурентным путем росту более злокачественного

клона. После гибели менее злокачественных клеток их более злокачественные аналоги начинают быстро пролиферировать, обгоняя иногда контрольные опухоли, не подвергавшиеся химиотерапии.

В наших опытах обращает на себя внимание различие в скорости роста более злокачественного клона в карциноме Льюиса у мышей при сочетанной их обработке сначала Б-ДНКЖ-Г (100 мкМ/кг), а затем ДЭТК (500 мкМ/кг), с одной стороны, или же, наоборот, сначала ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-Г – с другой стороны. Не исключено, что в первом случае значительная часть катионов нитрозония, высвобождавшихся из Б-ДНКЖ-Г, могла связываться с тиоловой группой в ДЭТК и не оказывать тем самым значительного токсического действия на тиолсодержащие белки, критически важные для клеточного и тканевого метаболизма мышей. При обратной последовательности введения препаратов – за 1 ч до контакта ДЭТК с Б-ДНКЖ-Г значительная часть ДЭТК, как низкомолекулярного соединения, могла быть удалена из организма, так что оставшаяся его часть не могла конкурировать с эндогенными тиолсодержащими соединениями за NO^+ , что и приводило к более выраженному токсическому эффекту последовательности введения ДЭТК + Б-ДНКЖ-Г в отношении опухолей у животных. Другими словами, в этом варианте концентрация высвободившихся из Б-ДНКЖ-Г катионов нитрозония, способных атаковать тиолсодержащие белки печени, была существенно выше, чем при введении ДЭТК после Б-ДНКЖ-Г.

Эти предположения пока слабо согласуются с результатами эксперимента. Так, например, в опухоли после введения мышам сначала Б-ДНКЖ-Г, а затем ДЭТК регистрировался интенсивный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК, свидетельствующий о полном превращении в этот комплекс Б-ДНКЖ-Г (рис. 3а, спектр 3). Такое превращение в опухоли не наблюдалось при введении мышам сначала ДЭТК, а затем Б-ДНКЖ-Г (рис. 3а, спектр 5). В этом случае в опухоли регистрировался только сигнал 2.03. Если сигнал МНКЖ-ДЭТК в спектре ЭПР этой ткани и присутствовал, он мог маскироваться сигналом 2.03, а это означает, что его интенсивность была незначительной, следовательно, незначительной была и концентрация высвободившихся из Б-ДНКЖ-Г катионов нитрозония. Тем не менее, ее было достаточно, чтобы оказывать на опухолевые клетки мощное токсическое действие, причем не только на слабо- но и на высокоустойчивые к

NO^+ злокачественные клетки. Действительно ли это так, могут решить результаты наших дальнейших исследований, в которых при последовательности введения сначала Б-ДНКЖ-Г, а затем ДЭТК молярное соотношение между ними будет повышено с 1 : 5 (в настоящих опытах) до 1 : 2. В этом случае, в соответствии со схемой на рис. 1, весь ДЭТК должен будет включаться в МНКЖ-ДЭТК, так что вероятность связывания NO^+ с ДЭТК должна будет существенно снизиться.

Второй загадочный результат работы состоит в следующем.

При введении животным-опухоленосителям сначала Б-ДНКЖ-Г, а затем ДЭТК в опухоли методом ЭПР, как мы и ожидали, было продемонстрировано полное превращение Б-ДНКЖ-Г в МНКЖ-ДЭТК – вместо сигнала 2.03 в опухоли был зарегистрирован триплетный сигнал ЭПР МНКЖ-ДЭТК (рис. 3а, спектр 3), тогда как в печени тех же животных такое превращение не имело места (рис. 3б, спектр 3')?!

Не исключено, что это различие могло быть обусловлено различием в механизмах доставки Б-ДНКЖ-Г и ДЭТК в опухоль и в печень. В опухоль данные реагенты могли доставляться при посредстве макрофагов, атакующих опухоль. При этом макрофаги могли включать в себя как Б-ДНКЖ-Г, так и ДЭТК, что и обеспечивало превращение в опухоли Б-ДНКЖ-Г в МНКЖ-ДЭТК. Печень захватывала только Б-ДНКЖ-Г, при этом железо-динитрозильные фрагменты из этих комплексов переходили на тиоловые группы белков печени с образованием в этом органе устойчивых белковых ДНКЖ. Что касается ДЭТК, они поступали в основном в почки, с последующей их фильтрацией в мочу. Естественно, это предположение, как и вышесказанное, требует экспериментального доказательства.

В заключение следует отметить, что, несмотря на загадочность полученных в работе результатов, которые остаются трудно объяснимыми, все же есть основания предполагать, что катионы нитрозония могут оказаться теми химическими агентами, которые могут существенно сдвинуть решение проблемы химиотерапии злокачественных заболеваний. Полученные нами результаты позволяют предположить, что эти катионы способны оказывать цитотоксическое действие *in vivo* не только на высокочувствительные к химическим агентам опухолевые клетки, но и на их аналоги, резистентные к большинству этих соединений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ ПРИ РАБОТЕ С ЖИВОТНЫМИ.

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)», «Anticancer Drug Development Guide. Pre-clinical screening, clinical trials, and approval», Second ed. (Edt. by B.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 №51СП 2.2.1.3218-14 от 29.08.2014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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⁺ donors. *Nitric Oxide*, 29, 4–16 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2012.11.001
2. Vanin A. F., Tronov V. A., and Borodulin R. R. Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF-7 human breast cancer cell culture). *Cell Biochem. Biophys.*, 79 (1), 93–102 (2021). DOI: 10.1007/s12013-020-00962-x
3. Галаган М. Е., Орановская Е. В., Мордвинцев П. И., Медведев О. С. и Ванин А. Ф. Гипотензивный эффект динитрозильных комплексов железа на бодрствующих животных. *Бюл. Всесоюз. кардиол. центра*, 2, 75–79 (1988).
4. Ванин А.Ф., Телегина Д.И., Микоян В.Д., Ткачев Н.А., Васильева С.В. Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионом нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов. *Биофизика*, 67, 938–946 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050106
5. Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Пьянков О. В., Багрянская Е. Г., Микоян В. Д. и Попкова В. Я. Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка. *Биофизика*, 67 (5), 969–981 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050167
6. Ванин А. Ф., Островская Л. А., Корман Д. Б., Блюхтерова Н. В., Рыкова В. А. и Фомина М. М. Роль катиона нитрозония в механизме противоопухолевого эффекта препаратов динитрозильных комплексов железа. *Биофизика*, 67 (5), 982–990 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050179
7. Borodulin R. R., Kubrina L. N., Shvydkiy V. O., Lakomkin V. L., and Vanin A. F. A simple protocol for the synthesis of dinitrosyl iron complexes with glutathione: EPR, optical, chromatographic and biological characterization of reaction products. *Nitric Oxide*, 35, 110–115 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2013.08.007
8. Vanin A. F., Poltorakov A. P., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., and Burbaev D. S. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide*, 23, 136–149 (2010). DOI: 10.1016/j.niox.2010.05.285
9. Трещалина Е. М., Жукова О. С., и Герасимова Г. К. В кн. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А. Н. Миронова (Изд-во «Грин и К», 2012), ч. 1, сс. 642–657.
10. Emanuel N. M., Saprin A. N., Shabalkin V. A., Kozlova L. E., and Kruglyakova K. E. Detection and investigation of a new type of ESR signal characteristic of some tumour tissues. *Nature*, 222 (5189), 165–167 (1969). DOI: 10.1038/222165a0
11. Ignarro L. J. *Nitric Oxide: Biology and Pharmacology* (Acad. Press, San Diego, USA, 2000).
12. Ванин А. Ф., Блюменфельд Л. А. и Четвериков А. Г. Исследование комплексов негемового железа в клетках и тканях методом ЭПР. *Биофизика*, 12, 829–841 (1967).
13. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами. *Физико-химия, биология, медицина* (Институт компьютерных исследований, Москва-Ижевск, 2015).
14. Vanin A. F., Serezhnikov V. A., Mikoyan V. D., and Genkin M. V. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*, 2, 224–234 (1998). DOI: 10.1006/niox.1998.0180

Nitrosonium Cation as an Antitumor Component of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands

A.F. Vanin*, L.A. Ostrovskaya**, D.B. Korman**, V.A. Rykova**, N.V. Bluhterova**,
M.M. Fomina**, V.D. Mikoyan*, and N.A. Tkachev*

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

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

The combination of two compounds such as the binuclear form of dinitrosyl iron complexes with glutathione (B-DNIC-G, 100 $\mu\text{M/kg}$, s/c) and sodium diethyldithiocarbamate (DETK, 500 $\mu\text{M/kg}$, i/p), administered eight times, causes two week-lasting complete inhibition of solid tumor development in mice after tumor transplantation (Lewis lung carcinoma). However, when the antitumor effect was evaluated on the 20th day after the end of drug administration, the maximum activity - inhibition of tumor growth by 60% – was observed when drugs were administered in the order DETK, and then after an hour B-DNIC-G, while when drugs were used in reverse order, tumor growth inhibition was not greater than 30%. Based on the analysis of EPR measurements of tumor tissues (day 15 of tumor development), it was concluded that the inhibition of tumor growth was caused by nitrosonium cations released from B-DNIC-G during the breakdown of these complexes under the action of DETC.

Keywords: binuclear dinitrosyl iron complexes with glutathione, diethyldithiocarbamate, nitrosonium cations, Lewis lung carcinoma

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ВКЛЮЧЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОЛЬНО МЕТИЛИРОВАННЫХ БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КРИОТОЛЕРАНТНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А.Г. Миронова*, **, #, С.И. Афанасьева***, С.А. Яковенко***,
А.Н. Тихонов**, ***, Е.Ю. Симоненко***

*Клиника репродукции человека «Альтравита», ул. Нагорная, 4А, Москва, 117186, Россия

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

***Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/2, Москва, 119991, Россия

#E-mail: agm90@mail.ru

Поступила в редакцию 14.09.2024 г.

После доработки 14.09.2024 г.

Принята к публикации 16.10.2024 г.

Исследованы криозащитные свойства комплексов включения холестерина на основе RAMEB — произвольно метилированных производных бета-циклодекстринов (randomly methylated β -cyclodextrin) в отношении сперматозоидов человека. Изучено взаимодействие различных концентраций RAMEB и комплексов включения холестерина на основе RAMEB с мембранами сперматозоидов. Показано, что выраженная цитотоксичность RAMEB в отношении сперматозоидов обусловлена взаимодействием циклодекстринов с липидными компонентами мембраны, в частности экстракцией холестерина. Комплексы RAMEB с холестерином обладают значительно менее выраженной цитотоксичностью. Установлена зависимость между концентрацией холестерина в мембранах сперматозоидов и концентрацией комплексов RAMEB с холестерином в образце. Показано, что инкубация сперматозоидов перед криоконсервацией с 2 мг/мл комплексов RAMEB с холестерином статистически значимо повышает выживаемость (на 13.8%) и долю прогрессивно подвижных сперматозоидов (на 14.8%) после разморозки. Методом рентгеноструктурного анализа показано, что присутствие в образцах RAMEB и комплексов RAMEB с холестерином в исследуемых концентрациях (2, 4 и 8 мг/мл) не влияет на средний размер кристаллов льда, формирующихся в образце при криоконсервации. Предложен механизм криопротекторного действия комплексов RAMEB с холестерином.

Ключевые слова: криоконсервация, сперматозоид, мембрана, холестерин метил-бета-циклодекстрины, RAMEB.

DOI: 10.31857/S0006302924060249, EDN: NJBHOH

Первые попытки криоконсервации сперматозоидов были предприняты около 250 лет назад итальянским священником Лазаро Спалланцани, который подвергал сперму воздействию отрицательных температур, используя для этих целей снег [1]. Дальнейший научный прогресс в криобиологии был достигнут значительно позже, когда в 1949 г. были открыты криопротекторные

свойства глицерина [2]. Первый ребенок, рожденный в результате использования криоконсервированной спермы, появился на свет в 1953 г. [3]. На сегодняшний день криоконсервация сперматозоидов является неотъемлемой частью вспомогательных репродуктивных технологий [4].

Криоконсервация сперматозоидов рекомендована мужчинам, страдающим онкологическими, аутоиммунными и другими заболеваниями, сопряженными с потенциально высокими рисками нарушения репродуктивной функции, а также пациентам, которым предстоит химио- или радиотерапия [5, 6]. Криоконсервация может быть назначена пациентам с тяжелыми и/или прогрес-

Сокращения: RAMEB — произвольно метилированные производные β -циклодекстрина (randomly methylated β -cyclodextrin), М β -ЦД — метил-бета-циклодекстрины, М β -ЦД-Х — комплексы метил-бета-циклодекстринов с холестерином, DPBS — раствор Дюльбекко с кальцием и магнием (Dulbecco's phosphate-buffered saline).

сирующими формами олиго-, астенозооспермии, в том числе в момент улучшения показателей спермограммы, достигнутых в процессе андрологического лечения [7]. Возможность криоконсервации единичных сперматозоидов, полученных у мужчин с диагнозом азооспермия посредством микрохирургической биопсии тестикулярных сперматозоидов, позволяет избежать повторные операции [8]. Криоконсервация сперматозоидов позволяет создавать криобанки донорской спермы без риска передачи ВИЧ, гепатитов В и С и сифилиса реципиенту благодаря возможности проведения надлежащего скрининга [9].

Ввиду большого объема замораживаемого образца для криоконсервации сперматозоидов рутинно используется технология медленной заморозки [10]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в криобиологии в целом, эффективность технологии медленной заморозки остается достаточно низкой: 40-60% процентов сперматозоидов (от изначального количества подвижных сперматозоидов в нативном образце) утрачивают подвижность после разморозки [11].

Большинство криоповреждений биологических объектов прямо или косвенно связаны с образованием вне- и внутриклеточных кристаллов льда [12]. Было установлено, что для сперматозоидов основными факторами, приводящими к гибели клеток, являются осмотический дисбаланс и повреждение мембраны [13]. При понижении температуры структура липидов мембраны трансформируется, в основном за счет фазово-структурных переходов [14]. В области фазовых переходов липидных молекул сосуществование в бислое областей жидкокристаллической и гелевой фаз становится причиной образования микродефектов в структуре мембраны [15], а перераспределение мембранных белков в конечном итоге приводит к образованию белковых агрегатов [16], что ведет к необратимой потере некоторых функций мембраны. Осмотические эффекты, связанные с формированием внеклеточных кристаллов льда, а также с добавлением и удалением криопротекторов, вносят существенный вклад в повреждение плазматической мембраны [17].

Степень криоповреждений мембран зависит от скорости замораживания-оттаивания, природы и концентрации криопротекторов, фосфолипидного состава и степени гидратированности, а также от содержания холестерина [14]. Известно, что холестерин, локализованный в составе липидов мембраны, регулирует упаковку [18] и контролирует динамичность липидных молекул (подвижность, вращение, латеральную диффузию), что приводит к модулированию ряда свойств и функций мембраны, таких как толщина мембраны, ее текучесть, проницаемость для воды и других молекул, а также температура и степень ко-

оперативности фазового перехода [19]. Доказано, что добавление холестерина препятствует переходу липидов в гексагональную фазу (H_{II}) [20].

В связи с таким влиянием холестерина на свойства плазматической мембраны во многих исследованиях изучалась гипотеза о холестерин-опосредованном повышении устойчивости мембран к повреждениям, вызванным криоконсервацией.

Важной особенностью мембраны сперматозоидов является физиологическая перестройка в процессе капацитации, состоящем из гиперактивации и акросомальной реакции, необходимых для оплодотворения. Процесс гиперактивации сопровождается оттоком холестерина с плазматической мембраны сперматозоидов, повышением ее текучести и проницаемости, изменением мембранного потенциала, а также гиперполяризацией мембраны [21, 22]. Однако преждевременная активация сперматозоидов, например, при криоконсервации, ведет к гибели клеток.

В исследованиях, проводившихся на сперме разных видов млекопитающих, была обнаружена строгая корреляция между молярным процентом холестерина в плазматической мембране и криотолерантностью сперматозоидов. Наибольшей криотолерантностью обладают сперматозоиды кролика, в их мембранах молярный процент холестерина равен 62%, а на последнем месте — сперматозоиды барана — 38% [23]. Насыщение мембраны сперматозоидов холестерином приводит к повышению их криотолерантности [24–27].

Молекула холестерина гидрофобна и нерастворима в полярных растворителях. Для того, чтобы доставить холестерин к мембране сперматозоидов, требуется «молекула-переносчик». В качестве таких «переносчиков» могут быть использованы циклодекстрины.

Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды, состоящие из остатков D-(+)-глюкопиранозы, связанных α -D-1,4-гликозидной связью [28]. Циклодекстрины обладают гидрофильной внешней поверхностью и гидрофобной внутренней полостью, способной образовывать комплексы включения с широким спектром гидрофобных гостевых молекул [29].

Включение происходит в основном за счет гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий [30]. Номенклатура циклодекстринов определяется количеством остатков глюкозы в их структуре. Так, гексамер глюкозы обозначается как α -циклодекстрин, гептамер — β -циклодекстрин, а октомер — γ -циклодекстрин [31]. Степень полимеризации определяет размер гидрофобной полости и, следовательно, сродство носителя к определенным классам соединений [32]: α -циклодекстрины обладают наивысшим сродством к фосфолипидам, а β -циклодекстрины — к холесте-

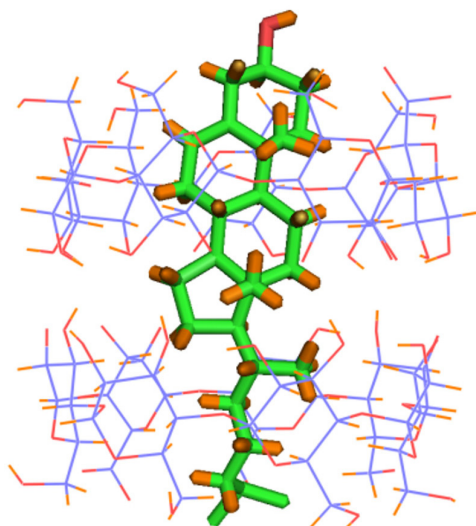


Рис. 1. Комплекс включения холестерина на основе β -ЦД: в результате взаимодействия двух молекул β -ЦД с молекулой холестерина последняя оказывается инкапсулированной с обоих концов: стероидное ядро входит в полость одной молекулы β -ЦД, а боковая цепь — в полость другой [35].

рину [33]. Стоит отметить, что полость одиночной молекулы β -циклодекстрина ($\sim 8 \text{ \AA}$) слишком мала, чтобы полностью экранировать молекулу холестерина ($\sim 18 \text{ \AA}$) от молекул воды [34]. Существование комплекса включения холестерина на основе β -циклодекстрина со стехиометрией 1 : 2 было неопровержимо доказано с помощью дифракционного анализа (рис. 1) [35].

Применение нативных β -циклодекстринов затруднено из-за их низкой растворимости в полярных растворителях (18.8 г/л при 25°C для воды) [36]. Растворимость β -циклодекстрина и комплексов включения на его основе может быть значительно повышена модификацией гидроксильных групп различными заместителями [37]. Метилированные производные β -циклодекстрина, такие как 2,6-ди-О-метил- β -циклодекстрин и 2,3,6-три-О-метил- β -циклодекстрин, известны своей высокой растворимостью в воде ($> 300 \text{ г/л}$) [38]. Однако, в связи с трудоемкостью синтеза диметилированного производного β -циклодекстрина [39], использование произвольно замещенных метилированных производных (RAMEB — randomly methylated β -cyclodextrin) в настоящее время является предпочтительным [40].

Целью данной работы было исследование взаимодействия метилированных β -циклодекстринов (М β -ЦД) и их комплексов с холестерином (М β -ЦД-Х) с мембранами сперматозоидов, оценка их роли в выживаемости клеток после криоконсервации и выявление потенциальных механизмов их криозащитных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы, использованные в работе: набор реагентов для определения холестерина «Холестерин-ФКД» (ООО «Агат-Мед», Россия); набор для оценки жизнеспособности сперматозоидов Vital Screen (FertiPro, Бельгия); раствор Дюльбекко с кальцием и магнием — DPBS («Панэко», Россия); произвольно метилированные бета-циклодекстрины RAMEB (степень замещения (degree of substitution) $DS = 1.5\text{--}2.1$ метильных групп на каждый остаток глюкозы) (Sigma, США); холестерин (Sigma, США); среда Sperm Wash (Vitromed, Германия); среда All Grad Wash (Vitromed, Германия); криопротекторная среда Sperm Freeze (Vitromed, Германия);

Работа проводилась на образцах спермы доноров. Оценку концентрации и подвижности сперматозоидов осуществляли в камере Маклера в соответствии с критериями ВОЗ [41]. Оценку подвижности производили по четырем категориям: а — быстрое прямолинейное движение, b — медленное прямолинейное движение, с — не прямолинейное движение, d — неподвижные сперматозоиды.

Оценка интактности мембраны сперматозоидов. Для оценки доли сперматозоидов с интактной мембраной использовали стандартный набор Vital Screen. В основе анализа Vital Screen лежит окраска образца красителями эозином и нигрозином. Поскольку краситель эозин проникает только в клетки с поврежденной плазматической мембраной, метод позволяет оценить долю живых клеток в образце. Для каждого образца оценивали не менее 200 сперматозоидов.

Выделение подвижной фракции сперматозоидов и определение цитотоксичности М β -ЦД и М β -ЦД-Х. Для выделения подвижной фракции сперматозоидов использовали метод центрифугирования в градиенте плотности (90% и 45% All Grad Wash : Sperm Wash (об./об.)). На 1 мл 90%-го градиента наслаивали 1 мл 45%-го градиента, затем наслаивали 2 мл эякулята и центрифугировали при 400 g в течение 7 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 2 мл среды Sperm Wash и центрифугировали при 500 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, к осадку добавляли 2 мл среды Sperm Wash и повторно центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в объеме среды Sperm Wash, необходимом для достижения концентрации сперматозоидов в образце, равной 100 млн/мл . Полученную клеточную суспензию делили на аликвоты по 50 мкл и добавляли к этим аликвотам по 50 мкл среды Sperm Wash, содержащей 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 и 12.8 мг М β -ЦД или 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 и 3.2 мг М β -ЦД-Х. К контрольному образцу добавляли 50 мкл среды Sperm Wash. Образцы инкубировали при 25°C , а через 15, 30 и

60 мин производили оценку доли сперматозоидов с интактной мембраной.

Оценка экстракционной способности Мβ-ЦД. К эякуляту добавляли среду DPBS в соотношении 1 : 2 (об./об.) и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, полученный осадок ресуспендировали в 2 мл среды DPBS и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Осадки от нескольких эякулятов объединяли, оценивали концентрацию клеток с помощью камеры Маклера (не менее 3 раз в разных аликвотах) и разделяли на аликвоты по 100 мкл. К аликвотам добавляли 100 мкл среды DPBS, содержащей 1.6, 3.2, 6.4 и 12.8 мг Мβ-ЦД. К контрольной аликвоте добавляли 100 мкл 2%-го раствора Triton X-100 в DPBS. Инкубировали образцы при 37°C в течение 1 ч и определяли концентрацию холестерина в образцах при помощи ферментативного колориметрического детектирования.

Приготовление комплексов «циклодекстрины–холестерин». Мβ-ЦД-Х были приготовлены согласно работе [24]. Растворяли 1 г Мβ-ЦД в 2 мл метанола и 200 мг холестерина – в 1 мл хлороформа. Затем 450 мкл раствора холестерина добавляли к раствору Мβ-ЦД, тщательно перемешивали и высушивали на ротационном испарителе Laborota-4000 (Heidolph, Германия).

Оценка насыщенности мембраны сперматозоидов холестерином. К 1 мл нативного эякулята добавляли 0, 2, 4, 8 или 16 мг Мβ-ЦД-Х и инкубировали в течение 15 мин при 25°C. После чего к образцу добавляли среду DPBS в соотношении 1 : 2 (об./об.) и центрифугировали при 300 g в течение 10 минут. Полученный осадок ресуспендировали в 2 мл среды DPBS и повторно центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, добавляли к осадку 100 мкл DPBS. Определяли концентрацию сперматозоидов в образце (подсчет производили на менее трех раз, рассчитывали среднее значение) и отбирали 100 мкл для определения концентрации холестерина в образце с помощью ферментативного колориметрического детектирования.

Определение концентрации холестерина с помощью ферментативно-колориметрического метода. К 100 мкл исследуемого образца добавляли 100 мкл 2%-го раствора Triton X-100 в DPBS, инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Этот этап пропускали в случае, когда для экстракции холестерина к образцу добавляли Мβ-ЦД-Х. Добавляли к образцу 2 мл ферментно-хромогенной смеси «Холестерин-ФКД». Образцы тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 25 мин при 25°C в темноте. По окончании инкубации сперматозоиды осаждали посредством центрифугирования при 500 g в течение 10 мин. Супернатант отбирали для регистрации спектра поглощения на спектрофотометре ПЭ-5400УФ

(«ЭКРОСХИМ», Россия) в диапазоне длин волн от 300 до 700 нм с шагом 1 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Расчет концентрации холестерина в анализируемом образце проводили по формуле:

$$C = \frac{E_0}{E_k} \cdot \frac{51.7}{n}, \quad (1)$$

где C – концентрация холестерина в исследуемом образце, нмоль/млн; E_0 – оптическая плотность опытной пробы при длине волны 514 нм, ед. оп. плотн.; E_k – оптическая плотность калибровочной пробы при длине волны 514 нм, ед. оп. плотн.; 51.7 – количество холестерина в калибровочной пробе, нмоль; n – количество сперматозоидов в образце, млн.

Определение оптимальной концентрации Мβ-ЦД-Х для повышения криотолерантности сперматозоидов при криоконсервации. Нативный эякулят делили на аликвоты объемом 200 мкл, к аликвотам добавляли 50 мкл среды Sperm Wash, содержащей 0 (контроль), 0.25, 0.5 и 1 мг Мβ-ЦД-Х, и инкубировали полученные образцы в течение 15 мин при 25°C. Медленно, по 1 капле в 3–4 с, перемешивая на вортексе, добавляли к образцам криопротекторную среду Sperm Freeze в соотношении 1 : 0.7 (об./об.), инкубировали 10 мин при 25°C. Заморозку осуществляли в устройстве Nandi-freezer Freezing tray (Taylor-Wharton, США) путем трехэтапного ступенчатого охлаждения в течение 45 мин. Образцы спермы хранили в жидком азоте при –196°C. Образцы размораживали на водяной бане при температуре 37°C в течение 5 мин. Непосредственно после разморозки образцов производили оценку подвижности сперматозоидов и доли сперматозоидов с интактной мембраной.

В данной работе показатели подвижности после разморозки выражали через индекс подвижности:

$$I_{\text{motility}} = \frac{P_{\text{postthaw}}}{P_{\text{prefreeze}}} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где I_{motility} – индекс подвижности, P_{postthaw} – доля сперматозоидов с категориями подвижности а и b после разморозки, $P_{\text{prefreeze}}$ – доля сперматозоидов с категориями подвижности а и b до криоконсервации (в нативном образце).

Процентную долю сперматозоидов с интактной мембраной после разморозки выражали через индекс «жизнеспособности»:

$$I_{\text{viability}} = \frac{V_{\text{postthaw}}}{V_{\text{prefreeze}}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где $I_{\text{viability}}$ – индекс «жизнеспособности», V_{postthaw} – доля сперматозоидов с интактной мем-

браной после разморозки, $V_{\text{prefreeze}}$ — доля сперматозоидов с интактной мембраной до криоконсервации (в нативном образце).

Рентгеноструктурный анализ. К 1 мл среды Sperm Wash добавляли 2, 4 и 8 мг Мβ-ЦД или 2, 4 и 8 мг Мβ-ЦД-Х. Затем к образцам добавляли криопротекторную среду Sperm freeze и замораживали в соответствии с вышеописанным протоколом. Дифракционные картины для исследуемых растворов были получены на пучке P11 синхротронного источника PETRA III в Исследовательском центре DESY (Гамбург, Германия).

Статистическая обработка. При оценке цитотоксичности циклодекстринов расчет доли сперматозоидов с интактной мембраной проводили целиком по всей группе, для сравнения этих данных применяли критерий хи-квадрат Пирсона (χ^2). Для описания количественных признаков (индекс подвижности и индекс «жизнеспособности») были использованы медианные значения (Me) и межквартильный интервал. Для сравнения медианных значений индекса подвижности и индекса «жизнеспособности» применяли W -критерия Уилкоксона. В качестве меры статистической связи между концентрацией сперматозоидов в образцах эякулята и индексом «жизнеспособности» после разморозки при добавлении различных концентраций Мβ-ЦД-Х использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для описания концентрации холестерина в образцах были использованы среднее значение (M) и стандартное отклонение ($\pm SD$). Для всех используемых критериев уровень статистической значимости различий был определен как $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х с мембраной сперматозоидов; цитотоксичность. Была исследована цитотоксичность Мβ-ЦД и комплексов Мβ-ЦД-Х по отношению к сперматозоидам человека. Сперматозоиды инкубировали с Мβ-ЦД в диапазоне концентрации от 2 до 128 мг/мл или Мβ-ЦД-Х в диапазоне концентраций от 2 до 32 мг/мл, долю клеток с интактной мембраной оценивали через 15, 30 и 60 минут инкубации.

Было установлено, что Мβ-ЦД обладают выраженной цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека. Для концентрации Мβ-ЦД, равной 2 мг/мл, различия в доле клеток с интактной мембраной между образцами, содержащими Мβ-ЦД, и контролем становились статистически значимыми через 30 мин инкубации, а для концентраций ≥ 4 мг/мл — через 15 мин инкубации. Для времени инкубации 15 мин средняя токсическая концентрация Мβ-ЦД, вызывающая гибель 50% клеток (IC_{50}), для сперматозоидов человека составила 32 мг/мл (табл. 1).

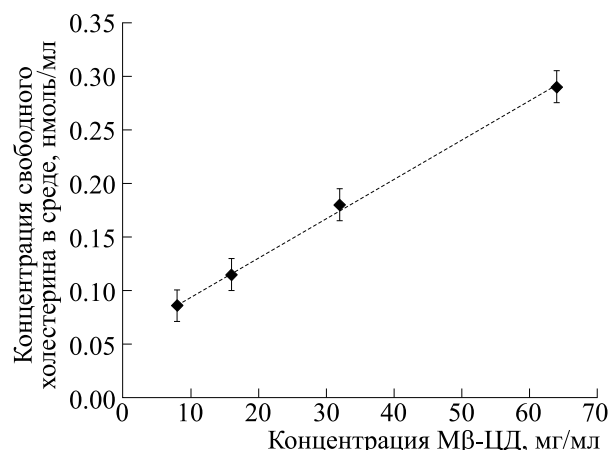


Рис. 2. График зависимости концентрации свободного холестерина в среде со сперматозоидами от концентрации Мβ-ЦД в образце ($R^2 = 0.9987$). Данные представлены в виде среднего значения (M) \pm стандартное отклонение (SD) ($n = 5$).

Цитотоксичность Мβ-ЦД может быть обусловлена их способностью экстрагировать липидные компоненты клеточной мембраны, в частности холестерин, образуя с ними комплексы включения [42, 43].

В данной работе была измерена концентрация холестерина в среде, в которой инкубировались сперматозоиды после добавления различных концентраций Мβ-ЦД. С увеличением концентрации Мβ-ЦД в образце концентрация холестерина в среде возрастала (рис. 2). Инкубация сперматозоидов в течение часа при 37°C в среде, содержащей 8, 16, 32 и 64 мг/мл Мβ-ЦД, привела к экстракции соответственно 20, 27, 42 и 67% холестерина из мембран сперматозоидов.

Для Мβ-ЦД-Х различие в доле клеток с интактной мембраной между контролем и образцами, содержащими Мβ-ЦД-Х, становилось статистически значимым при концентрации Мβ-ЦД-Х, равной 16 мг/мл, через 1 ч инкубации. Однако доля сперматозоидов с интактной мембраной в этих образцах была значительно выше, чем в образцах, инкубированных с такой же концентрацией Мβ-ЦД. Менее выраженная цитотоксичность эквивалентных концентраций Мβ-ЦД-Х, полости которых заполнены холестерином, косвенно подтверждает тот факт, что цитотоксичность Мβ-ЦД обусловлена их аффинностью к липидам мембраны.

В работах [44] и [45] исследовалась цитотоксичность циклодекстринов по отношению к эндотелиальным клеткам пупочной вены человека и клеткам колоректальной аденокарциномы человека Сасо 2. Авторы пришли к заключению, что выраженность цитотоксического эффекта определяется холестеринсолубилизирующей способ-

Таблица 1. Доля сперматозоидов с интактной мембраной в образцах инкубированных с различными концентрациями Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х в течение 15, 30 и 60 минут

	Концентрация							
	2 мг/мл	4 мг/мл	8 мг/мл	16 мг/мл	32 мг/мл	64 мг/мл	128мг/мл	контроль
15 минут								
Мβ-ЦД	1376/1400 98.3% $p = 0.672$	1373/1400 98.1% $p = 1$	1236/1400 88.3% $p < 0.01$	910/1400 65.0% $p < 0.01$	609/1400 43.5% $p < 0.01$	567/1400 40.5% $p < 0.01$	22/1400 1.6% $p < 0.01$	1373/1400 98.1%
30 минут								
Мβ-ЦД	1292/1400 92.3% $p < 0.01$	1276/1400 91.2% $p < 0.01$	1190/1400 85.0% $p < 0.01$	791/1400 56.5% $p < 0.01$	607/1400 43.4% $p < 0.01$	529/1400 37.8% $p < 0.01$	14/1400 1.0% $p < 0.01$	1369/1400 97.8%
Мβ-ЦД-Х	1379/1400 98.5% $p = 0.162$	1376/1400 98.3% $p = 0.341$	1380/1400 98.6% $p = 0.121$	1370/1400 97.9% $p = 0.897$	1325/1400 94.7% $p < 0.01$	—	—	
60 минут								
Мβ-ЦД	1254/1400 89.6% $p < 0.01$	1240/1400 88.6% $p < 0.01$	1029/1400 73.5% $p < 0.01$	732/1400 52.3% $p < 0.01$	553/1400 39.5% $p < 0.01$	336/1400 24.0% $p < 0.01$	0	1370/1400 97.9%
Мβ-ЦД-Х	1380/1400 98.6% $p = 0.154$	1377/1400 98.4% $p = 0.332$	1355/1400 96.8% $p = 0.080$	1253/1400 89.5% $p < 0.01$	1195/1400 85.4% $p < 0.01$	—	—	

Примечание. Для сравнения данных использован критерий хи-квадрат (χ^2). Уровень статистической значимости различий определен как $p < 0.05$.

ностью конкретного производного циклодекстринов, которая, в свою очередь, зависит от вида заместителя, степени замещенности гидроксильных групп и положения заместителя [46–48]. Способность метилированных производных циклодекстринов образовывать водорастворимые комплексы включения с холестерином возрастает с увеличением количества метильных групп в молекуле циклодекстрина, достигая максимального значения (в среднем 3.8 мг холестерина на 1 мл раствора, содержащего 0.04 М циклодекстринов) при количестве метильных заместителей, равном 14 (соответствует диметил-β-циклодекстрину (DIMEB), у которого на каждый остаток глюкозы молекулы циклодекстрина приходится по 2 метильные группы) [45].

Мβ-ЦД, изучаемые в данной работе, относятся к произвольно метилированным производным (RAMEB) и содержат 1.5–2.1 метильных групп на каждый остаток глюкозы молекулы Мβ-ЦД. RAMEB-производные обладают высокой холесте-

ринсолюбилизирующей способностью: по эффективности включения холестерина они стоят на втором месте после DIMEB-производных Мβ-ЦД [47], что обуславливает их выраженную цитотоксичность.

Встраивание или экстракция липидов плазматической мембраны может приводить к изменению формы клеток вследствие изменения соотношения площадей наружного и внутреннего монослоев мембраны [49]. Такие изменения возможны и в случае экстракции и включения в мембрану молекул холестерина [50]. Инкубация сперматозоидов с Мβ-ЦД приводит к изменению морфологии сперматозоидов: хвосты сперматозоидов закручиваются. Данный эффект наблюдался при концентрации Мβ-ЦД в образце, равной 16 мг/мл, и становился более выраженным при дальнейшем (32 мг/ и выше) повышении концентрации Мβ-ЦД (рис. 3).

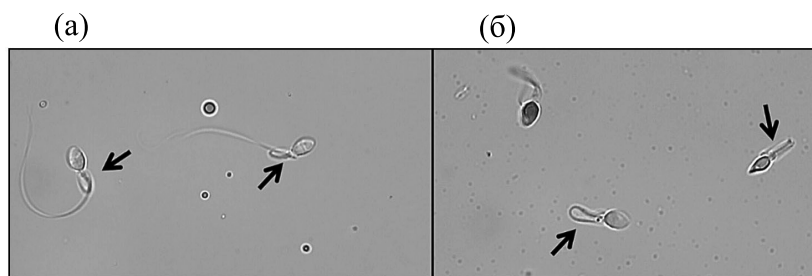


Рис. 3. Изменение морфологии сперматозоидов при добавлении к образцу: (а) — 16 мг/мл Мβ-ЦД, (б) — 32 мг/мл Мβ-ЦД. Стрелка указывает на характерное закручивание хвоста сперматозоидов.

Насыщение мембраны сперматозоидов холестерином с помощью Мβ-ЦД-Х. Была определена концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов после инкубации нативного эякулята с различными концентрациями Мβ-ЦД-Х (рис. 4). В области концентраций Мβ-ЦД-Х ≤ 8 мг/мл зависимость концентрации холестерина в образце от концентрации Мβ-ЦД-Х выражается полиномом второго порядка ($R^2 = 0.9847$). Аналогичный вид зависимости наблюдался в работах по насыщению холестерином мембран сперматозоидов жеребцов [51] и быков [52]. При концентрации Мβ-ЦД-Х > 8 мг/мл кривая зависимости выходит на плато.

Инкубация сперматозоидов с 2, 4, 8 и 16 мг/мл Мβ-ЦД-Х приводит к повышению концентрации холестерина в образце в среднем в 2.4, 3.13, 5.8 и 6.0 раз. Встраивание такого количества холестерина в мембраны сперматозоидов привело бы к соотношению холестерин/фосфолипиды в мембране, равному $\sim 2.4, 3.13, 5.8$ и 6 соответственно.

Максимальное количество холестерина, которое может встроиться в липидный бислой, со-

ставляет 50 моль % (молярное соотношение холестерин/фосфолипиды равно 1). При более высоком молярном соотношении холестерин/фосфолипиды (> 50 моль % холестерина) в пределах упорядоченной жидкокристаллической фазы L_o бислоя образуются домены чистого холестерина. Дальнейший рост концентрации холестерина в бислое (> 66 моль % холестерина, молярное соотношение холестерин/фосфолипиды равно 2) приводит к образованию кристаллов холестерина, предположительно вне липидного бислоя [53].

Таким образом, измеренное количество холестерина в образцах не может состоять только из холестерина мембран сперматозоидов. Предположительно, часть комплексов Мβ-ЦД-Х остаются в среде, содержащей сперматозоиды после отмывки, внося вклад в повышение концентрации холестерина в образце. Оценка остаточного количества комплексов Мβ-ЦД-Х в среде после двукратной отмывки показала, что для концентрации Мβ-ЦД-Х, равной 4 мг/мл, оно составляет

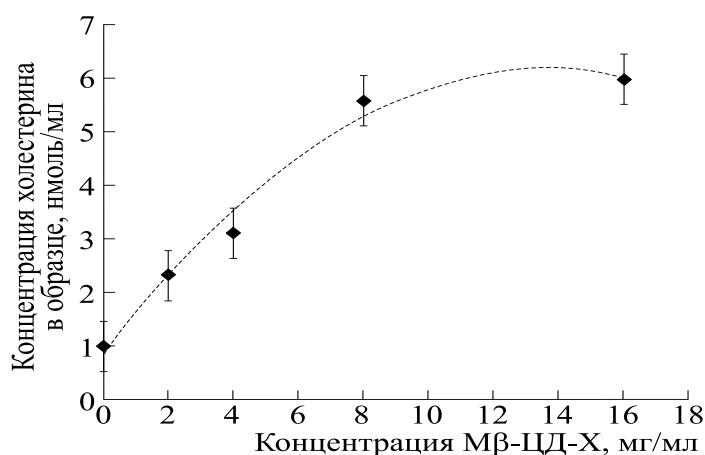


Рис. 4. График зависимости концентрации холестерина в образце, содержащем сперматозоиды, от концентрации Мβ-ЦД-Х, добавленных к эякуляту ($R^2 = 0.9847$). Данные представлены в виде среднего значения (M) \pm стандартное отклонение (SD) ($n = 5$).

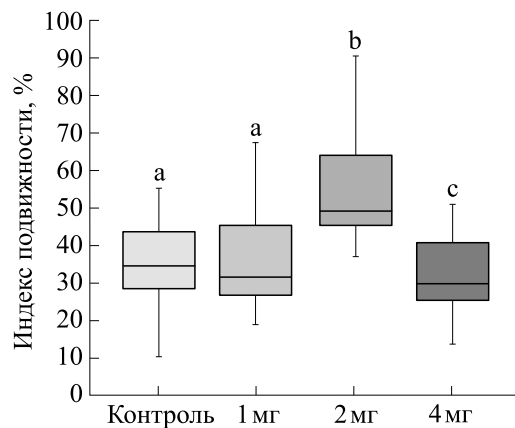


Рис. 5. Box-plot-диаграмма индекса подвижности сперматозоидов после разморозки в образцах, инкубированных с 1, 2 и 4 мг/мл Мβ-ЦД-Х перед криоконсервацией, и в контрольных образцах ($n = 12$). Для сравнения данных использован W -критерий Уилкоксона. Уровень статистической значимости определен как $p < 0.05$. Буквами *a*, *b* и *c* обозначены статистически значимо отличные выборки. Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически значимых различий.

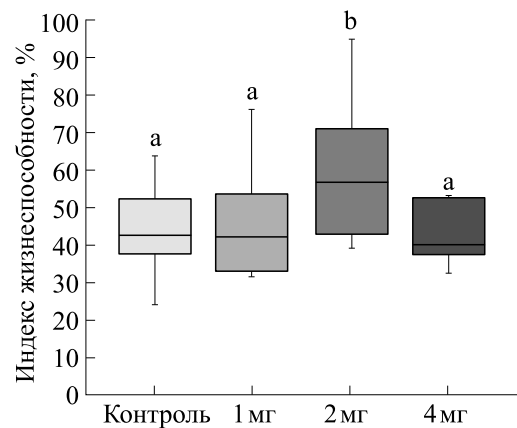


Рис. 6. Box-plot-диаграмма индекса «жизнеспособности» сперматозоидов после разморозки в образцах, инкубированных с 1, 2 и 4 мг/мл Мβ-ЦД-Х перед криоконсервацией, и в контрольных образцах ($n = 12$). Для сравнения данных использован W -критерий Уилкоксона. Уровень статистической значимости определен как $p < 0.05$. Буквами *a* и *b* обозначены статистически значимо отличные выборки. Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически значимых различий.

менее 10% от среднего значения концентрации холестерина в образцах.

Вероятно, Мβ-ЦД-Х могут адсорбироваться на поверхности клеточной мембраны сперматозоидов. Данные, полученные с использованием малоуглового рассеяния, показали, что при добавлении к липосомам Мβ-ЦД склонны адсорбироваться на их поверхности [54]. Можно предположить, что и Мβ-ЦД-Х с холестерином будут взаимодействовать с мембраной схожим образом. В таком случае содержание холестерина в образцах повышается за счет холестерина, который встраивается в бислой, и в большей степени за счет холестерина, присутствующего в составе Мβ-ЦД-Х на поверхности клеток.

Определение оптимальной концентрации Мβ-ЦД-Х для криоконсервации сперматозоидов человека. Было исследовано влияние инкубации эякулята с различными концентрациями Мβ-ЦД-Х перед заморозкой на выживаемость сперматозоидов (рис. 5 и 6). После разморозки во всех образцах наблюдалось значительное снижение подвижности и доли сперматозоидов с интактной мембраной по сравнению с нативными образцами. Индекс подвижности и индекс «жизнеспособности» после разморозки были статистически значимо выше для образцов, инкубированных с 2 мг/мл Мβ-ЦД-Х перед криоконсервацией, чем в контрольных образцах (49.4 [45.3; 64.3] vs. 34.6 [28.5; 43.9], $p < 0.05$; 56.6 [42.9; 70.9] vs. 42.8 [37.4; 52.1], $p < 0.05$). Статистически значимые различия между индексом подвижности и индексом «жизнеспособности» в образцах, инкубиро-

ванных перед криоконсервацией с 1 мг/мл Мβ-ЦД-Х, и соответствующими параметрами в контрольных образцах обнаружены не были (31.8 [26.7; 45.8] vs. 34.6 [28.5; 43.9], $p = 1$; 42.0 [33.1; 53.4] vs. 42.8 [37.4; 52.1], $p = 0.76$). В образцах, инкубированных с 4 мг/мл Мβ-ЦД-Х перед криоконсервацией, индекс подвижности был статистически значимо ниже, чем в контрольных образцах (29.6 [25.3; 40.8] vs. 34.6 [28.5; 43.9], $p < 0.05$). При этом индекс «жизнеспособности» в этих образцах статистически значимо не отличался от контроля (39.8 [37.7; 51.3] vs. 42.8 [37.4; 52.1], $p = 0.81$).

Аналогичные результаты были получены для других видов млекопитающих: инкубация с Мβ-ЦД-Х с концентрацией 2 мг на 120 млн клеток перед криоконсервацией повышала выживаемость сперматозоидов быка [52] и барана [55]. Для жеребца концентрация Мβ-ЦД-Х, повышающая криотолерантность сперматозоидов, составляла 1.5 мг на 120 млн клеток [51, 56, 57].

В данной работе концентрацию добавленных к эякуляту Мβ-ЦД-Х рассчитывали на объем эякулята, а не на количество клеток, как это представлено в большинстве статей, для удобства дальнейшей рутинной работы в случае внедрения Мβ-ЦД-Х в качестве компонента криопротекторной среды в клиническую практику. Медианное значение концентрации сперматозоидов в образцах составило 100.5 [78.0; 109.5] млн/мл. Мы не выявили корреляции между концентрацией сперматозоидов в нативном образце и выживаемостью сперматозоидов после разморозки при инкуба-

Таблица 2. Средний размер кристаллов, формирующихся в образцах с различной концентрацией Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х

Контроль	2 мг Мβ-ЦД	4 мг Мβ-ЦД	8 мг Мβ-ЦД	2 мг Мβ-ЦД-Х	4 мг Мβ-ЦД-Х	8 мг Мβ-ЦД-Х
14 мкм	15 мкм	14 мкм	14 мкм	15 мкм	15 мкм	14 мкм

Примечание. Состав криопротекторного раствора — 1 мл среды Sperm Wash + 0.7 мл среды Sperm Freeze. Для каждого образца оценка среднего размера кристаллов проводилась по 2000 значений.

ции эякулята с различными концентрациями Мβ-ЦД-Х перед криоконсервацией. Для концентраций Мβ-ЦД-Х, равных 1 и 2 мг/мл, коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил 0.059 ($p = 0.89$) и 0.275 ($p = 0.51$) соответственно.

Анализ кристаллообразования в криопротекторной среде Sperm Freeze после добавления Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х методом рентгеноструктурного анализа. Дисахариды (сахароза, трегалоза) широко используются в криобиологии в качестве непроницающих криопротекторов [58]. Ингибирование роста кристаллов льда дисахаридами обусловлено как уменьшением количества свободной воды в растворе за счет значительного гидратационного эффекта, так и увеличением частоты нуклеации кристаллов льда [59]. Таким образом, включение дисахаридов в криопротекторный раствор приводит к уменьшению размера кристаллов льда, при этом увеличивая их количество [60, 61]. Можно предположить, что циклодекстрины, являясь олигомерами глюкозы, также могут влиять на структуру окружающей воды и образование льда. Рентгеноструктурный анализ сформировавшихся в процессе криоконсервации кристаллов льда в образцах с добавлением 2, 4 и 8 мг/мл Мβ-ЦД или Мβ-ЦД-Х показал, что средний размер образующихся кристаллов не отличается от среднего размера кристаллов в контрольных образцах (табл. 2). Исходя из этого, можно сделать вывод, что криопротекторный механизм циклодекстринов и комплексов включения на их основе заключается не в подавлении роста кристаллов льда, по крайней мере для используемых в работе концентраций. Криопротекторный механизм Мβ-ЦД-Х, по-видимому, носит комплексный характер. Он обусловлен как непосредственно встраиванием холестерина в бислой мембраны, так и ассоциацией Мβ-ЦД-Х с поверхностью мембраны клеток. Встраиваясь в мембрану сперматозоидов, холестерин влияет на физико-химические свойства бислоя и фазово-структурные переходы липидов мембраны. Наслаиваясь на поверхности клеток, Мβ-ЦД-Х, вероятно, способствуют замедлению осмотического и диффузионного обмена между клеткой и внешней средой, что позволяет снизить осмотический стресс. Конкрет-

ный механизм криозащитных свойств Мβ-ЦД-Х еще предстоит выяснить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Произвольно метилированные производные бета-циклодекстринов обладают выраженной цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека, что обусловлено высокой холестерин-солюбилизирующей способностью данных производных циклодекстринов. Инкубация сперматозоидов с Мβ-ЦД приводит к экстракции значительного количества холестерина (67% для концентрации Мβ-ЦД в образце, равной 64 мг/мл) из мембран клеток и, как следствие, к изменению их морфологии, потере подвижности и гибели клеток. Цитотоксичность Мβ-ЦД-Х значительно менее выражена, так как они не могут экстрагировать липидные компоненты мембраны клеток из-за того, что их полости уже заполнены холестерином. В концентрациях, используемых для повышения криотолерантности сперматозоидов, Мβ-ЦД-Х не цитотоксичны.

При инкубации сперматозоидов с Мβ-ЦД-Х (2–16 мг/мл) количество холестерина в образце со сперматозоидами возрастает. Измеренное количество холестерина в образцах превышает теоретически возможное его содержание в мембране в несколько раз. Вероятно, это объясняется адсорбцией Мβ-ЦД-Х на поверхности мембран сперматозоидов, приводящей к существенному увеличению количества холестерина в образцах.

Инкубация сперматозоидов с 2 мг/мл Мβ-ЦД-Х перед криоконсервацией приводит к увеличению индекса подвижности и индекса «жизнеспособности» сперматозоидов после разморозки на 14.8 и 13.8% соответственно. Инкубация сперматозоидов с 1 и 4 мг/мл Мβ-ЦД-Х не приводит к статистически значимому повышению криотолерантности сперматозоидов.

Рентгеноструктурный анализ среднего размера кристаллов льда, образующихся в образцах при криоконсервации, не выявил статистически значимых различий между образцами с добавлением Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х и контрольными образцами.

Таким образом, криопротекторный механизм Мβ-ЦД-Х, по-видимому, представляет собой совокупность двух факторов: 1) изменение физико-химических свойств мембраны в результате изменения концентрации холестерина в бислое; 2) смягчение осмотических эффектов в результате адсорбции Мβ-ЦД-Х на поверхности мембраны.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good clinical practice) и принципами Хельсинской Декларации. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом клиники репродукции человека «Альтравита» (ООО «ЭКО ЦЕНТР»). До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Royere D., Barthelemy C., Hamamah S., and Lansac J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum. Reprod. Update*, **2**, 553–559 (1996). DOI: 10.1093/HUMUPD/2.6.553
- Polge C., Smith A. U., and Parkes A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**, 666–666 (1949). DOI: 10.1038/164666a0
- Bunge R. G. and Sherman J. K. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, **172**, 767–768 (1953). DOI: 10.1038/172767b0
- Rodriguez-Wallberg K. A., Waterstone M., and Anastácio A. Ice age: Cryopreservation in assisted reproduction - An update. *Reprod. Biol.*, **19**, 119–126 (2019). DOI: 10.1016/J.REPBIO.2019.04.002
- McBride A. J. and Lipshultz L. I. Male fertility preservation. *Curr. Urology Rep.*, **19** (7), 49 (2018). DOI: 10.1007/s11934-018-0803-2
- Moore K. J., Delgado C., and Ory J. Fertility preservation in uro-oncology. *Curr. Opin. Support Palliat. Care*, **16**, 230–233 (2022). DOI: 10.1097/SPC.0000000000000621
- Hughes G. and da Silva M. S. Sperm cryopreservation for impaired spermatogenesis. *Reproduction & fertility*, **4** (1), e220106 (2022). Advance online publication. DOI: 10.1530/RAF-22-0106
- Liu S. and Li F. Cryopreservation of single-sperm: where are we today? *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **18** (1), 41 (2020). DOI: 10.1186/S12958-020-00607-X
- Guidance regarding gamete and embryo donation* (American Society for Reproductive Medicine, 2021).
- Ozimic S., Ban-Frangez H., and Stimpfel M. Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **45**, 4716–4734 (2023). DOI: 10.3390/CIMB45060300
- Kunkitti P., Chatdarong K., Suwimonteerabutr J., Neddumpun T., Johannisson A., Bergqvist A. S., Sjunnesson Y., and Axné E. Osmotic tolerance of feline epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, **185**, 148–153 (2017). DOI: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2017.08.014
- Yashaswi S. and Mona S. Biophysics of cryopreservation. *Int. J. Thermodynamics*, **25**, 17–27 (2022). DOI: 10.5541/IJOT.925283
- Morris J. G., Acton E., Murray B. J., and Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*, **64**, 71–80 (2012). DOI: 10.1016/J.CRYOBIOL.2011.12.002
- Белоус А. М. и Грищенко В. И. Криобиология (Наукова думка, 1994).
- Quinn P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, **22**, 128–146 (1985). DOI: 10.1016/0011-2240(85)90167-1
- Ilieva A., Ivanov A. G., Kovachev K., Richter H. P. Cryo-damage in ram sperm plasma membranes. Energy transfer and freeze-fracture studies. *J. Electroanal. Chem.*, **342**, 41–44 (1992). DOI: 10.1016/0022-0728(92)85033-Y
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, **247** (3), 125–142 (1984). DOI: 10.1152/AJPCELL.1984.247.3.C125
- van Blitterswijk W. J., Hilkmann H., and van der Meer B. W. Quantitative contributions of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un)saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry*, **26**, 1746–1756 (1987). DOI: 10.1021/BI00380A038
- Yeagle P. L. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 267–287 (1985). DOI: 10.1016/0304-4157(85)90011-5
- Tilcock C. P. S., Bally M. B., Farren S. B., Cullis P. R., and Gruner S. M. Cation-dependent segregation phenomena and phase behavior in model membrane systems containing phosphatidylserine: influence of cholesterol and acyl chain composition. *Biochemistry*, **23**, 2696–2703 (1984). DOI: 10.1021/BI00307A025
- Cohen R., Mukai C., and Travis A. J. Lipid regulation of acrosome exocytosis. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, **220**, 107–127 (2016). DOI: 10.1007/978-3-319-30567-7_6
- Abou-haila A. and Tulsiani D. R. P. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **485**, 72–81 (2009). DOI: 10.1016/J.ABB.2009.02.003
- Darin-Bennett A. and White I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, **14**, 466–470 (1977). DOI: 10.1016/0011-2240(77)90008-6
- Purdy P. H. and Graham J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, **48**, 36–45 (2004). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2003.12.001
- Mocé E. and Graham J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosur-

- vival. *J. Anim. Sci.*, **84**, 826–833 (2006). DOI: 10.2527/2006.844826X
26. Combes G. B., Varner D. D., Schroeder F., Burghardt R. C., and Blanchard T. L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **56**, 127–132 (2000). PMID: 20681124
 27. Moore A. I., Squires E. L., and Graham J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, **51**, 241–249 (2005). DOI: 10.1016/J.CRYOBIO.2005.07.004
 28. Uekama K., Hirayama F., and Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.*, **98**, 2045–2076 (1998). DOI: 10.1021/CR970025P
 29. Huang Z. and London E. Effect of cyclodextrin and membrane lipid structure upon cyclodextrin-lipid interaction. *Langmuir*, **29**, 14631–14638 (2013). DOI: 10.1021/LA4031427
 30. Lipkowitz K. B. Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins. *Chem. Rev.*, **98**, 1829–1873 (1998). DOI: 10.1021/CR9700179
 31. Davis M. E. and Brewster M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 1023–1035 (2004). DOI: 10.1038/NRD1576
 32. Szente L. and Fenyvesi É. Cyclodextrin-lipid complexes: cavity size matters. *Struct. Chem.*, **28**, 479–492 (2017). DOI: 10.1007/S11224-016-0884-9/METRICS
 33. Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., and Pitha J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **186**, 17–22 (1989). DOI: 10.1111/J.1432-1033.1989.TB15171.X
 34. Tsamaloukas A., Szadkowska H., Slotte P. J., and Heerklotz H. Interactions of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. *Biophys. J.*, **89**, 1109–1119 (2005). DOI: 10.1529/BIOPHYSJ.105.061846
 35. Christoforides E., Papaioannou A., and Bethanis K. Crystal structure of the inclusion complex of cholesterol in β -cyclodextrin and molecular dynamics studies. *Beilstein J. Org. Chem.*, **14**, 838–848 (2018). DOI: 10.3762/BJOC.14.69
 36. Jozwiakowski M. J. and Connors K. A. Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins. *Carbohydr. Res.*, **143**, 51–59 (1985). DOI: 10.1016/S0008-6215(00)90694-3
 37. Szente L. and Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **36**, 17–28 (1999). DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00092-1
 38. Szejtli J. Dimethyl- β -cyclodextrin as parenteral drug carrier. *J. Inclusion Phenomena*, **1**, 135–150 (1983). DOI: 10.1007/BF00656816
 39. Spencer C. M., Stoddart J. F., and Zarzycki R. Structural mapping of an unsymmetrical chemically modified cyclodextrin by high-field nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, No 9, 1323–1336 (1987). DOI: 10.1039/P29870001323
 40. *Process for the preparation of alkylated cyclodextrin derivatives, methylated cyclodextrin derivatives which can be prepared by the process and the use of the products*. Patent № DE4333598A1
 41. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. *World Health Organization*, **6**, 1–276 (2021)
 42. Christian A. E., Haynes M. P., Phillips M. C., and Rothblat G. H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.*, **38**, 2264–2272 (1997). DOI: 10.1016/S0022-2275(20)34940-3
 43. Kilsdonk E. P. C., Yancey P. G., Stoudt G. W., Bangerter F. W., Johnson W. J., Phillips M. C., and Rothblat G. H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17250–17256 (1995). DOI: 10.1074/JBC.270.29.17250
 44. Castagne D., Fillet M., Delattre L., Evrard B., Nussgens B., and Piel G. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **63**, 225–231 (2009). DOI: 10.1007/S10847-008-9510-9/METRICS
 45. Kiss T., Fenyvesi F., Bácskay I., Váradi J., Fenyvesi É., Iványi R., Szente L., Tósaki Á., and Vecsernyés M. Evaluation of the cytotoxicity of beta-cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **40**, 376–380 (2010). DOI: 10.1016/J.EJPS.2010.04.014
 46. Piel G., Piette M., Barillaro V., Castagne D., Evrard B., and Delattre L. Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int. J. Pharm.*, **338**, 35–42 (2007). DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2007.01.015
 47. Wenz G. Influence of intramolecular hydrogen bonds on the binding potential of methylated β -cyclodextrin derivatives. *Beilstein J. Org. Chem.*, **8**, 1890–1895 (2012). DOI: 10.3762/BJOC.8.218
 48. Fenyvesi É., Szemán J., Csabai K., Malanga M., and Szente L. Methyl-beta-cyclodextrins: the role of number and types of substituents in solubilizing power. *J. Pharm. Sci.*, **103**, 1443–1452 (2014). DOI: 10.1002/JPS.23917
 49. Sheetz M. P. and Singer S. J. Equilibrium and kinetic effects of drugs on the shapes of human erythrocytes. *J. Cell Biol.*, **70**, 247–251 (1976). DOI: 10.1083/JCB.70.1.247
 50. Cassera M. B., Silber A. M., and Gennaro A. M. Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study. *Biophys. Chem.*, **99**, 117–127 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00139-4)
 51. Moore A. I., Squires E. L., and Graham J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, **51**, 241–249 (2005). <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIO.2005.07.004>
 52. Mocé E. and Graham J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosur-

- vival. *J. Anim. Sci.*, **84**, 826–833 (2006). DOI: 10.2527/2006.844826X
53. Subczynski W. K., Pasenkiewicz-Gierula M., Widomska J., Mainali L., and Raguz M. High cholesterol/low cholesterol: Effects in biological membranes: a review. *Cell Biochem. Biophys.*, **75**, 369–385 (2017). DOI: 10.1007/S12013-017-0792-7
 54. Joset A., Grammenos A., Hoebeke M., and Leyh B. Investigation of the interaction between a β -cyclodextrin and DMPC liposomes: A small angle neutron scattering study. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **83**, 227–238 (2015). DOI: 10.1007/S10847-015-0558-Z/METRICS
 55. Mocé E., Purdy P. H., and Graham J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.*, **118**, 236–247 (2010). DOI: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2009.06.013
 56. Murphy C., English A. M., Holden S. A., and Fair S. Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, **145**, 123–129 (2014). DOI: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2014.01.013
 57. Spizziri B. E., Fox M. H., Bruemmer J. E., Squires E. L., and Graham J. K. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, **118**, 255–264 (2010). DOI: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2009.08.001
 58. da Cardoso L. M. F., Pinto M. A., Pons H. A., and Alves L. A. Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy. *Cryobiology*, **78**, 15–21 (2017). DOI: 10.1016/J.CRYOBIOL.2017.07.010
 59. Uchida T., Nagayama M., Shibayama T., and Gohara K. Morphological investigations of disaccharide molecules for growth inhibition of ice crystals. *J. Crystal Growth*, **299**(1), 125–135 (2007). DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2006.10.261
 60. Solocinski J., Osgood Q., Wang M., Connolly A., Menze M. A., and Chakraborty N. Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. *Cryobiology*, **75**, 134–143 (2017). DOI: 10.1016/J.CRYOBIOL.2017.01.001
 61. Wang G. M. and Haymet A. D. J. Trehalose and other sugar solutions at low temperature: modulated differential scanning calorimetry (MDSC). *J. Phys. Chemistry B*, **102**, 5341–5347 (1998). DOI: 10.1021/JP980942E

The Use of Cholesterol/Randomly Methylated β -Cyclodextrin (RAMEB) Inclusion Complexes to Improve Human Spermatozoa Cryosurvival

A.G. Mironova*, **, S.I. Afanasyeva***, S.A. Yakovenko***,
A.N. Tikhonov**, ***, and E.Yu. Simonenko***

*Human Reproduction Clinic “Altravita”, ul. Nagornaya 4A, Moscow, 117186 Russia

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

***Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

Cryoprotective properties of cholesterol/randomly methylated beta-cyclodextrin (RAMEB) inclusion complexes with respect to human spermatozoa have been investigated. The influence of different concentrations of RAMEB and cholesterol/RAMEB inclusion complexes on sperm membranes has been explored. It was shown that obvious cytotoxicity of RAMEB against spermatozoa is due to the interaction between cyclodextrins and lipid components of the membrane, in particular cholesterol extraction. Cholesterol/RAMEB inclusion complexes are significantly less cytotoxic. The dependence of cholesterol concentration in sperm membranes on the concentration of cholesterol/RAMEB inclusion complexes in the sample was established. It was demonstrated that incubation of spermatozoa with 2 mg/ml of cholesterol inclusion complexes before cryopreservation caused a statistically significant increase in survival rate (by 13.8%) and in the proportion of progressively motile spermatozoa (by 14.8%) post-thaw. X-ray diffraction revealed that the concentrations of RAMEB or cholesterol/RAMEB inclusion complexes (2, 4 and 8 mg/mL) do not affect the average size of ice crystals formed in the sample during cryopreservation in the samples. The mechanism of the cryoprotective effect of cholesterol/RAMEB inclusion complexes is proposed.

Keywords: cryopreservation, spermatozoa, membrane, cholesterol methylated beta-cyclodextrin, RAMEB

ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

УДК 599.742.22

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АРКТИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ БЕЛОГО МЕДВЕДЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСТОРИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

© 2024 г. А.А. Канапин*, А.А. Самсонова*, А.В. Абрамов**, М.В. Саблин**, В.В. Платонов**, Х.Х. Мустафин***, С.А. Чекрыгин****, Д. Хирата*.*

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

**Зоологический институт РАН, Университетская наб., 1, Санкт-Петербург, 199034, Россия

***Московский физико-технический институт,
Институтский пер., 9, Долгопрудный, Московская обл., 141701, Россия

****Санкт-Петербургский государственный университет,
Ботаническая ул., 17, Петергоф, Санкт-Петербург, 198504, Россия

#E-mail: dhirata59@gmail.com

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.

После доработки 22.04.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Впервые проведен анализ генетических данных с использованием ДНК белого медведя, выделенной из музейных образцов, находящихся в коллекции Зоологического института РАН. Уникальные данные, полученные в ходе анализа, позволили впервые охарактеризовать структуру популяций в различных регионах и тем самым заложить основу для дальнейших исследований. Впервые были применены методы выделения ДНК из исторического материала, разработанные для использования в археологии. Данные методы позволили получить материал высокого качества, пригодный для высокопроизводительного секвенирования. Анализ генетических вариантов дал возможность впервые описать структуру популяций белого медведя в российских арктических регионах и ее изменения, связанные с активной хозяйственной деятельностью, развернувшейся в первой трети XX века.

Ключевые слова: арктическая фауна, генетика редких видов, древняя ДНК, историческая геномика, белый медведь, генетика популяций.

DOI: 10.31857/S0006302924060251, EDN: NIRPYU

Развитие генетических технологий открывает новые возможности для исследований редких и исчезающих видов животных [1–3]. В частности, исследования популяционной генетики белого медведя (*Ursus maritimus*), основанные на данных полногеномного и таргетного секвенирования, позволяют в режиме реального времени отслеживать изменения в популяциях животных и принимать соответствующие природоохранные меры [4–10]. Тем не менее, несмотря на то, что российские ареалы обитания белого медведя занимают существенную часть в арктическом регионе, исследования в области популяционной генетики животного все еще недостаточны для полноценной характеристики его популяционно-генетического статуса [11–13]. Кроме того, накопленные в ходе исследований образцы биоматериала (преимущественно костные фрагменты или скелеты), хранящиеся в фондах музеев, представляют собой уникальный источник информации о динамике популяций и дают возможность оценить степень

воздействия хозяйственной деятельности человека на состояние данного вида [14]. Прогресс в развитии методик исследования древней ДНК позволил получать фрагменты генома живых организмов с качеством, пригодным для высокопроизводительного секвенирования [15], и, таким образом, анализировать генетику популяций в исторической перспективе [16–19].

Ранее нами была описана база данных, включающая 506 образцов животных, содержащая исчерпывающую информацию, включая данные фотофиксации, уникальные идентификаторы образцов, информацию с бумажных носителей (картотека хранения), геолокацию и другую информацию. База данных BEARBASE находится в открытом доступе на сайте shirokuma.compbio.ru/db/.

В данном исследовании мы использовали музейные образцы костей белого медведя из фондов хранения Зоологического института РАН, из которых была выделена и отсекументирована геном-

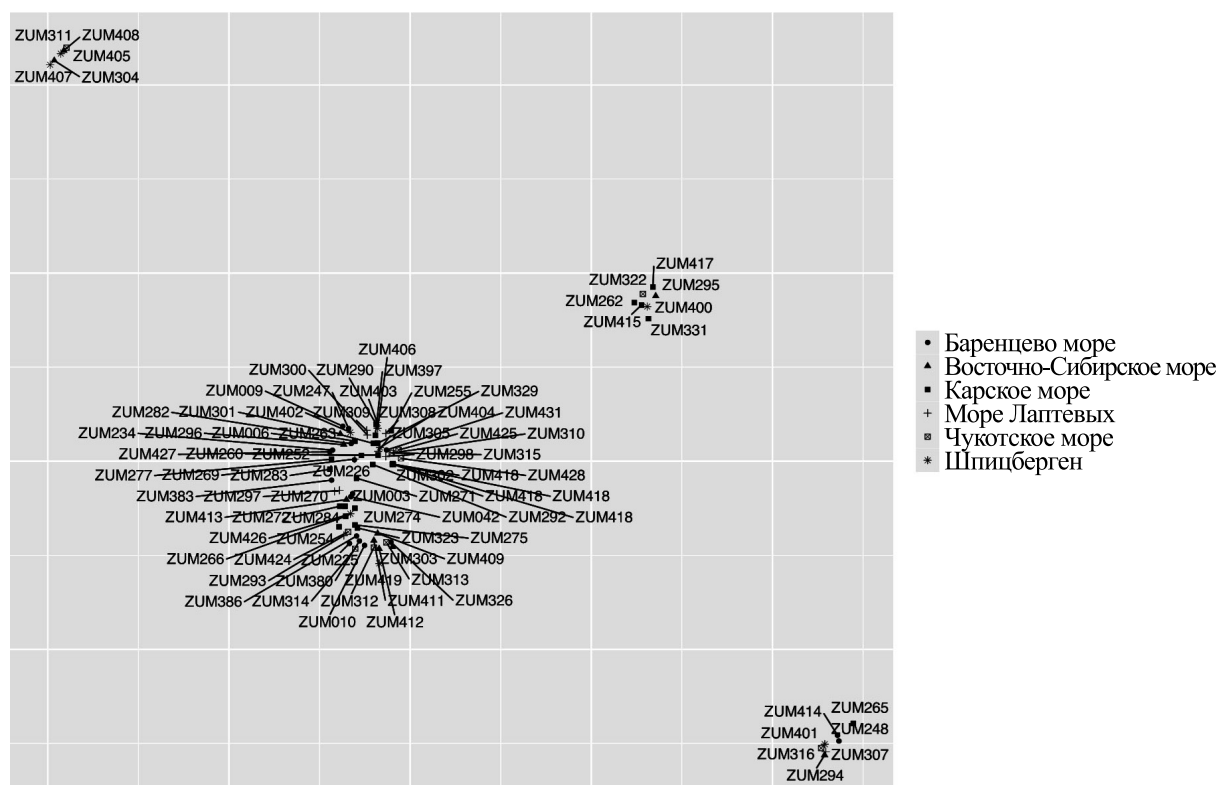


Рис. 1. Диаграмма коэффициентов преобразования umap для матрицы ковариаций генотипов 86 образцов белого медведя. Идентификаторы образцов соответствуют информации в базе данных BearBase, арктические регионы показаны различными значками.

ная ДНК, что позволило впервые охарактеризовать генетический ландшафт популяций белого медведя в российской Арктике.

ДНК из образцов была выделена в лаборатории исторической генетики Московского физико-технического института в соответствии с методиками, используемыми для работы с древней ДНК. Такой подход позволил получить препараты высокого качества, пригодные для высокопроизводительного секвенирования. Нами были отобраны 86 образцов для первого раунда экспериментов по выделению ДНК и последующему секвенированию. Исследуемые образцы были собраны в интервале от 1883 до 2000 гг., информация о времени сбора, локации и характеристиках проб (концентрация ДНК, количество фрагментов секвенирования, эффективность картирования на референсный геном) доступна в ранее описанной базе данных BEARBASE. Для выбранных образцов ДНК выделяли из ткани зубов в соответствии с ранее описанной методикой [20]. Оценка качества выделенной ДНК перед приготовлением библиотек секвенирования проводилась при помощи капиллярного электрофореза на инструменте QIAxcel Advanced (QIAGEN, США). Синтез библиотек секвенирования осу-

ществляли в соответствии с протоколом Nupur-Cap KAPA Workflow v3.3, предложенным производителем набора реагентов (Roche, США). Секвенирование библиотек проводилось компанией Genetico (Москва) на инструменте NovaSeq (Illumina, США).

Фрагменты секвенирования выравнивали на референсный геном белого медведя версии GCF_017311325.1_ASM1731132v1 [8] посредством программы bwa mem [21], поиск однонуклеотидных замен проводили с использованием программы angsd [22]. Для анализа структуры популяций были отобраны биаллельные однонуклеотидные замены общим числом 13 866 959. На рис. 1 представлена диаграмма коэффициентов преобразования UMAP для матрицы ковариаций генотипов исследованных образцов. Следует отметить, что кластеризация образцов по генетическому сходству не всегда совпадает с географической локацией, что может объясняться миграцией животных. Диаграмма популяционного состава ADMIXTURE для образцов приведена на рис. 2 для 3, 4 и 5 популяций, в целом согласуется с анализом umap и служит дополнительным указанием на незначительную роль географической

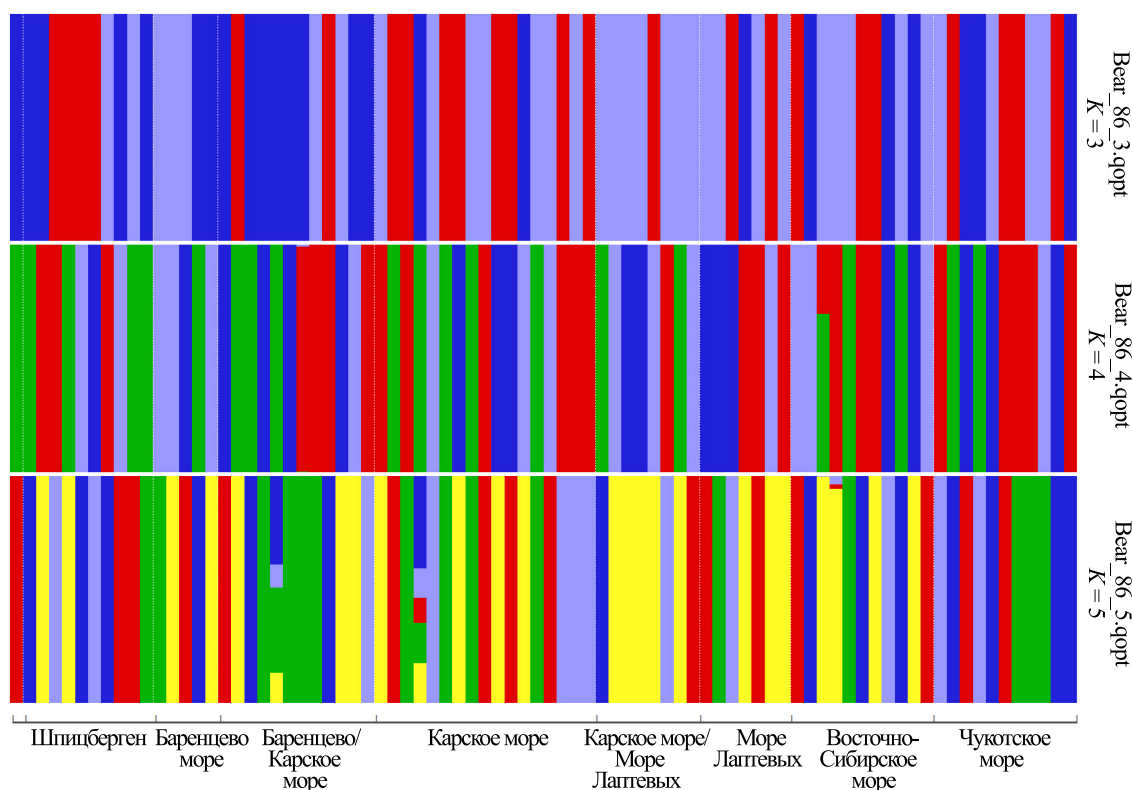


Рис. 2. Диаграмма ADMIXTURE для различных значений числа популяций (сверху вниз, от 3 до 5). Различные цвета соответствуют популяциям, высота столбца данного цвета соответствует пропорции соответствующей популяции. Образцы отсортированы по регионам сбора, обозначенным на оси Region.

изоляции различных регионов и высокой мобильности животных.

Таким образом, впервые проведен популяционный анализ генетических данных белого медведя в российской Арктике. Дальнейшие исследования, включающие все доступные образцы, позволят детально охарактеризовать динамику популяционных процессов и, в перспективе, прогнозировать последствия воздействия антропогенных факторов на арктические экосистемы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-74-00038.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Supple M. A. and Shapiro B. Conservation of biodiversity in the genomics era. *Genome Biol.*, **19**, 131 (2018). DOI: 10.1186/s13059-018-1520-3
2. Theissinger K., Fernandes C., Formenti G., Bista I., Berg P. R., Bleidorn C., Bombarely A., Crottini A., Gallo G. R., Godoy J. A., Jentoft S., Malukiewicz J., Mouton A., Oomen R. A., Paez S., Palsbøll P. J., Pampoulie Ch., Ruiz-López M. J., Secomandi S., Svoldal H., Theofanopoulou C., de Vries J., Waldvogel A.-M., Zhang G., Jarvis E. D., Bálint M., Ciofi C., Waterhouse R. M., C Mazzoni J., and Höglund J. How genomics can help biodiversity conservation. *Trends Genet.*, **39**, 545–559 (2023). DOI: 10.1016/j.tig.2023.01.005
3. Schmidt T. L., Thia J. A., and Hoffmann A. A. How can genomics help or hinder wildlife conservation? *Annu Rev. Anim. Biosci.*, **12**, 45–68 (2024). DOI: 10.1146/annurev-animal-021022-051810

4. Miller W., Schuster S. C., Welch A. J., Ratan A., Bedoya-Reina O. C., Zhao F., Kim H. L., Burhans R. C., Drautz D. I., Wittekindt N. E., Tomsho L. P., Ibarra-Laclette E., Herrera-Estrella L., Peacock E., Farley S., Sage G. K., Rode K., Obbard M., Montiel R., Bachmann L., Ingólfsson Ó., Aars J., Mailund Th., Wiig Ø., Talbot S. L., and Lindqvist Ch. Polar and brown bear genomes reveal ancient admixture and demographic footprints of past climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109** (36), E2382–E2390 (2012). DOI: 10.1073/pnas.1210506109
5. Cahill J. A., Green R. E., Fulton T. L., Stiller M., Jay F., Ovsyanikov N., Salamzade R., St John J., Stirling I., Slatkin M., and Shapiro B. Genomic evidence for island population conversion resolves conflicting theories of polar bear evolution. *PLoS Genet.*, **9**, e1003345 (2013). DOI: 10.1371/journal.pgen.1003345
6. Liu S., Lorenzen E. D., Fumagalli M., Li B., Harris K., Xiong Z., Zhou L., Korneliussen T. S., Somel M., Babbitt C., Wray G., Li J., He W., Wang Zh., Fu W., Xiang X., Morgan C. C., Doherty A., O'Connell M. J., McInerney J. O., Born E. W., Dalén L., Dietz R., Orlando L., Sonne Ch., Zhang G., Nielsen R., Willerslev E., and Wang J. Population Genomics reveal recent speciation and rapid evolutionary adaptation in polar bears. *Cell*, **157**, 785–794 (2014). DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.054
7. Jensen E. L., Tschirter C., de Groot P. V. C., Hayward K. M., Branigan M., Dyck M., Clemente-Carvalho R. B. G., and Loughheed S. C. Canadian polar bear population structure using genome-wide markers. *Ecol. Evol.*, **10**, 3706–3714 (2020). DOI: 10.1002/ece3.6159
8. Laidre K. L., Supple M. A., Born E. W., Regehr E. V., Wiig Ø., Ugarte F., Aars J., Dietz R., Sonne C., Hegelund P., Isaksen C., Akse G. B., Cohen B. H., Stern L., Moon T., Vollmers Ch., Corbett-Detig R., Paetkau D., and Shapiro B. Glacial ice supports a distinct and undocumented polar bear subpopulation persisting in late 21st-century sea-ice conditions. *Science*, **376**, 1333–1338 (2022). DOI: 10.1126/science.abk2793
9. Lan T., Leppälä K., Tomlin C., Talbot S. L., Sage G. K., Farley S. D., Shideler R. T., Bachmann L., Wiig Ø., Albert V. A., Salojärvi J., Mailund Th., Drautz-Moses D. I., Schuster S. C., Herrera-Estrella L., and Lindqvist Ch. Insights into bear evolution from a Pleistocene polar bear genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2200016119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2200016119
10. Wang M.-S., Murray G. G. R., Mann D., Groves P., Vershinina A. O., Supple M. A., Kapp J. D., Corbett-Detig R., Crump S. E., Stirling I., Laidre K. L., Kunz M., Dalén L., Green R. E., and Shapiro B. A polar bear paleogenome reveals extensive ancient gene flow from polar bears into brown bears. *Nature Ecol. Evol.*, **6**, 936–944 (2022). DOI: 10.1038/s41559-022-01753-8
11. Peacock E., Sonsthagen S. A., Obbard M. E., Boltunov A., Regehr E. V., Ovsyanikov N., Aars J., Atkinson S. N., Sage G. K., Hope A. G., E. Zeyl, L. Bachmann, D. Ehrlich, K. T. Scribner, S. C. Amstrup, S. Belikov, E. W. Born, A. E. Derocher, I. Stirling, M. K. Taylor, Ø. Wiig, D. Paetkau, and Talbot S. L. Implications of the circumpolar genetic structure of polar bears for their conservation in a rapidly warming Arctic. *PLoS One*, **10**, e112021 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0112021
12. Malenfant R. M., Davis C. S., Cullingham C. I., and Coltman D. W. Circumpolar genetic structure and recent gene flow of polar bears: a reanalysis. *PLoS One*, **11**, e0148967 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0148967
13. Sorokin P. A., Zvychnayaya E. Y., Ivanov E. A., Mizin I. A., Mordvintsev I. N., Platonov N. G., Isachenko A. I., Lazareva R. E., and Rozhnov V. V. Population genetic structure in polar bears (*Ursus maritimus*) from the Russian Arctic Seas. *Russ. J. Genet.*, **59**, 1320–1332 (2023). DOI: 10.1134/S1022795423120128
14. Johnson K. R. and Owens I. F. P. A global approach for natural history museum collections. *Science*, **379**, 1192–1194 (2023). DOI: 10.1126/science.adf6434
15. Orlando L., Allaby R., Skoglund P., Der Sarkissian C., Stockhammer P. W., Ávila-Arcos M. C., Fu Q., Krause J., Willerslev E., Stone A. C., and Warinner Ch. Ancient DNA analysis. *Nature Rev. Methods Primers*, **1**, 14 (2021). DOI: 10.1038/s43586-020-00011-0
16. Díez-Del-Molino D., Sánchez-Barreiro F., Barnes I., Gilbert M. T. P., and Dalén L. Quantifying temporal genomic erosion in endangered species. *Trends Ecol. Evol.*, **33**, 176–185 (2018). DOI: 10.1016/j.tree.2017.12.002
17. Card D. C., Shapiro B., Giribet G., Moritz C., and Edwards S. V. Museum genomics. *Annu. Rev. Genet.*, **55**, 633–659 (2021). DOI: 10.1146/annurev-genet-071719-020506
18. Raxworthy C. J. and Smith B. T. Mining museums for historical DNA: advances and challenges in museomics. *Trends Ecol. Evol.*, **36**, 1049–1060 (2021). DOI: 10.1016/j.tree.2021.07.009
19. Benham P. M. and Bowie R. C. K. Natural history collections as a resource for conservation genomics: Understanding the past to preserve the future. *J. Hered.*, **114**, 367–384 (2023). DOI: 10.1093/jhered/esac066
20. Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M.-T., Weihmann A., Nickel B., Valdiosera C., García N., Pääbo S., Arsuaga J.-L., and Meyer M. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 15758–15763 (2013). DOI: 10.1073/pnas.1314445110
21. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv, **1303.3997** [q-bio.GN] (2013). Available from: <http://arxiv.org/abs/1303.3997>.
22. Korneliussen T. S., Albrechtsen A., and Nielsen R. ANGSD: Analysis of next generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, **15**, 356 (2014). DOI: 10.1186/s12859-014-0356-4

Genetic Analysis of Arctic Polar Bear Populations using Historical Samples

A.A. Kanapin*, **A.A. Samsonova***, **A.V. Abramov****, **M.V. Sablin****, **V.V. Platonov****,
H.H. Mustafin***, **S.A. Chekrygin******, and **D. Hirata***

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

***Institute of Zoology, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya nab. 1, St. Petersburg, 199034 Russia*

****Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Institutskij per. 9, Moscow Region, 141701 Russia*

*****St. Petersburg State University, Botanicheskaya ul. 17, Peterhof, St. Petersburg, 198504 Russia*

This study analyzed genetic data using DNA isolated from museum specimens of polar bears in the collection of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences. The unique data obtained in this study made it possible to characterize population structure of polar bears in the past and to lay the foundation for further research. Methods of DNA isolation used in archaeogenetics and paleogenetics were applied for historical materials. These methods provided sufficient quantity and quality of DNA suitable for high-throughput sequencing. The analysis of genetic variants made it possible to reveal population structure of spatial and temporal polar bear populations in the Russian Arctic regions and its changes associated with the active economic activities that unfolded in the first third of the twentieth century.

Keywords: Arctic fauna, conservation genetics, historical DNA, museum genomics, polar bear, population genetics