



БИОФИЗИКА

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 1, 2023

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Конформационные аспекты формирования структур остова полипептидных цепей в белках. Связь конформационной стабильности/лабильности с типом β -изгибов <i>И.Ю. Торшин, И.В. Филатов, А.В. Батяновский, К.В. Смирнов, А.А. Анашкина, Н.Г. Есипова, В.Г. Туманян</i>	5
Индукция повреждений структуры ДНК опухолевых клеток полиакрилатом золота <i>А.К. Чигасова, Л.А. Островская, Д.Б. Корман</i>	11
Мекеновая кислота – возможный нейропротектор: обоснование на экспериментах <i>in vitro</i> и физико-химических свойствах <i>С.В. Козин, Л.И. Иващенко, А.А. Кравцов, Л.В. Васильева, А.М. Васильев, Н.Н. Буков, А.А. Дорохова, О.М. Лясота, А.В. Беспалов, С.С. Джимак</i>	20
Изучение конформации гема и глобина фракционированных эритроцитов крыс с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света <i>Б.Г. Юшков, М.Г. Зуев, С.А. Бриллиант, А.А. Васин</i>	33

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Модель диффузии липидов в цитоплазматических мембранах <i>П.В. Мокрушников, В.Я. Рудяк</i>	41
Локальная оптическая томография нервной клетки <i>Г.Г. Левин, А.А. Самойленко, Т.А. Казакова, Т.А. Маракуца, Г.В. Максимов</i>	57
Механизмы регуляции свертывания крови: история исследований и перспективы <i>Д.Ю. Нечипуренко, М.А. Пантелеев, Е.И. Синауридзе, К.С. Троянова, А.Д. Мегалинский, Н.А. Подоплелова, А.М. Шибеко, А.Н. Баландина, Е.В. Кольцова, Ф.И. Атауллаханов</i>	66
Сравнительный анализ содержания монооксида азота в эритроцитсодержащих компонентах крови при ее хранении и их оптико-морфометрическая характеристика <i>Н.В. Акулич, В.В. Зинчук</i>	79
Влияние паракринных факторов кондиционированной культуральной среды стволовых клеток на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах крови на фоне ацетаминофен-индуцированной печеночной недостаточности <i>А.А. Темнов, А.Н. Склифас, В.К. Жалимов, М.Г. Шарапов, Р.С. Фадеев, М.И. Кобякова, Н.И. Кукушкин, К.А. Рогов</i>	87

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Частотные и временные характеристики зрительной системы насекомых в оптическом диапазоне <i>С.И. Зиенко, В.Л. Жбанова</i>	98
Исследование образования короткоживущих активных форм кислорода в гомогенате сердца крысы методом электронного парамагнитного резонанса <i>А.А. Тимошин, В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, Э.К. Рууге</i>	108

Сравнение динамики повреждений ДНК лейкоцитов крови и выживаемости мышей после их тотального облучения ионами углерода в пике Брэгга или рентгеновскими лучами	
<i>Е.А. Кузнецова, О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, С.И. Глухов, Т.В. Сирота, Т.А. Белякова, Н.П. Сирота</i>	112
Динамика температуры и массы тела у облученных мышей: зависимости «доза—эффект» и «время—эффект»	
<i>Ю.А. Зрилова, О.В. Никитенко, Т.М. Бычкова, И.М. Парфенова, Т.А. Караулова, А.А. Иванов</i>	120
Исследование изменения объема легких вследствие воздействия высокоинтенсивных акустических колебаний на резонансной частоте дыхательной системы	
<i>С.П. Драган, В.И. Кезик, А.В. Богомолов, С.В. Дроздов</i>	125
Численное моделирование преднерестовой и нерестовой миграций представителя семейства терпуговых рыб (на примере одноперового терпуга)	
<i>А.Н. Четырбоцкий, А.Н. Вдовин, В.А. Четырбоцкий</i>	134
МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА	
Лечебное действие высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота при постковидном синдроме, диабете и ВИЧ-инфекции	
<i>А.Ф. Ванин, А.В. Пекшев, Е.В. Печёнкин, А.Б. Ваганов, Н.А. Шаранов</i>	142
О возможности неинвазивного изучения периферических механизмов автономной регуляции сердечно-сосудистой системы человека	
<i>В.П. Нестеров, А.И. Бурдыгин, К.Б. Иванов, С.М. Коротков, К.В. Соболев, С.И. Сороко, И.В. Шемарова</i>	150
Патогенетические механизмы ожоговой болезни, связанные с окислительной деструкцией мембран, и направления их коррекции	
<i>Д.В. Вильянен, Н.И. Пашкевич, М.М. Борисова-Мубаракшина, С.С. Осочук</i>	160
Синаптические аспекты патогенеза аутизма, бокового амиотрофического склероза, болезни Альцгеймера	
<i>А.Е. Хайруллин, М.А. Мухамедьяров, С.Н. Гришин, А.Ю. Теплов, К.К. Нагиев, А.У. Зиганшин</i>	169
Анализ мультифрактальности различных компонент электроэнцефалограмм при психических расстройствах	
<i>О.Е. Дик</i>	179
Содержание тома 67, 2022 г.	187
Авторский указатель к 67 тому за 2022 год	198

Contents

Vol. 68, No. 1, 2023

Molecular Biophysics

Conformational Aspects in the Formation of Structures of the Backbone of Polypeptide Chains in Proteins. Relationship between Conformational Stability/Lability and β -Turns

I.Yu. Torshin, I.V. Filatov, A.V. Batyanovskii, K.V. Smirnov, A.A. Anashkina, N.G. Esipova, and V.G. Tumanyan 5

Induction of Damage to the DNA Structure of Tumor Cells by Aurum Polyacrylate

A.K. Chigasova, L.A. Ostrovskaya, and D.B. Korman 11

Meconic Acid Is a Possible Neuroprotector: Justification on *In Vitro* Experiments and Its Physico-Chemical Properties

S.V. Kozin, L.I. Ivashchenko, A.A. Kravtsov, L.V. Vasilyeva, A.M. Vasiliev, N.N. Bukov, A.A. Dorohova, O.M. Lyasota, A.V. Bepalov, and S.S. Dzhimak 20

Study of Heme and Globin Conformation in Fractionated Rat Erythrocytes by Means of Raman Spectroscopy

B.G. Yushkov, M.G. Zuev, S.A. Brilliant, and A.A. Vasin 33

Cell Biophysics

Model of Lipid Diffusion in Cytoplasmic Membranes

P.V. Mokrushnikov and V.Ya. Rudyak 41

Local Optical Tomography of a Nerve Cell

G.G. Levin, A.A. Samoilenko, T.A. Kazakova, T.A. Marakutsa, and G.V. Maksimov 57

Mechanisms Involved in Regulation of Blood Coagulation: History of Research and Perspectives

D.Y. Nechipurenko, M.A. Panteleev, E.I. Sinauridze, K.S. Troyanova, A.D. Megalinsky, N.A. Podoplelova, A.M. Shibeko, A.N. Balandina, E.V. Koltsova, and F.I. Ataullakhanov 66

Comparative Analysis of the Nitrogen Monoxide Content and Optical-Morphometric Characteristics of Erythrocyte-Containing Blood Components during Storage

N. V. Akulich and V.V. Zinchuk 79

Paracrine Effects of Stem Cell Conditioned Medium on Production of Oxygen Reactive Species in Blood Neutrophils in Acetaminophen-Induced Liver Failure

A.A. Temnov, A.N. Sklifas, V.K. Zhalimov, M.G. Sharapov, R.S. Fadeev, M.I. Kobayakova, N.I. Kukushkin, and K.A. Rogov 87

Complex Systems Biophysics

Frequency and Time Domain Characteristics of the Insect Visual System in Optic Flow

S.I. Zienko and V.L. Zhbanova 98

EPR Study of the Generation of Short-Lived Reactive Oxygen Species in Rat Heart Homogenate

A.A. Timoshin, V.L. Lakomkin, A.A. Abramov, and E.K. Ruuge 108

Comparison of the Dynamics of DNA Damage in Blood Leukocytes and Survival of Mice after Total Body Irradiation with Bragg Peak Carbon Ions or X-Rays

E.A. Kuznetsova, O.M. Rozanova, E.N. Smirnova, S.I. Glukhov, T.V. Sirota, T.A. Belyakova and N.P. Sirota 112

Dynamics of Temperature and Body Weight in Irradiated Mice: the Dose—Effect and Time—Effect Relationships	
<i>Yu.A. Zrilova, O.V. Nikitenko, T.M. Bychkova, I.M. Parfenova, T.A. Karaulova, and A.A. Ivanov</i>	120
Investigation of Changes in Lung Volume Caused by High-Intensity Acoustic Oscillations at the Resonant Frequency of the Respiratory System	
<i>S.P. Dragan, V.I. Kezik, A.V. Bogomolov, and S.V. Drozdov</i>	125
Numerical Modeling of Pre-Spawning and Spawning Migrations of the Representative of the Family Hexagrammidae: The Case of the Arabesque Greenling	
<i>A.N. Chetirbotzky, A.N. Vdovin, and V.A. Chetirbotzky</i>	134

Medical Biophysics

Therapeutic Effects of High-Dose Inhaled Nitric Oxide Gas against Post-COVID Syndrome, Diabetes or AIDS	
<i>A.F. Vanin, A.V. Pekshev, E.V. Pechyonkin, A.B. Vagapov, and N.A. Sharapov</i>	142
On the Possibility of Non-Invasive Study of the Peripheral Mechanisms of Autonomous Regulation of the Human Cardiovascular System	
<i>V.P. Nesterov, A.I. Burdygin, K.B. Ivanov, S.M. Korotkov, K.V. Sobol, S.I. Soroko, and I.V. Shemarova</i>	150
Pathogenetic Mechanisms of Burn Disease Associated with Oxidative Membrane Damage and Ways of Their Correction	
<i>D.V. Vilyanen, N.I. Pashkevich, M.M. Borisova-Mubarakshina, and S.S. Osochuk</i>	160
Synaptic Aspects of the Pathogenesis of Autism, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Alzheimer's Disease	
<i>A.E. Khairullin, M.A. Mukhamedyarov, S.N. Grishin, A.Yu. Teplov, K.K. Nagiev, and A.U. Ziganshin</i>	169
Analysis of Multifractality of Various Components of Electroencephalograms in Mental Disorders	
<i>O.E. Dick</i>	179

Contents 2022	187
Author Index 2022	198

КОНФОРМАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ СТРУКТУР ОСТОВА ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ В БЕЛКАХ. СВЯЗЬ КОНФОРМАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ/ЛАБИЛЬНОСТИ С ТИПОМ β -ИЗГИБОВ

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

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

^{**}Московский физико-технический институт, Институтский пер.,
9, Долгопрудный Московской области, 141700, Россия

^{***}Институт биофизики клетки и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, Минск, 220072, Беларусь

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

[#]E-mail: tiy135@yahoo.com

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 11.12.2022 г.

Принята к публикации 14.12.2022 г.

Для оценки характера связи между интегральной конформационной стабильностью тетрапептидов и главными типами β -изгибов (также являющихся тетрапептидами) рассчитаны спектр-диаграммы, асимметрия распределения конформационно-стабильных и конформационно-нестабильных тетрапептидов. Показано, что β -изгибы типов I', II и II' состоят, в основном, конформационно-лабильных пептидов, что согласуется с контекстно-предопределенным характером их структуры. Поскольку, как мы показали ранее, в этом случае конформация навязывается внешними условиями (конкретно, замыканием цикла), превалирование конформационно-лабильных пептидов облегчает формирование структуры за счет внешних факторов. Тип I β -изгиба представляет собой исключение: в нем пептиды с разной конформационной лабильностью распределены достаточно равномерно. Можно предположить, что формирование β -изгиба I-го типа не является контекстно-обусловленным.

Ключевые слова: конформационно стабильные/лабильные сегменты белка, локальная структура белка, конформационный анализ, β -изгибы, статистический анализ, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0006302923010015, EDN: NYMYUD

Общие представления о β -изгибах сводятся к тому, что это — типовой структурный элемент белка, представляющий интерес как сам по себе, так и в качестве составной части определенного уровня иерархии структуры белка. Эта иерархия, вообще говоря, не может не отражать процесса складывания белка в глобулу (так называемый фолдинг) и комплексы глобул. Значение проблемы β -изгибов подчеркивается тем обстоятельством, что в некоторых белках их доля достигает 80%, т.е. они встречаются чаще α -спиралей и β -тяжей. По оценке, сделанной в работе [1], каждый четвертый остаток входит в состав β -изгиба. Зачастую β -изгибы являются компонентом более сложного структурного элемента, прежде всего так называемых β -шпилек [2, 3].

Для β -изгиба характерна четко очерченная локальная структура (иначе говоря, определенный тип вторичной структуры), причем определенного размера. В отличие от α -спирали, β -структуры или левой спирали РРП (при исследовании которых встает вопрос об их длине и о критериях, используемых для определения длины), длина β -изгиба — строго четыре аминокислотных остатка. Важно и то, что β -изгиб — небольшой структурный мотив, конформация которого определяется малым числом степеней свободы, что делает возможным применение переборных алгоритмов. Среди структурных функций β -изгиба самая очевидная связана с изменением хода полипептидной цепи на обратный, что отражено в альтернативном названии β -изгиба — «обратный поворот» (reverse turn). Такого рода изменение хода поли-

пептидной цепи способствует ее компактизации и формированию белковой глобулы.

Таким образом, доля β -изгибов в белках достаточно велика, их структурное и функциональное значение вполне очевидно. Между тем в имеющихся представлениях о β -изгибах до сих пор присутствуют существенные пробелы и противоречия. В частности, аннотация этих типов локальной структуры и способы их прогнозирования, исходя из аминокислотной последовательности, нуждаются в дальнейшем совершенствовании. Действительно, хотя в прогнозировании β -изгибов наметился заметный прогресс, он связан не с углублением наших представлений об этом типе структуры, а с применением более эффективных методов интеллектуального анализа данных и так называемого машинного обучения (метод поддерживающих векторов, сверточные нейронные сети и др. [4, 5]). Дальнейший рост качества прогнозирования ограничен не только трудностями в исходной аннотации β -изгибов, но и тем, что фактически приходится решать две различные задачи: нахождение места β -изгиба в полипептидной цепи и определение типа изгиба. Следует добавить, что чисто биоинформационный подход, при котором исследуется схожесть аминокислотных последовательностей, имеет ограниченную область применения. Дальнейшее углубление понимания проблемы β -изгибов следует искать на пути анализа физико-химических свойств этих локальных структур.

Как для всего белка, так и для β -изгибов одной из важнейших проблем является поиск взаимосвязей между структурой изгибов, аминокислотными последовательностями собственно β -изгибов («текст») и последовательностями фланкирующих областей, играющих роль «контекста». В настоящей работе поставлена и получила положительное решение оригинальная задача о взаимосвязи основных структурных черт конкретного типа β -изгиба и конформационной подвижности/лабильности составляющих его сегментов. Такая взаимосвязь может дать возможность прогнозирования β -изгибов посредством оценки конформационной стабильности/лабильности его сегментов.

О КОНТЕКСТЕ β -ИЗГИБОВ В СТРУКТУРАХ БЕЛКОВ

Проблемы взаимосвязи структуры и последовательности аминокислот, стабилизации структуры, роли «текста» и «контекста» в случае β -изгибов сводятся к решению конкретных задач оптимизации по геометрическим и энергетическим критериям. Подчеркнем, что формирование всех типов β -изгибов (а не только изгибов II' типа) сопряжено с преодолением стереохимических препятствий. Наличие таких стереохимических труд-

ностей становится очевидным, в частности, из рассмотрения карт Рамачандрана для β -изгибов: точки на картах для остатков $i+1$ и/или $i+2$ в изгибах сконцентрированы в запрещенных областях карты Рамачандрана (см., например, работу [6]). Более или менее «свободной» конформационной картой характеризуется только β -изгиб типа I. Возникает вопрос: каким образом β -изгиб приобретает конформацию, которая представляется энергетически «напряженной»? Второй вопрос: коль скоро энергетически «напряженная» структура уже образовалась, как компенсируется «неблагоприятная» энергия, свойственная этой структуре?

Ответ на первый вопрос был исследован нашим коллективом путем привлечения геометрических представлений об уменьшении числа независимых конформационных параметров в цикле, образованном олигопептидом [7]. Вследствие замыкания цикла (через водородную связь между первым и последним остатками β -изгиба) число независимых конформационных параметров уменьшается настолько, что определение конформации может быть сведено к чисто геометрическому расчету. Такой геометрический анализ был проведен в работе [8] для основных типов β -изгибов с использованием независимых методов — оригинальной процедуры геометрии расстояний (distance geometry) и процедуры перебора конформаций. Было продемонстрировано, что число геометрически возможных конформаций в этом случае сводится к двум: первое из найденных решений совпадает с данными рентгеноструктурного анализа, а второе хотя и геометрически корректно, но приходится на абсолютно запрещенные области карты Рамачандрана (т.е. соответствует крайне выраженным стерическим затруднениям). Таким образом, вследствие замыкания водородной связи образуется своеобразный «топологический замок» и этот фактор контекста приводит к формированию конформации β -изгиба.

Что касается ответа на второй вопрос, то очевидно, что даже при фиксированной геометрии β -изгиба энергия соответствующей локальной структуры не может быть слишком «неблагоприятной», иначе произойдет кардинальная перестройка и реализуется существенно иная структура. Наличие конформационно нестабильных сегментов позволило бы неблагоприятной энергии «рассосаться» по многим степеням свободы, и, тем самым, «лишнее» напряжение было бы снято. Включение конформационно лабильных сегментов увеличивает число степеней свободы и эффекта цикла не наблюдается. Итак, сегменты с вынужденной (навязанной) конформацией, взятые сами по себе, *a priori* должны были бы быть конформационно лабильными.

КОНФОРМАЦИОННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ β-ИЗГИБОВ И КОНФИГУРАЦИИ ТЕТРАПЕПТИДОВ

В связи с изложенным мы пришли к необходимости оценить конформационную стабильность тетрапептидов, образующих β-изгибы, с помощью разработанных нами ранее оценок конформационной лабильности/стабильности тетрапептидов (см. работу [9]). Напомним, что интерес к β-изгибам как к особым фрагментам вторичной структуры связан с тем, что, с одной стороны, конформация β-изгиба может быть навязана контекстом в структуре белка. С другой стороны, имеющиеся алгоритмы прогнозирования β-изгибов позволяют успешно проводить такое прогнозирование (с аккуратностью распознавания 75–82%) при рассмотрении достаточно небольшого контекста в последовательностях вокруг β-изгибов (5–7 остатков). Поэтому представляет интерес изучить, как именно соотносится наличие структуры β-изгибов с конформационной стабильностью/лабильностью составляющих их тетрапептидов («текстов») и фланкирующих областей («контекстов») и есть ли вообще такое соотношение.

Как показано в нашей предыдущей работе по мерам конформационной стабильности/лабильности s_1 – s_5 [9], в файлах из банка данных PDB найдено 122100 различных тетрапептидов, которые встречались не менее пяти раз в различных структурах. При более редкой встречаемости пептидов (менее пяти случаев по всему банку данных PDB) использование разработанных мер конформационной лабильности s_1 – s_5 , основанных на сборе статистики конформаций, не вполне обосновано статистически.

Нахождение в PDB всего 122100 из ~160000 комбинаторно возможных тетрапептидов указывает, скорее всего, на особенности аминокислотных последовательностей кристаллизуемых белков, которые составляют 90% от объема данных в PDB (остальные 10% структур определены с применением методов ЯМР или электронной микроскопии). В подтверждение этому можно отметить, что частоты встречаемости одних и тех же три- и тетрапептидов существенно разнятся в базах данных PDB и UNIPROT [10].

Для каждого из тетрапептидов, найденных в файлах PDB, были вычислены меры конформационной лабильности s_1 – s_5 [9]. Затем, для каждого i -го тетрапептида была вычислена интегральная оценка конформационной стабильности b_i по формуле $b_i = 5 - \sum_{k=1,5} \omega_k s_k(i)$, где веса ω_k для каждой из мер конформационной лабильности s_k определялись так, чтобы значение b_i произвольного тетрапептида лежало в диапазоне значений от 1 до 5

(1 — минимальная конформационная стабильность, 5 — максимальная конформационная стабильность).

В общем списке из 122100 тетрапептидов были выделены тетрапептиды, для второго и третьего остатков которых преимущественной конформацией (т.е. конформацией, встречавшейся чаще любой другой) являлся β-изгиб одного из четырех типов (I, I', II, II'). Определения β-изгибов соответствовали критериям из работы [6]. Далее представлены результаты анализа тетрапептидов, преимущественной конформацией которых (более 50% конформаций из найденных в PDB для данного пептида) являлся один из четырех типов изгибов (I, I', II, II'). Таких тетрапептидов было найдено всего 64769.

Среди этих тетрапептидов с преимущественной конформацией в виде одного из типов β-изгибов наиболее часто встречались пептиды с β-изгибом типа I, соответствующие (в большинстве случаев) α-спиралям (в широком смысле, включая спирали 3/10) или их «кэпирующим» фрагментам (63770 тетрапептидов). Тетрапептиды, наиболее частой конформацией которых являлся β-изгиб других трех типов, встречались гораздо реже: тип I' — 331 тетрапептид, тип II — 41 тетрапептид, тип II' — 627 тетрапептидов. Обращает на себя внимание, что изгибу II', самому напряженному со стереохимической точки зрения, соответствует большее количество различных аминокислотных последовательностей тетрапептидов.

Следует подчеркнуть, что приведенные выше данные являются новыми, уникальными и не имеющими мировых аналогов, так как относятся не к частоте встречаемости конформаций (которая обычно представлена в имеющейся литературе), а к тетрапептидам (сегментам длиной четыре аминокислоты с определенной последовательностью), конформации которых преимущественно ассоциированы с указанными выше типами изгибов, т.е. эти данные имеют отношение собственно к «тексту», а не к «контексту» β-изгиба.

Для анализа взаимоотношений между конформационной стабильностью тетрапептидов и β-изгибами четырех типов (I, I', II, II') использовали: 1) — спектр-диаграммы значений b_i ; 2) — эмпирические функции распределения значений интегральной оценки конформационной стабильности b_i ; 3) — анализ распределения тетрапептидов, преимущественно соответствующих β-изгибам между верхней и нижней частью общего списка из 122100 тетрапептидов, упорядоченного по убыванию значений b_i . Все три независимых метода анализа показали схожие результаты.

Спектр-диаграммы позволяют наглядно оценить различия в частоте встречаемости пептидов заданного типа (тип β-изгиба) при различных

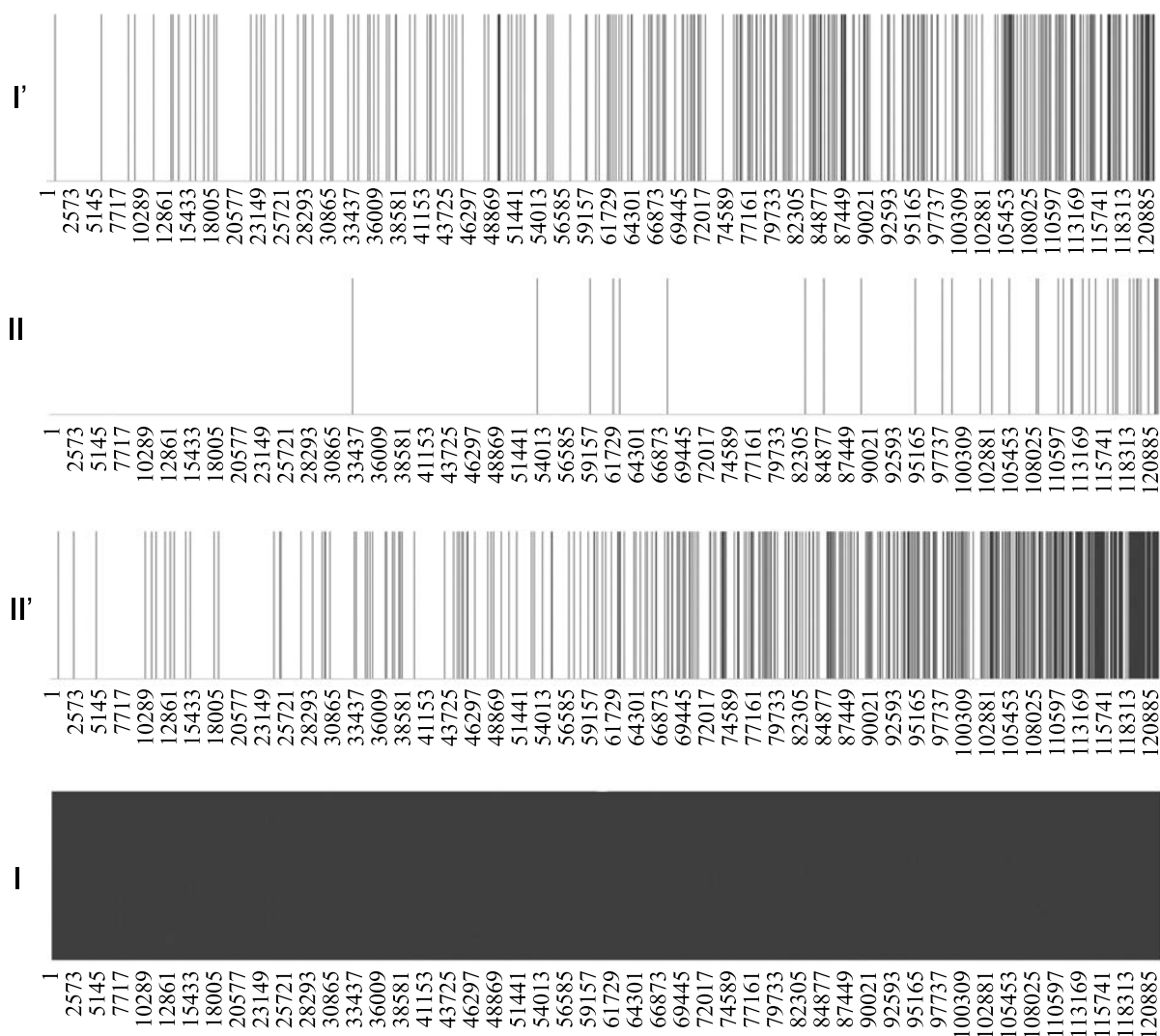


Рис. 1. Спектр-диаграммы значений b_i β -изгибов. По оси абсцисс отложен ранг стабильности тетрапептида, вычисляемый как порядковый номер значения b_i в списке тетрапептидов, упорядоченных по убыванию значений b_i . Очевидна большая частота встречаемости (более высокая плотность линий) конформационно лабильных пептидов для трех типов изгибов (I', II, II'). Спектр-диаграмма для изгиба типа I, очевидно, представляет собой равномерное распределение линий по всем значениям рангов.

значениях b_i . По оси абсцисс спектр-диаграммы отложен ранг стабильности тетрапептида, вычисляемый как порядковый номер значения b_i в списке тетрапептидов, упорядоченных по убыванию значений b_i . Визуальный анализ спектр-диаграмм значений b_i показал, что конформационно лабильные пептиды встречаются гораздо чаще для трех типов изгибов – I', II, и особенно II' (рис. 1).

Рассмотрим статистические оценки распределения пептидов с преимущественной конформацией в виде β -изгибов по значениям b_i . Анализ конформационно-лабильных пептидов, которые встречались гораздо чаще для трех типов изгибов (I', II и II'), показал, что данные пептиды отли-

чались выраженным избытком глицина и сниженной встречаемостью аланина, глутамата, фенилаланина, изолейцина, лизина, лейцина, аргинина, валина (таблица). По сравнению с встречаемостью аминокислот в среднем по банку данных PDB, достоверными по критерию χ^2 были только различия для глицина, аланина, изолейцина, лейцина и валина. Конформационно стабильные пептиды в этой подвыборке не показали достоверных различий в аминокислотном составе.

Анализ эмпирических функций распределения значений b_i (рис. 2) показал очевидные смещения кривых эмпирических функций распределения. β -изгибов типов I', II и II' в сторону более

Таблица 1. Частоты встречаемости (в %) различных аминокислот в конформационно-лабильных мотивах

Выборка	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
Конформа- ционно-ла- бильные для типов I', II и II'	3.1	3.4	6.9	3.8	3.6	24.5	4.6	2.5	3.9	2.5	3.3	6.2	4.9	4.1	3.8	5.3	4.2	2.5	3.1	4.0
Среднее по выборке из PDB	5.9	2.8	5.6	5.7	5.0	5.9	4.1	5.5	5.4	6.0	3.3	5.1	5.2	4.9	5.4	5.6	5.5	5.8	2.8	4.8

низких значений b_i , т.е. в сторону более конформационно-лабильных пептидов. Например, среднее значение b_i для изгиба типа I составило 2.4 ± 0.2 (среднее $\pm$ стандартное отклонение), а для изгиба типа I', II' и II – 2.22 ± 0.2 , 2.1 ± 0.15 и 2.05 ± 0.12 соответственно.

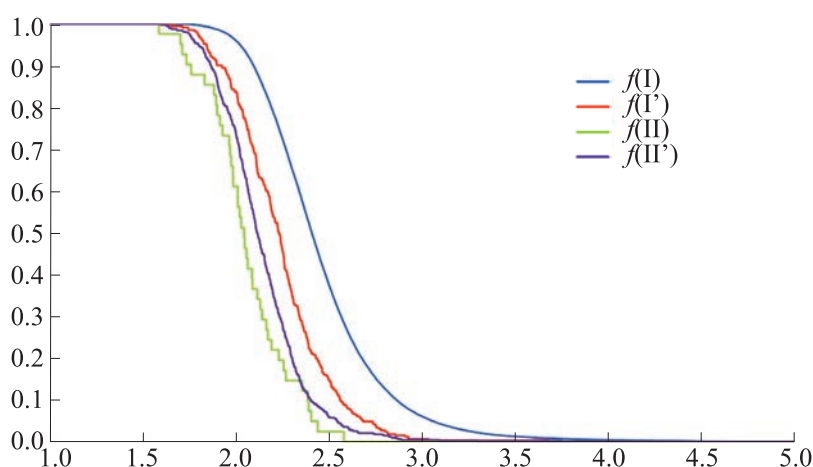
Анализ распределения соответствующих β -изгибам тетрапептидов между верхней и нижней частью общего списка из 122100 тетрапептидов, упорядоченного по убыванию значений b_i , подтвердил описанные выше результаты. Так, для изгибов типа I частота встречаемости в верхней и в нижней половинах списка была практически одинаковой (32955 пептидов в верхней части, 30785 – в нижней, т.е. частоты равны 0.548 и 0.512 соответственно). В случае трех других типов β -изгибов были отмечены статистически достоверные различия в частотах встречаемости с преобладанием конформационно лабильных пептидов: для типа I' – 74 и 256 тетрапептидов, т.е. частоты отличались более чем в три раза (0.0012 и 0.0043); для типа II – 3 и 37, частоты отличались на порядок ($5 \cdot 10^{-5}$ и $6 \cdot 10^{-4}$); для типа II' – 65 и 555, частоты отличались почти на порядок (0.0011 и 0.0092). Эти различия для β -изгибов типов I', II и II' были

достоверны по критерию χ^2 ($P < 0.008$ во всех трех случаях).

Таким образом, результаты проведенного анализа показали, что среди β -изгибов типов I', II и II' достоверно чаще встречаются конформационно лабильные пептиды. Очевидно, что предлагаемые показатели конформационной лабильности пептидов могут быть использованы в качестве дополнительной независимой информации в вычислительных схемах для распознавания β -изгибов этих типов по аминокислотным последовательностям белков. Полученные данные свидетельствуют о принципиальном различии в структурообразовании типа I и остальных типов β -изгибов. В отличие от трех остальных типов β -изгибы I-го типа, по-видимому, не являются конформационно зависимыми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной результат работы заключается в установлении уникальных свойств β -изгибов типов I', II и II' в аспекте аминокислотного «текста» этих локальных структур белков. В отличие от них β -изгиб типа I не проявляет выраженных особен-


Рис. 2. Эмпирические функции распределения значений интегральной оценки конформационной стабильности b_i .

ностей аминокислотного состава, в том числе в смысле обогащенности конформационно-лабильными последовательностями. Повышенная конформационная лабильность тетрапептидов, формирующих β -изгибы типов I', II и II', способствует смягчению стереохимических затруднений, характерных для наблюдаемых в эксперименте конформаций этих локальных структур.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-01085).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. W. Kabsch and C. Sander, *Biopolymers*, **22** (12), 2577 (1983).
2. X. de la Cruz, E. G. Hutchinson, A. Shepherd, and J. M. Thornton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (17), 11157 (2002).
3. M. Kumar, M. Bhasin, N. K. Natt, and G. P. S. Ragha-va, *Nucl. Acids Res.*, **33**, W154 (2005).
4. M. K. Elbashir, J. Wang, F. X. Wu, et al., *Proteome Sci.*, **11** (Suppl. 1), S5 (2013).
5. C. Fang, Y. Shang, and D. Xu, *Proteins*, **88** (1), 143 (2020).
6. A. G. de Brevern, *Sci. Reports*, **6**, 33191 (2016).
7. Л. А. Урошлев, И. Ю. Торшин, А. В. Батяновский и др., *Биофизика*, **60** (1), 5 (2015).
8. Л. А. Урошлев, И. Ю. Торшин, А. В. Батяновский и др., *Биофизика*, **64** (2), 272 (2019).
9. И. Ю. Торшин, А. В. Батяновский, Л. А. Урошлев и др., *Биофизика*, **64** (2), 256 (2019).
10. Ю. И. Журавлёв, К. В. Рудаков и И. Ю. Торшин, *Труды МФТИ*, **3** (4), 45 (2011).

Conformational Aspects in the Formation of Structures of the Backbone of Polypeptide Chains in Proteins. Relationship between Conformational Stability/Lability and β -Turns

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

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

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

***Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Akademicheskaya ul. 27, Minsk, 220072 Belarus

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

To assess the nature of the relationship between the integral conformational stability of tetrapeptides and the main types of β -turns (which are also tetrapeptides), calculations were performed using spectrum diagrams and asymmetry in the distribution of conformationally stable and unstable tetrapeptides. It was shown that type I', II, and II' β -turns are comprised of predominantly conformationally labile peptides, that is consistent with the predetermined nature of their structure as described earlier. As previously shown in our study, in this case the conformation is imposed by external conditions (namely the cycle closing) and the prevalence of conformationally labile peptides facilitates the formation of the structure by virtue of external factors. Type I β -turn is an exception: peptides with different conformational lability are fairly evenly distributed. Most likely, this indicates that the formation of the type I β -turn is not predetermined.

Keywords: conformational stable/labile segments of protein, local protein structure, conformational analysis, β -turns, statistical analysis, molecular dynamics

ИНДУКЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ СТРУКТУРЫ ДНК ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОЛИАКРИЛАТОМ ЗОЛОТА

© 2023 г. А.К. Чигасова*, Л.А. Островская*, #, Д.Б. Корман*

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

#E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 14.10.2022 г.

После доработки 14.10.2022 г.

Принята к публикации 18.10.2022 г.

Изучена способность полиакрилата золота (аурумакрила) вызывать изменения в структуре ДНК опухолевых клеток (на примере культуры клеток карциномы молочной железы человека MCF-7). Установлено, что молекулярный механизм действия аурумакрила на опухолевые клетки связан с индукцией однонитевых разрывов и сшивок в молекуле ДНК. Наряду с этим показана способность аурумакрила снижать число спонтанных либо индуцированных облучением двухнитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках MCF-7.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), культура клеток MCF-7, однонитевые разрывы ДНК, двухнитевые разрывы ДНК, сшивки ДНК.

DOI: 10.31857/S0006302923010027, EDN: NYQIWK

Современные подходы к разработке и изучению новых противоопухолевых препаратов включают в себя обязательное установление мишеней, на которые направлено действие изучаемого соединения, а также механизмов этого действия.

В последние годы внимание исследователей, разрабатывающих инновационные подходы к лекарственному лечению злокачественных опухолей, привлекают комплексные соединения благородных металлов, в первую очередь, золотосодержащие соединения, для многих из которых установлена существенная цитотоксичность и противоопухолевая активность, свидетельствующие о перспективности изучения такого рода веществ в качестве лекарственных средств для лечения злокачественных опухолей. В то же время сведения о мишенях и механизмах действия этих препаратов пока достаточно противоречивы, что указывает на необходимость проведения исследований в данном направлении [1, 2].

Ранее нами было установлено, что, оригинальное золотосодержащее соединение — полиакрилат золота (аурумакрил) — представляющее собой золотосодержащий полимер, оказывает выраженное цитотоксическое действие на культуры клеток ряда опухолей человека *in vitro* и обладает противоопухолевой активностью, зарегистрированной на нескольких штаммах перевиваемых опухолей мышей *in vivo* [3–6].

Полученные результаты указывают на необходимость исследования механизмов действия аурумакрила и установление мишеней, взаимодействие с которыми включает эти механизмы.

Одной из ключевых внутриклеточных мишеней, воздействие на которую может приводить к гибели опухолевых клеток, является ДНК, что подтверждает многолетний клинический опыт использования алкилирующих противоопухолевых препаратов, до сих пор входящих в арсенал основных лекарственных средств, применяемых для лечения разнообразных опухолей [7].

Известно, что в результате структурных повреждений ДНК, могут возникать одно- и двухнитевые разрывы ДНК, а также ДНК-сшивки, которые в случае отсутствия или дефектности репарации этих повреждений ведут к гибели клетки.

Целью настоящего исследования было изучение способности аурумакрила индуцировать разрывы ДНК и образование ДНК-сшивок в опухолевых клетках (культура клеток карциномы молочной железы человека MCF-7).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат. Исследовавшийся препарат аурумакрила представляет собой неполную золотую соль полиакриловой кислоты, содержащую 8 массовых процентов (8 масс. %) ионов металла, отвечает общей формуле $(-\text{CH}_2-\text{CH}-$

$\text{COOH-})_n(-\text{CH}_2\text{CHCOO}(\text{AuCl}_3\text{H-}))_m$, где $n = 12000-35000$, $m = 1650-6650$. Молекулярная масса полимера составляет 100–300 кДа. ИК-спектры препарата содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 см^{-1} соответственно. Субстанция препарата представляет собой стекловидные пластинки золотистого цвета, хорошо растворимые в воде. Оценка эффектов препарата *in vitro* проведена при его применении в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от 1 до 1000 мкг/мл.

Культура клеток. Эксперименты проведены с использованием культуры клеток рецептор-положительной карциномы молочной железы человека MCF-7, полученной из банка опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Культивирование клеток проводили в стандартной культуральной среде DMEM/F12 (Life Technologies Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия), 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 10% FBS (Life Technologies Thermo Fisher Scientific, США) путем термостатирования при 37°C в 5% CO_2 (МСО-18АС, Саноу, Япония). В дальнейшем клетки снимали с поверхности флаконов 0.25%-м раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия) и пассировали с плотностью 200 кл/см² в той же культуральной среде. Пассирование клеток проводили при достижении культурой 80–90% монослоя. Замену среды осуществляли каждые четверо суток.

Экспериментальное изучение аурумакрила проведено на клетках, находящихся в фазе экспоненциального роста (плотность клеточной популяции ~70–80%). Клетки снимали с пластика раствором трипсина-ЭДТА с последующей инактивацией трипсина и отмывкой клеток в полной среде. Клетки пассировали в 35 мм чашки Петри, содержащие покровные стекла (SPL Lifesciences, Южная Корея). Действие аурумакрила в различных концентрациях (1, 10, 100 и 1000 мкг/мл) изучено при инкубации клеток с препаратом при 37°C в течение 1, 6 и 24 ч при параллельном инкубировании интактных клеток в качестве контроля [8].

Анализ одонитевых разрывов ДНК. Для анализа одонитевых разрывов ДНК, индуцированных аурумакрилом, использовали метод электрофореза единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет). Суспензию контрольных или обработанных аурумакрилом клеток MCF-7 смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1:1) и наносили по 70 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали при

4°C в течение 10 мин. Затем в течение 60 мин клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: 2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 10% диметилсульфоксида, 1% Triton X100) и щелочному электрофорезу (раствор для электрофореза: 300 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, pH >13; стабилизация по напряжению – 0.75 В/см; 20 мин при 4°C) с дальнейшей нейтрализацией в течение 3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C. Для окраски ДНК использовали краситель акридиноранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4). Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab, Польша).

Образование одонитевых разрывов в структуре ДНК определяли по уровню миграции ДНК в геле агарозы, используя показатель «процент ДНК в хвосте ДНК-комет». Влияние аурумакрила на образование одонитевых разрывов ДНК оценивали, сравнивая показатель «процент ДНК в хвосте ДНК-комет» в обработанных препаратом золотых клетках с аналогичным показателем в контрольных клетках. Превышение этого показателя в клетках, инкубированных с аурумакрилом, по сравнению с контрольными клетками свидетельствует о том, что аурумакрил в исследуемой концентрации индуцирует одонитевые разрывы.

Анализ двухнитевых разрывов ДНК. Для выяснения способности аурумакрила индуцировать двухнитевые разрывы ДНК использовали иммуноцитохимический метод определения в клетках фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γH2AX), детектирующего двухнитевой разрыв ДНК. Полагают, что один фокус H2AX соответствует сайту репарации одного двухнитевого разрыва ДНК.

Количественный анализ фокусов γH2AX в настоящее время широко используется для изучения радиационно-индуцированных двухнитевых разрывов ДНК, образующихся в большом количестве в клетках после облучения.

В ряде экспериментов по изучению способности аурумакрила влиять на двухнитевые разрывы ДНК нами было использовано облучение клеток в качестве фактора, индуцирующего образование большого числа двухнитевых разрывов ДНК.

Для этого клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, предварительно инкубированные с аурумакрилом в концентрациях 10, 50, 100, 500 и 1000 мкг/мл при 37°C в течение 24 ч, облучали на рентгеновской биологической установке «РУСТ-М1» (ООО «Диагностика-М», Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излуча-

телями, в дозе 5 Гр (мощность дозы 0.85 Гр/мин, напряжение 100 кВ, ток 0.8 мА, фильтр 1.5 мм Al) при температуре 4°C (для охлаждения использовались термогранулы «LAB ARMOR BEADS», Life Technologies Thermo Fisher Scientific, США). Погрешность отпускаемой дозы не превышала 15%. Облученные клетки инкубировали в стандартных условиях в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂) в течение 24 ч с параллельной инкубацией интактных клеток в качестве контроля, после чего определяли уровень фокусов γ H2AX в соответствии с приводимой ниже методикой.

Интактные и облученные клетки MCF-7 фиксировали на покровных стеклах параформальдегидом (4% в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4) в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и пермеабилizировали 0.3%-м Тритон X100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания.

При проведении иммуноцитохимического окрашивания слайды инкубировали в течение часа при комнатной температуре с первичными антителами к белку γ H2AX (разведение 1/200, клон EP854(2)Y, Merck-Millipore, США) в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. Затем промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и инкубировали при комнатной температуре в течение часа с вторичными антителами IgG (H + L), конъюгированными с флуорохромами (антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с Rhodamine (Merck-Millipore, США), в разведении 1/400) в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. Для окраски ДНК и предотвращения фотоблещивания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MF-cool (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340–380 нм – возбуждение и 435–485 нм – эмиссия), B-2E/C (465–495 нм – возбуждение и 515–555 нм – эмиссия) и Y-2E/C (540–580 нм – возбуждение и 600–660 нм – эмиссия).

Анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов γ H2AX использовали программу DARFI.

Анализ ДНК-сшивок. Изучение влияния аурумакрила на ДНК опухолевых клеток MCF-7 проводили путем детектирования сшивок ДНК с ис-

пользованием метода ДНК-комет в щелочных условиях.

Клетки инкубировали с аурумакрилом в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкг/мл в течение часа при 37°C. Затем клетки дважды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (pH 7.4), снимали с чашек раствором трипсина-ЭДТА и переводили в суспензию, содержащую 1·10⁶ клеток в 1 мл. Суспензию контрольных или обработанных полиакрилатом золота клеток смешивали с 1%-м раствором легкоплавкой агарозы при 37.5°C (1 : 1) и наносили по 70 мкл на предметные стекла, предварительно покрытые 1%-м раствором нормоплавкой агарозы, после чего накрывали покровным стеклом и выдерживали 10 мин при 4°C. Затем в течение часа клетки подвергали лизису при 4°C (лизирующий буфер: 2.5 моль/л NaCl, 20 ммоль/л трис-HCl, 100 ммоль/л Na₂ЭДТА, 10% диметилсульфоксида, 1% Triton X100) и щелочной денатурации с последующим проведением электрофореза (раствор для щелочной денатурации и электрофореза: 100 ммоль/л NaOH, 1 ммоль/л Na₂ЭДТА, pH 12.5; стабилизация по напряжению – 2 В/см, 20 мин при 4°C) и с дальнейшей нейтрализацией в течение 3–5 мин в 0.4 моль/л трис-HCl-буфере при 4°C. Для окраски ДНК использовали краситель акридиновый оранжевый (2 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4). Визуализацию и документирование ДНК-комет проводили на люминесцентном микроскопе Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой ProgRes CFcool (Jenoptik AG, Германия). Для анализа и обработки микрофотоизображений ДНК-комет использовали программу CASP 1.2.2 (CASPlab, Польша).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0. Результаты представлены как среднее из пяти независимых результатов $\pm$ стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенное экспериментальное исследование влияния аурумакрила на структуру ДНК клеток рака молочной железы человека MCF-7 включает в себя оценку способности препарата индуцировать одно- и двухнитевые разрывы, а также сшивки ДНК.

Однонитевые разрывы ДНК. Влияние аурумакрила на образование однонитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7 характеризуют данные, представленные на рис. 1.

Как видно, аурумакрил индуцирует образование однонитевых разрывов ДНК при применении только в наибольшей из изученных концентраций (1000 мкг/мл), причем этот эффект практически не зависит от сроков инкубирования

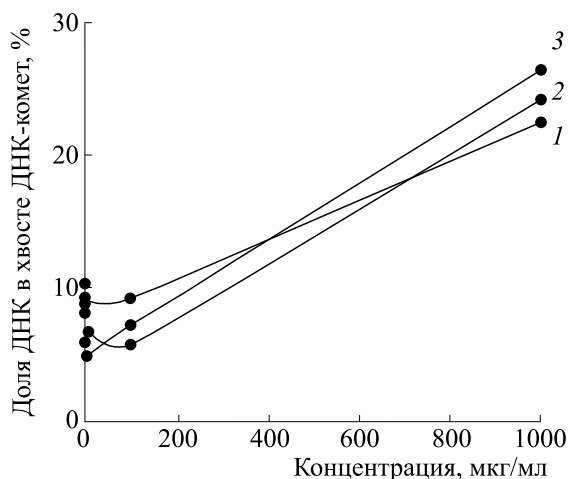


Рис. 1. Влияние аурумакрила на образование одностранных разрывов ДНК в клетках MCF-7: изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аурумакрила при различных сроках инкубации (кривая 1 — 1 ч, кривая 2 — 6 ч, кривая 3 — 24 ч).

клеток с препаратом. Так, доля ДНК в хвосте комет через 1, 6 и 24 ч инкубации клеток с препаратом составляет 22, 24 и 26% соответственно, увеличиваясь в 2.4, 4.7 и 4.5 раза по сравнению с контролем (рис. 1).

Этот эффект также наглядно иллюстрируют данные диаграммы распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет, в контроле и при воздействии аурумакрила (рис. 2). Как видно из представленных на диаграмме данных, количество клеток с

долей ДНК в хвосте ДНК-комет более 20% увеличилось после 6 ч культивирования с аурумакрилом с ~3% в контроле до 47%. Примерно такое же соотношение между числом клеток в хвосте ДНК-комет для интактных и обработанных аурумакрилом клеток зарегистрировано и после инкубирования в течение 24 ч — 6% и 47% соответственно (рис. 2).

Таким образом, очевидно, что аурумакрил в концентрации 1000 мкг/мл индуцирует образование в опухолевых клетках линии MCF-7 одностранных разрывов ДНК, число которых возрастает в 3.0–4.5 раза по сравнению со спонтанным уровнем разрывов ДНК, наблюдаемых в контроле, уже через 1 ч инкубации и сохраняется на протяжении 24 ч культивирования клеток.

Двухнитевые разрывы ДНК. Способность аурумакрила вызывать двухнитевые разрывы ДНК охарактеризована в соответствии с показателем уровня фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), регистрируемого в клетках MCF-7, подвергавшихся воздействию препарата, по сравнению с контролем.

Изменение уровня фокусов γ H2AX в ДНК опухолевых клеток после инкубации с различными концентрациями аурумакрила в течение 24 и 48 ч показано на рис. 3.

Как видно, культивирование клеток MCF-7 в течение 24 и 48 ч приводит к спонтанному образованию двухнитевых разрывов ДНК, при котором уровень фокусов γ H2AX имеет значения, равные 1.92 и 2.17 соответственно (рис. 3).

Влияние аурумакрила на уровень фокусов γ H2AX (двухнитевые разрывы ДНК), имеет дозо-

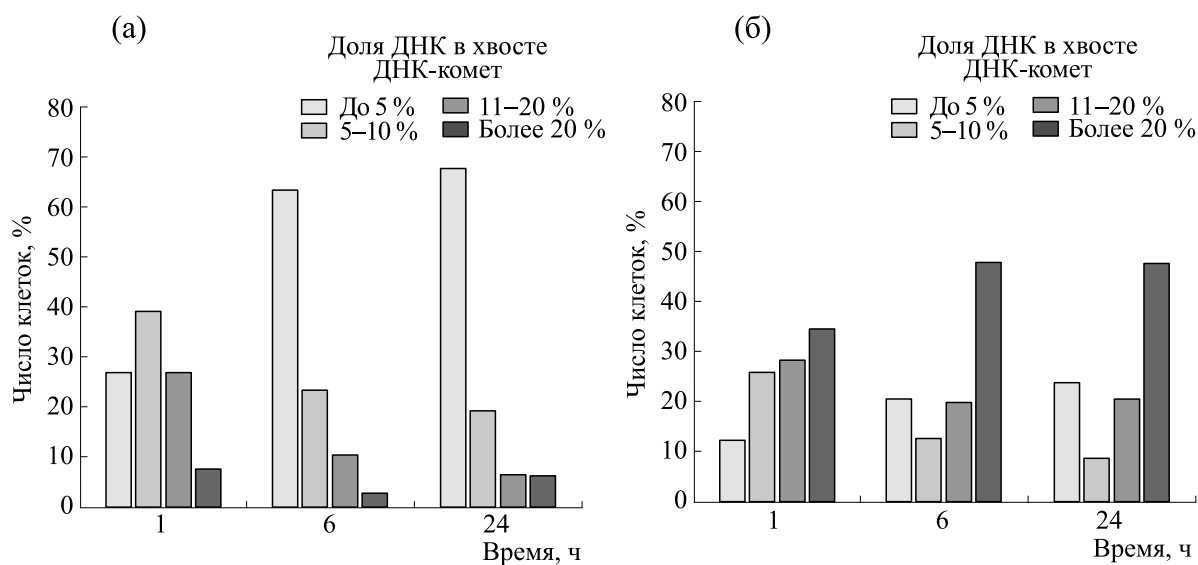


Рис. 2. Диаграмма распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет, в контроле (а) и при воздействии аурумакрила в концентрации 1 мкг/мл (б) в зависимости от сроков инкубирования клеток с препаратом.

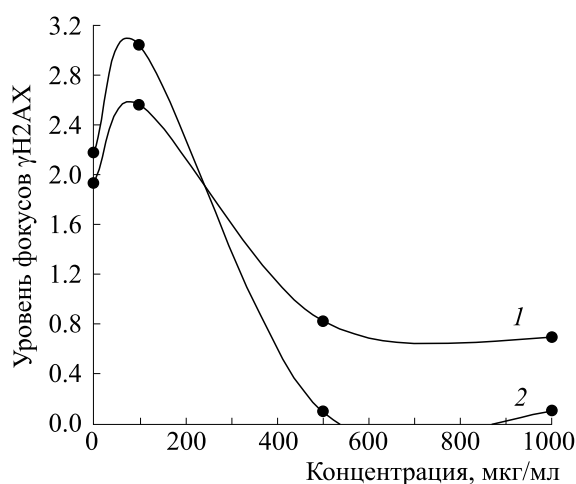


Рис. 3. Влияние аурумакрила на образование двухнитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7: изменение числа фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в зависимости от концентрации аурумакрила при инкубации клеток в течение 24 ч (кривая 1) и 48 ч (кривая 2).

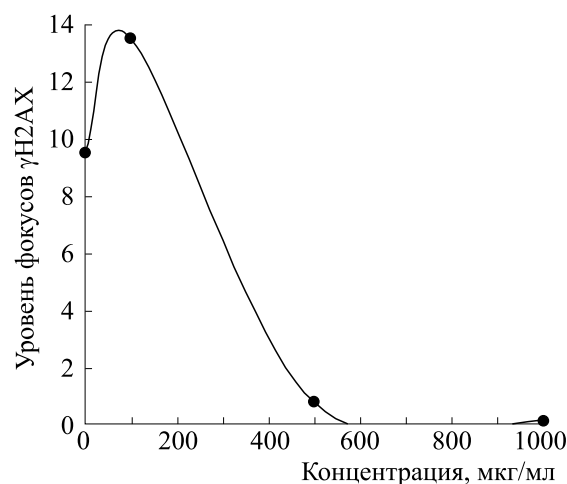


Рис. 4. Влияние аурумакрила на уровень двухнитевых разрывов ДНК, индуцированных облучением, в клетках MCF-7: изменение уровня фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в зависимости от концентрации аурумакрила.

зависимый характер. При воздействии аурумакрила в концентрации 100 мкг/мл спонтанный уровень двухнитевых разрывов ДНК практически не изменяется. Однако при увеличении концентрации препарата до 500 и 1000 мкг/мл уровень фокусов γ H2AX снижается до значений, составляющих соответственно 0.7–0.8 и 0.1, при инкубации как в течение 24 ч, так и 48 ч (рис. 3).

Иными словами, аурумакрил через 48 ч инкубации с опухолевыми клетками вызывает снижение уровня спонтанных двухнитевых разрывов в 21 раз при применении в концентрациях как 500, так и 1000 мкг/мл (рис. 3).

Для того чтобы подтвердить способность аурумакрила снижать уровень двухнитевых разрывов ДНК, нами были проведены эксперименты с использованием облучения клеток в качестве фактора, индуцирующего образование большого числа двухнитевых разрывов ДНК.

С этой целью клетки, предварительно инкубированные в течение 24 ч с различными концентрациями аурумакрила, облучали на рентгеновской биологической установке и определяли количество фокусов γ H2AX спустя 24 ч после облучения.

Как видно из данных, приведенных на рис. 4, облучение, действительно привело к значительному возрастанию уровня двухнитевых разрывов ДНК. Количество фокусов γ H2AX в облученных клетках, не подвергавшихся воздействию аурумакрила, составило 9.56, что примерно в 5 раз превышает спонтанный уровень двухнитевых разрывов (равный ~2), возникающих в процессе культивирования клеток (рис. 3 и 4).

В то же время характер влияния аурумакрила на количество фокусов γ H2AX в облученных клетках практически не отличался от наблюдаемого в интактных клетках. Применение аурумакрила в концентрации 100 мкг/мл достоверно не изменило уровень фокусов γ H2AX в облученных клетках при сохранении тенденции к увеличению этого параметра. Применение более высоких концентраций аурумакрила (500 и 1000 мкг/мл) привело к резкому снижению уровня фокусов γ H2AX в облученных клетках до значений, составляющих 0.75 и 0.12 соответственно (рис. 4).

Таким образом, показано, что предварительное (до облучения) воздействие аурумакрила приводит к значительному снижению числа двухнитевых разрывов ДНК, индуцируемых облучением. Уровень фокусов γ H2AX в облученных клетках при применении аурумакрила в концентрациях 500 и 1000 мкг/мл снижается в 12.7 и 80 раз соответственно.

Приведенные данные убедительно свидетельствуют о способности аурумакрила снижать число спонтанных, либо индуцированных облучением, двухнитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках MCF-7.

ДНК-сшивки. Известно, что при использовании метода ДНК-комет ДНК, мигрирующая во время электрофореза в геле агарозы к аноду, создает так называемый «хвост» ДНК-комет, который может содержать, в зависимости от условий проведения электрофореза, только фрагментированную ДНК (одно- и двухнитевые разрывы ДНК) или одновременно фрагментированную и неповрежденную ДНК. В последнем случае доля ДНК, остающаяся в «голове» ДНК-кометы, ха-

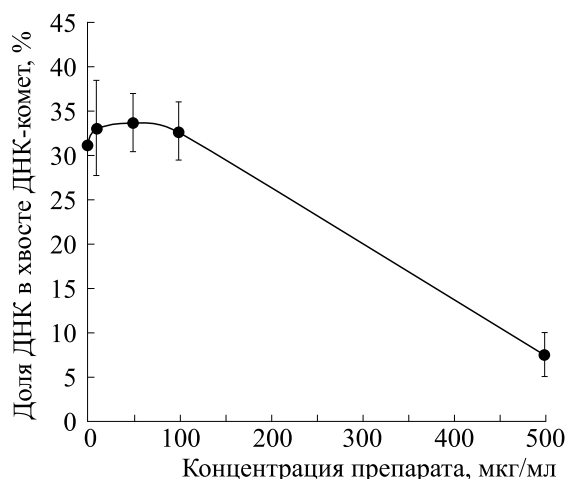


Рис. 5. Влияние аурумакрила на образование сшивок ДНК в клетках MCF-7: изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет клеток MCF-7 в зависимости от концентрации аурумакрила.

рактически не отличается от контроля. В то же время в клетках, подвергавшихся воздействию аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл, доля ДНК в хвосте ДНК-комет снижается в ~ 4 раза — с 31.2%, регистрируемых в контрольном образце, до 7.4%, определяемых в клетках, подвергавших-

ся воздействию аурумакрила. Соответственно, возрастает доля «сшитой» ДНК, остающейся в голове ДНК-кометы и не мигрирующей к аноду (рис. 5).
Полученные данные свидетельствуют о выраженном влиянии аурумакрила на структуру ДНК опухолевых клеток, выражающемся в индуцировании препаратом сшивок ДНК.
Этот эффект наглядно иллюстрирует диаграмма распределения клеток MCF-7 в соответствии с долей ДНК, содержащейся в хвосте ДНК-комет через 1 ч после инкубации с аурумакрилом, показанная на рис. 6.
Как видно, около 70% интактных клеток карциномы MCF-7 в контроле после проведения электрофореза содержали более 25% ДНК в хвосте ДНК-комет.

Аналогичное распределение клеток в соответствии с содержанием ДНК в хвосте ДНК-комет наблюдается для клеток, подвергавшихся в течение часа воздействию аурумакрила в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл.

Иное распределение клеток наблюдается при воздействии аурумакрила в концентрации 500 мкг/мл. Показано, что около 60% клеток содержали менее 5% ДНК в хвосте ДНК-комет, что свидетельствует о выраженной способности аурумакрила вызывать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток (рис. 6).

Очевидно, что представленные данные свидетельствуют о выраженной способности аурумакрила вызывать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток.

Таким образом, в результате исследования влияния аурумакрила на структуру ДНК клеток карциномы молочной железы человека MCF-7

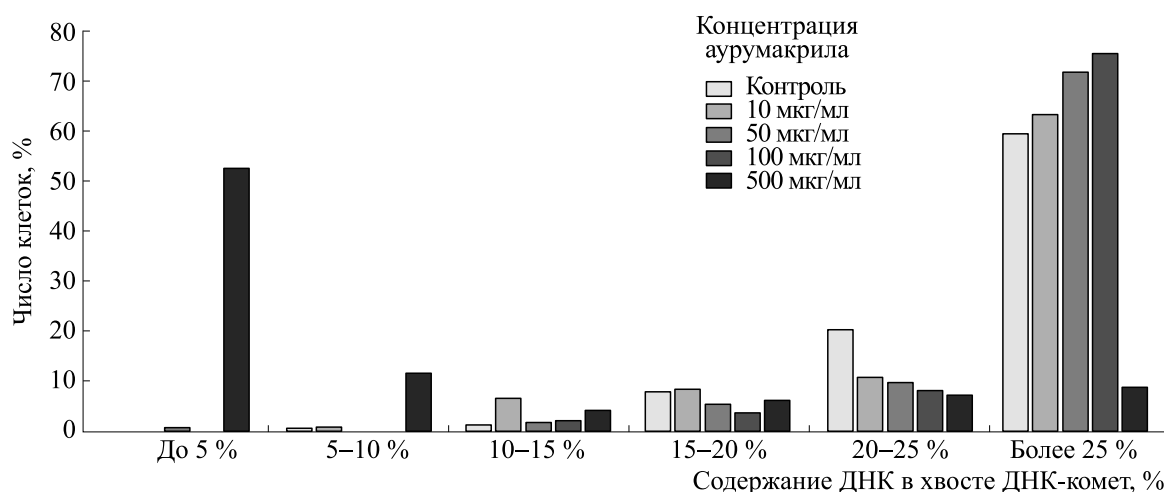


Рис. 6. Распределение клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 в соответствии с содержанием ДНК в хвосте ДНК-комет после воздействия аурумакрила в различных концентрациях (время инкубации 1 ч).

установлено, что молекулярный механизм действия аурумакрила на опухолевые клетки связан с индукцией односторонних разрывов и сшивков в молекуле ДНК. Наряду с этим показана способность аурумакрила снижать число спонтанных, либо индуцированных облучением, двусторонних разрывов ДНК в опухолевых клетках MCF-7.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования механизмов действия золотосодержащих комплексных соединений, обладающих цитостатической и противоопухолевой активностью, показывают, что эти соединения могут рассматриваться как мультитаргетные препараты.

Установлено, что мишенями для действия золотосодержащих комплексов могут быть клеточные органеллы (митохондрии, протеосома 26S, эндоплазматический ретикулум), различные внутриклеточные молекулы, играющие важную роль в опухолевом росте (тиоредоксинредуктаза; деубиквитиназы UCHL5 и USP14; протеосомы 26S; белки внутриклеточных сигнальных путей MARK, PI3K/AKT, TOR, JAK2, STAT3, EKR1/2; специфический ингибитор транскрипционного фактора FOXO3 – IKKB; рецептор эпидермального фактора роста – EGFR; фактор роста эндотелия сосудов – VEGF; топоизомераза I). Механизм действия разных комплексов, также как их различная цитотоксичность, во многом определяются природой лигандов, соединенных с одно- или трехвалентным золотом в структуре конкретного комплекса [2].

Практически для всех изученных золотосодержащих комплексов показано, что их цитотоксический эффект во многом опосредован воздействием на ферментную систему антиоксидантной защиты – систему «тиоредоксин–тиоредоксинредуктаза», регулируемую уровнем активных форм кислорода в митохондриях и цитозоле. Ингибирование золотосодержащими соединениями тиоредоксинредуктазы, обусловленное высокой аффинностью золота к селену, входящему в селеноцистеин в активном центре фермента, с образованием связей Au-Se, ведет к повышению уровня окисленного тиоредоксина и тем самым лишает тиоредоксин антиоксидантной активности. В результате меняется внутриклеточный окислительно-восстановительный баланс, что ведет к увеличению интрацеллюлярного уровня активных форм кислорода, развитию оксидативного стресса и апоптотической гибели клеток [2].

Следует отметить, что индукция разными способами оксидативного стресса, рассматривается как одно из перспективных направлений в поисках средств для противоопухолевой лекарственной терапии [9].

Влияние золотосодержащих комплексов на структуру ДНК изучено гораздо меньше, полученные результаты весьма противоречивы.

В большинстве исследований влияние золотосодержащих комплексов на структуру ДНК выполнены в модельных экспериментах с изолированной ДНК тимуса теленка.

Показано, что комплексы одно- и трехвалентного золота с различными лигандами слабо связываются с ДНК, при этом связь по природе не ковалентная, а электростатическая и обратимая [10]. Так, показано, что в ДНК опухолевых клеток, инкубированных с комплексами трехвалентного золота с терпиридинами в качестве лигандов, ион золота связывается с нуклеотидами в соотношении 1 : 6400 и 1 : 4900. При этом интенсивность электростатического связывания золота с ДНК зависела от стерических особенностей лигандов и коррелировала с цитотоксичностью комплексов [11].

В ряде исследований показана способность некоторых комплексов трехвалентного золота с разными лигандами (алкинилы, пиразин-дипиразолы, инертные доноры NO) интеркалировать ДНК [12]. В то же время при исследовании двух комплексов трехвалентного золота с тиосемикарбазонатными лигандами интеркаляции ДНК не зарегистрировано [13].

В экспериментах с изолированной ДНК плазмиды pBR322 установлено связывание с ДНК комплексов одно- и трехвалентного золота с разными лигандами с образованием межнитевых ДНК-сшивков. Показано, что на способность комплексов образовывать сшивки не влияет степень окисленности золота; более эффективны комплексы, в которых имеется два или более лигандов, слабо координированных с ионами золота [14].

Обнаружено в опытах *in vitro* с разными линиями опухолевых клеток (HeLa, MCF-7, HCT11), что комплекс одновалентного золота с парациклофаном, обладающий значительной цитотоксичностью (IC_{50} колебался в пределах от 3.5 мкМ до 38 мкМ), способен индуцировать двусторонние разрывы ДНК [15].

Следует заметить, что для комплексного соединения двухвалентной платины (противоопухолевый препарат цисплатин – дихлордиаминоплатина) основной внутриклеточной мишенью является ДНК. Возникающий в результате внутриклеточного гидролиза исходного соединения платиносодержащий ион образует аддукты с ДНК путем формирования координационных связей между атомом платины и двумя основаниями ДНК (преимущественно гуанином). В результате образуются плохо репарируемые и длительно существующие внутри- и межнитевые сшивки ДНК [7].

Как показано в проведенном нами исследовании, молекулярный механизм действия полиакрилата золота (аурумакрил), представляющего собой, в отличие от всех изученных золотосодержащих комплексов, золотосодержащий полимер, связан с воздействием на ДНК опухолевых клеток.

Так, аурумакрил способен дозозависимо индуцировать образование однонитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках линии MCF-7. Под влиянием препарата (1000 мкг/мл) число однонитевых разрывов ДНК в клетках возрастает в 3.0–4.5 раза по сравнению со спонтанным уровнем разрывов ДНК, наблюдаемых в контроле, уже через час инкубации и сохраняется на протяжении 24 ч культивирования клеток.

Следует отметить, что максимальный цитотоксический эффект аурумакрила в отношении клеток MCF-7 отмечался также при концентрации препарата, равной 1000 мкг/мл [5, 6].

В то же время увеличение двухнитевых разрывов ДНК под влиянием аурумакрила не отмечено. Более того, показана способность препарата снижать число как спонтанных, так и индуцированных облучением двухнитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках MCF-7.

Так, 24-часовая инкубация клеток с аурумакрилом (500–1000 мкг/мл) приводит к снижению уровня спонтанных двухнитевых разрывов ДНК (регистрировался по количеству фокусов γ H2AX) в два-три раза, а после 48-часовой инкубации уровень γ H2AX снижается на порядок по сравнению с контролем. В облученных клетках MCF-7, предварительно в течение 24 ч инкубированных с аурумакрилом, уровень фокусов γ H2AX, регистрируемый через 24 ч после облучения, снизился на порядок по сравнению с наблюдаемым в облученных клетках, не подвергавшихся воздействию аурумакрила.

Показано, что аурумакрил способен вызывать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток. Так, уже после часовой инкубации клеток MCF-7 с аурумакрилом (500 мкг/мл) уровень сшивок ДНК в клетках увеличился примерно в четыре раза.

Экспериментально обнаруженный факт уменьшения в клетках под влиянием аурумакрила уровня двухнитевых разрывов ДНК требует для своего объяснения специального изучения и предположительно может быть связан с ранним образованием ДНК-сшивок. Характер образующихся ДНК-сшивок (ДНК–ДНК или/и ДНК–белок) остается неясным. Ответ на это вопрос является задачей последующих исследований.

Основываясь на полученных данных следует констатировать, что препарат аурумакрил способен изменять структуру ДНК опухолевых клеток, индуцируя образование однонитевых разрывов ДНК и сшивок ДНК. Таким образом, молекула

ДНК может рассматриваться в качестве одной из мишеней для реализации цитотоксического действия полиакрилата золота.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, Л. А. Островская, Н. В. Блюхтерова и др., *Биофизика*, **66** (6), 1229 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106020X
2. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии*, **64** (6) 697 (2018).
3. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика*, **38** (12), 64 (2019).
4. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Росс. биотерапевтич. журн.*, **19** (4), 74 (2020).
5. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **66** (5), 978 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050161
6. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова и др., *Биофизика*, **67** (1), 82 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922010070
7. Д. Б. Корман. *Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов* (Практическая медицина, М., 2014).
8. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Биофизика*, **62** (3), 598 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917030150
9. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика*, **64** (3), 552 (2019). DOI: 10.1134/S0006350919030102
10. L. Messori, P. Orioli, C. Tempi, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 852 (2001). DOI: 10.1006/bbrc.2001.4348
11. P. Shi, Q. Jiceng, Y. Zhao, et al., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **11**, 745 (2006). DOI: 10.1007/s00755-006-0120-y
12. M. S. Alsaedi, B. A. Babgi, M. A. Hussein, et al., *Molecules*, **25**, 1933 (2020). DOI: 10.3390/j.molecules.25051033
13. B. Possato, L. R. Dalmolin, L. M. Pereira, et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **162**, 105834 (2021). DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105834
14. C. K. Mirabelli, J. B. Zimmerman, H. R. Bartus, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 1435 (1986). DOI: 10.1016/0006-2952(86)90107-3
15. S. Bestgen, C. Seide, T. Wiesher, et al., *Chemistry*, **23**, 6315 (2017). DOI: 10.1002/chem.201605337

Induction of Damage to the DNA Structure of Tumor Cells by Aurum Polyacrylate**A.K. Chigasova*, L.A. Ostrovskaya*, and D.B. Korman*****Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

The ability of aurum polyacrylate (aurumacryl) to cause changes in the DNA structure of tumor cells (culture of MCF-7 human breast cancer cells) was studied. It was established that the molecular mechanism underlying the effects of aurumacryl on tumor cells is associated with the induction of single-strand breaks and cross-links in the DNA molecule. At the same time, it was shown that aurumacryl can reduce the number of spontaneous, or irradiated, DNA double-strand breaks in MCF-7 cells.

Keywords: aurum polyacrylate (aurumacryl), culture of MCF-7 cells, DNA single-strand breaks, DNA double-strand breaks, DNA cross-links

МЕКОНОВАЯ КИСЛОТА – ВОЗМОЖНЫЙ НЕЙРОПРОТЕКТОР: ОБОСНОВАНИЕ НА ЭКСПЕРИМЕНТАХ *in vitro* И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ

© 2023 г. С.В. Козин*, **, Л.И. Ивашенко*, А.А. Кравцов*, **, Л.В. Васильева*,
А.М. Васильев*, Н.Н. Буков*, А.А. Дорохова*, **, #, О.М. Лясота*, **,
А.В. Беспалов*, С.С. Джимаков*, **

*Кубанский государственный университет, Ставропольская ул., 149, Краснодар, 350040, Россия

**ФИЦ «Южный научный центр РАН», пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону, 344006, Россия

#E-mail: 013194@mail.ru

Поступила в редакцию 12.09.2022 г.

После доработки 23.09.2022 г.

Принята к публикации 26.09.2022 г.

Основными представителями гамма-пириновых кислот являются меконовая, коменовая, хелидоновая и койевая кислоты. В отношении коменовой кислоты обнаружен нейропротекторный эффект, а хелидоновая кислота обладает выраженным противовоспалительным действием. В отношении меконовой кислоты нейропротекторное действие не было изучено. Целью настоящей работы было установление нейропротекторного потенциала меконовой кислоты на модели ишемического инсульта *in vitro*, в том числе и исходя из ее физико-химических свойств. Первичную нейро-глиальную культуру получали из мозжечка семи-восьмисуточных крысят линии Wistar методом механической-диссоциации. Защитное действие меконовой кислоты на культуру нейронов мозжечка изучали на модели глутаматной токсичности и кислородо-глюкозной депривации. Антиоксидантную активность меконовой кислоты изучали квантово-механическими расчетами и экспериментально в модельной системе «цитрат–фосфат–люминол» методом хемилюминесцентного анализа. Хелатирующие свойства меконовой кислоты по отношению к Fe^{3+} в растворах изучены Job's-методом. Было установлено, что меконовая кислота оказывает защитный эффект на моделях ишемии *in vitro*. Ее действие приводит к снижению уровня внутриклеточного кальция и восстановлению мембранного потенциала митохондрий в культуре нейронов мозжечка при глутаматном воздействии, и увеличению процента живых клеток при кислородо-глюкозной депривации. Меконовая кислота имеет высокий расчетный антиоксидантный потенциал, подтвержденный экспериментально. При повышении pH среды происходит ступенчатое связывание меконовой кислоты с Fe^{3+} с образованием комплексов разного соотношения лиганд/металл. При физиологических значениях pH полученный комплекс имеет состав 1:3. Выявленное антиоксидантное, хелатирующее и цитопротекторное действие меконовой кислоты дает основание для дальнейшего изучения возможных нейропротекторных свойств данного соединения в экспериментах *in vivo*, а полученные в работе данные о ее физико-химических свойствах могут быть полезны для синтеза и изучения новых координационных соединений на основе меконовой кислоты.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, меконовая кислота, культура нейронов мозжечка, глутаматная токсичность, кислородо-глюкозная депривация, нейропротекция, комплексы железа.

DOI: 10.31857/S0006302923010039, EDN: NYXBTR

Меконовая кислота (МК, 3-гидрокси-4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновая кислота) является представителем класса гамма-пириновых соединений, входит в состав опия снотворного мака *Papaver somniferum*. С точки зрения фармакологии МК интересна тем, что является представителем

семейства γ -пириновых кислот, в отношении которых установлено терапевтическое действие. Так, например, коменовая кислота (5-гидрокси-4-оксо-4Н-пиран-2-карбоновая кислота), входящая в состав лекарственного препарата «Бализ-2», способствует ускорению сроков заживления язв двенадцатиперстной кишки. На модели сквозной неинфицированной раны у кроликов было установлено, что коменовая кислота приво-

Сокращения: МК – меконовая кислота, ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

дила к уменьшению сроков закрытия раны. Коменовая кислота способствует снижению сроков заживления ожоговых ран и отторжению некроза, не оставляя на теле грубых рубцов. Фармакологическое средство «Бализ-2» на основе коменовой кислоты хорошо зарекомендовало себя в клинической практике и успешно применялось в ходе военных действий, а также на борту космической станции «Союз» [1]. Установлено, что коменовая кислота оказывает антигипоксическое и нейропротекторное действие у крыс на модели гипоксического воздействия и острого иммобилизационного стресса [2, 3] и оказывает протекторное действие на культуру нейронов мозжечка при глутаматном воздействии, снижая гибель нейрональных клеток и уменьшая уровень ионов кальция внутри клеток [4]. Она положительно влияет на рост спинальных ганглиев при действии окислительного стресса [5], а также восстанавливает амплитуду длительной потенциации переживающих срезов гиппокампа у стрессированных животных [6]. Еще один представитель семейства 4Н-пирановых кислот – хелидоновая кислота (4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновая кислота), входит в состав лекарственного растения *Chelidonium majus* L. и оказывает противовоспалительное действие при моделировании у животных язвенного колита и аллергического ринита [7, 8]. В отношении МК известно, что она, также как и коменовая кислота, снижает частоту повторных ответов ноцицептивных нейронов [9] и входит в состав неопиоидного анальгетика «Аноцептин» [10].

С точки зрения химии молекула МК интересна тем, что выступает потенциальным донорным биолигандом для ряда жестких и умеренно жестких кислот Льюиса из *d*- и *f*-металлов [11], это дает основание для изучения координационных свойств МК с ионами биометаллов.

Цереброваскулярные и нейродегенеративные заболевания являются самыми распространенными неврологическими расстройствами и занимают второе место по смертности населения после сердечно-сосудистых заболеваний. Последствия данных заболеваний опасны высоким уровнем инвалидизации всех слоев населения, включая и трудоспособное. Основной стратегией лечения является фармакологическая коррекция, направленная на устранение ключевых патологических звеньев, развивающихся в поврежденных отделах головного мозга. Одним из таких звеньев является окислительный стресс. В головном мозге есть необходимые предпосылки для развития свободнорадикальных процессов, особенно при гипоксических условиях. Например, таковыми являются наличие высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот, очень низкая активность каталазы и глутатионпероксидазы, высокое содержание ионов двухвалентного железа и

малое количество витамина А [12]. Гиперпродукция активных форм кислорода и азота, а также развитие процессов перекисного окисления липидов приводят к нарушению гематоэнцефалического барьера, развитию воспалительного процесса, апоптотической и некротической гибели нейронов. Поэтому для снижения последствий инсульта и нейродегенеративных процессов была предложена антиоксидантная терапия. Антиоксиданты подразделяются на прямые и косвенные. Первые осуществляют захват радикалов за счет особенностей структурного строения, эффект вторых достигается активацией первичных и вторичных мессенджеров клетки, ведущих к увеличению экспрессии ряда низкомолекулярных белков и ферментов антиоксидантной защиты. В процессе старения происходит нарушение гомеостаза металлов переменной валентности, таких как медь и железо, что приводит к их накоплению в тканях головного мозга [13]. У пациентов, страдающих нейродегенеративными расстройствами, обнаруживается избыточная концентрация ионов железа в соответствующих областях головного мозга. При болезни Альцгеймера происходит активное накопление ионов железа в амилоидных бляшках и нейрофибриллярных клубках и вокруг них [14]. При паркинсонизме накопление ионов железа происходит в черной субстанции и тельцах Леви [15]. Усиление агрегации β -амилоидного белка и α -синуклеина, а также отягощение окислительного стресса на фоне накопления железа приводит к прогрессированию данных заболеваний. Большое количество ионов железа может резко высвобождаться в поврежденных областях мозга после местного кровоизлияния, вызванного травмой или эпизодов инсульта различной этиологии [16]. На основании этих данных хелатотерапия металлов рассматривается как перспективное направление в нейропротекции, но в связи с высокой токсичностью многие хелатирующие агенты не нашли клинического применения [17, 18].

Еще одним патологическим звеном при нейродегенерации является эксайтотоксичность. Поэтому наряду с антиоксидантами используют лекарственные препараты, действие которых направлено на уменьшение токсического действия глутамата. К таким веществам относят антагонисты глутаматных рецепторов, блокаторы кальциевых каналов, а также агонисты рецепторов гамма-аминомасляной кислоты [19].

Современная нейрофармакология использует стратегию полипрагмазии, использующую одновременно несколько препаратов, действующих на разные звенья патологического процесса [20]. Применение нескольких препаратов создают некоторые проблемы: во-первых, из-за большой токсической нагрузки на организм пациента, во-вторых, необходимо учитывать взаимное влия-

ния веществ друг на друга в условиях организма. Несмотря на большое количество известных молекул с нейропротекторной активностью, многие из них не проходят стадии клинического испытания [19, 21]. Поэтому вопрос поиска эффективных и безопасных нейропротекторов, обладающих одновременно несколькими терапевтическими свойствами, является актуальной задачей. В литературе отсутствуют сведения о комплексообразующих свойствах МК с ионами железа. Ранее было сказано, что родственные меконовой кислоте коеновая и хелидоновая кислоты обладают высокой биологической активностью, в том числе антиоксидантной и противовоспалительной. В исследовании, проведенном нами ранее, было установлено, что МК ингибировала развитие реакции свободнорадикального окисления липидов желтка и повышала выживаемость нейронов мозжечка при глутаматном воздействии [22]. Целью настоящей работы было исследование нейропротекторного потенциала меконовой кислоты на моделях ишемического инсульта *in vitro*, а именно, оценить уровень внутриклеточного кальция и мембранный потенциал митохондрий нейронов мозжечка при глутаматной токсичности, исследовать ее защитный эффект при кислород-глюкозной депривации, а также дальнейшее исследование антиоксидантных свойств МК исходя из ее физико-химических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Меконовая кислота была получена в отделе биологически активных веществ Кубанского государственного университета из койевой кислоты по методике, подробно описанной немецкими исследователями [23]. Чистоту полученного соединения контролировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Сорбфил-А», элюент — изопропанол, растворитель — диметилсульфоксид, проявитель — пары йода, щелочной раствор KMnO_4 . Качественный фазовый состав устанавливали рентгенодифрактометрическим методом на приборе XRD-7000 (Shimadzu, Япония). Идентификацию пиков на дифрактограммах и количественное содержание фаз проводили с помощью программного комплекса PDWin 2.0 и пакета Crystallographica Search-Match, интегрированных в программно-аппаратный комплекс прибора. Инфракрасные спектры записывали на ИК-Фурье-спектрометре VERTEX 70 (Bruker, Германия). Электронные спектры фиксировали на двулучевом спектрофотометре U-2900 (Hitachi, Япония).

Электронные спектры поглощения меконовой кислоты и комплексных соединений, образующихся в растворе при сливании растворов FeCl_3 и

меконовой кислоты (молярное соотношение 1:5) изучали в условиях различной кислотности среды ($\text{pH} = 1-10$). Регулирование pH среды осуществляли концентрированными растворами гидроксида калия и хлорной кислоты, поскольку анион хлорной кислоты (ClO_4^-) не склонен к образованию комплексов с катионами Fe^{3+} . Ионную силу во всех экспериментах поддерживали 0.1 М раствором хлорида калия.

Определение состава комплексов осуществляли методом изомолярных серий (метод Остромысленского—Жоба) [24]. Для этого готовили три серии растворов смеси трехвалентного железа и меконовой кислоты в антибатных соотношениях от 1:9 до 9:1, сохраняя постоянным общий объем раствора в каждом опыте (pH 3.0, 5.0 и 7.5). Необходимое значение кислотности задавали раствором HCl/KCl для pH 3.0 и ацетатным буфером для pH 5.0; физиологическое значение pH 7.4 поддерживали HEPES-буфером. Используя полученные кривые «состав—свойство», определяли ступенчатые константы нестойкости образующихся комплексных соединений. Так, путем линейной экстраполяции начальных участков каждой кривой до точки пересечения определяли оптическую плотность A_0 , соответствующую комплексу при полном отсутствии диссоциации, и далее рассчитывали ступенчатую константу нестойкости по формуле $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, где C — концентрация несвязанного в комплекс лиганда; α — степень диссоциации комплекса, которую рассчитывали по формуле $\alpha = (A_0 - A_1) / A_0$ где A_1 — оптическая плотность, соответствующая максимуму кривой изомолярной серии (экспериментальное значение).

Полученные константы нестойкости дополнительно уточняли методом кажущегося отклонения от закона Бугера—Ламберта—Бера (метод Бабко) [24].

Антиоксидантную активность МК изучали методом хемилюминесцентного анализа на приборе Lum-100 (Россия) в модельной системе — «цитрат—фосфат—люминол» [25]. Веществом сравнения служил антиоксидант — этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС). Модельная система «цитрат—фосфат—люминол» состоит из цитрата натрия (4 мМ), фосфатного буфера (105 мМ KCl , 20 мМ KH_2PO_4) и люминола (10 мМ). Инициацию свечения проводили добавлением 35 мМ Fe^{2+} в форме сульфата железа. Регистрацию вели пять минут. Антиоксидантный статус исследуемого вещества оценивали по интенсивности свечения (площадь под спектраль-

ной кривой) в усл. ед., а также по тангенсу угла наклона восходящего участка графика.

Квантово-химическое исследование осуществляли в программном пакете ORCA 5.0.1 [26]. Оптимизацию геометрии нейтральных молекул, анионов и радикалов, а также расчет термодинамических параметров осуществляли в рамках теории DFT с помощью хорошо известного гибридного функционала B3LYP [27] с дисперсионной поправкой D3BJ [28] в валентно-расщепленном базисном наборе def2-TZVPD [29]. Все найденные геометрии подтверждались отсутствием мнимых колебательных частот. Все расчеты проводили с учетом неспецифической сольватации в рамках модели CPCM (растворитель – вода) [30]. Для генерации Input-файлов применяли программу Gabedit 2.5. Для визуализации молекулярной геометрии и колебательных частот использовали программу ChemCraft 1.8.

Первичную нейроглиальную культуру получали из мозжечка 7–8-суточных крысят линии Wistar методом ферментно-механической диссоциации, с последующей недельной инкубацией в питательной среде, состоящей из фетальной телячьей сыворотки (10%) и среды Игла (90%) [31]. Для определения доли живых клеток использовали ручной подсчет, для этого культивированные клетки фиксировали смесью «этанол–формальдегид–уксусная кислота» (7:2:1) с последующим окрашиванием трипановым синим. Кислородно-глюкозную депривацию моделировали, заменяя на 45 мин культуральную среду на солевой раствор (состав (в мм): NaCl – 154, KCl – 25, CaCl₂ – 2.3, MgCl₂ – 1, NaHCO₃ – 3.6, Na₂HPO₄ – 0.35, HEPES – 10) и помещая культуры в аргоновую атмосферу вместе с безглюкозным солевым раствором [32]. Через 45 мин культуры промывали и возвращали в солевой раствор с глюкозой и МК в исследуемых концентрациях 1.0, 0.1, 0.01 и 0.001 мМ; через сутки промывали от вещества и проводили фиксацию с последующим окрашиванием. Результат пересчитывали в процентах от контроля.

Эксайтотоксичность моделировали добавлением глутамата (Sigma, США) концентрацией 50 мкМ на 10 мин в солевом растворе следующего состава (в мМ): NaCl – 154, KCl – 25, CaCl₂ – 2.3, NaHCO₃ – 3.6, Na₂HPO₄ – 0.35, HEPES – 5, глюкоза – 5.6. Затем культуры возвращали в исходную питательную среду. В часть лунок добавляли МК в концентрации 1.0, 0.1, 0.01 и 0.001 мМ. Уровень кальция после действия глутамата определяли с использованием флуоресцентного зонда Fluo4-AM (ThermoFisher Scientific, США), кото-

рый добавляли к культурам перед воздействием глутамата на 30 мин. Регистрацию флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 485 нм, эмиссии 535 нм. Результаты представлены в процентах, за 100% принят уровень флуоресценции контрольных культур, не подвергавшихся воздействию глутамата и меконовой кислоты. Мембранный потенциал митохондрий после глутаматного воздействия определяли с использованием флуоресцентного зонда тетраметилродамина (ThermoFisher Scientific, США), который добавляли к культурам перед воздействием глутамата на 30 мин. Регистрацию флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 535 нм, эмиссии 595 нм. Результаты представлены в процентах, за 100% принят уровень флуоресценции контрольных культур, не подвергавшихся воздействию глутамата и меконовой кислоты.

Все измерения с использованием зондов проводили на многофункциональном ридере для микропланшетов FilterMax F5 (США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью STATISTICA 10. Достоверность различий средних значений (M), найденных между группами, статистически оценивали с помощью непараметрического U -критерия (Манна–Уитни), различие считали достоверным для $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученное соединение характеризуется рядом специфических полос в инфракрасном спектре, характерных для меконовой кислоты и указанных в работе [23]: 3508, 3362, 3092, 1752, 1676, 1622, 1269, 1232, 1196, 1053, 906, 783, 667 см⁻¹.

Согласно данным рентгенофазового анализа исследуемый образец имеет кристаллическую структуру (рис. 1а) и характеризуется определенным набором значений 2θ , межплоскостных расстояний d_{hkl} и относительных интенсивностей I (%), которые сравнивали с табличными значениями эталонных дифрактограмм однофазных веществ, представленных в базе данных ICDD-PDF-2. Исследуемый образец идентифицируется как гидрат меконовой кислоты с брутто-формулой C₇H₄O₇ · 3H₂O орторомбической кристаллической системы (код ссылки: 00-024-1653) (рис. 1б).

Для определения области существования различных форм комплексных соединений, во-первых, изучено спектральное поведение меконовой кислоты при различных рН среды. Из рис. 2 видно, что спектр поглощения меконовой кислоты при повышении рН среды от 3 до 10 не испытыва-

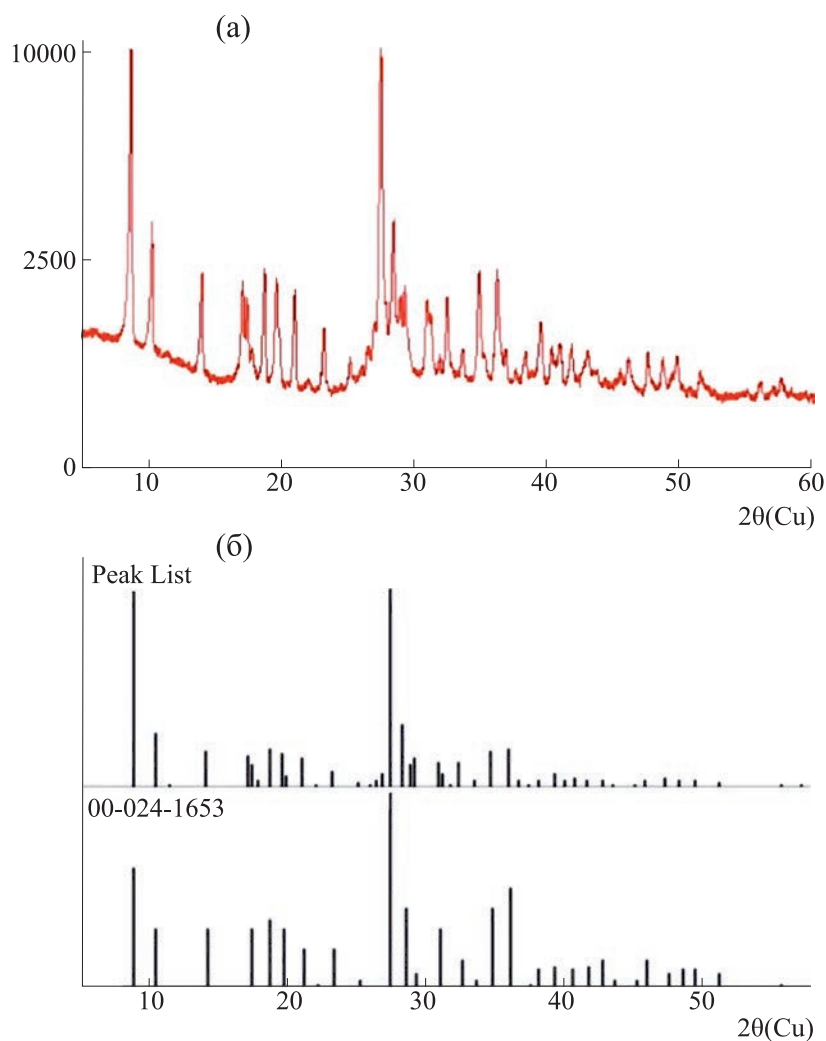


Рис. 1. (а) – Дифрактограмма исследуемого образца, (б) – штрих-диаграммы исследуемого и эталонного образца.

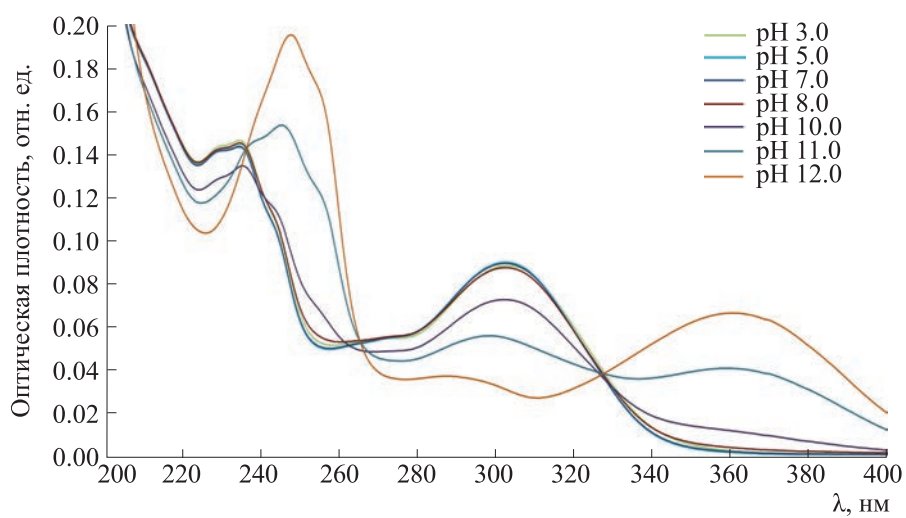


Рис. 2. Электронные спектры водных растворов мекеновой кислоты при различных pH.

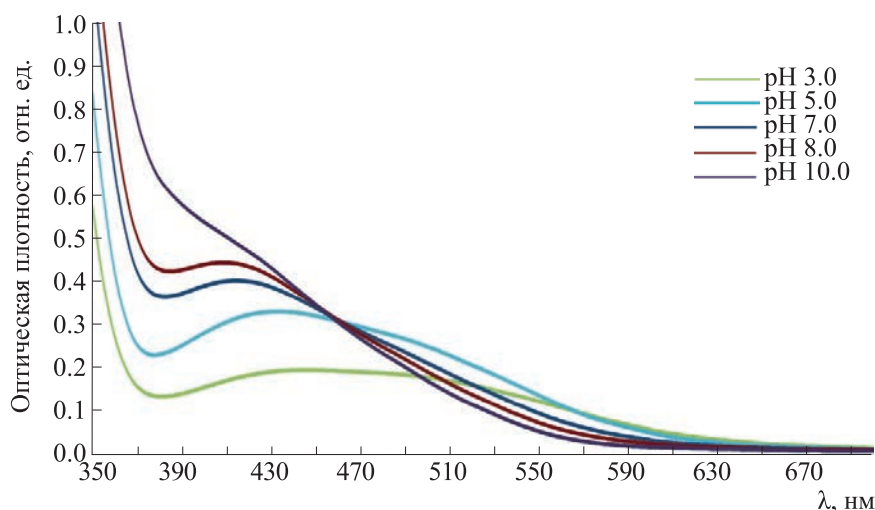


Рис. 3. Электронные спектры водных растворов FeCl_3 ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М) и меконовой кислоты (молярное соотношение 1 : 5).

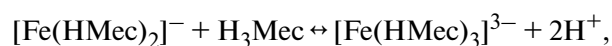
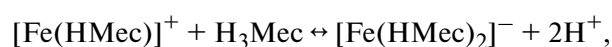
ет заметных изменений и обладает двумя характерными максимумами: $\lambda_1 = 233$ нм и $\lambda_2 = 303$ нм. При pH свыше 10 происходит депротонирование OH-группы, которое приводит к батохромному сдвигу максимумов полос поглощения, отвечающей за переход $\pi \rightarrow \pi$, в результате чего максимум поглощения смещается к 247 и 360 нм. Во-вторых, записаны электронные спектры поглощения комплексных соединений, образующихся в растворе при сливании растворов FeCl_3 и меконовой кислоты (молярное соотношение 1 : 5) в условиях различной кислотности среды (pH = 1 ÷ 10).

Из рис. 3 видно, что максимумы полос поглощения различных форм комплексов лежат в области 380–600 нм, а изобестическая точка расположена при 460 нм. В качестве аналитической длины волны для метода изомолярных серий и метода Бабко использовали длину волны 420 нм (средняя величина, при которой каждая из форм комплексов имеет поглощение в электронном спектре).

Из рис. 4а видно, что первая и вторая константа диссоциации меконовой кислоты составляют 2.0 и 2.5 и соответствуют депротонированию двух карбоксильных групп, третья константа находится в щелочной области и равна 9.7 и обусловлена диссоциацией гидроксильной группы. Таким образом, при значениях pH, близких к физиологическим, меконовая кислота находится в дважды депротонированной форме (~99%). С использованием диаграмм изомолярных серий были получены константы нестойкости и полные константы устойчивости вышеуказанных комплексов при трех значениях pH. При pH 3.0 получен комплекс с соотношением лиганд/металл 1 : 1 с $K_1 = 1.20 \cdot 10^{-5}$ моль/л и $\lg \beta k_1 = 4.85$. При pH 5.0 полу-

чен комплекс с соотношением лиганд/металл 1 : 2 с $K_2 = 1.07 \cdot 10^{-6}$ моль/л и $\lg \beta k_2 = 5.93$. При физиологическом значении pH раствора состав комплекса 1 : 3 с $K_3 = 1.21 \cdot 10^{-11}$ моль/л и $\lg \beta k_3 = 10.86$.

Методом Бабко были получены близкие значения констант. Для комплекса составом 1 : 1 при разбавлении в два и пять раз получены $K_1 = 1.58 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lg \beta k_1 = 4.80$, $K_1^* = 1.48 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lg \beta k_1^* = 4.83$. При разбавлении в два раза для комплекса 1 : 2 значения констант следующие: $K_2 = 1.26 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $\lg \beta k_2 = 5.90$, а при разбавлении в пять раз комплекса данного состава получили $K_2^* = 1.20 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $\lg \beta k_2^* = 5.92$. При соотношении лиганд/металл, равном 1 : 3, $K_3 = 1.35 \cdot 10^{-11}$ моль/л, $\lg \beta k_3 = 10.87$ (при разбавлении в два раза) и $K_3^* = 1.55 \cdot 10^{-11}$ моль/л, $\lg \beta k_3^* = 10.81$ (при разбавлении в пять раз). На основании величин констант устойчивости, полученных на основании двух экспериментальных методов, была построена диаграмма распределения различных форм комплексов от pH раствора. Из нее видно, что при физиологическом значении pH преобладает комплекс состава 1 : 3 (~97%), на долю комплекса составом 1 : 2 приходится ~3%. Таким образом, при повышении pH среды происходит ступенчатое образование комплексов по следующей схеме:



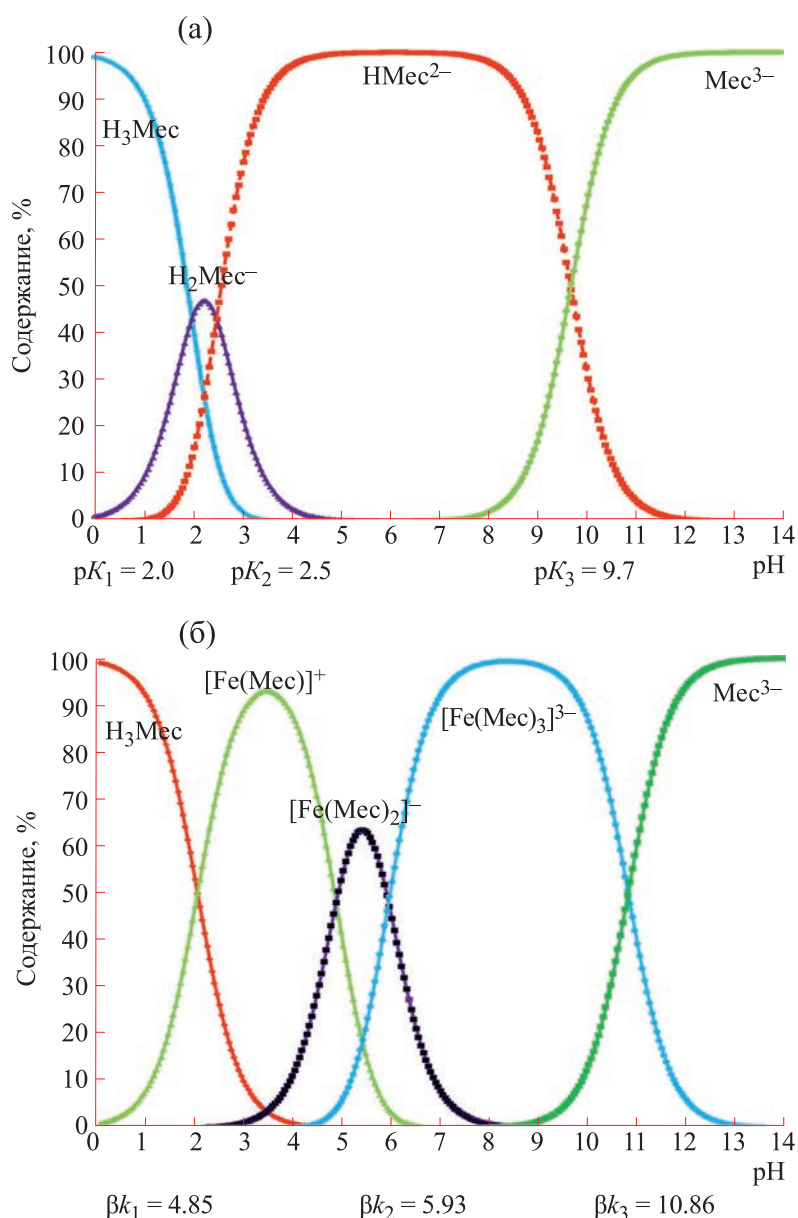
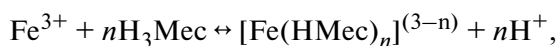


Рис. 4. (а) — Диаграмма зависимости распределения ионных форм мекеновой кислоты от pH; (б) — диаграмма распределения различных форм комплекса Fe^{3+} с мекеновой кислотой в зависимости от pH.



где H_3Mec — молекула мекеновой кислоты, $[\text{Fe}(\text{HMec})]^+$ — комплекс состава 1 : 1, $[\text{Fe}(\text{HMec})_2]^-$ — комплекс состава 1 : 2, $[\text{Fe}(\text{HMec})_3]^{3-}$ — комплекс состава 1 : 3.

Согласно расчетным данным, мекеновая кислота обладает наименьшим значением энтальпии одноэлектронного переноса в трианионной форме и составляет 318.7 кДж/моль, тогда как для дианионной формы данное значение равно 421.3 кДж/моль. Для нейтральной молекулы ЭМГПС данный показатель составляет

472.4 кДж/моль, тогда как для анионной формы — 322.3 кДж/моль.

В модельной системе «цитрат—фосфат—люминол» МК проявила дозозависимое снижение интенсивности свечения и уменьшение тангенса наклона восходящего графика хемилюминесцентной реакции (табл. 1). При концентрации 0.2 мМ МК уменьшает хемилюминесценцию на 73% против 48% в случае ЭМГПС. Снижение интегрального показателя свечения при концентрациях антиоксидантов 0.3 и 0.6 мМ составило 80 и 87% у МК против 55 и 73% у ЭМГПС ($p < 0.05$). Мекеновая кислота также, как и вещество срав-

Таблица 1. Показатели хемилюминесцентной реакции в модельной системе «цитрат–фосфат–люминол»

Концентрация, мМ	Интенсивность свечения, усл. ед.		$\text{tg}\alpha \cdot 10^{-4}$	
	МК	ЭМГПС	МК	ЭМГПС
0	141.0 ± 1.9	141.0 ± 1.9	360 ± 9	360 ± 9
0.2	$38.0 \pm 0.8^{* \#}$	$73.0 \pm 3.2^*$	$90 \pm 3^{* \#}$	$190 \pm 3^*$
0.3	$28.0 \pm 0.5^{* \#}$	$64.0 \pm 1.4^*$	$56 \pm 3^{* \#}$	$160 \pm 6^*$
0.6	$16.0 \pm 0.6^{* \#}$	$38.0 \pm 1.1^*$	$24 \pm 4^{* \#}$	$100 \pm 6^*$

Примечание. МК – меконная кислота, ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, # – $p < 0.05$ по сравнению с ЭМГПС.

нения этилметилгидроксипиридина сукцинат ингибировали образование аминоталевой кислоты (конечного продукта окисления люминола). Данные этого эксперимента хорошо согласуются с результатами раннее проведенного нами исследования. В работе [22] показано, что МК и ЭМГПС оказывали дозозависимое снижение интенсивности развития свободнорадикальной реакции окисления липидов желтка в модельной системе желточных-липопротеинов. Полученные экспериментальные данные в двух модельных системах и расчетные данные указывают на высокий антиоксидантный потенциал МК.

Ранее было показано [22], что добавление МК в культуры нейронов мозжечка, не подвергшихся воздействию, во всех исследуемых концентрациях не влияла на жизнеспособность клеток, поэтому действие МК на выживаемость клеток оцени-

вали только после воздействия – кислородо-глюкозной депривации. Из рис. 5 видно, что при действии кислородо-глюкозной депривации в отсутствие меконной кислоты количество живых клеток составило 12%. Добавление МК в культуру нейронов мозжечка, подвергшихся кислородо-глюкозной депривации, способствовало увеличению выживаемости клеток. Статистически значимое отличие в количестве живых клеток между исследуемыми концентрациями не наблюдалось, однако максимальный эффект наблюдался при концентрации 1 мМ и составил 56%, а минимальный – при концентрации 0.001 мМ и составил 31%.

На рис. 6 представлены результаты исследования влияния меконной кислоты на уровень внутриклеточного кальция при эксайтотоксическом воздействии глутаматом.

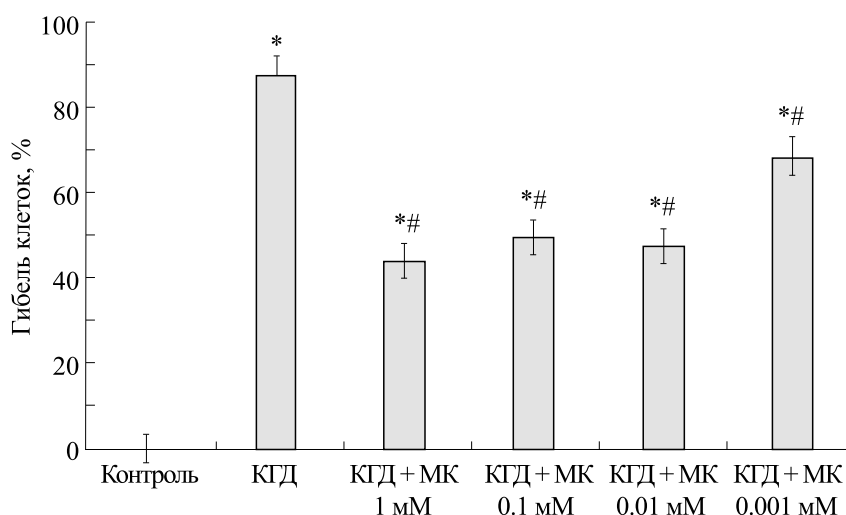


Рис. 5. Влияние меконной кислоты на выживаемость нейронов мозжечка при кислородо-глюкозной депривации. Данные представлены в виде $M \pm m$; * – $p < 0.05$ к контролю; # – $p < 0.05$ к кислородо-глюкозной депривации.

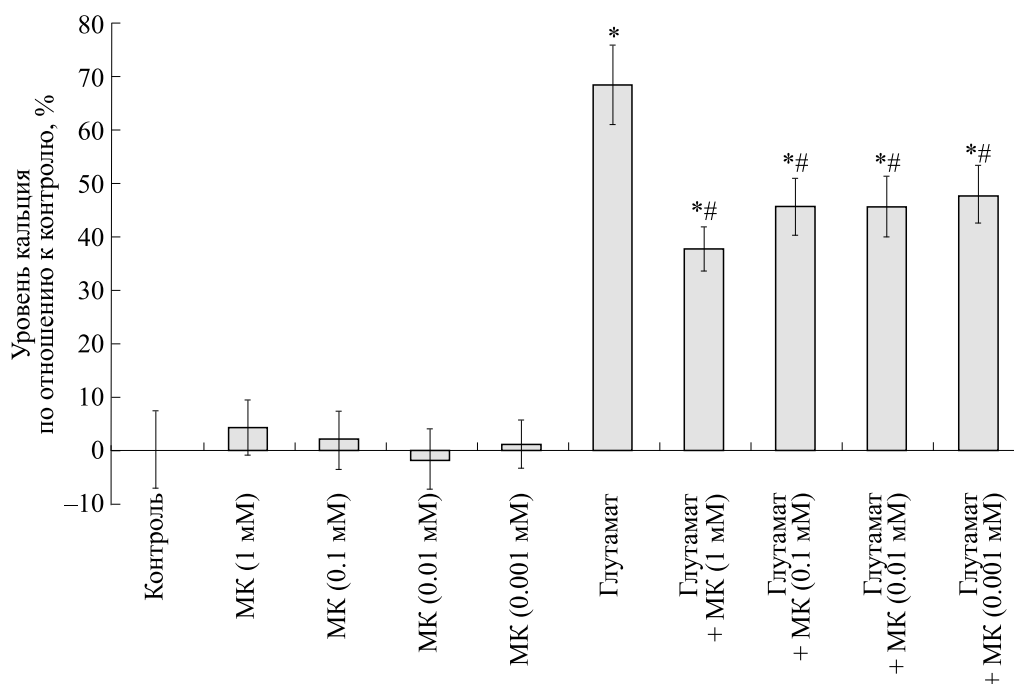


Рис. 6. Влияние меконовой кислоты на уровень внутриклеточного ионов кальция при глутаматной токсичности. Данные представлены в виде $M \pm t$; * — $p < 0.05$ к контролю; # — $p < 0.05$ к глутамату.

Анализ полученных данных показал, что воздействие глутаматом приводит к возрастанию уровня кальция на 69% по отношению к контролю. С другой стороны, в культурах с добавлением МК повышение уровня кальция было существенно меньше и составило 38, 46, 46 и 48% по отношению к контролю соответственно для концен-

траций 1.0, 0.1, 0.01 и 0.001 mM. В культурах, не подвергшихся глутаматному воздействию, МК не оказала статистически достоверного влияния на концентрацию ионов кальция в цитозоле нейронов мозжечка.

На рис. 7 показано, что воздействие глутаматом на клетки головного мозга приводит к сниже-

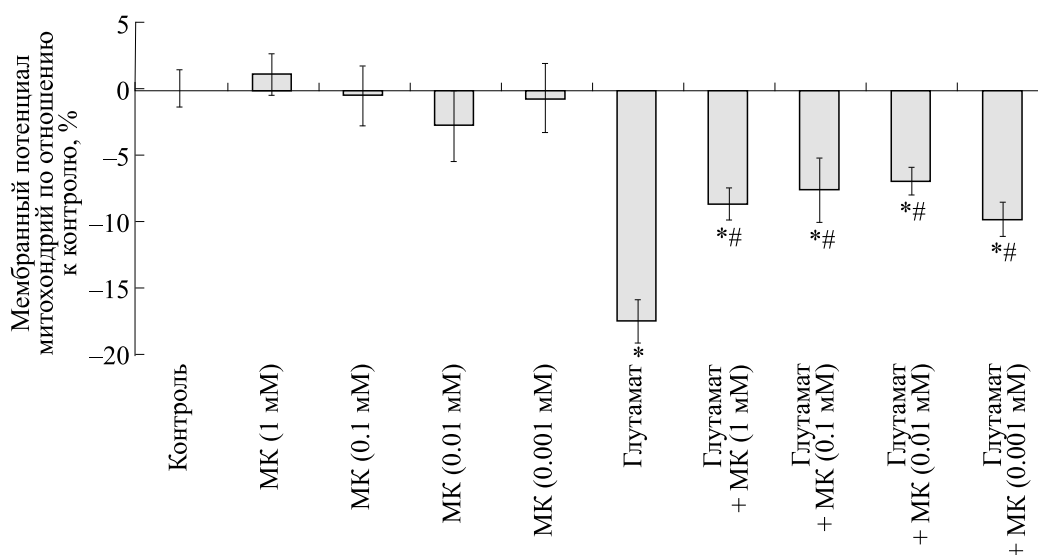


Рис. 7. Влияние меконовой кислоты на мембранный потенциал митохондрий при глутаматной токсичности. Данные представлены в виде $M \pm t$; * — $p < 0.05$ к контролю; # — $p < 0.05$ к глутамату.

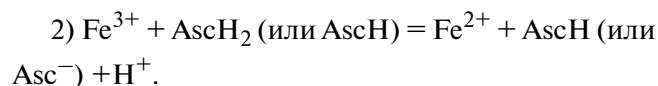
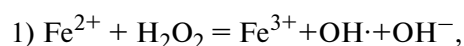
нию мембранного потенциала митохондрий на 17% по отношению к контролю. Меконная кислота способствовала меньшему снижению значения мембранного потенциала митохондрий – на 9, 8, 7 и 10% по сравнению с контролем соответственно для концентраций 1.0, 0.1, 0.01 и 0.001 мМ.

Добавление меконной кислоты в культуру нейронов мозжечка способствует снижению гибели клеток при кислородном и глюкозном голодании, препятствует повышению внутриклеточного уровня кальция и снижению мембранного потенциала митохондрий при глутаматном воздействии – одних из ключевых факторов, приводящих к повреждению клеток. Таким образом, МК препятствует эксайтотоксическому действию глутамата, оказывая цитопротекторный эффект на культуру нейронов мозжечка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для МК возможна реализация трех возможных механизмов антиоксидантной активности: прямой перенос атома водорода (HAT), одноэлектронный перенос с последующим депротонированием (SET-PT) и депротонирование с последующим одноэлектронным переносом (SPLET) [33]. Поскольку вероятность реализации механизмов HAT и SET-PT в водной среде невелика [34], то можно предположить, что основным механизмом реализации прямого антиоксидантного эффекта меконной кислоты является SPLET-механизм, для которого и была рассчитана энтальпия одноэлектронного переноса. Как видно из диаграммы протеолитического равновесия МК при физиологических pH может находиться в двух состояниях: дианионной форме HMe^{2-} (99.82%) и трианионной Me^{3-} (0.018%) с соответствующими энергиями отрыва электрона 421.3 и 318.7 кДж/моль. Расчетные значения энергии переноса электрона для МК ниже, чем у природных антиоксидантов – катехинов [33], а экспериментально полученные значения ингибирования развития свободнорадикальных реакций выше, чем у лекарственного антиоксидантного препарата «Мексидол». Все это указывает на высокий уровень прямого антиоксидантного потенциала меконной кислоты. Также ее прямой антиоксидантный эффект может реализоваться за счет способности МК вступать во взаимодействие с ионами железа и образовывать координационные комплексы. Койевая кислота, близкая по строению к МК, способна к образованию хелатных комплексов с ионами железа и алюминия [35]. В последнее время в литературе появляется все больше сведений о влиянии нарушения мета-

болизма железа и развития неврологических заболеваний. Так, у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, наблюдается повышенное накопление ионов железа в гиппокампе [36]. Применение хелаторов железа, таких как дефероксамин, увеличивает уровень дофамина в клетках черной субстанции и предупреждает развитие окислительного стресса у пациентов, страдающих болезнью Паркинсона [37]. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* на грызунах показали, что применение ферростатина-1 оказало защитный эффект при моделировании болезни Гентингтона [38]. Установлено, что при всех видах инсульта происходит аккумуляция ионов железа, а применение их хелаторов приводит к значительному улучшению состояния пациентов [39]. Основной причиной патологического действия ионов Fe^{2+} является развитие реакции Фентона и усиление на фоне этой реакции процессов перекисного окисления липидов, которое сопровождается снижением восстановленного глутатиона и активности глутатионпероксидазы в нейронах головного мозга. Следует отметить роль ионов железа (III) в развитии повреждающего эффекта. Восстановление ионов Fe^{3+} , образующихся в результате реакции Фентона, аскорбиновой кислотой открывает дополнительный канал для образования активных форм кислорода [40]. Относительно высокие концентрации аскорбиновой кислоты и ионов железа в головном мозге способствуют развитию следующих реакций и созданию повреждающего цикла:



Разорвать данный замкнутый круг можно применением хелаторных лигандов или/и веществ с прямым антиоксидантным эффектом. Таким образом, хелатирование ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} в тканях головного мозга при окислительном стрессе может ингибировать развитие реакции Фентона и обрывать одну из цепей свободнорадикального окисления, а также выводить избыточное железо из поврежденных отделов головного мозга при нейродегенеративных процессах. Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют рассматривать хелаторы железа как потенциальные нейропротекторы [16–18]. Результаты наших исследований показали, что при физиологическом значении pH преобладает комплекс с соотношением меконная кислота/ Fe^{3+} 3 : 1 в значении ~97% с высокой константой устойчивости, тогда как на долю комплекса составом 2 : 1 приходится ~3%.

Эти данные позволяют говорить о возможном хелатировании ионов железа МК в тканях головного мозга и уменьшению интенсивности окислительных процессов за счет ингибирования реакции Фентона, и, как следствие, снижению повреждения и гибели нейронов.

При развитии нейродегенеративных заболеваний появляется астроцитарная дисфункция, обусловленная нарушением работы глутаматного транспортера EAAT-1 [41]. При болезни Альцгеймера A β 1-42 индуцирует глутаматную токсичность за счет изменения функциональной активности обратного захвата глутамата из синаптической щели [42]. При рассеянном склерозе происходит подавление экспрессии генов, ответственных за синтез переносчика глутамата в олигодендроцитах и астроцитах за счет повышения провоспалительных факторов [43]. Вызванная на фоне ишемического повреждения головного мозга деполяризация приводит к нарушению работы глутаматного транспортера и накоплению возбуждающей аминокислоты в синаптической щели [44]. Эксайтотоксичность и окислительный стресс являются взаимоусиливающими звеньями одного патологического процесса. С одной стороны, активация AMPA- и NMDA-рецепторов и Ca²⁺-каналов L-типа приводит к активации ряда ферментов и вторичных мессенджеров, приводящих к развитию воспалительного процесса и отягощению окислительного стресса. Например, гиперактивность Ca²⁺-зависимой n-NOS приводит к гиперпродукции активных форм азота, таких как оксид азота и высокотоксичный пироксинитрит, и усилению интенсивности окислительных процессов в нейронах [45]. Высвобождение арахидоновой кислоты в результате активации фосфолипазы A способствует выработке эйкозаноидов, стимулирующих провоспалительный ответ [46]. С другой стороны, повышенная продукция свободных радикалов в поврежденных отделах головного мозга приводит к повреждению глиальных клеток и, как следствие, еще более сильному нарушению работы глутамат/глутаминовой системы и накоплению возбуждающей аминокислоты в синаптическом пространстве [47]. Снижение уровня гибели нейронов мозжечка и уровня цитозольного кальция в них на фоне глутаматной токсичности, установленное в нашей экспериментальной работе, может быть реализовано за счет прямого антиоксидантного эффекта меконовой кислоты по механизму одноэлектронного переноса на радикальную частицу. Таким образом, снижение интенсивности окислительного стресса МК может облегчить эксай-

тотоксический эффект глутамата. Можно предположить, что действие МК приводит к активации некоторых сигнальных путей, за счет которых может развиваться нейропротекторный потенциал. В литературе встречаются данные, на основании которых можно выдвинуть вышеуказанное предположение, однако, таких работ мало, и это требует более детальных экспериментальных исследований. В работе [48] было показано, что коленовая кислота подавляет фокальный ответ нейронов на переживающих срезах гиппокампа. Предварительная аппликация срезов пикротоксином, являющимся антагонистом рецепторов гамма-аминомасляной кислоты, предотвращала тормозное действие коленовой кислоты. Можно предположить, что меконовая кислота, схожая по строению с коленовой кислотой также может являться агонистом рецепторов гамма-аминомасляной кислоты и оказывать тем самым защитный эффект при гиперстимуляции глутаматных рецепторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в данном исследовании экспериментальные данные о физико-химических свойствах меконовой кислоты и установленный в отношении данного соединения цитопротекторный и антиоксидантный эффект в экспериментах *in vitro* дает основания рассматривать данное вещество как возможный нейропротектор и создает необходимые предпосылки для дальнейшего изучения защитного действия меконовой кислоты, а также других представителей кислот гамма-пирового ряда на ткани головного мозга при моделировании различных нейродегенеративных процессов. Полученные в работе данные о ее физико-химических свойствах могут быть полезны для синтеза и изучения биологических свойств новых координационных соединений на основе меконовой кислоты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках Конкурса научно-инновационных проектов, ориентированных на коммерциализацию № НИП-20.1/15 и государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Я. Шурыгин, *Препарат Бализ* (Периодика Кубани, Краснодар, 2002).
2. Л. В. Шурыгина, Э. И. Злищева и А. А. Кравцов, *Эксперим. клинич. фармакология*, **81** (4), 3 (2018).
3. Л. В. Шурыгин, Э. И. Злищев, А. Н. Кравцова и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **163** (3), 325 (2017).
4. А. А. Кравцов, А. Я. Шурыгин, Н. С. Скороход и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **150** (10), 410 (2010).
5. Л. В. Шурыгина, Э. И. Злищева и А. А. Кравцов, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **165** (4), 457 (2018).
6. Р. В. Кондратенко, А. Н. Чепкова, А. Я. Шурыгин и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **136** (11), 523 (2003).
7. D. S. Kim, S. J. Kim, M. C. Kim, et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **35** (5), 666 (2012).
8. H. A. Oh, H. M. Kim, and H. J. Jeong, *Int. Immunopharmacol.*, **11** (1), 39 (2011).
9. И. В. Рогачевский, В. Б. Плахова, И. Н. Домнин и др., *Клинич. патофизиология*, **1**, 15 (2006).
10. Б. В. Крылов и др., *Пат. РФ № 2322977 С1*, *Бюл. изобретений*, № 12 (2008).
11. N. N. Bukov, L. I. Ivashchenko, and V. T. Panyushkin, *Rus. J. Gen. Chem.*, **91** (4) 1 (2021).
12. O. V. Vetrovoy, E. A. Rybnikova, and M. O. Samoilov, *Biochemistry*, **82** (3), 392 (2017).
13. L. Mezzaroba, D. F. Alfieri, and A. N. Colado Simão, *Neurotoxicology*, **74**, 230 (2019).
14. J. Li, F. Cao, H. L. Yin, et al., *Cell Death Dis.*, **11** (2), 88 (2020).
15. P. Dusek, P. M. Roos, T. Litwin, et al., *J. Trace Elements in Medicine and Biology*, **31**, 193 (2015).
16. X. Wei, X. Yi, X. H. Zhu, et al., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2020**, 1 (2020).
17. R. J. Ward, D. T. Dexter, A. Martin-Bastida, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (7), 3338 (2021).
18. S. Entezari, S. M. Haghi, N. Norouzkhani, et al., *J. Toxicol.*, **2022**, 1 (2022).
19. I. A. Mulder, E. T. van Bavel, H. E. de Vries, et al., *Fluids and Barriers of the CNS*, **18** (1), 46 (2021).
20. B. Bargagna, L. Ciccone, S. Nencetti, et al., *Molecules*, **26** (19), 6015 (2021).
21. S. Paul and E. Candelario-Jalil, *Exp. Neurol.*, **335**, 1 (2021).
22. С. В. Козин, А. А. Кравцов, С. В. Кравченко и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **171** (5), 592 (2021).
23. P. Güntzel, L. Forster, C. Schollmayer, et al., *Org. Prepar. Procedures Int.*, **50** (5), 512 (2018).
24. I. A. Antipova, S. A. Mukha, and S. A. Medvedeva, *Rus. Chem. Bull.*, **53** (4), 780 (2004).
25. Л. В. Шурыгина, А. А. Кравцов, С. В. Козин и др., *Растительные ресурсы*, **53** (2), 291 (2017).
26. F. Neese, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **2**, 73 (2011).
27. A. D. Becke, *Phys. Rev. A*, **38**, 3098 (1988).
28. S. Grimme, S. Ehrlich, and L. Goerigk, *J. Comput. Chem.*, **32**, 1456 (2011).
29. F. Weigend and R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **7**, 3297 (2005).
30. J. Tomasi, B. Mennucci, and R. Cammi, *Chem. Rev.*, **105**, 2999 (2005).
31. С. В. Козин, А. А. Кравцов, А. А. Елкина и др., *Биофизика*, **64** (2), 362 (2019).
32. A. Kravtsov, S. Kozin, A. Basov, et al., *Molecules*, **27** (1), 243 (2022).
33. S. Anitha, S. Krishnan, K. Senthilkumar, et al., *Mol. Physics*, **118**, 17 (2020).
34. J. Rimarcik, V. Lukes, E. Klein, et al., *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, **952**, 25 (2010).
35. V. M. Nurchi, G. Crisponi, J. I. Lachowicz, et al., *J. Inorg. Biochem.*, **104** (5), 560 (2010).
36. E. P. Raven, P. H. Lu, T. A. Tishler, et al., *J. Alzheimer's Dis.*, **37** (1), 127 (2013).
37. B. Do Van, F. Gouel, A. Jonneaux, et al., *Neurobiol. Dis.*, **94**, 169 (2016).
38. J. J. Zhang, J. Du, N. Kong, et al., *Ann. Translat. Med.*, **9** (19), 1503 (2021).
39. X. L. Fang, S. Y. Ding, X. Z. Du, et al., *Front. Neurol.*, **13** (2022).
40. O. Y. Selyutina, P. A. Kononova, V. E. Koshman, et al., *Antioxidants (Basel)*, **11** (2), 376 (2022).
41. S. Satarker, S. L. Bojja, P. C. Gurram, et al., *Cells*, **11** (7), 1139 (2022).
42. A. Scimemi, J. S. Meabon, R. L. Woltjer, et al., *J. Neurosci.*, **33** (12), 5312 (2013).
43. S. Garofalo, G. Cocozza, G. Bernardini, et al., *Brain, Behavior, and Immunity*, **105**, 1 (2022).
44. Z. Shen, M. Xiang, C. Chen, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **151** (2022).
45. A. Jurcau and A. I. Ardelean, *Biomedicines*, **10** (3), 574 (2022).
46. M. Regulaska, M. Szuster-Głuszcak, E. Trojan, et al., *Curr. Neuropharmacol.*, **19** (2), 278 (2021).
47. M. Verma, B. N. Lizama, and C. T. Chu, *Translat. Neurodegeneration.*, **11** (1), 3 (2022).
48. А. А. Кхрплов, А. Н. Чепкова, А. Я. Шурыгин, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **125** (1), 53 (1998).

Meconic Acid Is a Possible Neuroprotector: Justification on *In Vitro* Experiments and Its Physico-Chemical Properties

S.V. Kozin*, **, L.I. Ivashchenko*, A.A. Kravtsov*, **, L.V. Vasilyeva*, A.M. Vasiliev*, N.N. Bukov*, A.A. Dorohova*, **, O.M. Lyasota*, **, A.V. Bespalov*, and S.S. Dzhimak*, **

*Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

**Federal Research Center "Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences",
prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia

Main representatives of gamma pyronic acid are meconic, comenic, chelidonic and kojic acid. It was found that comenic acid exerts a neuroprotective effect, and chelidonic acid has a pronounced anti-inflammatory effect. It was not studied whether meconic acid exhibits neuroprotective effects. The aim of this work was to assess the neuroprotective potential of meconic acid, taking into account its physicochemical properties, using an *in vitro* model of ischemic stroke. Primary neuroglial culture was obtained from the cerebellum of 7–8-day-old Wistar rat pups by mechanical tissue dissociation. The protective effect of meconic acid on the culture of cerebellar neurons was studied using the model of glutamate toxicity and oxygen-glucose deprivation. Quantum mechanical calculations were used and experiments in the model system citrate-phosphate-luminol were conducted by the method of chemiluminescent analysis to investigate the antioxidant activity of meconic acid. The chelating properties of meconic acid with respect to Fe^{3+} in solutions were studied using Job's method. Meconic acid has been found to have a protective effect in *in vitro* models of ischemia. Its action leads to a decrease in the level of intracellular calcium and the restoration of the membrane potential of mitochondria in a culture of cerebellar neurons under glutamate exposure, resulting in an increase in the percentage of living cells under oxygen-glucose deprivation. Meconic acid has a high calculated antioxidant potential, confirmed experimentally. With an increase in the pH of the medium, stepwise binding of meconic acid with Fe^{3+} occurs with the formation of complexes with different ligand/metal ratios. At physiological pH, the composition of the resulting complex is 1 : 3. The obtained antioxidant, chelating, and cytoprotective action of meconic acid provides a basis for further study of the possible neuroprotective properties of this compound in *in vivo* experiments, and the data obtained in the work on its physicochemical properties can be useful for the synthesis and study of new coordination compounds based on meconic acid.

Keywords: antioxidant activity, meconic acid, cerebellar neuron culture, glutamate toxicity, oxygen-glucose deprivation, neuroprotection, iron complexes

ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ ГЕМА И ГЛОБИНА ФРАКЦИОНИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

© 2023 г. Б.Г. Юшков*, **, М.Г. Зуев***, С.А. Бриллиант*, **, А.А. Васин***

*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, ул. Первомайская, 106, Екатеринбург, 620049, Россия

**ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», ул. Карла Маркса, 22а, Екатеринбург, 620026, Россия

***Институт химии твердого тела УрО РАН, ул. Первомайская, 91, Екатеринбург, 620108, Россия

E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Поступила в редакцию 10.10.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Выявлены конформационные изменения гема и глобина фракционированных эритроцитов крыс с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света. Полученные данные показывают, что в крови крыс преобладают (более 80%) нормальные (основные) изоформы гемоглобина, которые выполняют ключевые кислородтранспортную и защитную функции. Однако наличие тяжелых (3%) и легких изоформ (11%), образующихся в результате полимеризации или деградации белка, играет важную роль в организме, поскольку они выполняют дополнительные функции, такие как участие в передаче сигналов и связывание экзогенных лигандов.

Ключевые слова: гемоглобины, метод спектроскопии комбинационного рассеяния света, фракционное центрифугирование.

DOI: 10.31857/S0006302923010040, EDN: NZMURQ

Гемоглобины состоят из смеси близких по структуре молекул, которые методом электрофореза на различных носителях (бумага, агар, крахмал, полиакриламид) удается разделить на фракции. Электрофоретические различия между отдельными белковыми фракциями гемоглобина определяются в первую очередь отличиями первичной структуры белковой молекулы, следовательно, фракционный состав гемоглобина находится под строгим генетическим контролем.

На данный момент описаны первичные структуры более 600 вариантов гемоглобинов различных организмов [1, 2]. Термин «вариант», а не «аномальный», является предпочтительным, поскольку большинство гемоглобинов не связано с заболеванием. В крови одного организма определяются различные типы гемоглобинов, называемых изоформами. Установлено, что у человека выделяются как минимум пять изоформ (H_1 , H_2 , H_3 , HF, HP), у собаки, лошади, кошки — две, у крысы — шесть, а по некоторым данным девять, которые отличаются по своей молекулярной структуре [3, 4]. Молекулярная масса большин-

ства изоформ этого пигмента колеблется в пределах 64.5–68 кДа.

Если различия между вариантами гемоглобинов по молекулярной массе и электрофоретической активности описаны давно и хорошо известны, то насколько они отличаются по своим структурным характеристикам представляется мало изученной проблемой, что обусловлено недостатками обычно применяемых для исследования методик. Одним из современных методов характеристики структурного состояния гемоглобина может служить метод спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановской спектроскопии). В основе этой методики лежит принцип идентификации колебательного состояния фотонов, что позволяет изучить характеристики молекул и структурные изменения молекулярных связей. Целью исследования являлась оценка различий структурных характеристик изоформ гемоглобина с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили крысы-самцы ($n = 16$, в возрасте 3–3.5 месяца) массой 250 г.

Забор крови осуществляли из хвостовой вены животных в объеме 5 мл, используя золотил-ксилазиновый наркоз. Периферическую кровь использовали для разделения эритроцитов на фракции. Для этого 5 мл цельной крови разводили физиологическим раствором (ООО «Гротекс», Россия) в соотношении 1 : 1 и центрифугировали с помощью центрифуги Sigma 3R30 (Россия) в течение 5 мин (1-я проба) при 500 об/мин ($RCF = 19.56 g$). Процедуру повторяли 6 раз, увеличивая время центрифугирования для каждой последующей пробы: 2-я проба – 10 мин, 3-я проба – 15 мин, 4-я – 20 мин, 5-я проба – 25 мин и 6-я проба – 30 мин. После шестого центрифугирования эритроциты в надосадочной жидкости не выявлялись [5, 6].

Изоформы гемоглобина исследовали как в эритроцитах цельной крови, так и в отдельных фракциях клеток. Для этого приготавливали гемолизат клеток, а затем проводили разгонку методом электрофореза в полиакриламидном геле (по Г. Мауреру). Для рамановской спектроскопии гемолизат после каждого центрифугирования высушивали в термостате при $53.8^{\circ}C$ в течение суток. Оценку конформации гема и его белкового окружения в глобине осуществляли с помощью метода комбинационного рассеяния света [7–11].

Для записи спектров комбинационного рассеяния использовали конфокальный рамановский микроскоп inVia Qontor (Renishaw plc, Великобритания), оборудованный двумя полупроводниковыми твердотельными лазерами – на 532 нм (измеряемый диапазон частот от 50 до 4000 см^{-1} , 200 мВт) и 785 нм (диапазон от 50 до 3500 см^{-1} , 300 мВт) – и ICDD-детектором (оптическая чувствительность до 1.08 мкм), а также системой стабилизации положения лазеров и измерительной сотовой плиты.

Перед началом работы прибор был откалиброван с использованием кремниевой пластины в режиме Static при помощи лазера на 532 нм по положению линии Si (520 см^{-1}). Порошкообразные образцы были горизонтально размещены на препаративном стекле, которое при закрытой шторке лазера было установлено в пазе сотовой плиты и закреплено пружинным фиксатором. Для съемки был выбран лазер на 785 нм. Съемку проводили в режиме Extended в диапазоне от 100 до 3200 см^{-1} с автоматической калибровкой по центральной частоте 750 см^{-1} . Для лазера 785 нм (режим точечной съемки – Edge) была выбрана дифракционная решетка 1200 штрихов/мм. При съемке было задано минимально возможное время экспозиции 10 с и мощность лазера 10% от максимальной. Съемку проводили в режиме на-

копления сигнала с числом шагов, равным трем за одно измерение. Для каждой точки в автоматическом режиме проводили по три измерения с временным интервалом между измерениями 2 с. Для каждого образца было проведено четыре независимых измерения в разных точках. Фокусировку лазерного луча на зернах и поверхностях образцов осуществляли при помощи стереоскопической системы (бинокулярные линзы) и системы регулировки положения сотовой плиты, состоящей из двух рукояток – грубой и более тонкой настройки, расположенных под сотовой плитой. Посредством инструментов, включенных в пакет программного обеспечения, обеспечивающего связь между персональным компьютером и прибором, была проведена цифровая очистка полученных спектров от фонового сигнала и шумоподавление при помощи фильтра Савицкого–Голея (фильтр 7-го порядка, длина кадров – 24).

Анализируя частоты колебаний и отношения интенсивностей линий в спектрах комбинационного рассеяния, в геме оценивали различия состояния пиррольных полуколец (1170 см^{-1} , 1355 см^{-1} , 1375 см^{-1} , отношения интенсивностей линий I_{1375}/I_{1172} и I_{1375}/I_{1127}), метиновых мостиков между пирролами (1550 см^{-1} , 1580 см^{-1}), винилов (1620 см^{-1}), атомов железа (1567 см^{-1} , 1550 см^{-1} , 1580 см^{-1} , 1640 см^{-1} , 1355 см^{-1}), $(-C=C-)$ - и $(-C=N-)$ -групп (1620 см^{-1} , 1640 см^{-1}), а в глобине в валентных колебаниях аминокислот, симметричном/ассимметричном растяжении CH_3 -групп, колебаниях CN -концевых метиленовых групп аминокислот (2850 см^{-1} , 2880 см^{-1} , I_{2930}/I_{2850}), полярном окружении аминокислот (2930 см^{-1} , 2940 см^{-1}) и плотности упаковки белка (I_{2850}/I_{2880}), отдельно оценивали лигандсвязывающую способность гемоглобина (1355 см^{-1} , 1375 см^{-1} , 1618 см^{-1} , I_{1375}/I_{1355} , $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$, $I_{1618}/(I_{1355}+I_{1375})$, I_{1618}/I_{1580} , I_{1688}/I_{1580} , $I_{1355}/(I_{1355}+I_{1375})$, I_{1355}/I_{1550} , I_{1375}/I_{1580} , $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$) [8, 9, 12–14].

Достоверность отличий в сравниваемых выборках оценивали с применением непараметрического (рангового) U -теста Манна–Уитни. Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные данные свидетельствуют, что если в цельной крови крыс методом электрофореза в полиакриламидном геле можно выделить шесть отличающихся по электрофоретической подвижности изоформ гемоглобина, то в каждой отдельной фракции клеток всегда содержатся только две изоформы – одна более легкая, другая – тяжелая

Таблица 1. Общие характеристики гема и глобина крыс фракционированных эритроцитов

Фракции эритроцитов						
Показатели	ФЭ-1	ФЭ-2	ФЭ-3	ФЭ-4	ФЭ-5	ФЭ-6
Варианты гемоглобинов	T + T	T + Ht	Ht + Hл	Ht + Hл	Hл + Л	Л + Л
Молекулярная масса, кДа	84.84 ± 1.50 74.51 ± 0.84	83.32 ± 1.0 66.68 ± 0.83	71.89 ± 0.57 64.04 ± 1.08	73.46 ± 1.04 64.55 ± 0.46	61.70 ± 0.52 55.3 ± 0.80	59.09 ± 0.75 50.76 ± 0.82
Соотношение вариантов гемоглобинов, %	46.0% 54.0%	40.0% 60.0%	66.7% 33.3%	56.5% 43.1%	62.9% 37.1%	67.1% 32.5%
Отношения интенсивностей спектральных линий гема в интервале частот 1000–1700 см ⁻¹						
«Плоская» конформация гема, I_{1640}/I_{1375}	0.7719 ± 0.1582	0.5551 ± 0.1004	0.4767 ± 0.1209	0.4676 ± 0.0431	0.5634 ± 0.0433	0.8403 ± 0.1246
Нахождение гема в плоской конформации, I_{1640}/I_{1127}	1.1417 ± 0.2106	0.40701 ± 0.028	1.416 ± 0.1268	1.8565 ± 0.2819	1.2891 ± 0.09805	1.1622 ± 0.0474
«Скрученная» конформация гема, I_{1172}/I_{1375}	0.2481 ± 0.0234 b	0.40701 ± 0.028	0.2532 ± 0.0680 b	0.1748 ± 0.0420 b	0.3752 ± 0.110648	0.2529 ± 0.0542 b
Жесткость белкового окружения гема, I_{1170}/I_{1127}	0.2756 ± 0.0431	0.7725 ± 0.049 a	0.8029 ± 0.0672 a	0.6097 ± 0.0669 a	0.7673 ± 0.2400 c d	0.316 ± 0.1138
Интенсивность спектральных линий пиррольных колец в интервале частот 1300–1370 см ⁻¹						
Ассиметричные колебания пиррольных полуколец оксигемоглобина, 1170 см ⁻¹	1523.5 ± 169.26 b	625.25 ± 128.268 a d	864.25 ± 146.6756	656.5 ± 174.2194	2237.75 ± 699.808 b	1257.25 ± 186.764
Симметричные колебания пиррольных полуколец в молекулах дезоксигемоглобина, 1355 см ⁻¹	8360.667 ± 1073.034 b	1435.68 ± 382.79	4359 ± 2221.8	5594.6 ± 1514.803 b	5820.33 ± 873.01 b	7205.19 ± 497.9538 b
Симметричные колебания пиррольных полуколец в молекулах гемоглобина, связанного с лигандами, 1375 см ⁻¹	6420.25 ± 689.579 b	1396.333 ± 374.2523 a d f	3999.667 ± 2047.55	5025.5 ± 1827.603	4129.0 ± 1186.021 b	6604.308 ± 821.6703 b
Выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных колец, I_{1375}/I_{1172} — конформационные изменения пирролов	4.137624 ± 0.382869	3.979275 ± 1.503758	4.546194 ± 1.149223	7.716417 ± 2.89026	2.532694 ± 0.7819806	4.574989 ± 0.96907
Вклад боковых СН ₃ -групп колебаний полуколец пиррола гема, I_{1375}/I_{1127}	1.33021 ± 0.104345 e	3.07814 ± 1.168709	1.33021 ± 0.104345 e	4.2724 ± 1.135425 a f	2.35965 ± 0.350801	1.189855 ± 0.060178 e
Колебание метиновых радикалов, I_{1127}	4534.5 ± 928.39 b c d	808 ± 160.98 a f	1039.667 ± 227.97 a f	1107.75 ± 288.358 a f	2549.667 ± 390.4367 b c d	4927.75 ± 1040.268 b c d

Колебания метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, I_{1550}	10596.25 ± 2854.195 c d	1385.67 ± 320.33 a c d e f	2623 ± 767 a b e f	4185.6 ± 1024.628 a f	6181 ± 841.26 f	12603.9 ± 1316.547 b c d e
Колебания метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию, I_{1580}	13847.75 ± 2511.795 b c d e	2343.625 ± 382.093 a f	3283.333 ± 585.0453 a f	4897.222 ± 861.4128 a f	6238.625 ± 1270.55 a f	14245.71 ± 1648.57 b c d e
Виниловая полоса — C=C—, I_{1620}	11015.25 ± 2201.64	1916.0 ± 493.9167 a f	2457.75 ± 645.1602 a f	3917.25 ± 1240.147 a f	6038.0 ± 650.681 a b	10669.5 ± 2095.529 b d

Интенсивность спектральных линий железа

Маркер спинового состояния, I_{1567}	13379.02 ± 488.812	2324.0 ± 586.0283 a f	3334.0 ± 661.1953 a f	4718.0 ± 1449.671 a f	8005.667 ± 920.884 a c	13329.0 ± 2473.411
Спиновое состояние железа в дезокси-форме, степень погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца, I_{1550}	10596.25 ± 2854.195	1385.67 ± 320.33 a f	2623.0 ± 767 a f	4185.6 ± 1024.628	6181 ± 841.26 c	12603.9 ± 1316.547 b c d
Спиновое состояние железа в окси-форме, степень погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца, I_{1580}	13847.75 ± 2511.795	2343.625 ± 382.093 a f	3283.33 ± 585.0453 a f	4897.22 ± 861.4128	6238.625 ± 1270.55 f	14245.71 ± 1648.57 b d e
Зависимость от спинового состояния железа эквивалентное состоянию оксигенации анализируемой клетки, I_{1640}	5239.5 ± 1500	1111.5 ± 293.057	1486.0 ± 402.9173	2184.5 ± 714.768	2398.5 ± 678.268	5584.75 ± 1036.506
Редокс-состояние железа (Fe ²⁺) присутствие лиганда, I_{1355} (дезоксигемоглобин)	8360.667 ± 1073.034 b	2739.25 ± 692 a f	4359 ± 2221.8	5594.6 ± 1514.803	5820.33 ± 873.01	7205.19 ± 497.9538 b
Редокс-состояние железа (Fe ²⁺) присутствие лиганда, I_{1375} (оксигемоглобин)	6420.25 ± 689.579 b	2717.25 ± 1347.167 a	3999.667 ± 2047.555	5025.5 ± 1827.603	4129.0 ± 1186.021	6604.308 ± 821.6703 b
Колебание (—C=C—)-связей, I_{1580}	13847.75 ± 2511.795 b c d e	2343.625 ± 382.093 a f	3283.33 ± 585.0453 a f	4897.22 ± 861.4128 a f	6238.625 ± 1270.55 a f	14245.71 ± 1648.57 b c d e

Интенсивность спектральных линий глобина						
Симметричное растяжение СН, окси- и дезоксигемоглобина, I_{2850}	136.25 ± 26.939	69.57 ± 17.966	113.666 ± 13.990	312.77 ± 86.580	316.125 ± 120.62	117.762 ± 33.126
Ассимметричное растяжение СН-, I_{2880}	218.95 ± 41.136	171.25 ± 48.370	256.16 ± 52.54	411.11 ± 82.9307	896.875 ± 340.819 f	166.53 ± 20.701 d
Симметричное СН ₃ -растяжение (оксигемоглобин), I_{2930}	315.644 ± 45.848 d	324.6 ± 59.825	357.5 ± 64.03	747.22 ± 146.03	766.25 ± 57.379 f	306.862 ± 35.612 d
Симметричное СН ₃ -растяжение (дезоксигемоглобин), I_{2940}	202.266 ± 42.776	251.2 ± 53.397	290.166 ± 57.351	396.22 ± 106.25	476.875 ± 79.069	205.0 ± 41.996
Колебания Н-метиновых групп аминокислот, I_{2930}/I_{2850}	2.693 ± 0.611	5.160 ± 0.551	4.325 ± 0.883	3.374 ± 0.76	3.976 ± 0.858	3.485 ± 0.935
Плотность упаковки, I_{2850}/I_{2880}	0.54 ± 0.062 b	0.295 ± 0.072	0.412 ± 0.050 b	0.750 ± 0.119 b	0.355 ± 0.043 b	0.701 ± 0.160 b
Редокс и спиновое состояние железа, наличие лиганда, NO-Гб, I_{1618}	12990.0 ± 1642.103	1917 ± 488.4 a f	2646.33 ± 754.33 a f	4473.4 ± 1093.019 a f	6038 ± 650.628 a b f	11610 ± 1256.17 d

Примечание. ФЭ1–ФЭ6 – фракции эритроцитов с первой по шестую; Т+Т – тяжелые варианты гемоглобина, Т+Нт – нормальные варианты + тяжелая форма, Нт+Нл – нормальные (основные) варианты гемоглобина; Нл+Л – нормальные варианты + легкая форма, Л+Л – легкие варианты гемоглобина; а – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ1 ($p < 0.05$), b – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ2 ($p < 0.05$), c – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ3 ($p < 0.05$), d – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ4 ($p < 0.05$), e – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ5 ($p < 0.05$), f – достоверность изоформ гемоглобина от ФЭ6 ($p < 0.05$).

(табл. 1). В цельной крови наибольшая доля (65%) приходится на нормальные изоформы гемоглобина с молекулярной массой 60–70 кДа (в литературе чаще указывают диапазон 64–68 кДа), 11% составляют тяжелые (более 70 кДа) и 24% – более легкие (менее 60 кДа) изоформы. Возникновение тяжелых изоформ можно связать с полимеризацией, а легких – с деградацией белка.

В полученных в процессе разделения путем центрифугирования шести фракциях клеток первая содержит исключительно тяжелые варианты гемоглобина (84.84 ± 1.50 кДа – 74.51 ± 0.84 кДа), вторая – тяжелую и нормальную изоформы (83.32 ± 1.0 кДа – 66.68 ± 0.83 кДа), третья и четвертая – нормальные в различных сочетаниях (71.89 ± 0.57 кДа – 64.04 ± 1.08 кДа и 73.46 ± 1.04 кДа – 64.55 ± 0.46 кДа), пятая – нормальную и легкую (61.70 ± 0.52 кДа – 55.3 ± 0.80 кДа), шестая – исключительно легкие изоформы (59.09 ± 0.75 кДа – 50.76 ± 0.82 кДа).

Данные спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановской спектроскопии)

свидетельствуют, что варианты гемоглобинов, содержащиеся в различных фракциях эритроцитов отличаются не только по молекулярной массе и электрофоретической подвижности, но и имеют ряд структурных особенностей.

Тяжелые и легкие варианты в одинаковой степени отличаются от нормальных по жесткости белкового окружения гема – I_{1170}/I_{1127} [15], колебаниям метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, – I_{1550} [16], колебаниям метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию, – I_{1580} [12, 16], маркеру спинового состояния – I_{1567} [12, 16], спиновому состоянию железа в дезокси-форме, степени погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца – I_{1550} [12, 16], спиновому состоянию железа в окси-форме, степени погруженности атома железа в плоскость порфиринового

кольца — I_{1580} [12, 16], колебаниям $—C=C—$ связей I_{1580} [14, 17], редокс- и спиновому состоянию железа, наличию лиганда $NO-Gb - I_{1618}$ [18]. Таким образом, как увеличение, так и уменьшение молекулярной массы гемоглобина одинаково сказываются на состоянии гема (табл. 1).

Добавление к нормальному варианту гемоглобина тяжелой формы приводит к увеличению «скрученной» конформации гема I_{1172}/I_{1375} [13], к снижению (замедлению) симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах дезокси-гемоглобина — 1355 см^{-1} [8, 9] и симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах гемоглобина, связанного с лигандами, — 1375 см^{-1} [13], уменьшению колебаний метиновых радикалов — I_{1127} [19], уменьшению колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, — I_{1550} [14, 17].

Добавление к нормальному варианту гемоглобина легкой формы приводит к увеличению колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию, — I_{1580} [12, 16]. Спиновое состояние железа в дезокси-форме, степень погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца повышается в два раза по сравнению с нормальными (основными) изоформами.

Анализ смесей «нормальные + легкая форма» (Нл+Л) и «нормальные + тяжелая форма» (Нт+Т) (табл. 1) показывает, что наибольшие различия между ними касаются симметричных колебаний пиррольных полуколец в молекулах оксигемоглобина — 1170 см^{-1} , симметричных колебаний пиррольных полуколец дезоксигемоглобина — 1355 см^{-1} , колебаний метиновых радикалов, колебаний метиновых мостиков, спинового состояния железа в дезокси-форме, степени погруженности атома железа в плоскости порфиринового кольца — I_{1580} , колебаний $—C=C—$ связей, плотности упаковки, редокс и спинового состоянии железа, наличия лиганда $NO-Gb - I_{1618}$.

Тяжелые варианты гемоглобина (Т+Т) в сравнении с смесью «нормальные + тяжелая форма» (Нт+Т) отличаются «скрученной» конформации гема, также отмечаются различия между смесью «нормальные + тяжелая форма» (Нт+Т) и основными изоформами (Нт+Нл). Жесткость белкового окружения гема (I_{1170}/I_{1127}) увеличивается в фракциях IF2 (Нт+Т), IF3 и IF4 (Нт+Нл) по сравнению с фракцией IF1 (Т+Т), что, вероятно, обусловлено уменьшением расстояния между ковалентно связанными атомами (табл. 1). В литера-

туре описано, что атомы, располагающиеся наиболее близко друг к другу и имеющие тесные межатомные контакты, будут являться наиболее жесткими (твердыми), что обусловлено заданными ковалентными связями и углами [15].

Легкие варианты гемоглобина (Л+Л) отличаются от смеси «нормальные + легкая форма» (Нл+Л) большим увеличением колебаний метиновых радикалов, возрастанием колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин растянут и деформирован, — I_{1550} , ростом колебаний метиновых мостиков между пирролами в молекулах гемоглобина, в которых гемопорфирин имеет более компактную недеформированную конформацию, — I_{1580} , изменениями виниловой полосы — I_{1620} , спинового состояния железа в дезокси-форме, ассиметричным растяжением $CH-$ групп — I_{2880} , симметричным растяжением CH_3 -групп — I_{2930} , редокс- и спиновым состоянием железа, наличием лиганда $NO-Gb - I_{1618}$ (табл. 1).

Лиганд-связывающая способность. Тяжелые и легкие формы обладают наиболее низкой, по сравнению с основными нормальными изоформами IF3-F4 (Нт+Нл), лиганд-связывающей способностью. В одинаковой степени снижены как относительная способность гемоглобина связывать лиганды (I_{1355}/I_{1550}), так и его способность выделять их (I_{1375}/I_{1580}). Наиболее зависимыми от изменений молекулярной массы гемоглобина являются такие показатели, как его сродство к лигандам и колебания метиновых мостиков в геме.

ОБСУЖДЕНИЕ

Считают, что разнообразие форм гемоглобина дает определенные преимущества организму в процессе его приспособления к условиям среды. Хорошо известно, что свободный от стромы гемоглобин очень токсичен из-за воздействия на функции почек, коагуляцию и тонус сосудов. Токсичность гемоглобина в основном обусловлена диамерами и мономерами, вызывающими почечную недостаточность и экстравазацию гемоглобина, который связывается с NO , вызывая тяжелую гипертонию. Увеличение молекулярной массы путем полимеризации или конъюгации уменьшает экстравазацию. Также вязкость прямо пропорциональна молекулярной массе гемоглобина [20]. Оказывается, что полимеризованные гемоглобины улучшают показатели гемодинамики по сравнению с исходной молекулой 64 кДа. Внеклеточный полимерный дигемоглобин человека (130 кДа) менее токсичен для почек и обладает меньшей вазоактивностью по сравнению с гемоглобином 64 кДа [21].

На кинетику полимеризации гемоглобина серповидно-клеточной анемии влияют гемоглобин А2 и фетальный гемоглобин. Известно, что у людей сохранение экспрессии фетального гемоглобина плода во взрослом возрасте улучшает патологические эффекты серповидноклеточной анемии.

Поскольку фетальный гемоглобин при его содержании в цельной крови приблизительно 15–20% от всего белка ингибирует полимеризацию гемоглобина серповидно-клеточной анемии, а при 4–15% снижает развитие вазоокклюзионных кризов на 50%, то его повышение в крови с терапевтической целью создает условия для улучшения состояния пациентов с серповидноклеточной анемией.

Полученные данные показывают, что в крови крыс преобладают (более 80%) нормальные (основные) изоформы гемоглобина, которые выполняют ключевые кислородтранспортную и защитную функции. Однако наличие тяжелых (3%) и легких изоформ (11%), образующихся в результате полимеризации или деградации белка, играют тоже немаловажную роль в организме, поскольку выполняют дополнительные функции, такие как: участвуют в передаче сигналов, связывают экзогенные лиганды и т.д.

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния света в ходе нашего исследования показано, что изоформы гемоглобина отличаются по характеристикам как гема, так и глобина, что отражается на их лиганд-связывающей способности.

Применение спектроскопии комбинационного рассеяния света для оценки структурно-функциональных различий изоформ гемоглобина у крыс показывает перспективность данного подхода в изучении заболеваний крови, связанных с гемоглобином, как в норме, так и при действии на организм экстремальных факторов (или при патологии).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А21-121012090091-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание и выведение животных из эксперимента выполняли согласно правилам, описанным Международным Советом медицинских научных обществ (CIOMS) в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и согласно приказу Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (Этический комитет ИИФ УрО РАН, протокол №01/20 от 8.04.2020 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Н. Федяшкина и Г. В. Максимов, Вестн. Мордов. универ., **3** (4), 141 (2013).
2. A. Bogdanova, L. Kaesthner, et al., Rev. Artic. Front. Physiol., **11**, 392 (2020).
3. И. К. Проскурина и А. В. Титовский, Ярослав. педагогич. вестн., **3** (21), 83 (1999).
4. M. Z. Lu, Y. J. Guo, et al., Spectroscopy and Spectral Analysis, **34** (2), 439 (2014).
5. Б. Г. Юшков и С. А. Бриллиант, Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова, **106** (10), 1312 (2020).
6. Б. Г. Юшков и С. А. Бриллиант, Бюл. эксперим. биологии и медицины, **173** (1), 16 (2022).
7. П. Кэри, *Применения спектроскопии КР и РКР в биохимии* («Мир», М., 1985).
8. О. В. Слатинская, О. Г. Лунева и др. Биофизика, **65** (2), 250 (2020).
9. О. В. Слатинская и Г. В. Максимов, Актуал. вопр. биологии, физики и химии, **4** (2), 283 (2019).
10. И. А. Хуторская, В. П. Балашов и др. Вестн. нов. мед. техн., **23** (3), 55 (2016).
11. K. Ramser, K. Logg, et al. J. Biomed. Opt., **9**, 593 (2004).
12. N. A. Brazhe, S. Abdali, A. R. Brazhe, et al., Biophys. J., **97** (12), 3206 (2009).
13. V. V. Revin, N. V. Gromova, et al., BioMed Res. Int., 973 (2015).
14. I. V. Syusin, V. V. Revin, et al., Biol. Med., **7**, 239 (2015).
15. H. Holtje, W. Sippl, et al., *Molecular Modeling*. Third edition (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2008).
16. А. И. Юсипович, Н. А. Браже и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины, **155** (2), 201 (2013).
17. И. В. Сюсин, Дисс. ... канд. биол. наук (Мордов. гос. ун-т им. Н.П. Огарева, Воронеж, 2015).
18. С. С. Бочкарева, Дисс. ... канд. биол. наук (МГУ имени М.В. Ломоносова, М., 2016).
19. Э. И. Никельшпарг, Дисс. ... канд. биол. наук (МГУ имени М.В. Ломоносова, М., 2019).
20. C. R. Haney and P. W. Buehler, Adv. Drug. Deliv., **40** (3), 153 (2000).
21. V. Budhiraja and J. D. Hellums, Microvasc. Res., **64** (2), 220 (2002).

Study of Heme and Globin Conformation in Fractionated Rat Erythrocytes by Means of Raman Spectroscopy

B.G. Yushkov*, **, M.G. Zuev*, S.A. Brilliant*, **, and A.A. Vasin*****

**Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Pervomayskaya ul. 106, Yekaterinburg, 620049 Russia*

***GAUZ SO "Institute for Medical Cell Technologies", ul. Karla Marksa 22a, Yekaterinburg, 620026 Russia*

****Institute of Solid State Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Pervomayskaya ul. 91, Yekaterinburg, 620108 Russia*

Conformational changes of heme and globin in fractionated rat erythrocytes have been investigated using Raman spectroscopy. The results obtained show that normal isoforms (common variants) of hemoglobin, which plays a key role in oxygen transport and a protective role against oxidative stress, are dominant (more than 80%) in rat blood. However, heavy chain (3%) and light chain isoforms (11%) formed as a result of protein polymerization or degradation perform important roles in the body because they also function in signal transmission and binding to exogenous ligands.

Keywords: hemoglobin, Raman spectroscopy, fractional centrifugation

МОДЕЛЬ ДИФФУЗИИ ЛИПИДОВ В ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

© 2023 г. П.В. Мокрушников*, #, В.Я. Рудяк*, **, ***

*Новосибирский государственный архитектурно-строительный университет (Сибстрин),
Ленинградская ул., 113, Новосибирск, 630008, Россия

**Институт теплофизики им. С.С. Кутателадзе СО РАН, просп. Лаврентьева, 1, Новосибирск, 630090, Россия

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

#E-mail: pavel.mokrushnikov@bk.ru

Поступила в редакцию 20.01.2022 г.

После доработки 10.11.2022 г.

Принята к публикации 16.11.2022 г.

Представлена аналитическая модель латеральной диффузии липидов в неоднородных нативных цитоплазматических мембранах. Методом Фурье-преобразования решено уравнение диффузии для функции распределения липидов по координатам в периодически-неоднородной мембране, в которой коэффициент диффузии описывается гармонической функцией от координат. Показано, что в мембране существует адвекция–диффузия. Модель объясняет наблюдавшиеся ранее экспериментально различные виды диффузии липидов появлением в мембране в результате структурных переходов периодически расположенных неподвижных белок–липидных доменов, связанных со спектрин–актин–анкириновой сетью. Если эти домены одинаковые, то в экспериментах можно наблюдать супер- и субдиффузию, когда среднее квадратичное смещение липидов нелинейно зависит от времени, а их среднее смещение равно нулю. Дрейфовый снос при адвекции меньше хаотического броуновского перемещения липидов, адвекция в эксперименте не наблюдается. В случае, когда не все мембранные белки, связанные со спектрин–актин–анкириновой сетью, одинаково меняют свою конформацию при взаимодействии с лигандами, в мембране возникают две периодические подрешетки неоднородностей из неподвижных белок–липидных доменов вокруг мембранных белков, связанных с цитоскелетом и вложенных одна в другую. В этом случае в экспериментах может наблюдаться хмелевая диффузия, когда периоды нелинейной диффузии молекул сменяются периодами адвекции–диффузии, при которой среднее смещение молекул не равно нулю. Адвекция носит локальный характер и возникает около отдельных белок–липидных доменов. В работе аналитически получены критерии, при которых в периодически-неоднородной мембране экспериментально наблюдается хмелевая диффузия.

Ключевые слова: диффузия липидов, структурные переходы в биомембранах, адвекция в неоднородных слоях.

DOI: 10.31857/S0006302923010052, EDN: NZMXGY

Диффузия липидов в цитоплазматических мембранах является важным механизмом при эндоцитозе и экзоцитозе, связывании лигандов с плазматическими рецепторами, выбрасывании нейротрансмиттеров в синаптическую щель [1, 2]. В этих процессах к месту связывания лиганда с мембраной должны диффундировать за несколько миллисекунд определенные липиды и белки для образования из них рафтов. Это возможно, если после присоединения лиганда к мембране около места присоединения в цитоплазматической мембране возникает адвекция–диффузия этих определенных липидов.

Первой моделью диффузии крупных молекул или группы молекул в мембране была модель Саффмана–Дельбрюка [3], которая представляет собой приближенное решение гидродинамиче-

ской задачи о поступательном движении включения в мембране, окруженной вязкой жидкостью. Эта модель не описывает адекватно все экспериментальные данные, поскольку она не учитывает существование в мембране областей с разной плотностью или вязкостью [4]. В качестве примера можно рассмотреть взаимодействие мембран эритроцитов с андрогенами и гормонами стресса (в дальнейшем просто гормоны). Эти гормоны связываются с адренорецепторами в плазматических мембранах, которые, в свою очередь, взаимодействуют с подмембранной спектрин–актин–анкириновой цитоплазматической сетью. Конформация адренорецепторов менялась, менялась и конформация белков спектрин–актин–анкириновой сети, между активными группами этих белков усиливались связи, возникали новые.

Усиливались также связи между этими белками и окружающими их липидами. Белки сильнее притягивали окружающие их липиды. Вследствие этого вокруг белков, с которыми связались гормоны, образовывались белок-липидные домены, в которых липиды перешли из жидкой неупорядоченной фазы в жидкую упорядоченную фазу $L_d \rightarrow L_o$ или даже в гель-фазу $L_d \rightarrow L_\beta$. Изменение структуры липидного бислоя около белков приводило к значительному увеличению микровязкости липидного бислоя в белок-липидных доменах (до 40%) [5]. Между этими доменами, в области липид-липидных взаимодействий, образуются мезополосы разрыхления, в которых липиды находятся в жидкой неупорядоченной фазе L_d , микровязкость в этих мезополосах ниже (коэффициент диффузии липидов выше), чем в области белок-липидных взаимодействий. Возникает неподвижная квазипериодическая сеть белок-липидных доменов, которая через узловые и анкириновые комплексы связана с цитоскелетом. Но деформации липидного бислоя из-за увеличения плотности липидов в белок-липидных доменах не происходят свободно, этому мешают нити спектрин-актин-анкириновой сети. В мембране возникают механические напряжения растяжения-сжатия. Кроме этого, изменение конформации адренорецепторов передается цитоскелету, нити спектрина сжимаются, создавая в мембране продольные и поперечные усилия. Мембрана теряет устойчивость, покрывается складками. Эти выводы следуют из следующих экспериментальных результатов. Методами атомно-силовой микроскопии установлено, что при взаимодействии с гормонами мембрана эритроцита теряет устойчивость и покрывается периодически расположенными складками с длиной волны 100, 200 или 300 нм и так далее, т.е. с периодом, кратным 100 нм [5]. Это можно объяснить возникновением в мембране периодического поля механических сжатий-растяжений, создаваемого белок-липидными доменами. То, что именно белки являются инициаторами образования белок-липидных доменов, следует из измерения микровязкости мембран флуоресцентным методом. При взаимодействии гормонов с мембраной именно в области белок-липидных взаимодействий сильнее увеличивается микровязкость, в области липид-липидных взаимодействий она возрастает слабее. Результаты ИК-спектроскопии также подтверждают этот вывод, в мембране наблюдается увеличение интенсивности связей внутри белков, белок-липидных и липид-липидных связей. Кратность длины волны складок 100 нм, равной размеру ячейки спектрин-актин-анкириновой сети, крепящейся к мембране со стороны цитоплазмы, говорит о том, что именно мембранные белки, соединенные с цитоскелетом, являются инициаторами образования непо-

движной квазипериодической сети белок-липидных доменов [5]. Она не является строго периодической, поскольку подмембранная спектрин-актин-анкириновая сеть, к которой сеть этих доменов крепится, является квазипериодической.

Чем больше изменяется конформация этих мембранных белков, например, при взаимодействии с некоторыми лигандами, тем сильнее их связи с окружающими их липидами, тем больше по размеру эти домены. Внутри доменов диффузия липидов затруднена, между доменами образуются легкопроницаемые липидные области [5]. Из физических соображений понятно, что липиды будут стремиться передвигаться вдоль этих легкопроницаемых областей, будет возникать нелинейная диффузия липидов в цитоплазматических мембранах. Эта нелинейная диффузия была ранее экспериментально обнаружена [6–10].

Экспериментально диффузия липидов в мембране изучалась различными методами, например, флуоресцентной корреляционной спектроскопией, методом истощения стимулированного излучения [6–10]. В этих работах строились траектории частиц при их перемещении вдоль мембраны и измерялись зависимости среднеквадратичного смещения частиц и среднего смещения от времени. По этим результатам, используя эйнштейновский закон диффузии [11], вычислялась зависимость коэффициента диффузии липидов от времени. В результате были выделены следующие виды диффузии липидов: замедленная (slowed lipid diffusion), ограниченная (confined diffusion), простая броуновская (simple-Brownian), направленная диффузия (directed) и хмелевая (hop diffusion) [6, 7].

Экспериментаторы следующим образом описывают эти различные виды диффузий. На начальном участке зависимости среднеквадратичного смещения от времени по формуле Эйнштейна определяется коэффициент диффузии. При замедленной диффузии кажущийся коэффициент диффузии меньше среднего значения коэффициента диффузии по мембране. При ограниченной диффузии частицы во время броуновского движения не выходили за пределы некоторого очень малого компартмента. При направленной диффузии среднеквадратичное смещение частицы нелинейно зависело от времени. При хмелевой диффузии наблюдалось чередование адвекции-диффузии (латерального потока частиц с наложенным на нее хаотическим броуновским движением) с ограниченной диффузией [6, 7]. При этих разных видах диффузии среднее смещение частицы равно нулю, а зависимость среднеквадратичного смещения частицы $\langle R^2 \rangle$ пропорционально времени наблюдения t^α . Степени $\alpha > 1$ соответствует супердиффузия, $\alpha = 1$ — простая

броуновская диффузия и $\alpha < 1$ — субдиффузия. При хмелевой диффузии наблюдалось чередование адвекции-диффузии (латерального потока частиц с наложенным на неё хаотическим броуновским движением) с ограниченной диффузией [6,7]. Траектория движения отдельного липида похожа плетью хмеля, когда участок траектории при ограниченной диффузии похож на шишечку, а участок траектории при адвекции похож веточку. В цитоплазматических мембранах экспериментально обнаружены все эти виды диффузии липидов [6, 7].

Экспериментально установлено, что на вид диффузии влияют мембранные белки, связанные со спектрин-актин-анкириновой сетью, выступающим изнутри мембрану. Частичная деполимеризация актинового мембранного скелета после обработки латрункулином-А приводила к тому, что почти все (90%) траектории фосфолипидов, наблюдаемые в мембранах, были классифицированы как простой броуновский режим [12]. Это можно объяснить тем, что при деполимеризации белков связи между активными группами белков и окружающих их липидов ослабевают, белки переставали притягивать к себе окружающие их липиды и белок-липидные домены в мембране не образовывались. Мембрана становилась однородной средой, в которой и наблюдалась броуновская диффузия. В исследовании [13] использовали флуоресцентную микроскопию полного внутреннего отражения в сочетании с отслеживанием нескольких отдельных молекул со сверхвысоким разрешением, чтобы создать карты локальной вязкости мембраны с высоким разрешением. Перед этим образцы промывали в нескольких буферах, так что с них были смыты все лиганды, взаимодействующие с мембранными белками и меняющие их конформацию. В результате белок-липидные домены в мембране не возникали, не было обнаружено областей с разным коэффициентом диффузии, везде была простая броуновская диффузия.

Для объяснения экспериментальных результатов ранее изучалась зависимость латеральной диффузии от геометрии мембраны и размера диффундирующей частицы методом Монте-Карло в работе [14]. В частности, здесь было показано влияние на величину коэффициента диффузии аспектного отношения частицы. В одной из моделей исследовалась диффузия частиц в плоском неоднородном слое, состоящем из периодически чередующихся слабопроницаемых и легкопроницаемых участков (модель «гребенки»), методом Монте-Карло [15]. Была установлена возможность существования хмелевой диффузии. Для этой же модели в работах [16, 17] выполнено моделирование адвекции в пористой среде аналитически. Решение получено в интегральном виде. Наконец, стоит упомянуть недавнюю работу [18], где методом молекулярной динамики изучено

влияние неоднородности распределения плотности флюида вблизи стенки в нанометровом канале на диффузию молекул флюида. Показано, что это может приводить к их аномальной диффузии. Неизотропность самодиффузии молекул флюида достаточно естественна и ранее уже устанавливалась методом молекулярной динамики [19], в более сложной среде типа пористой возможна и аномальная диффузия [20].

Подводя итог этому краткому обзору, необходимо отметить, что до сих пор не ясно, при каких условиях в мембране наблюдается хмелевая диффузия. Целью данной работы является изучение диффузии липидов в неоднородной нативной плазматической мембране. Рассматривались две модели периодически неоднородной мембраны, в которых коэффициент диффузии описывается гармонической функцией от координат. В первой модели все мембранные белки, связанные с цитоскелетом, одинаково меняют свою конформацию и одинаково притягивают к себе окружающие их липиды. Образующиеся при этом белок-липидные домены образуют одну периодическую неподвижную решетку неоднородностей в мембране. Во второй модели не все мембранные белки одинаково меняют свою конформацию, по-разному притягивают к себе окружающие их липиды, так что в мембране образуется две подрешетки неоднородностей, вложенных одна в другую. Аналитически получены критерии, при которых в периодически-неоднородной мембране наблюдается хмелевая диффузия. Модель строится в парадигме классической работы Эйнштейна [11] (см. также работу [21]).

ФУНКЦИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КОНФИГУРАЦИОННОМ ПРОСТРАНСТВЕ

Жидкостно-мозаичная модель природной биологической мембраны описывает наличие в ней липидов и мембранных белков и взаимное влияние их конформаций друг на друга [22–24]. Установлено, что мембранные белки и липиды образуют белок-липидные домены. Некоторые из них могут перемещаться по мембране и носят названия «рафтов» [25]. Есть домены, образующиеся вокруг мембранных белков, связанных со спектрин-актин-анкириновой сетью, объединенной с цитоскелетом [5]. Они не перемещаются в мембране. Мембранные белки, связанные со спектрин-актин-анкириновой сетью, располагаются в вершинах равносторонних треугольников со стороной 100 нм, образуя гексагональную сеть [26]. При изменении своей конформации они усиливают имеющиеся и создают новые связи с окружающими их липидами, притягивают сильнее их к себе, создавая вокруг себя белок-липидные домены с повышенной плотностью липидов [5, 27, 28]. В этих доменах коэффициент диффузии липидов меньше, чем в области между доменами.

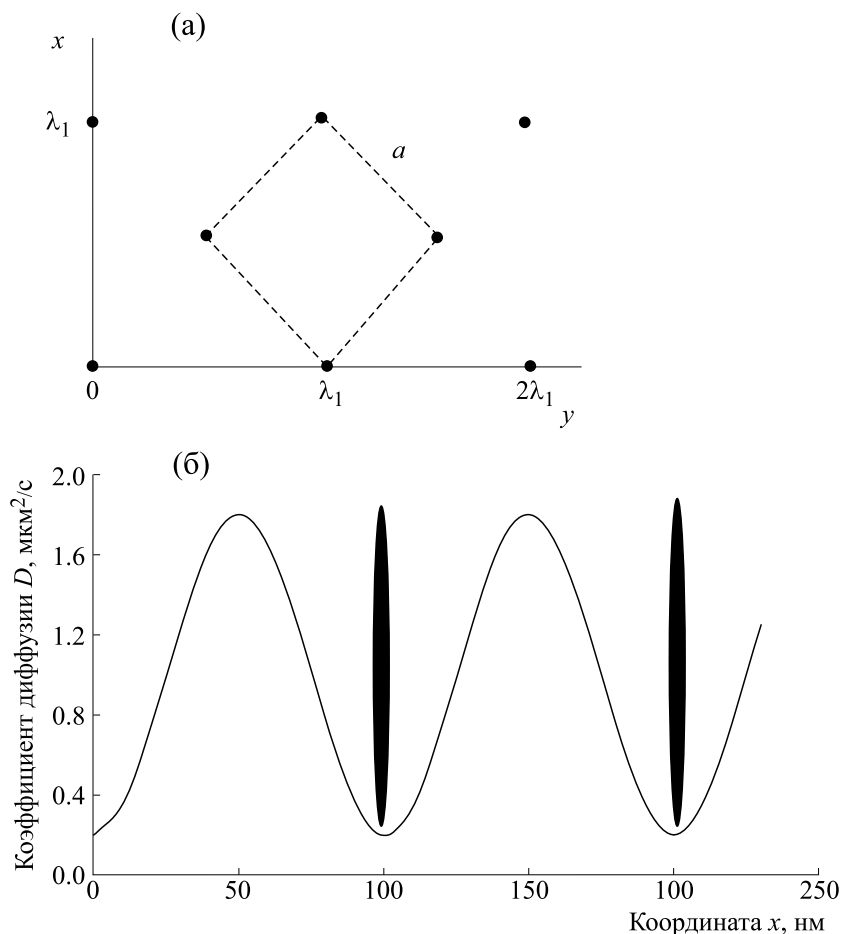


Рис. 1. (а) — Расположение мембранных белков, связанных с цитоскелетом; (б) — зависимость коэффициента диффузии D из (1) от координаты x при $y = 0$. Первый коэффициент диффузии $D_0 = 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$, второй коэффициент диффузии $D_1 = 0.8 D_0$.

Таким образом, при взаимодействии с некоторыми лигандами мембрана разбивается на квазипериодически расположенные неподвижные белок-липидные домены с увеличенной плотностью липидов около мембранных белков, связанных с цитоскелетом, между этими доменами липидный бислой разрыхлен [5, 27, 28]. Мембрана представляет из себя неоднородную среду, в которой слабо- и легкопроницаемые участки чередуются в шахматном порядке. Для простоты в представленной ниже модели предполагается, что белки, связанные со спектрин-актин-анкириновой сетью, располагаются в вершинах равнобедренных прямоугольных треугольников с катетами $a = 71 \text{ нм}$ и гипотенузой 100 нм .

В декартовой системе координат направим оси OX и OY вдоль плоскости мембраны, считая ее бесконечной. Расположение мембранных белков, связанных с цитоскелетом, в рассматриваемой модели представлено на рис. 1а. Будем считать, что давление и температура T постоянны. Изучим зависимость диффузии от времени молекулы липида с начальными координатами вдоль

осей OX и OY равными, соответственно, c и d . В случае, если бы мембрана представляла собой однородную в пространстве и времени плоскость, подвижность липидов определялась бы лишь коэффициентом динамической вязкости среды η и эффективным гидродинамическим радиусом липида R . Диффузия липидов имела бы броуновский характер. Соответствующий коэффициент диффузии тогда был бы равен $D_0 = k_B T / (4\pi\eta R)$, где k_B — постоянная Больцмана.

In vitro показано, что коэффициент диффузии липидов в цитоплазматической мембране меняется в диапазоне от 10^{-13} до $10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ [6, 7]. В данной работе принимается $D_0 = 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$. Белок-липидные домены, связанные с цитоскелетом, будут снижать или повышать коэффициент диффузии в зависимости от координаты рассматриваемой точки мембраны. При связывании с некоторыми лигандами в мембране появляются периодически расположенные, неподвижные белок-липидные домены с повышенной плотностью липидов, разделенных липидными

мезополосами, где плотность липидов понижена [5, 27, 28]. Предположим сначала, что образовались белок-липидные домены с одинаковой плотностью липидов вокруг каждого белка, тогда коэффициент латеральной диффузии липидов в мембране $D(x,y)$ можно интерполировать в виде:

$$D = D_0 - D_1 \cos(k_0 x) \cos(k_0 y), \quad (1)$$

где D_0 и D_1 – первый и второй коэффициенты диффузии. Первый коэффициент диффузии D_0 есть формула Стокса–Эйнштейна для однородной среды, она соответствует броуновской диффузии в однородной мембране, в которой нет белок-липидных доменов. Волновое число $k_0 = 2\pi/\lambda_1$, где $\lambda_1 = 100$ нм. На рис. 16 показана зависимость коэффициента диффузии D , описываемой уравнением (1), от координаты x при $y = 0$. Первый коэффициент диффузии $D_0 = 10^{-12}$ м²/с, второй – $D_1 = 0.8D_0$, $\lambda_1 = 100$ нм. Овалами обозначены неподвижные мембранные белки, связанные со спектрин-актин-анкириновой сетью. При $y = 0$ нм они имеют по x координату 0, 100, 200 нм и т.д. При изменении своей конформации они сильнее притягивают к себе липиды, упорядочен-

ность окружающих их липидов увеличивается. Коэффициент диффузии липидов D около этих белков (в области белок-липидных взаимодействий) наименьший. На границах доменов, в области липид-липидных взаимодействий, коэффициент D наибольший. Такое изменение коэффициента диффузии можно интерполировать гармонической функцией от координат (1). Экспериментально *in vitro* установлено, что максимальное значение коэффициента D в одной мембране может превышать минимальное значение в 20 раз [6, 7], т.е. значение второго коэффициента в формуле (1) может достигать значения $D_1 = 0.9D_0$. На рис. 16 $D_1 = 0.8D_0$.

Рассмотрим диффузию на бесконечной плоскости N_p частиц. Введем функцию распределения частиц по координатам $\Psi(x,y,t) dx dy = dn(x,y,t)$, где $dn(x,y,t)$ – число частиц в области, ограниченной отрезками $[x, x+dx]$ и $[y, y+dy]$, в момент времени t . Вследствие диффузионного характера движения липидов в мембране, функция распределения должна удовлетворять уравнению диффузии:

$$\frac{\partial \Psi}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D(x,y) \frac{\partial \Psi(x,y,t)}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(D(x,y) \frac{\partial \Psi(x,y,t)}{\partial y} \right). \quad (2)$$

Получим решение этого уравнения с помощью преобразования Фурье. Подставляя выражение (1) в уравнение (2), находим:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \Psi(x,y,t)}{\partial t} = & \frac{D_1 k_0}{2} (\sin(k_0(x-y)) + \sin(k_0(x+y))) \frac{\partial \Psi(x,y,t)}{\partial x} + \\ & + \left\{ D_0 - \frac{D_1}{2} (\cos(k_0(x-y)) + \sin(k_0(x+y))) \right\} \left[\frac{\partial^2 \Psi(x,y,t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Psi(x,y,t)}{\partial y^2} \right] + \\ & + \frac{D_1 k_0}{2} (-\sin(k_0(x-y)) + \sin(k_0(x+y))) \frac{\partial \Psi(x,y,t)}{\partial y}. \end{aligned}$$

Применим обратное преобразование Фурье к этому уравнению:

$$\begin{aligned} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\partial \Psi(x,y,t)}{\partial t} \exp(-ik_x x - ik_y y) dx dy = \\ = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ \frac{D_1 k_0}{2} (\sin(k_0(x-y)) + \sin(k_0(x+y))) \frac{\partial \Psi(x,y,t)}{\partial x} + \right. \\ + \left[D_0 - \frac{D_1}{2} (\cos(k_0(x-y)) + \cos(k_0(x+y))) \right] \left[\frac{\partial^2 \Psi(x,y,t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Psi(x,y,t)}{\partial y^2} \right] + \\ \left. + \frac{D_1 k_0}{2} (-\sin(k_0(x-y)) + \sin(k_0(x+y))) \frac{\partial \Psi(x,y,t)}{\partial y} \right\} \exp(-ik_x x - ik_y y) dx dy, \end{aligned}$$

где i – мнимая единица. Заменяв гармонические функции экспонентами по формуле Эй-

лера, для компонент Фурье-образов вместо уравнения (2) получим:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial \Psi^*(k_x, k_y, t)}{\partial t} = & \frac{D_1 k_0 (k_x - k_0)}{4} \Psi^*(k_x - k_0, k_y + k_0, t) - \\
& - \frac{D_1 k_0 (k_x + k_0)}{4} \Psi^*(k_x + k_0, k_y - k_0, t) + \frac{D_1 k_0 (k_x - k_0)}{4} \Psi^*(k_x - k_0, k_y - k_0, t) - \\
& - \frac{D_1 k_0 (k_x + k_0)}{4} \Psi^*(k_x + k_0, k_y + k_0, t) - D_0 (k_x^2 + k_y^2) \Psi^*(k_x, k_y, t) + \\
& + \frac{D_1}{4} \{ (k_x - k_0)^2 + (k_y + k_0)^2 \} \Psi^*(k_x - k_0, k_y + k_0, t) + \\
& + \frac{D_1}{4} \{ (k_x + k_0)^2 + (k_y - k_0)^2 \} \Psi^*(k_x + k_0, k_y - k_0, t) + \\
& + \frac{D_1}{4} \{ (k_x - k_0)^2 + (k_y - k_0)^2 \} \Psi^*(k_x - k_0, k_y - k_0, t) + \\
& + \frac{D_1}{4} \{ (k_x + k_0)^2 + (k_y + k_0)^2 \} \Psi^*(k_x + k_0, k_y + k_0, t) - \\
& - \frac{D_1 k_0 (k_y + k_0)}{4} \Psi^*(k_x - k_0, k_y + k_0, t) + \frac{D_1 k_0 (k_y - k_0)}{4} \Psi^*(k_x + k_0, k_y - k_0, t) + \\
& + \frac{D_1 k_0 (k_y - k_0)}{4} \Psi^*(k_x - k_0, k_y - k_0, t) - \frac{D_1 k_0 (k_y + k_0)}{44} \Psi^*(k_x + k_0, k_y + k_0, t),
\end{aligned} \tag{3}$$

где $\Psi^*(k_x, k_y, t) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi(x, y, t) \exp(-ik_x x - ik_y y) dx dy$.

Для дальнейшего решения докажем, что

$$\Psi^*(k_x + k_0, k_y + k_0, t) = \exp(-i(k_0 x + k_0 y)) \Psi^*(k_x, k_y, t). \tag{4}$$

Действительно, пусть $k_0 = \text{const}$, тогда

$$\begin{aligned}
& \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi^*(k_x + k_0, k_y + k_0, t) \exp(ik_x x + ik_y y) dk_x dk_y = \\
& = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi^*(k_x + k_0, k_y + k_0, t) \exp(i[(k_x + k_0)x + (k_y + k_0)y - k_0 x - k_0 y]) \\
& \quad d(k_x + k_0) d(k_y + k_0) = \\
& = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi^*(k'_x, k'_y, t) \exp(ik'_x x + ik'_y y - ik_0 x - ik_0 y) dk'_x dk'_y = \\
& = \frac{1}{(2\pi)^2} \exp(-i[k_0 x + k_0 y]) \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi^*(k_x, k_y, t) \exp(ik_x x + ik_y y) dk_x dk_y.
\end{aligned}$$

Здесь сделана замена переменных в интеграле: $k'_y = k_y + k_0, k'_x = k_x + k_0$. Аналогично можно доказать, что

$$\Psi^*(k_x - k_0, k_y - k_0, t) = \exp(i(k_0 x + k_0 y)) \Psi^*(k_x, k_y, t). \tag{5}$$

Используя преобразования (4) и (5), уравнение диффузии для компонент Фурье-образов (3) можно записать в следующем виде:

$$\frac{\partial \Psi(k_x, k_y, t)}{\partial t} = F(k_x, k_y) \Psi^*(k_x, k_y, t), \quad (6)$$

где

$$\begin{aligned} F(k_x, k_y) = & \frac{D_1}{4} \{ (k_x - k_0) k_x + (k_y + k_0) k_y \} \exp(ik_0(x - y)) + \\ & + \frac{D_1}{4} \{ (k_x + k_0) k_x + (k_y - k_0) k_y \} \exp(-ik_0(x - y)) + \\ & + \frac{D_1}{4} \{ (k_x - k_0) k_x + (k_y - k_0) k_y \} \exp(ik_0(x + y)) + \\ & + \frac{D_1}{4} \{ (k_x + k_0) k_x + (k_y + k_0) k_y \} \exp(-ik_0(x + y)) - D_0(k_x^2 + k_y^2). \end{aligned}$$

Решением уравнения (6) является

$$\Psi^*(k_x, k_y, t) = \Psi^*(k_x, k_y, 0) \exp\{F(k_x, k_y)t\},$$

где

$$\Psi^*(k_x, k_y, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi(x, y, 0) \exp(-ik_x x - ik_y y) dx dy.$$

Если в начальный момент времени все диффундирующие броуновские частицы находились в точке с координатами (c, d) , то $\Psi(x, y, 0) dy dx = N_p \delta(c, d)$, где N_p — число диффундирующих частиц, $\delta(x, y)$ — дельта-функция:

$$\Psi^*(k_x, k_y, 0) = N_p \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \delta(c, d) \exp(-ik_x x - ik_y y) dx dy = N_p \exp(-ik_x c - ik_y d).$$

Тогда для функции распределения получается следующее выражение:

$$\Psi(x, y, t) = \frac{N_p}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\{F(k_x, k_y)t + ik_x(x - c) + ik_y(y - d)\} dk_x dk_y,$$

или, вычисляя последний интеграл,

$$\Psi(x, y, t) = \frac{N_p}{4\pi Q_t} \exp\left\{-\frac{[u_1 t - (x - c)]^2 + [u_2 t - (y - c)]^2}{4Q_t}\right\}, \quad (7)$$

где

$$\begin{aligned} Q_t = & \left\{ D_0 - \frac{D_1}{2} (\cos(k_0(x - y)) + \cos(k_0(x + y))) \right\} t, \\ u_1 = & \frac{D_1}{2} k_0 (\sin(k_0(x - y)) + \sin(k_0(x + y))), \\ u_2 = & \frac{D_1}{2} k_0 (-\sin(k_0(x - y)) + \sin(k_0(x + y))). \end{aligned}$$

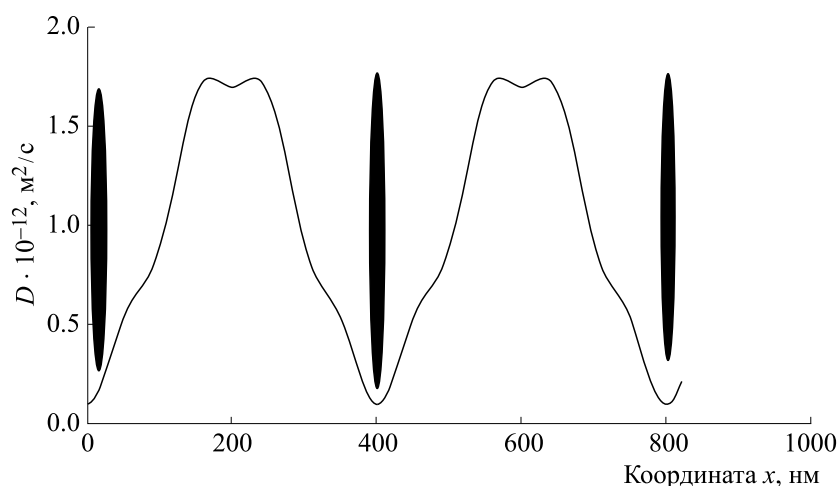


Рис. 2. Зависимость коэффициента диффузии D из (8) от координаты x при $y = 0$.

Здесь u_1 и u_2 есть компоненты двумерного вектора $\mathbf{u}$ скорости адвекции липидов (дрейфовой скорости) вдоль осей OX и OY соответственно. Формула (7) описывает адвекцию–диффузию в плоском слое [16, 17].

Возможны ситуации, когда не все мембранные белки, связанные со спектрин-актин-анкириновой сетью, одинаково меняют свою конформацию при взаимодействии с лигандами. Некоторые меняют свою конформацию очень сильно, усиливая связи с окружающими их липидами или образуя дополнительные связи, так что липиды около таких белков находятся в более упорядоченном состоянии, чем липиды около других белков, чья конформация поменялась не так сильно [21, 22]. Например, если концентрация молекул адреналина или норадреналина мала, то при их инкубации с эритроцитами они связываются специфически не со всеми своими адренорецепторами на поверхности плазматиче-

ских мембран [21, 22]. Те адренорецепторы, с которыми гормоны не связались, свою конформацию не поменяли, поэтому слабее притягивают окружающие их липиды. Плотность окружающих их липидов ниже, чем вокруг адренорецепторов, с которыми гормоны связались и которые сильно поменяли свою конформацию.

Таким образом, около некоторых адренорецепторов липиды находятся в более упорядоченном состоянии, чем липиды около других мембранных белков, тоже связанных со спектрин-актин-анкириновой сетью, но конформация которых изменилась слабо. В мембране возникает две подрешетки неоднородностей липидов, встроенных одна в другую: одна с увеличенной упорядоченностью липидов, в другой решетке упорядоченность липидов тоже увеличилась, но слабее. Коэффициент диффузии в этом случае будет иметь вид

$$D = D_0 - \tilde{D}_1 \cos(k_0 x) \cos(k_0 y) - \tilde{D}_2 \cos(k_2 x) \cos(k_2 y), \quad (8)$$

где $D_0, \tilde{D}_1, \tilde{D}_2$ – первый, второй и третий коэффициенты диффузии соответственно. Если рассматривать мембранные белки, имеющие координату $y = 0$, то вдоль оси OX $\lambda_1 = 100$ нм – расстояние между ближайшими мембранными белками, которые слабо изменили свое конформационное состояние, λ_2 – расстояние вдоль оси OX между ближайшими мембранными белками, которые сильно изменили свое конформационное состояние, $k_0 = 2\pi/\lambda_1$, $k_2 = 2\pi/\lambda_2$. На рис. 2 показана зависимость коэффициента диффузии D из выражения (8) от координаты x при $y = 0$. Первый коэффициент диффузии $D_0 = 10^{-12}$ м²/с, второй

коэффициент диффузии $\tilde{D}_1 = 0.1D_0, \tilde{D}_2 = 0.8D_0$, $\lambda_1 = 100$ нм, $\lambda_2 = 400$ нм. Овалами обозначены мембранные белки, связанные со спектрин-актин-анкириновой сетью, конформация которых очень сильно изменилась. Они имеют вдоль оси OX координату 0, 400, 800 нм и т.д. Коэффициент диффузии D около них наименьший.

Можно найти решение уравнения диффузии (2) для коэффициента диффузии вида (8). Проведя выкладки, аналогичные приведенным выше, получим для функции распределения следующее выражение:

$$\Psi(x, y, t) = \frac{N_p}{4\pi G_1} \exp \left\{ -\frac{[\tilde{u}_1 t - (x - c)]^2 + [\tilde{u}_2 t - (y - c)]^2}{4G_1} \right\}, \quad (9)$$

где

$$\begin{aligned} G_1 &= \left\{ D_0 - \frac{\tilde{D}_1}{2} (\cos(k_0(x - y)) + \cos(k_0(x + y))) - \frac{\tilde{D}_2}{2} (\cos(k_2(x - y)) + \cos(k_2(x + y))) \right\} t, \\ \tilde{u}_1 &= \frac{\tilde{D}_1}{2} k_0 (\sin(k_0(x - y)) + \sin(k_0(x + y))) + \frac{\tilde{D}_2}{2} k_2 (\sin(k_2(x - y)) + \sin(k_2(x + y))), \\ \tilde{u}_2 &= \frac{\tilde{D}_1}{2} k_0 (-\sin(k_0(x - y)) + \sin(k_0(x + y))) + \frac{\tilde{D}_2}{2} k_2 (-\sin(k_2(x - y)) + \sin(k_2(x + y))). \end{aligned}$$

Здесь $\tilde{u}_1$ и $\tilde{u}_2$ есть компоненты двумерного вектора $\tilde{\mathbf{u}}$ скорости адвекции липидов (дрейфовой скорости) вдоль осей OX и OY соответственно [16, 17]. Формула (7) является частным случаем выражения (9), когда третий коэффициент диффузии из выражения (8) равен нулю. Адвекция в обоих моделях носит локальный характер, липи-

ды дрейфуют к локальному центру притяжения, где вязкость мембраны наименьшая, а коэффициент диффузии наибольший.

Используя функции распределения (7) или (9), можно найти среднее смещение частицы вдоль осей OX и OY :

$$\langle x - c \rangle = N_p^{-1} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} (x - c) \Psi(x, y, t) dx dy, \quad \langle y - d \rangle = N_p^{-1} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} (y - d) \Psi(x, y, t) dx dy. \quad (10)$$

Среднеквадратичное смещение частицы составит

$$\langle R^2(t) \rangle = N_p^{-1} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \{ (x - c)^2 + (y - d)^2 \} \Psi(x, y, t) dx dy. \quad (11)$$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Функции (7) и (9) характерны для двумерной адвекции–диффузии [16, 17], которая в экспериментах может наблюдаться как хмелевая диффузия [6, 7]. Но дрейфовый снос $\mathbf{X} = \mathbf{u}t$ в рассматриваемых моделях не всегда больше дисперсии $\sqrt{4G_1 t}$. Когда дрейфовый снос меньше дисперсии, адвекции липидов не видно на фоне их хаотического теплового движения, траектория липидов в мембране соответствует нелинейной диффузии. Получим аналитически условие, когда дрейфовый снос при адвекции липидов больше дисперсии $X \geq \sqrt{4G_1 t}$, т.е. когда хмелевая диффузия будет видна в экспериментах. Для этого рассмотрим эволюцию во времени центрального максимума функции распределения (9), который в начальный момент времени находится в точке (c, d) . Для простоты анализа исследуем движение вдоль одной оси OX , начальную точку берем $(0, 0)$:

$$\frac{\partial \Psi(x, t)}{\partial x} = 0. \quad (12)$$

Уравнение (12) является трансцендентным уравнением относительно квадрата координаты максимума функции распределения (9) $x_{\max}^2(t)$, имеющей бесконечное число решений. Это означает, что функция $x_{\max}^2(t)$ через определенные промежутки времени меняет свой знак. Но отрицательным квадрат координаты максимума функции распределения быть не может. Это означает, что в промежуток времени, когда $x_{\max}^2(t)$ меньше нуля согласно решению уравнения (12), адвекции не существует, а существует только диффузия. Далее наступает промежуток времени, когда существует одновременно адвекция и диффузия. Затем опять наступает промежуток только диффузионного движения липидов и так далее. Для оценки промежутка времени, когда $x_{\max}^2(t) \geq 0$ и существует дрейфовый снос, гармонические

функции в уравнении (12) разложим в ряд Тейлора и оставим члены со степенью не выше $x_{\max}^5$. Получим алгебраическое уравнение:

$$x_{\max} \left\{ a(x_{\max}^2)^2 + bx_{\max}^2 + c \right\} t = 0, \quad (13)$$

где

$$a = \left\{ \frac{1}{6} AC^2 - \frac{1}{6} B^2 C \right\} t^2 - \frac{1}{3} BCt + \frac{1}{6} C; b = -\frac{4}{3} ABCt^2 + \left(2B^2 + \frac{2}{3} AC \right) t; c = 2AB^2 t^2 + 2A.$$

В свою очередь, $A = D_0 - \tilde{D}_1 - \tilde{D}_2$; $B = \tilde{D}_1 k_0^2 + \tilde{D}_2 k_2^2$; $C = \tilde{D}_1 k_0^4 + \tilde{D}_2 k_2^4$.

Решая уравнение (13), можно найти зависимость квадрата координаты максимума функции распределения (9) $x_{\max}^2(t)$ от времени. Когда функция $a(t)$ равна нулю, $x_{\max}^2(t)$ меняет знак. Один из корней уравнения $a(t) = 0$ всегда отрицателен, другой — положителен. Отсюда следует, что в начальный промежуток времени от нуля до $t_0 = \frac{\sqrt{2B^2 - AC} - B}{B^2 - AC}$ существует только диффузия, а далее — диффузия и адвекция. Если в уравнении (12) оставить в разложении большие степени $x_{\max}$, чем в уравнении (13), получится алгебраическое уравнение более высокого порядка, чем уравнение (13). Соответственно, получится не два, а больше моментов времени, когда $x_{\max}^2$ меняет свой знак, можно рассчитать временные интервалы большего числа диффузионных и адвекционных режимов перемещения липидов. Можно сделать оценку, когда в режиме одновременной адвекции и диффузии дрейфовый снос вдоль одной координаты будет больше дисперсии, т.е. когда в эксперименте будет наблюдаться адвекция. Время, когда наблюдается максимальный дрейфовый снос, возьмем равным $t_{\max} = 1/2B$. Время $t_{\max}$ немного больше времени t_0 и лежит в промежутке, где существует адвекция:

$$\tilde{D}_1 k_0 t_{\max} + \tilde{D}_2 k_2 t_{\max} > \sqrt{2(D_0 - \tilde{D}_1 - \tilde{D}_2) t_{\max}}. \quad (14)$$

Делая оценку (14) для модели с одной решеткой неоднородности, описываемой уравнением (1), введем коэффициент неоднородности решетки $\beta = D_1/D_0$. Решая уравнение (14), найдем, учитывая, что $\tilde{D}_2 = 0$, что дрейфовый снос будет больше дисперсии при $\beta > 0.8$. При меньших значениях коэффициента неоднородности решетки β адвекция не будет видна на фоне хаотического теплового движения липида. Делая оценку (14) для модели с двумя подрешетками неоднородностей, описываемой уравнением (8), введем второй коэффициент неоднородности решетки $\beta_2 = \tilde{D}_1/D_0$, третий коэффициент неоднородности решетки $\beta_3 = \tilde{D}_2/D_0$ и отношение вол-

новых чисел двух подрешеток $q = k_2/k_0$. Тогда уравнение (14) превратится в

$$\frac{(\beta_2 + \beta_3 q)^2}{\beta_2 + \beta_3 q^2} > 4(1 - \beta_2 - \beta_3). \quad (15)$$

При известных коэффициентах неоднородностей β_2 и β_3 из неравенства (15) можно получить критическое значение отношения волновых чисел двух подрешеток q , при котором начинает наблюдаться хмелевая диффузия в мембране.

Вычисление среднего смещения липидов и среднеквадратичного смещения частицы подтверждает критерии (14) и (15), полученные из аналитического исследования уравнений (7) и (9). Среднее смещение частицы по формуле (10) и среднеквадратичное смещение (11) для разных начальных координат частицы (c, d) вычисляли с помощью программы Mathcad. Для диффузии в однорешеточной модели, описываемой функцией распределения (7), результаты расчетов показаны на рис. 3, где приведена эволюция $\langle R^2 \rangle$ при разных начальных координатах частицы. Здесь $D_0 = 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$, $D_1 = 0.8D_0$, зависимость коэффициента диффузии от координаты x показана на рис. 1б. На рис. 3а представлено среднеквадратичное смещение $\langle R^2 \rangle$ на малом времени наблюдения (от 0 до 700 мкс). Кривая 1 соответствует смещению частицы, имеющей начальные координаты $c = 3 \text{ нм}$, $d = 50 \text{ нм}$ (область липид-липидных взаимодействий, коэффициент диффузии в этой точке $D = 1.786D_0$). Кривая 2 соответствует смещению частицы, имеющей начальные координаты $c = 3 \text{ нм}$, $d = 5 \text{ нм}$ (область белок-липидных взаимодействий, коэффициент диффузии в этой точке $D = 0.253D_0$). Для сравнения дано смещение при простой диффузии с коэффициентом $D_0 = 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ (пунктирная прямая 3). На рис. 3б представлено среднеквадратичное смещение на больших временах наблюдения (от 0 до 5000 мкс), обозначения те же, что и на рис. 3а. Кривые 1 и 2 на этом графике слились вместе при времени наблюдения больше 1500 мкс. Для сравнения здесь снова приведена эволюция при простой броунов-

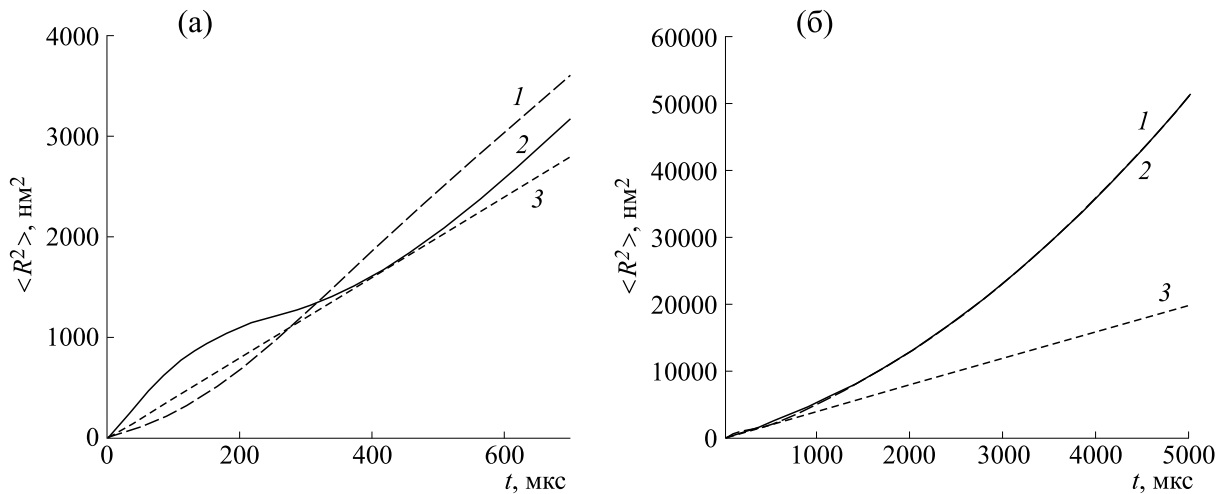


Рис. 3. Эволюция средневекторного смещения частицы от времени при ее различных начальных координатах: (а) — на малых временах, (б) — на больших временах. Кривая 1 соответствует смещению частицы, имеющей начальные координаты $c = 3$ нм, $d = 50$ нм; кривая 2 соответствует смещению частицы, имеющей начальные координаты $c = 3$ нм, $d = 5$ нм; прямая 3 соответствует смещению при простой диффузии с коэффициентом $D_0 = 10^{-12}$ м²/с.

ской диффузии с $D_0 = 10^{-12}$ м²/с (пунктирная прямая).

Анализ рис. 3 показывает, что средневекторное смещение нелинейно зависит от времени, диффузия частиц в неоднородной мембране не является простой броуновской, ее средневекторное смещение нелинейно растет со временем. Но хмелевая диффузия при этом не наблюдается. Согласно критерию (14) для этого коэффициент неоднородности решетки β должен быть больше 0.8, а в рассматриваемом примере $\beta = 0.8$, такой неоднородности недостаточно для возникновения хмелевой диффузии. Частица, стартовавшая из точки с координатами $c = 3$ нм, $d = 5$ нм (область белок-липидных взаимодействий), в промежуток времени от 0 до 300 мкс движется в режиме субдиффузии (кривая 2 на рис. 3а), когда $D \sim t^\alpha$, где $\alpha < 1$. Она перемещается внутри белок-липидного домена, связанного с цитоскелетом. Затем частица покидает свой компартмент (свой белок-липидный домен) и движется в режиме супердиффузии (кривая 2 на рис. 3а), когда $D \sim t^\alpha$, где $\alpha > 1$. У частицы, стартовавшей из точки с координатами $c = 3$ нм, $d = 50$ нм (область липид-липидных взаимодействий) на начальной стадии ($t < 300$ мкс), средневекторное смещение меньше средневекторного смещения при простой броуновской диффузии (кривая 3 на рис. 3а). Ее движение, следуя терминологии, принятой в работах [6, 7], можно назвать режимом замедленной диффузии. При $t > 300$ мкс диффузия частицы трансформируется в супердиффузию (кривая 1 на рис. 3а), здесь ее средневекторное смещение больше средневекторного смещения при простой броуновской диффузии (кри-

вая 3 на рис. 3а). Такой режим в работах [6, 7] трактуется как направленная диффузия, но не хмелевая. В промежутке времени от 0 до 300 мкс средневекторное смещение выше у частицы, стартовавшей из области белок-липидных взаимодействий около мембранного белка. В промежуток времени от 300 до 1000 мкс квадратичное смещение выше у частицы, стартовавшей из области липид-липидных взаимодействий, находящейся между белок-липидными мембранами (рис. 3а).

На больших временах (больше 1500 мкс), как уже отмечалось, кривые 1 и 2 на рис. 3б сливаются. Это означает, что липиды в результате столкновений с другими молекулами мембраны и обмена с ними энергией забывают о своем начальном положении и движутся в одинаковом режиме. Время релаксации для исследуемой диффузии липидов, когда характеристики движения выравниваются равно 1.5 мс. Средние смещения частиц $\langle x - c \rangle$, $\langle y - d \rangle$ вдоль осей x и y на рассматриваемом промежутке времени от 0 до 5000 мкс равны нулю, направленного перемещения (адвекции) липидов вдоль слоя не наблюдается. Таким образом, если при структурном изменении мембраны в ней появлялись неподвижные белок-липидные домены, связанные с цитоскелетом, причем плотность липидов около неподвижных мембранных белков, связанных с цитоскелетом, была одинаковой, то для липидов мембраны реализовывался режим ограниченной диффузии, или замедленной диффузии, или направленной диффузии. Хмелевая диффузия при этом не наблюдается. Для этого коэффициент неоднородности мембраны должен быть больше 0.8, что в

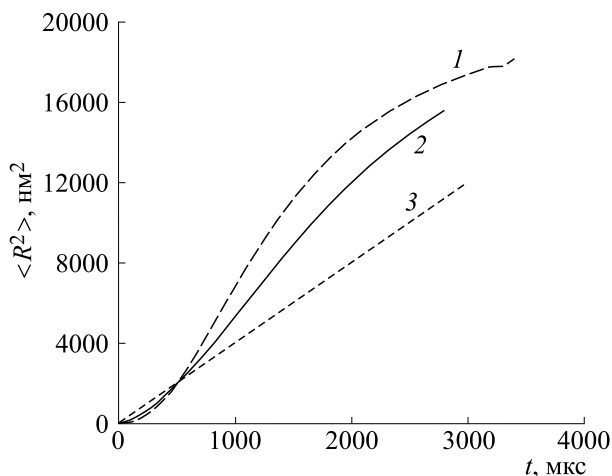


Рис. 4. Эволюция среднеквадратичного смещения частицы для двух разных ее начальных координат. Кривая 1 соответствует смещению частицы, имеющей начальные координаты $c = 5$ нм, $d = 3$ нм; кривая 2 соответствует квадратичному смещению частицы, имеющей начальные координаты $c = 3$ нм, $d = 50$ нм; прямая 3 соответствует простой броуновской диффузии с коэффициентом $D_0 = 10^{-12}$ м²/с.

экспериментах встречается очень редко. Режим определяется начальным положением липида.

Если в результате структурных изменений мембраны образуются две вложенные одна в другую подрешетки неоднородностей, то коэффициент диффузии описывается формулой (8). Качественно диффузия такая же, как и для однорешеточной модели. Но в этой модели в эксперименте может наблюдаться хмелевая диффузия. Результаты расчетов диффузии для этого случая показаны на рис. 4, где представлена эволюция среднеквадратичного смещения частицы при разных ее

начальных координатах. Здесь $D_0 = 10^{-12}$ м²/с, $\tilde{D}_1 = 0.1D_0$, $\tilde{D}_2 = 0.8D_0$, $\lambda_1 = 100$ нм, $\lambda_2 = 400$ нм, второй коэффициент неоднородности $\beta_2 = 0.1$, третий коэффициент неоднородности $\beta_3 = 0.8$, отношение волновых чисел двух подрешеток $q = 0.25$. Если подставить эти значения в критерий (15), то он выполняется. Это означает, что в системе будет наблюдаться хмелевая диффузия (адвекция). Кривая 1 на рис. 4 соответствует смещению частицы, имеющей начальные координаты $c = 5$ нм, $d = 3$ нм (область белок-липидных взаимодействий, коэффициент диффузии в этой точке $D = 0.11D_0$). Кривая 2 соответствует квадратичному смещению частицы, имеющей начальные координаты $c = 3$ нм, $d = 50$ нм (область липид-липидных взаимодействий, коэффициент диффузии в этой точке $D = 0.533D_0$). Для сравнения приведена прямая 3, соответствующая простой броуновской диффузии с коэффициентом $D_0 = 10^{-12}$ м²/с, второй и третий коэффициенты диффузии равны нулю.

Кривые 1 и 2 на рис. 4 соответствуют хмелевой диффузии липидов в плазматической мембране. Это подтверждают и средние смещения частиц от времени, приведенные на рис. 5. На рис. 5а даны средние смещения от времени в плоскости OXY частиц, стартовавших соответственно из начальной точки с координатами $c = 5$ нм, $d = 3$ нм (область белок-липидных взаимодействий), что соответствует кривой 1 на рис. 4 и $c = 3$ нм, $d = 50$ нм (область липид-липидных взаимодействий), что соответствует кривой 2 на рис. 4. Промежуток времени наблюдения на рис. 5а и 5б от 0 до 3100 мкс. Старт движения частиц на рис. 5 находится в точках с координатами (0; 0). На рис. 5 каждый квадрат соответствует среднему смеще-

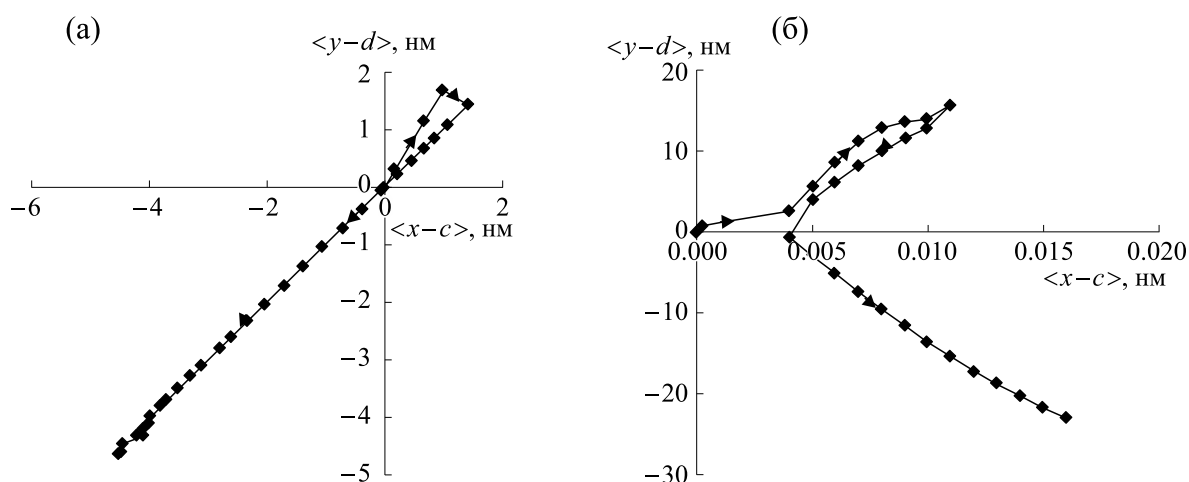


Рис. 5. Среднее смещение в плоскости xy от времени частиц с начальными координатами: (а) — $c = 5$ нм, $d = 3$ нм (область белок-липидных взаимодействий); (б) — $c = 3$ нм, $d = 50$ нм (область липид-липидных взаимодействий).

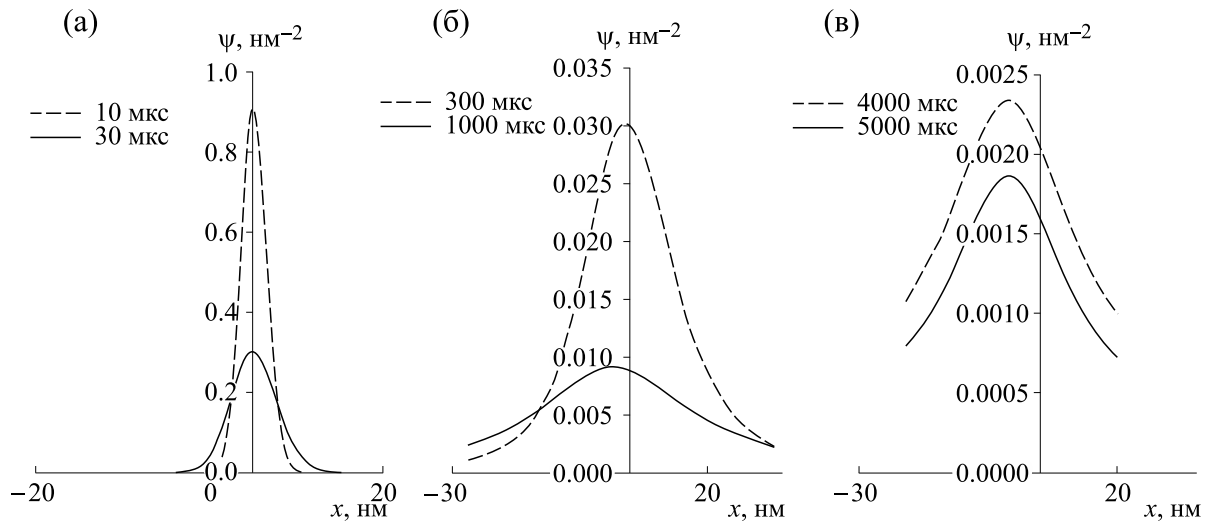


Рис. 6. Сечение функции распределения липида вдоль оси x при постоянной координате $y = 3$ нм, стартовавшего из области белок-липидного взаимодействия с начальными координатами $c = 5$ нм, $d = 3$ нм в разные моменты времени.

нию частицы через каждые 100 мкс. Квадраты соединены линией, которая соответствует усредненной по времени траектории движения частицы вдоль мембраны. Стрелками показаны направления движения частицы.

Характер диффузии частиц в обоих случаях качественно подобен и меняется с течением времени. На начальной стадии эволюции имеет место супердиффузия. Однако кривые 1 и 2 в промежутке времени от 0 до 50 мкс имеют наклон меньше, чем у прямой, описывающий эволюцию при простой диффузии (рис. 4). Это значит, что в этом промежутке диффузия частицы затруднена и ее эффективный коэффициент диффузии ниже, что согласно работам [6, 7] можно трактовать как режим замедленной диффузии. На этом промежутке времени среднее смещение частицы вдоль осей OX и OY равно нулю (рис. 5а). Далее, начиная с времени 850 мкс характер диффузии обеих частиц меняется, причем наклон кривых среднеквадратичного смещения оказывается выше, чем у прямой 3 для простой диффузии (рис. 4). На этом промежутке времени осуществляется адвекция-диффузия, среднее смещение частицы при этом не равно нулю (см. рис. 5). Время начала режима адвекции совпадает с оценкой t_0 из решения уравнения (13). Происходит перенос частицы к локальному центру притяжения. В промежутке времени $t > 2900$ мкс частица движется в режиме субдиффузии (ограниченной диффузии согласно работам [6, 7]). Изменение начальных координат частиц лишь количественно влияет на характер эволюции частиц 1 и 2. Среднее смещение липида, стартовавшего из области липид-липидного взаимодействия, в три раза больше, чем смещение липида, стартовавшего из области белок-ли-

пидного взаимодействия. Последнее хорошо иллюстрируется сопоставлением эволюции частиц 1 и 2, приведенных, соответственно на рис. 5а и 5б.

Различия характеров диффузии липидов, стартовавших из разных областей мембраны можно увидеть и с помощью функций распределения. На рис. 6 изображены последовательно в разные моменты времени сечение функции распределения липида вдоль оси x при постоянной координате $y = 3$ нм, стартовавшего из области белок-липидного взаимодействия с начальными координатами $c = 5$ нм, $d = 3$ нм. Функции распределения соответствует кривой 1 на рис. 5. По оси абсцисс отложена координата x , по оси ординат — функция распределения. Функция распределения Ψ имеет размерность нм^{-2} , $N_p = 1$. Ось ординат пересекает ось абсцисс при $x = 5$ нм. На рис. 6а отложены функции распределения при 10 и 30 мкс после начала наблюдения, на рис. 6б — спустя 300 и 1000 мкс, на рис. 6в — спустя 4000 и 5000 мкс. Рис. 6а показывает, что функции распределения имеют гауссовский характер, максимумы распределения находятся при $x = 5$ нм. Затем после времени t_0 из решения уравнения (13) (см. рис. 6б) происходит латеральное ненулевое среднее смещение частицы (адвекция), кривые распределения стали несимметричны и их максимумы смещаются. На рис. 5а это соответствует участку с ненулевым средним смещением. При 300 мкс максимум находится в точке $x = 5$ нм, при 1000 мкс — $x = 2$ нм. Отсюда можно оценить среднюю скорость адвекции частиц мембраны в этот период времени, она оказывается равной около 3 нм/мс. При 4000 и 5000 мкс максимумы функции распределения оставались на одном месте, а

функции распределения — симметричны. Это означает, что адвекция прекратилась и снова наступил период диффузии.

При появлении в мембране двух подрешеток неоднородностей, вставленных одна в другую, на участке мембраны размером около λ_2 на λ_2 появляется центр притяжения для липидов. В этом центре липидный бислой разрыхлен, коэффициент диффузии наибольший. Появляется адвекция липидов, но это локальные потоки, направленные к этому центру притяжения. Суммарного потока вдоль всей мембраны не возникает. Если в этом центре притяжения находится какой-нибудь лиганд, к нему устремляются липиды и белки, необходимые для образования вокруг него белок-липидного домена (рафта), который необходим этому лиганду, например, для эндоцитоза. В этом центре притяжения вокруг лиганда и происходит самосборка рафта. После отсоединения лиганда от мембраны адвекция молекул к этому лиганду прекращается.

Возможно, при создании двух подрешеток неоднородностей в мембране появляются наноканалы, заполненные молекулами воды, попадая в которые липиды начинают направленно перемещаться вдоль мембраны. Наноканалы могут появляться в мезополосах разрыхления, между белок-липидными доменами [5]. Характер движения липидов в этих наноканалах может отличаться от характера движения в мембране. Похожее явление наблюдается при движении наночастиц в наноканалах [29–31]. Связано это с тем, что уравнения переноса в стесненных условиях содержат не только тензор напряжений и вектор теплового потока, но и межфазные силы, ответственные за передачу количества движения и тепла из-за взаимодействия с поверхностями стенок наноканалов [29–31]. Было обнаружено, что вязкость жидкости в наноканале сильно зависит от потенциала взаимодействия между жидкостью и молекулами стенки канала. В частности, увеличение глубины потенциальной ямы этого взаимодействия приводит к увеличению вязкости жидкости. В то же время, если глубина потенциальной ямы мала, вязкость жидкости в наноканале может быть даже ниже, чем ее вязкость в неограниченной системе. Таким образом, вязкость жидкости в наноканале и, следовательно, сопротивление потоку в канале зависит от материала стенок наноканала.

Если говорить об адекватности модели, в предложенной модели рассматривается латеральная диффузия липидов в одном липидном монослое. Их перескоки из одного монослоя в другой (переходы типа «флип-флоп») не учитываются. Между тем в реальных процессах они происходят, особенно при искривлении мембраны. Кроме того, не учитывается разный состав липидов в мембра-

не, считается, что они одинаковые. Таким образом, не рассматриваются эффекты перекрестной диффузии. Сама модель бесконечного монослоя, в котором происходит диффузия, тоже не совсем точно отражает строение замкнутой мембраны. Далее, в нашей модели рассматривается перемещение липидов на участке мембраны размером примерно $50 \times 50 \text{ нм}^2$, что примерно в сто раз меньше размера мембраны эритроцита. При таком приближении рассматривать диффузию липидов в мембране эритроцита как диффузию в плоском бесконечном монослое вполне допустимо. С другой стороны, если рассматривать диффузию липидов при больших временах, то необходимо будет учитывать конечность мембраны и ее замкнутость.

Ранее установлено, что структурные изменения в плазматических мембранах изменяют функции мембран и клеток [32–48]. Несмотря на указанные ограничения предлагаемой модели, она качественно описывает один из механизмов влияния структурных переходов в биомембранах на их функции. В однородной мембране реализуется простая броуновская диффузия частиц, среднее смещение подвижных молекул мембраны равно нулю. При взаимодействии с лигандами мембрана испытывает структурный переход, из-за этого латеральная диффузия липидов становится облегченной, может возникнуть адвекция — локальный поток липидов к центру притяжения. Это облегчает образование подвижных белок-липидных доменов рафтов, с помощью которых происходит эндоцитоз лигандов.

ВЫВОДЫ

В данной работе аналитическими методами исследована модель нелинейной диффузии липидов в цитоплазматической мембране, которая возникает после появления в ней сети неподвижных периодически расположенных белок-липидных доменов, связанных с цитоскелетом. Коэффициент диффузии липидов в этих доменах ниже, чем в промежутках между доменами, так что в мембране он приблизительно описывается периодической от координат функцией. Аналитически показано, что для этой модели существует режим адвекции-диффузии. Было рассмотрено два случая. Если мембранные белки, связанные с цитоскелетом, меняют свою конформацию одинаково, в мембране возникает неоднородная структура из одинаковых неподвижных белок-липидных доменов, образованных вокруг этих мембранных белков. Аналитически показано чередование режимов нелинейной диффузии и совместной адвекции-диффузии. Показано, что от нуля до некоторого времени t_0 наблюдается нелинейная диффузия, далее наступает период адвек-

ции-диффузии, далее опять период нелинейной диффузии и т.д. В эксперименте это не всегда наблюдается в виде хмелевой диффузии. Когда дрейфовый снос при адвекции меньше дисперсии, адвекции липидов не видно на фоне их хаотического теплового движения, траектория липидов в мембране соответствует нелинейной диффузии. Аналитически получены критерии, при выполнении которых в эксперименте можно наблюдать адвекцию липидов. Аналитически показано, что адвекция липидов в случае одной решетки неоднородностей не наблюдается, поскольку коэффициент неоднородности мембраны β должен быть очень высоким ($\beta > 0.8$), что редко выполняется в эксперименте. При меньших значениях коэффициента неоднородности решетки β адвекция не будет видна на фоне хаотического теплового движения липида.

Во втором случае, когда мембранные белки, связанные со спектрин-актин-анкириновой сетью по-разному меняют свою конформацию, они по-разному притягивают к себе окружающие их липиды. Образующиеся при этом белок-липидные домены будут разными, плотность липидного бислоя можно представить как наложение одну на другую двух или более подрешеток неоднородной плотности липидов. Показано, что характер диффузии липидов при этом качественно остается прежним, как и для модели с одной решеткой неоднородности. Но в этом случае уже может наблюдаться хмелевая диффузия, при которой нелинейная диффузия сменяется периодами адвекции-диффузии. Адвекция носит локальный характер, сосредоточена около белок-липидных доменов, в которых увеличение плотности липидов наибольшее. Среднее смещение частиц при адвекции выше у молекул, стартовавших из области липид-липидных взаимодействий. Аналитически получен критерий, при соблюдении которого в эксперименте может наблюдаться хмелевая диффузия. Эта модель хорошо на качественном уровне объясняет экспериментальные результаты измерения перемещения липидов в цитоплазматической мембране.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение No. 075-15-2021-575) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант No. 20-01-00041).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Suzuki, K. Ritchie, E. Kajikawa, et al., *Biophys. J.*, **88** (5), 3659 (2005).
2. R. G. Parton and M. A. del Pozo, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14** (2), 98 (2013).
3. P.G. Saffman, M. Delbrück, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3111 (1975).
4. E. P. Petrov and P. Schuille, *Biophys. J.*, **94** (5), 45 (2008).
5. П. В. Мокрушников, Л. Е. Панин, В. Е. Панин и др., *Структурные переходы в мембранах эритроцитов (экспериментальные и теоретические модели)* (НГАСУ, Новосибирск, 2019).
6. T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, et al., *J. Cell Biol.*, **157** (6), 1071 (2002).
7. T. K. Fujiwara, K. Iwasawa, Z. Kalay, et al., *Mol. Biol. Cell*, **27** (7), 1101 (2016).
8. P. F. Lenne, L. Wawrezinieck, F. Conchonaud, et al., *EMBO J.*, **25** (14), 3245 (2006).
9. A. Honigsmann, S. Sadeghi, J. Keller, et al., *Elife*, **3**, e01671 (2014).
10. M. Renner, Y. Domanov, F. Sandrin, et al., *PLoS One*, **6** (9), e25731 (2011).
11. A. Einstein, *Annal. Der Physik*, **322**(8), 549 (1905).
12. K. Ayscough, *Methods Enzymol.*, **298**, 18 (1998).
13. G. I. Mashanov, T. A. Nenasheva, A. Mashanova, et al., *Faraday Discuss.*, **232**, 358 (2021).
14. M. N. Costa, K. Radhakrishnan, and J. S. Edwards, *J. Biotechnol.*, **151** (3), 261 (2011).
15. Y. A. Domanov, S. Aimon, G. E. S. Toombes, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (31), 12605 (2011).
16. O. A. Dvoretzskaya and P. S. Kondratenko, *J. Exp. Theor. Physics*, **116**, 698 (2013).
17. P. S. Kondratenko and A. L. Matveev, *J. Exp. Theor. Physics*, **157** (4), 703 (2020).
18. G. J. Wang and N. G. Hadjiconstantinou, *Langmuir*, **34** (23), 6976 (2018).
19. V. Andryushchenko and V. Rudyak, *Defect and Diffusion Forum* **312–315**, 417 (2011).
20. V. A. Andryushchenko and V. Ya. Rudyak, *Reports of the Academy of Sciences of the Higher School of the Russian Federation*, **2** (15), 6 (2010).
21. В. Я. Рудяк, *Статистическая аэрогидромеханика гомогенных и гетерогенных сред. Т. 2. Гидромеханика* (НГАСУ. Новосибирск, 2005).
22. S. J. Singer and G. L. Nicolson, *Science*, **175**, 720 (1972).
23. G. L. Nicolson, *Biochim. Biophys. Acta*, **457** (1), 57 (1976).
24. P. V. Mokrushnikov, in *Lipid Bilayers: Properties, Behavior and Interactions*, Ed. by M. Ashrafuzzaman (Nova Science Publishers, NY, 2019), pp. 43–91.
25. J. Morel, S. Claverol, S. Mongrand, et al., *Mol. Cell Proteomics*, **5** (8), 1396 (2006).

26. S.-C. Liu, L. H. Derick, J. Palek, Journal of cell biology **104**, 527 (1987).
27. L. E. Panin, P. V. Mokrushnikov, V. G. Kunitsyn, and B. N. Zaitsev, J. Phys. Chem. B, **114**, 9462 (2010).
28. L. E. Panin, P. V. Mokrushnikov, V. G. Kunitsyn, and B. N. Zaitsev, J. Phys. Chem. B, **115**, 14969 (2011).
29. V. Ya. Rudyak and A. A. Belkin, Doklady Physics, **59**, 604 (2014).
30. V. Ya. Rudyak and A. A. Belkin, Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics **6** (3), 366 (2015).
31. V. Ya. Rudyak and A. A. Belkin, Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics **9** (3), 349 (2018).
32. Л. Е. Панин и П. В. Мокрушников, Вестн. Новосибирского гос. пед. ун-та, **5** (15), 101 (2013).
33. P. V. Mokrushnikov, A. N. Dudarev, T. A. Tkachenko, et al., Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology, **11** (1), 48 (2017).
34. L. E. Panin, P. V. Mokrushnikov, V. G. Kunitsyn, et al., Phys. Mesomechanics, **14** (3–4), 167 (2011).
35. P. V. Mokrushnikov, L. E. Panin, N. S. Doronin, et al., Biophysics, **56** (6), 1074 (2011).
36. P. V. Mokrushnikov, Biophysics, **65** (1), 65 (2020).
37. A. I. Kozelskaya, A. V. Panin, I. A. Khlusov, et al, Toxicol. in Vitro, **37**, 34 (2016).
38. P. V. Mokrushnikov, J. Physics: Conf. Ser. The Conf. Proc. STS35 (Kutateladze Institute of Thermophysics, Sib. Branch of the RAS), 012161 (2019).
39. P. V. Mokrushnikov, E. V. Lezhnev, and V. Ya. Rudyak, AIP Conf. Proc., **2351**, 040054 (2021).
40. P. V. Mokrushnikov, V. Ya. Rudyak, and E. V. Lezhnev, Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics, **12** (1), 22 (2021).
41. L. E. Panin and P. V. Mokrushnikov, Biophysics, **59** (1), 127 (2014).
42. P. V. Mokrushnikov, L. E. Panin, and B. N. Zaitsev, Gen. Physiol. Biophys., **34** (3), 311 (2015).
43. P. V. Mokrushnikov, Biophysics, **62** (2), 256 (2017).
44. Л. Е. Панин, П. В. Мокрушников, Р. А. Князев и др., Атеросклероз, **6**, 12 (2012).
45. В. Г. Куницын, П. В. Мокрушников и Л. Е. Панин, Бюл. Сибирского отделения РАМН, **5** (127), 28 (2007).
46. П. В. Мокрушников, Бюл. Сибирского отделения РАМН, **1** (147), 38 (2010).
47. О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, П. В. Мокрушникови др. Вестн. Уральской мед. акад. науки, **48** (2), 149 (2014).
48. П. В. Мокрушников, Л. П. Осипова, Т. В. Гольцова и А. А. Розуменко, Якутский мед. журн. **54** (2), 15 (2016).

Model of Lipid Diffusion in Cytoplasmic Membranes

P.V. Mokrushnikov* and V.Ya. Rudyak*, **, ***

*Novosibirsk State University of Architecture and Civil Engineering (SIBSTRIN),
Leningradskaya ul. 113, Novosibirsk, 630008 Russia

**Kutateladze Institute of Thermophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Akademika Lavrent'eva 1, Novosibirsk, 630090 Russia

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

An analytical model of lateral lipid diffusion in heterogeneous native cytoplasmic membranes is presented. The Fourier transform method was used to solve the diffusion equation for the coordinate distribution function of lipids in a periodically inhomogeneous membrane, in which the diffusion coefficient is described by a harmonic function of the coordinates. It is shown that advection and diffusion are present in membrane. The model explains different types of lipid diffusion in membrane observed previously in experiments as a result of structural transitions of periodically located fixed protein-lipid domains associated with the spectrin-actin-ankyrin network. If these domains are the same, then super- and subdiffusion can be seen in experiments, when the mean square displacement of lipids depends non-linearly on time, and their average displacement is zero. Drift during advection was less than the chaotic Brownian displacement of lipids, advection was not observed in the experiment. When not all membrane proteins associated with the spectrin-actin-ankyrin network undergo conformational change in the same way upon ligand binding, two periodic sublattices of inhomogeneities arise in the membrane from fixed protein-lipid domains around membrane proteins associated with the cytoskeleton and nested in one another. In this case, hop diffusion can be found in experiments, when periods of nonlinear diffusion of molecules are replaced by periods of advection-diffusion, in which the average displacement of molecules is not zero. Advection is local in nature and occurs near individual protein-lipid domains. In the presented work, criteria are analytically obtained under which hop diffusion is experimentally observed in a periodically inhomogeneous membrane.

Keywords: lipid diffusion, structural transitions in biomembranes, advection in heterogeneous layers

УДК 57.033, 57.013

ЛОКАЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ ТОМОГРАФИЯ НЕРВНОЙ КЛЕТКИ

© 2023 г. Г.Г. Левин*, А.А. Самойленко*, Т.А. Казакова**,
Т.А. Маракуца***, Г.В. Максимов**, ***,#

*Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Озерная ул., 46, Москва, 119361, Россия

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/24, Москва, 119892, Россия

***Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,
Ленинский просп., 4, Москва, 119049, Россия

#E-mail: gmaksimov@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2022 г.

После доработки 12.10.2022 г.

Принята к публикации 25.10.2022 г.

Представленная модификация метода локальной оптической томографии позволяет исследовать динамические процессы субклеточных структур нативных нервных клеток. Преимущество данного подхода заключается в том, что возможен анализ динамики распределения структур нейрона в интересующей точке или области внутри клетки без проведения полной реконструкции изображения клетки. Доказано, что появляется возможность определения размеров, интересующей области клетки и координат субклеточных структур для дальнейшего исследования их динамики. В данной модификации метод локальной томографии позволяет исследовать как клетки, так и клеточные структуры, так как не требует зондирования всего поля зрения. Локальное зондирование интересующей области при функционировании нервной клетки позволит, во-первых, сократить время регистрации данных для получения локальных томограмм и, во-вторых, исследовать одновременно динамику нескольких областей внутри клетки.

Ключевые слова: локальная оптическая томография, нейрон.

DOI: 10.31857/S0006302923010064, EDN: NZPZCQ

В настоящее время метод оптической фазовой микроскопии широко используется для исследования динамики различных процессов в клетке [1, 2]. С помощью оптической фазовой микроскопии были выявлены изменения показателя преломления в ходе функционирования клетки. Однако применение данного метода сопровождается рядом трудностей, связанных, в частности, с проблемой разрешения внутриклеточных структур клетки, чувствительностью и временным разрешением отдельного измерения. В связи с этим особое внимание уделяется разработке методик оптической томографии в фазовой и абсорбционной микроскопии. Однако эти исследования возможны для морфологического анализа отдельной клетки, которая полностью попадает в поле зрения прибора со всех направлений зондирования [3]. В настоящее время методы и алгоритмы традиционной оптической компьютерной томографии не распространяются на клетки более сложной формы, такие, например, как нервные

клетки, имеющие многочисленные отростки и внутриклеточные структуры (ядро, митохондрии и т.п.).

На наш взгляд, существует несколько ограничений, которые снижают эффективность томографических исследований подобных биологических объектов. Во-первых, особенности оптической схемы многокурсного зондирования нативной клетки позволяют исследовать объект только при ограниченном угле обзора [4]. Во-вторых, при некоторых ракурсах объекта (например, нервной клетки) размер превышает область зондирования и приводит к проблеме регистрации неполных проекций. Эти ограничения усложняют задачу реконструкции томограмм с использованием обратного преобразования Радона, доводя ее до некорректной, так как приводят к многочисленным артефактам в восстановленном изображении, компенсация которых существенно ухудшает пространственное разрешение метода. В-третьих, используемые алгоритмы реконструкции изображений, полученных с помощью оптической компьютерной томографии (ОКТ), учитывают только слабые дифракционные эф-

Сокращения: ОКТ — оптическая компьютерная томография, ОРХ — оптическая разность хода.

факты для случая однократного рассеяния в приближении Борна или Рытова для уравнивания эйконала [5]. Очевидно, что в этих случаях градиенты показателя преломления внутри и на границе клетки должны быть малы, и в случае применения метода ОКТ для исследования нативной клетки эти условия не выполняются. Известно, что величина плотности клеточной мембраны существенно превышает плотность структур цитоплазмы и приводит к сильным дифракционным эффектам на краях клетки. Дифракцию света на мембране легко можно наблюдать на любом фазовом изображении клетки. При этом дифракционные искажения проекционных данных локализуются на границах клетки и внутренних ее органелл. Таким образом, использование нелокальных алгоритмов реконструкции ОКТ приводит к искажениям проекций и восстановлению изображения клетки.

Современные методы решения обратных некорректных задач, использующие итерационные процедуры позволяют реконструировать изображение внутриклеточных структур в некотором приближении даже при неполных и неточных проекциях. Однако достоверность полученных изображений вызывает сомнения, а выводы о корреляции полученного изображения и реальных структур клетки необходимо делать с большой осторожностью. При этом теряется основное достоинство томографических методов исследования — высокая чувствительность к локальным изменениям плотности внутри объекта. В связи с этим можно выделить целый ряд задач, при которых не нужно строить трехмерное изображение всей клетки, а достаточно анализировать динамику локальных изменений ее структурных элементов.

В данной работе будут впервые представлены результаты исследования ОКТ нативной нервной клетки (нейрона). Известно, что морфология нейрона включает тело (сому) и ряда отростков (дендриты и аксон), по которым нервный импульс поступает на нейрон или передается на другую клетку. Известно, что в этих структурах нейрона происходят динамические процессы, которые связаны не только с периодическими изменениями мембранного электрического потенциала как в теле клетки, так и ее отростках, но и изменениями в цитоплазме клетки, связанными с перераспределением субклеточных структур цитоскелета (локализация митохондрий или внутриклеточных везикул, содержащих нейромедиаторы). Процесс возбуждения нейрона связан с деполяризацией плазматической мембраны (увеличение мембранного потенциала), что инициирует перераспределение цитоплазматический пулов везикул, вектор которого направлен из центра нервной клетки к плазматической мембране. После завершения деполяризации, везикулы

сливаются с плазматической мембраной (в течение нескольких минут) и молекулы медиатора диффундируют в экстраклеточную среду. Известно, что в крупной (60–80 мкм в диаметре) соме нейрона пиявки серотонин хранится в скоплениях везикул (диаметром 100 нм), а электрическая стимуляция (серия из десяти импульсов частотой 20 Гц) вызывает экзоцитоз (направленное перераспределение везикул от центра клетки к ее периферии) в течение 2–5 мин. С помощью электронных микроскопии установлено, что в состоянии покоя в нейроне скопления везикул локализованы далеко от плазматической мембраны, тогда как после стимуляции нейрона большая часть их перемещается и плотно прилегает к плазматической мембране клетки. В связи с этим, в настоящее время существует насущная задача микроскопического контроля за перераспределением скоплений везикул при функционировании нейрона [6].

Ранее, нами было доказано, что распределение оптической разницы хода (ОРХ) луча света в функционирующем нейроне меняется как во времени, так и в субклеточных структурах нейрона. Установлено, что ОРХ в каждой точке клетки определяется коэффициентом преломления компонентов цитоплазмы, их размерами и количеством, а, главное, зависит от их перераспределения субклеточных структур (везикул и митохондрия, ядро и т.д.). Доказано, что в состоянии покоя у нейрона величина стандартного отклонения ОРХ клетки (динамика распределения ОРХ) незначительно варьирует в околоядерной области и в области плазматической мембраны. Однако при активации ацетилхолиновых рецепторов нейрона и деполяризации мембраны выявлены существенные изменения величины стандартного отклонения ОРХ Retzius-нейрона (распределения ОРХ) [7].

В связи с этим мы считаем, что основным аспектом исследований морфологии и цитологии нейрона является анализ динамики внутриклеточных процессов нервной клетки. Мы предполагаем, что без использования специфических флуоресцентных маркеров структур нейрона локальная ОКТ позволит исследовать динамику трехмерной субклеточной структуры функционирующей нервной клетки.

Цель работы заключалась в том, чтобы с помощью метода локальной оптической томографии разработать методологию анализа динамических процессов в нейроне (в интересующей точке или области без проведения полной реконструкции всего сечения клетки). Для реализации предлагаемой методологии были получены 3D-изображения нейрона, реконструированные методом локальной дифференциальной томографии, определены координаты и дана характеристика

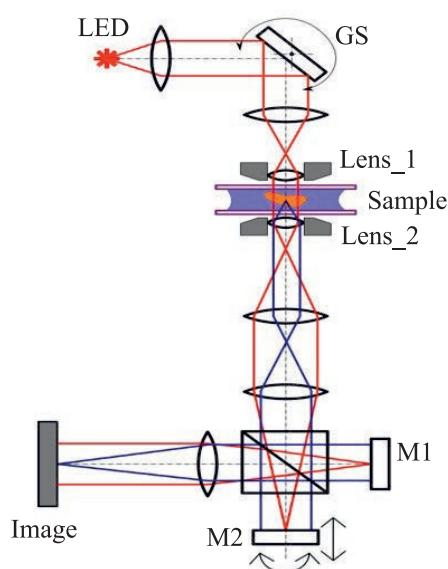


Рис. 1. Схема сдвигового интерференционного микротомографа. Описание рисунка представлено в тексте.

трехмерной структуры отдельных субклеточных структур в заданных точках 3D-изображения клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование первичной культуры гранулярных клеток мозжечка крысы. Для приготовления первичной культуры гранулярных клеток мозжечка использовали двух-четырёхсуточных крыс линии Wistar Kyoto. Декапитацию осуществляли в соответствии с этическими требованиями по работе с животными. После декапитации животных все процедуры с клетками производили в стерильных условиях. Извлеченные мозжечки промывали в холодном бескальциевом и безмагние-вом растворе Хенкса (Gibco, США) с 0.04% NaNHCO_3 , очищали от сосудов, пленок, ствола мозга и других тканей, измельчали, после чего клеточную суспензию помещали на 15 мин в 0.05%-й трипсин с 0.02% ЭДТА при 37°C (Gibco, США). После инкубации клетки на 2–3 мин помещали в 2–3 мл бычьей сыворотки для остановки реакции, а затем двукратно отмывали трипсин стандартным раствором Хенкса с феноловым красным (Gibco, США), и культуральной средой MEM (Minimal Essential Medium, Gibco, США). Клетки диспергировали в свежей среде MEM до получения однородной суспензии, которую центрифугировали 2 мин при 3000 об/мин. Далее осажденные клетки ресуспендировали в среде NBM (Neurobasal Medium, Gibco, США), содержащей 2% Supplement B-27 (Gibco, США), 0.5 мМ GlutaMax (Gibco, США), 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицин (Gibco, США) и 20 мМ KCl (Sigma, США). Под-

счет нейронов проводили в камере Горяева (концентрация нейронов обычно составляла $(1.0\text{--}3.5)\cdot 10^6$ клеток/мл), затем переносили 100–150 мкл клеточной суспензии в чашки Петри, преинкубированные с полиорнитином (Sigma, США) для улучшения адгезии клеток на поверхности чашек Петри. Культивирование осуществляли в среде NBM в течение пяти-семи суток в CO_2 -инкубаторе при 37°C, 5% CO_2 и относительной влажности 98%.

Оптическая локальная дифференциальная томография. Подробное описание экспериментальной установки было представлено в работе [8]. Можно выделить следующие основные характеристики используемого микротомографа. Источником света служил низкокогерентный светодиод, что позволило снизить шумы получаемых изображений; проекции (с разных углов) получали за счет освещения через широкоапертурный объектив. Фазовые изображения получали с помощью сдвигового интерферометра (рис. 1). Источником излучения служил коллимированный линзой (1) точечный светодиод (LED) с размером площадки 80 мкм. Использование светодиода по сравнению с лазером позволяет избавиться от спекл-шумов. Образец (Sample) помещали между двумя покровными стеклами и освещали параллельным лучом света (под разными углами) через широкоапертурный объектив (Lens_1). Наклон луча меняли за счет поворота зеркала (GS) с помощью гальвосканера. Такой способ сканирования лучом позволяет использовать фиксированные объективы и предметный столик, что существенно упрощает конструкцию установки. Диапазон сканирования в нашей установке составил $\sim \pm 60^\circ$.

Изображение клетки получали с помощью объектива Lens_2, идентичного объективу Lens_1. Далее изображение попадало в сдвиговый интерферометр, состоящий из зеркал (M1) и (M2) и светоделительного кубика 50/50 между ними. Сдвиг изображений получали благодаря наклону одного из зеркал. Для реализации алгоритма фазовых шагов одно из зеркал смещалось с помощью пьезоэлемента. Изображение формировали на светочувствительной матрице (Image) с помощью системы линз. Восстановление фазовых изображений производили методом интерферометрии фазовых шагов. В результате каждая полученная проекция представляла собой изображение, аналогичное изображению, полученному в дифференциальном интерференционно-контрастном микроскопе, но с численными значениями, соответствующими производной фазы.

Для калибровки томографа использовали стеклянные сферы размером 5 мкм, что позволило определить размер вокселя в восстановленном изображении (0.1 мкм^3). Время регистрации полного набора проекций составляло 8–10 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности локальной дифференциальной томографии. Локальные алгоритмы томографии отличаются тем, что для восстановления функции в какой-то конкретной точке внутри объекта не требуется измерять поле, прошедшее через весь объект. Достаточно знать значение поля только в небольшой области вокруг выбранной точки. Локальные алгоритмы достаточно широко используются в технических приложениях томографии, так как обладают высокой чувствительностью к изменениям внутренней структуры объекта. Так, например, при исследовании быстропротекающих процессов, аэро- и гидротоков, процессов горения использовались методы томографической аналоговой интерферометрии в оптическом диапазоне, которые позволили визуализировать изображения сечений этих процессов в реальном времени [9]. При этом использовались локальные алгоритмы обратного суммирования, которые позволяли получать некоторые приближения томограмм. Локальный алгоритм синтеза томограмм из дифференциальных проекций нашел применение в рентгеновской томографической дефектоскопии [10]. Ранее в нашей работе [8] были представлены результаты теоретических исследований и математическое моделирование локальных алгоритмов томографии.

Отметим, что изображения, восстановленные по указанным выше алгоритмам локальной томографии, не являются истинными томограммами. Но эти изображения визуально воспринимаются как более четкие, с выраженными границами неоднородностей объекта и инородных включений в нем, что позволяет очень точно определить координаты локализации этих структур внутри клетки. Другой особенностью локальных алгоритмов по дифференциальным проекциям является их высокая чувствительность к изменениям внутри объекта, что делает их перспективными для исследования динамики внутриклеточных процессов [11].

Оптическая томография и 3D-изображение нейрона. Для анализа ОКТ-изображения нативного нейрона использовали программу 3D Slicer, которая позволяла получить и исследовать произвольно ориентированные срезы клетки, строить модели поверхности из меток изображений и аппаратно-ускоренный объемный рендеринг (3D-изображение).

На рис. 2 представлено оптическое изображение нейрона (2D-проекция), на котором отмечены границы нервной клетки (сoma — тело нейрона) и ее отростков (дендриты и аксон).

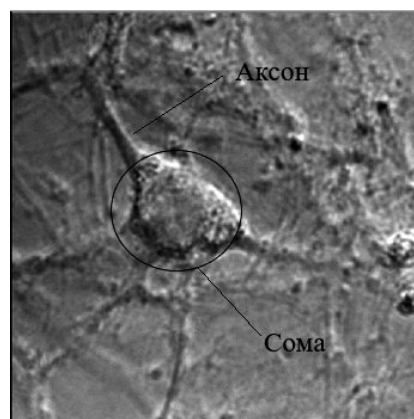


Рис. 2. Изображение нейрона, полученное с помощью оптического микроскопа (2D-проекция), на котором отмечены границы нервной клетки (сомы — тела нейрона) и ее отростков (дендритов).

трансформации 2D-изображения в 3D-изображение с помощью программы 3D Slicer были получены изображения клетки в трех проекциях: горизонтальная (вид сверху) (рис. 3в), профильная (вид спереди, сагиттальная) (рис. 3г) и фронтальная (сбоку) (рис. 3а), а также объемный рендеринг (трехмерный набор данных, где каждая ячейка определяет плотность в этой точке) (рис. 3б).

Так, область ядра нейрона представлена как в горизонтальной проекции (рис. 3в), так и в объемном рендеринге (рис. 3б).

Выделение и характеристика отдельных слоев трехмерной структуры в заданных точках 3D-изображения нейрона. Следующая процедура анализа полученных изображений заключалась в выделении отдельных слоев трехмерной структуры нейрона в заданных точках изображения (рис. 4а,б). Для случая, когда первая структура нейрона была выбрана на уровне -18 мкм, далее с шагом 2 мкм были получены следующие срезы изображения субклеточных структур: область верхнего среза изображения нейрона (рис. 4в; выделена темно-серым цветом) — в области -10.7 мкм, а нижний слой нейрона (рис. 4; выделен светло-серым цветом) — 24 мкм. На следующем этапе анализа изображения с помощью опции инструмента «линейка» были получены размеры высот нейрона (13.28 мкм) и его ядра (8.169 мкм).

В связи с задачей исследования анализировали ОКТ-изображения отростков нейрона и их срезы (рис. 4в).

Отметим, что локальная ОКТ позволила получить изображения слоев (срезы): цитоскелет, ядро, органеллы вокруг ядра (рис. 5а). Очевидно,

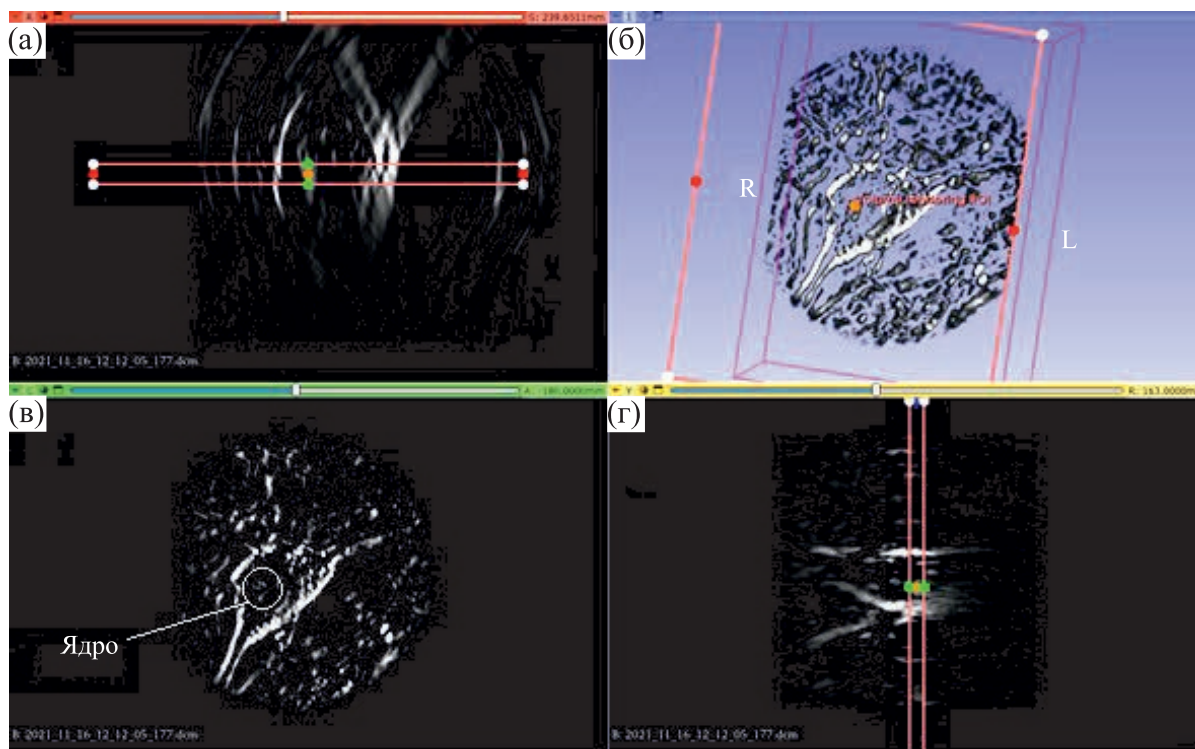


Рис. 3. Проекция нейрона, полученная с помощью программы 3D Slicer: (а) — фронтальная (вид сбоку), (б) — объемный рендеринг, (в) — горизонтальная (вид сверху), (г) — профильная (вид спереди, сагиттальная).

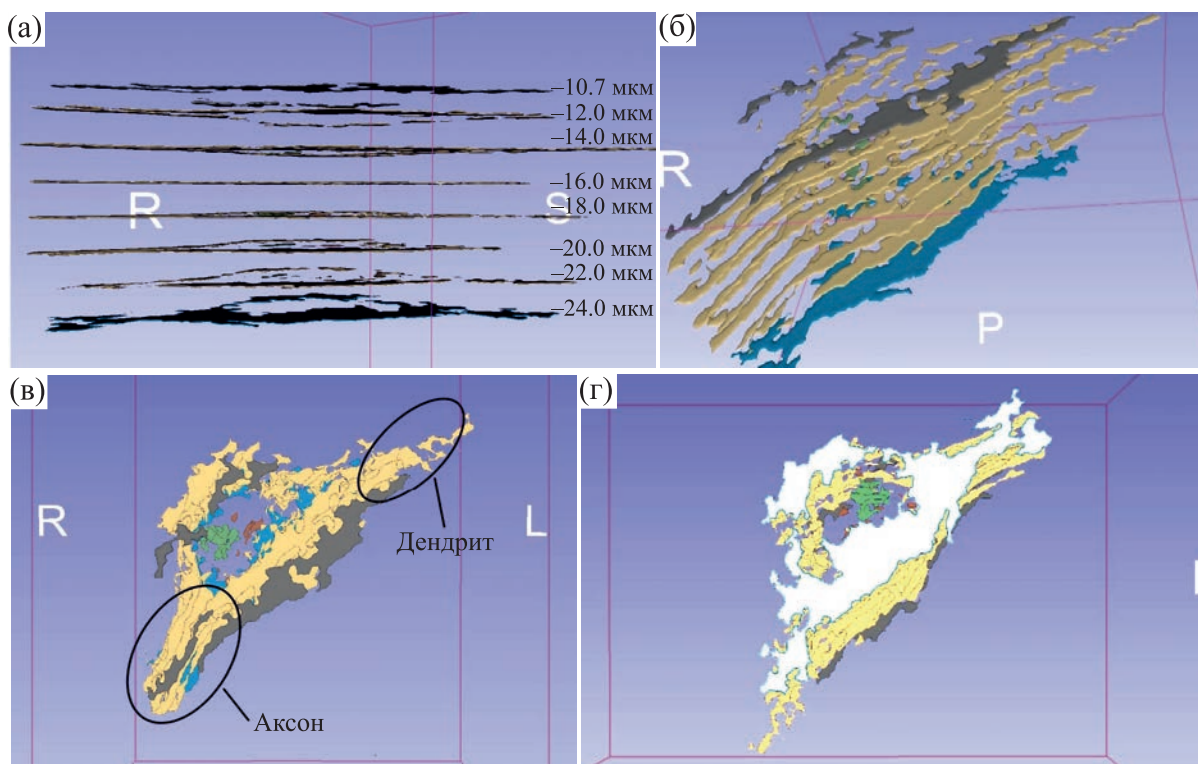


Рис. 4. Срезы нейрона: (а) — срезы (слои) с указанной размерностью в мкм, (б) — срез (слой) под углом, (в) — темно-серым цветом выделен верхний слой нейрона, ОКТ-изображения отростков нейрона (аксон и дендрит), (г) — светло-серым цветом выделен нижний слой.

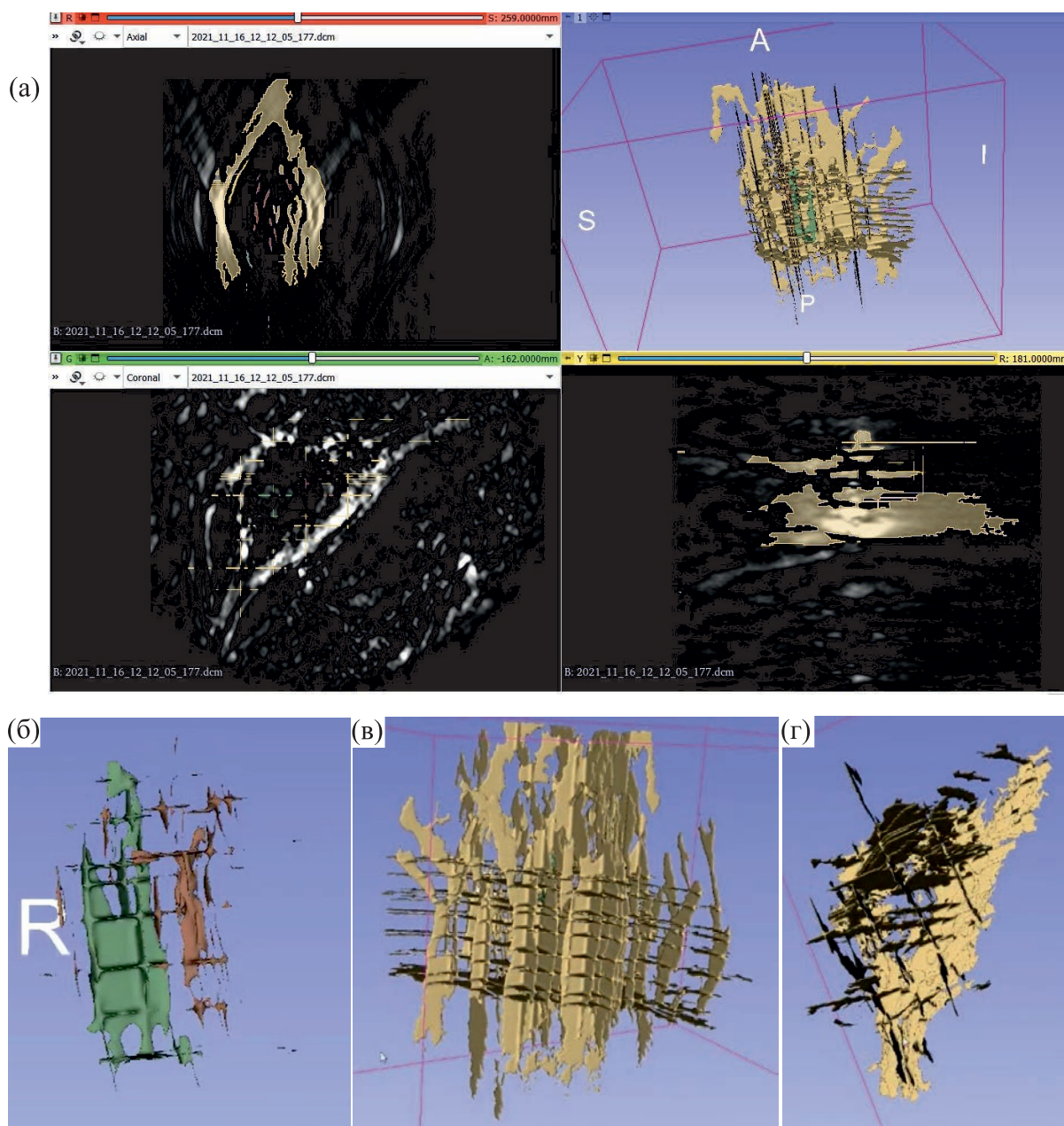


Рис. 5. 3D-изображения нейрона: (а) — слои цитоскелета, ядра и органелл в одной модели, (б) — ядро, (в) — цитоскелет, (г) — область дендрита и аксона.

что данный подход позволит не только исследовать 3D-структуру нейрона и его субклеточных структур, но и динамику изменения этих локальных структур при функционировании нейрона (рис. 5б–г).

С помощью опции «Fill beteen slicer» программы 3D Slicer были получены объемные 3D-изображения нейрона с учетом выделенных слоев (рис. 6а,б), а также область ядра клетки (рис. 6в), цитоскелет (рис. 6г) и область аксона (рис. 6д).

Как отмечалось выше, анализ изображений локальной ОКТ позволяет выбрать локализацию (координаты) исследуемых структур нейрона и оценить их динамику. Например, выберем точку в области ядра клетки (рис. 7а) и определим ее координаты: (24.45289, 11.18260, –16.97716) мкм, в области цитоплазмы клетки (рис. 7б): (28.749766 11.613736 –14.30570) мкм, или же в области аксона (рис. 7в): (14.99557, 7.57512, –14.17602) мкм. Размер указан с учетом перевода пикселей в мкм.

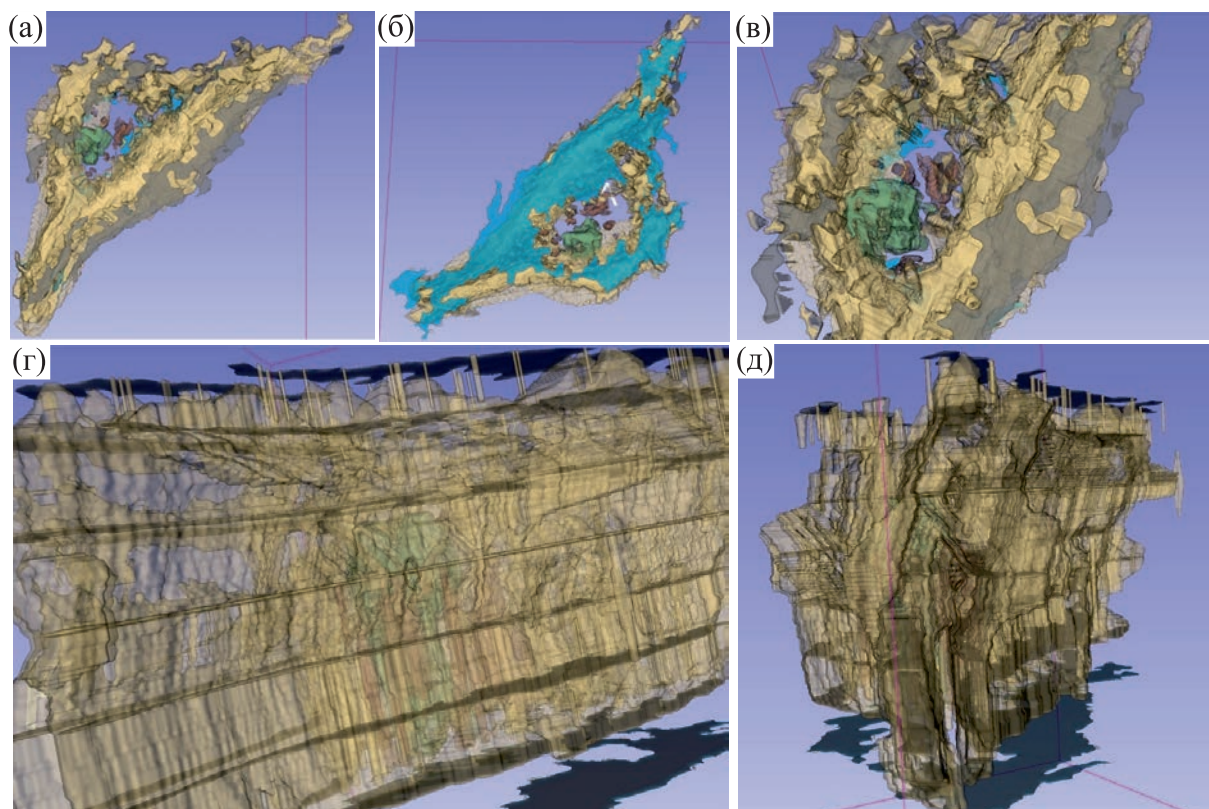


Рис. 6. Объемное 3D-изображение нейрона: (а) — верхний слой, (б) — нижний слой, (в) — область ядра, (г) — цитоскелет в приближении «полупрозрачный», (д) — область аксона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в данной работе результаты использования локальной ОКТ позволяют исследовать динамические процессы в субклеточных структурах функционирующего нейрона [12–16]. Преимущество предлагаемого подхода применения локальной томографии заключается в том, что метод позволяет проводить анализ динамики распределения заданных структур нейрона в интересующей точке или области внутри клетки без проведения полной реконструкции всего сечения объекта. При этом остается возможность определения точных размеров, интересующей области клетки и координат субклеточных структур для исследования их динамики. В данной модификации метод локальной томографии позволяет исследовать большие клетки и клеточные структуры, т.к. не требует освещения (анализа) всего поля зрения. Зондирование только интересующей исследователя части клетки позволяет, во-первых, сократить время регистрации данных для локальных томограмм, и, во-вторых, исследовать одновременно динамику нескольких областей внутри клетки, если они находятся в поле зрения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-79-30062 для МГВ и КТА). Это исследование также было поддержано Междисциплинарной научно-образовательной школой МГУ имени М.В. Ломоносова «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсор работы не участвовал в разработке исследования; при сборе, анализе или интерпретации данных; в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях (1986, 86/609/ЕЕС).

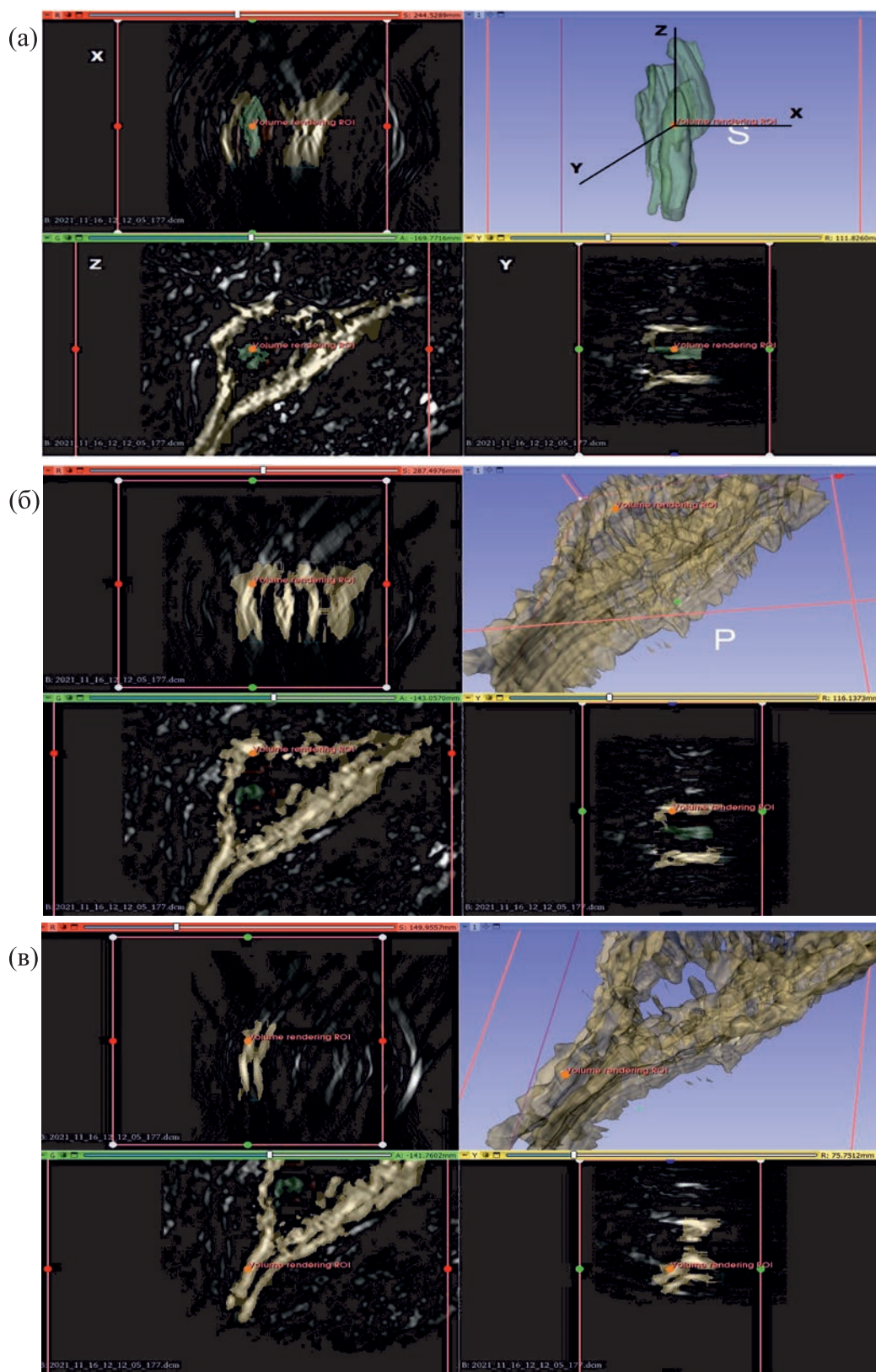


Рис. 7. Выбор локальных координат: (а) — в ядре, (б) — в цитоплазме, (в) — в аксоне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. I. Yusipovich, E. Yu. Parshina, A. A. Baizhumanov, et al., *Instruments and Experimental Techniques*, **64** (6), 877 (2021).
2. А. И. Юсипович, С. М. Новиков, Т. А. Казакова и др., *Квантовая электроника*, **36** (9), 874 (2006).
3. <http://www.tomocube.com> (дата посещения 01.08.2022).
4. G. N. Vishnyakov, G. G. Levin, V. L. Minaev, et al., *Microscopy and Analysis*, **87**, 19 (2004).
5. M. Slaney and A. C. Kak, *Proc. SPIE*, **413**, 2 (1983).
6. T. A. Kazakova, O. N. Suchalko, A. D. Ivanov, et al., *bioRxiv* (The preprint server for biology) (2020).
7. T. A. Kazakova, A. I. Yusipovich, and G. V. Maksimov, *Вестн. МГТУ им. Н.Э. Баумана (Естественные науки)*, **6** (93), 137 (2020).
8. G. N. Vishnyakov, G. G. Levin, V.L. Minaev, et.al., *Opt. Spectrosc.*, **125**, 1065 (2018).
9. G. N. Vishnyakov, G. G. Levin, et al., *Proc. SPIE*, **348**, 596 (1982).
10. Э. И. Вайнберг, И. А. Казак и В. П. Курозаев, *ДАН СССР*, **257** (1), 89 (1981).
11. A. Faridani, E. L. Ritman, and K. T. Smith, *J. Appl. Math.*, **52** (2), 459 (1992).
12. А. Р. Браже, Н. А. Браже, О. В. Сосновцева и др., *Компьютерные исследования и моделирование*, **1** (1), 77 (2009).
13. A. A. Platonova, S. V. Koltsova, G. V. Maksimov, et al., *Biophysics*, **58**, 389 (2013).
14. N. S. Bondarenko, A. I. Yusipovich, S. S. Kovalenko, et al., *Biologicheskie Membrany*, **30** (3), 199 (2013).
15. A. I. Yusipovich, Yu. Berestovskaya, V. Shutova, et al., *Measurement Techniques*, **55** (3), 351 (2012).
16. A. R. Brazhe, N. A. Brazhe, G. V. Maksimov, et al., *J. Biomed. Optics*, **13** (3), 034004 (2008).

Local Optical Tomography of a Nerve Cell

G.G. Levin*, A.A. Samoilenko*, T.A. Kazakova, T.A. Marakutsa***, and G.V. Maksimov**, *****

**All-Russian Research Institute of Optical and Physical Measurements, Ozernaya ul. 46, Moscow, 119361 Russia*

*** Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/24, Moscow, 119892 Russia*

****National Research Technological University "MISiS", Leninskiy prosp. 4, Moscow, 119049 Russia*

The presented modification of the method of local optical tomography makes it possible to study the dynamic processes of subcellular structures of native nerve cells. The advantage of this approach is that it is possible to analyze the dynamics of the distribution of neuron structures at a point or area of interest inside the cell without performing a complete reconstruction of the cell image. It has been proved that it becomes possible to determine the dimensions, the cell area of interest, and the coordinates of subcellular structures for further study of their dynamics. In this modification, the method of local tomography could be used to study both cells and cellular structures, because it is not necessary to probe a full field of view. Local probing of the region of interest during the functioning of the nerve cell will, firstly, reduce the time of data recording for obtaining local tomograms, and, secondly, provide the opportunity to explore the dynamics of several regions inside the cell at the same time.

Keywords: local optical tomography, neuron

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ: ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2023 г. Д.Ю. Нечипуренко^{*, **, ***, #}, М.А. Пантелеев^{*, **, ***, ****}, Е.И. Синаурдзе^{**, ***,}
К.С. Троянова<sup>*, **, А.Д. Мегалинский<sup>**, Н.А. Подопрелова<sup>**, ***, А.М. Шибко^{**, ***,}
А.Н. Баландина^{**, ***, Е.В. Кольцова^{**, ***, Ф.И. Атауллаханов^{*, **, ***, ****}}}</sup></sup></sup>

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

^{**}Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
Средняя Калитниковская ул., 30, Москва, 109029, Россия

^{***}Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
имени Д. Рогачева, ул. Саморы Машела, 1, Москва, 117997, Россия

^{****}Московский физико-технический институт (государственный университет),
Институтский пер., 9, Москва, 115184, Россия

[#]E-mail: ne4ipur@gmail.com

Поступила в редакцию 14.07.2022 г.

После доработки 14.07.2022 г.

Принята к публикации 03.11.2022 г.

Свертывание крови является важнейшим физиологическим ответом организма на нарушения целостности или функции сосудистой стенки. Данный процесс является нестационарным, обладает множеством не до конца установленных механизмов пространственной регуляции, а его понимание крайне необходимо для предотвращения большого количества жизнеугрожающих состояний. Данный обзор посвящен истории исследования процессов свертывания крови коллективом ученых-биофизиков, — выпускников и сотрудников кафедры биофизики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, усилиями, которых удалось создать одну из ведущих российских научных школ по экспериментальному и теоретическому исследованию системы гемостаза. В обзоре описаны основные направления исследований, которые включили множество разнообразных аспектов проблемы — от развития теоретических моделей свертывания крови до разработки и клинических исследований новых методов оценки состояния гемостаза.

Ключевые слова: гемостаз, свертывание крови, фибрин, тромбин, тромбоциты.

DOI: 10.31857/S0006302923010076, EDN: NZRQEZ

Система гемостаза, отвечающая за остановку кровотечений и поддержание естественного гомеостаза и циркуляции крови, обладает способностью быстро и эффективно отвечать на широкий спектр возможных повреждений сосудистой стенки: от быстрого «затыкания» нарушенных эндотелиальных контактов отдельными тромбоцитами (такие «прорехи» могут быть вызваны усиленной миграции клеток иммунной системы в ткани при воспалении), до формирования крупных гемостатических пробок, останавливающих острое кровотечение в случае серьезных повреждений сосудов. Нарушения в работе данной си-

стемы приводят к опасным состояниям — кровотечениям и тромбозам. В соответствии с печальной статистикой, осложнения, вызванные одними артериальными тромбозами — инфаркты и ишемические инсульты — являются лидирующей причиной смерти и инвалидности, как в России, так и далеко за ее пределами.

Изучение свертывания крови насчитывает уже многие десятилетия, однако отсутствие понимания принципиальных механизмов, регулирующих гемостатический ответ в норме, приводит к отсутствию надежных инструментов для диагностики и коррекции многообразных нарушений свертывания.

В системе гемостаза выделяют два звена: первичный гемостаз (сосудисто-тромбоцитарный) и вторичный, — включающий каскад биохимических реакций, приводящих к желированию плаз-

Сокращения: АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, ПЗР — плазмозамещающие растворы, ТПА — тканевый активатор плазминогена, РАИ-1 — ингибитор активатора плазминогена 1,

мы за счет формирования фибриновой сети. Такое разделение вызвано классическими представлениями, согласно которым в условиях потока крови вначале происходит формирование тромбоцитарного агрегата (то есть срабатывает клеточное звено гемостаза), после чего данный агрегат стабилизируется фибрином, который действует как клей и не только меняет локальное агрегатное состояние плазмы крови, но и надежно прикрепляет сформированный сгусток к сосудистой стенке.

Физиологические задачи системы гемостаза диктуют необходимость порогового поведения в плане инициации ответа (с целью предотвращения ошибочного запуска реакций свертывания), а также наличия механизмов, ограничивающих данный ответ в пространстве в случае его запуска (во избежание неограниченного распространения сгустка, которое может иметь смертельные последствия для организма).

Выявление механизмов, регулирующих инициацию гемостатического ответа, его распространение в пространстве и остановку, стало одним из ключевых направлений исследований команды биофизиков, которые под руководством Ф.И. Атауллаханова в начале девяностых годов прошлого века приступили к работе на базе Гематологического научного центра РАМН. Следует отметить, что данная работа была во многом мотивирована замечательным человеком, выдающимся врачом и организатором — академиком А.И. Воробьевым, который в то время возглавлял Гематологический научный центр.

В данном обзоре кратко описана история научных поисков, открытий и неудач, которые сопровождали исследования данной научной группы, со временем превратившейся в одну из крупнейших научных школ по изучению гемостаза в России.

ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ СВЕРТЫВАНИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Процесс образования фибринового сгустка в плазме крови обладает ключевыми свойствами, характерными для активных сред [1–3]: наработка тромбина и, как следствие, полимеризация фибрина может происходить во всем объеме, занимаемом плазмой крови, а каскад биохимических реакций свертывания имеет множество положительных обратных связей, которые могут приводить к самоактивации процесса. Таким образом, в данной системе есть все компоненты, необходимые для автоволнового роста тромба. Однако даже в упрощенных *in vitro* системах фибриновый сгусток никогда не растет на сколь угодно большие расстояния.

Теоретические исследования, выполненные под руководством Ф.И. Атауллаханова, позволили сформулировать гипотезу, согласно которой плазма крови является активной средой нового типа [4–9], в которой могут генерироваться не только классические автоволны, но и так называемые автоволны с остановкой [6, 10]. Рассмотренные феноменологические математические модели, формализующие ключевые представления о свертывании, описывают плазму крови как активную среду, в которой наряду с классическими решениями, могут существовать новые динамически и стационарные объекты: автоволны с меняющейся амплитудой [6, 10], а также разнообразные кольцевые структуры и «пятна» — стационарные неизотропные распределения веществ в пространстве [11–14].

Следует отметить, что спектр возможных пространственно-динамических режимов поведения предложенной феноменологической модели свертывания, описываемой всего тремя нелинейными дифференциальными уравнениями типа «реакция–диффузия», оказался крайне разнообразным и в настоящее время остается недостаточно изученным. Теоретический анализ моделей такого рода представляет интерес не только для исследования свертывания крови, но и для широкого круга задач, в том числе выходящих за рамки биологии.

ДЕТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ СВЕРТЫВАНИЯ ПЛАЗМЫ

Уже на самых первых этапах исследования пространственной регуляции свертывания крови стало ясно, что простые феноменологические модели могут позволить проверку принципиальной работоспособности тех или иных гипотез (в частности, автоволновой и пороговой концепций), но недостаточны для исследования конкретных молекулярных механизмов и сравнения с экспериментальными данными. Работа над детальными моделями свертывания для этих целей началась в нашей команде почти сразу же. Первая версия такой модели, созданная Атауллахановым и соавторами, была опубликована в журнале «Биофизика» в 1995 г. [15]. В отличие от всех предыдущих работ, она сразу фокусировалась на внутреннем пути свертывания, играющем ключевую роль в автоволновой гипотезе. Эта модель была «гомогенной», т.е. фокусировалась на биохимии свертывания и рассматривала его в однородном пространстве.

Следующий принципиальный шаг был сделан в работах [16, 17], авторы которых перенесли эту модель в пространственно-распределенную систему и показали, что в ней может существовать автоволна. В рамках стандартной биохимии свертывания она не останавливалась, поэтому в нее

были введены дополнительные гипотезы о переключении тромбина в «антикоагулянтный» режим одним из отщепляемых пептидов. Эти гипотезы в комбинации с упрощениями привели к новому поколению редуцированных автоволновых моделей свертывания [18]. Однако предложенная в работах [16, 17] модель продолжала базироваться на активации по контактному пути: для автоволновой фазы это не было существенно, и первые эксперименты ставили с активацией свертывания стеклом. Тем не менее, со временем в той же лаборатории начали разрабатываться новые экспериментальные подходы для исследования свертывания крови при активации по физиологическому пути, тканевым фактором [19].

Для решения этой проблемы в начале 2000-х годов началась работа по разработке модели нового поколения, с улучшенной биохимией и активацией по внешнему пути. Были выполнены отдельные проекты по детальному исследованию отдельных блоков свертывания [20–22], и в конце концов эта работа была опубликована в 2006 г. [23]. Предложенная модель была тщательно валидирована на всех уровнях организации и включала все ключевые реакции свертывания, известные на тот момент [24, 25]. Она позволила подвести молекулярную базу под роль внутреннего пути в пространственной динамике свертывания крови, а также предсказала остановку пространственного роста свертывания в присутствии тромбомодулина, успешно подтвержденную в эксперименте. К отрицательным результатам модели можно было отнести тот факт, что хотя в этой модели присутствовала активация фактора XI тромбином и ее вклад в рост сгустка был достоверным, он казался достаточно слабым, значимую «чистую» автоволну показать не удавалось, в том числе в экспериментах. Эта работа далее развивалась в следующих направлениях.

Во-первых, дальнейшие исследования регуляции свертывания крови под руководством Ф.И. Атауллаханова в значительной степени использовали разные варианты этой модели. Основные вехи на этом пути:

- 1) Роль активации фактора V в регуляции порогов по активации [26, 27];
- 2) Роль активации фактора VII в регуляции порога по скорости потока [28];
- 3) Роль ингибитора пути тканевого фактора в управлении порогом и динамикой свертывания [29, 30];
- 4) Полноценное экспериментальное доказательство и теоретическое исследование автоволнового феномена свертывания крови [31];
- 5) Механизмы устойчивости системы свертывания к возмущениям [32].

Эти исследования привели к формированию новой картины регуляции свертывания, которая

подтверждена экспериментально *in vitro*. Ее важнейшим недостатком сейчас является отсутствие данных *in vivo*.

Во-вторых, исследования биохимии процесса свертывания, предпринятые для этих моделей, привели к формированию новых направлений в коллективе — по изучению механизмов мембранных реакций, формированию прокоагулянтных тромбоцитов и далее, по мере развития тромбоцитарного направления, по исследованию формирования тромбоцитарного тромба.

МЕТОД РЕГИСТРАЦИИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СВЕРТЫВАНИЯ (ТРОМБОДИНАМИКА): ОТ КОНЦЕПЦИИ К ИСПЫТАНИЯМ В КЛИНИКЕ

Первые экспериментальные работы, в которых свертывание крови рассматривалось как пространственно неоднородный процесс, начинающийся в месте его активации и распространяющийся на определенное расстояние, были опубликованы в лаборатории в 1995–1998 гг. В работах [4, 33] были приведены эксперименты, демонстрирующие рост фибринового сгустка от стеклянных шариков, выступающих в роли активатора свертывания. В дальнейшем методика активации свертывания была усовершенствована: активацию проводили по внешнему пути от монослоя фибробластов на подложке, которая располагалась на одной из граней измерительной кюветы [19]. В этот момент стало ясно, что метод позволяет не только изучать принципы устройства системы свертывания в норме, но также проливает свет на механизмы, лежащие в основе некоторых патологических состояний. Так, до этого дефицит факторов свертывания VIII и XI (гемофилия А и С соответственно) традиционно определяли в клинических лабораториях, измеряя время свертывания при активации по внутреннему пути (тест активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ)), тогда как активация по внешнему пути (тест протромбинового времени) у таких пациентов была в норме, несмотря на тяжелые хронические кровотечения. Однако при повреждении сосуда в организме запускается именно активация по внешнему пути, что ставит вопрос об адекватности лабораторных тестов. Именно рассмотрение активации и роста сгустка в пространстве показало, что у таких пациентов изначально вблизи активатора быстро формируется нормальный сгусток, однако впоследствии этот сгусток становится неплотным, приобретает размытые границы (в отличие от нормального сгустка с очень четкой границей между самим сгустком и жидкой плазмой) и растет значительно медленнее, что приводит к выводу о том, что нарушена фаза роста сгустка [19]. При этом было показано [34], что сама фаза акти-

вазии достаточно слабо влияет на последующий рост сгустка, он скорее определяется свойствами среды (составом плазмы крови), а не уровнем активации. В дальнейшем было обнаружено [23], что за активацию свертывания отвечает только внешняя теназа, а распространение сгустка контролируется генерацией фактора Ха с помощью внутренней теназы. Остановить рост сгустка можно с помощью ингибитора свертывания тромбомодулина, в норме локализованного на здоровом эндотелии сосудов. Тем самым задается парадигма функциональных блоков, регулирующих отдельные свойства системы свертывания крови. Кроме этого, исследование пространственного роста сгустка позволило сделать важное предположение о механизмах действия гемостатического препарата фактора VIIa [35]. Было показано, что действие рекомбинантного фактора VIIa не ограничивается взаимодействием с поверхностью поврежденной стенки сосуда с тканевым фактором и преимущественно определяется независимым от тканевого фактора механизмом, однако зависит от присутствия микровезикул, что выражается в увеличении скорости роста сгустка и возникновении спонтанного тромбообразования вдали от фронта роста сгустка. Таким образом, независимое от тканевого фактора действие VIIa обеспечивает быстрое образование тромба вокруг места повреждения. Современные технологии, такие как применение светодиодов для освещения экспериментальной кюветы, качественные фильтры для флуоресцентного сигнала от «метки» тромбина и высокое разрешение фотокамеры позволили улучшить получаемые данные и впервые получить не только распределение фибрина, но и распределение тромбина в пространстве и продемонстрировать его волновую природу [31]. Следующим большим методологическим прорывом в этой области стала разработка стандартизованного активатора, представляющего собой иммобилизованный на пластиковую поверхность тканевый фактор [36]. Усовершенствование технологии создания активаторов и измерительной установки, а также предварительные данные клинической апробации привело к выдвижению разработки в конкурсе РОСНАНО и получению финансирования на промышленное производство диагностической системы и теста «Тромбодинамика».

Равномерность нанесения, возможность создания большого количества образцов, стабильность и воспроизводимость характеристик позволили проводить более масштабные исследования, в том числе на пациентах. Так, было обнаружено [37], что у пациентов в состоянии сепсиса и септического шока скорость роста сгустка повышалась за несколько дней до увеличения концентрации D-димеров (продукта распада фибрина вследствие лизиса сгустка), что расценивается

как показатель развития тромбоза. Таким образом, метод измерения пространственного роста сгустка стал рассматриваться как потенциально полезный в клинической практике метод ранней диагностики нарушений свертывания. При этом выяснилось, что важной особенностью свертывания, проявившейся при учете пространственной неоднородности, стало спонтанное тромбообразование: даже если избавиться от «паразитной» контактной активации от стенок измерительной кюветы с помощью добавления ингибитора, у пациентов с протромботическими нарушениями свертывания часто регистрируются сгустки по всему объему плазмы, вне зоны активации и роста сгустка [37, 38].

Поскольку основной пул методов, находящихся в распоряжении медицинских лабораторий, предназначен в основном для диагностики нарушений свертывания, ассоциированных с кровоточивостью, а для диагностики риска тромбоза надежных методов так и не было разработано, исследования тромбодинамики в клинике были сосредоточены вокруг двух основных тем — диагностики тромбогенных (или, по-другому, гиперкоагуляционных состояний) и контроля терапии антикоагулянтами, которые применяются для коррекции таких состояний.

Для диагностики гиперкоагуляционных состояний набирали группы пациентов с высоким риском развития тромбоза и сравнивали с группой здоровых добровольцев. Сдвиг параметров теста тромбодинамики в сторону гиперкоагуляции был обнаружен после различных оперативных вмешательств [39, 40], при инфекционных заболеваниях [41], беременности [40, 42], бесплодии [43], онкологических заболеваниях [44, 45], состояниях после уже произошедшего тромбоза [45], у пациентов детского возраста с редкими заболеваниями гематологического профиля [46–48] и новорожденных детей [49]. Помимо регистрации гиперкоагуляции в группах высокого риска тромбоза также ряд исследований показал предиктивную способность теста в отношении тромботических осложнений. Например, при добавлении в шкалу Каприни, которая используется для стратификации тромботического риска в хирургии, параметров тромбодинамики, превышающих нормальные диапазоны, предиктивная способность шкалы в отношении тромбозов достоверно увеличивалась [39].

В целях профилактики и терапии тромботических осложнений применяются антикоагулянтные препараты. В настоящее время наиболее распространенными являются гепарины (нефракционированный гепарин и препараты низкомолекулярных гепаринов), а также прямые оральные антикоагулянты (ривароксабан, дабигатран, апиксабан). Надежных инструментов для

оценки эффективности и безопасности терапии антикоагулянтами не существует, а существующие методы основаны на оценке концентрации препарата безотносительно оценки состояния собственно системы свертывания либо обладают сомнительной чувствительностью. Для оценки пригодности тромбодинамики для мониторинга гепаринов были проведены как *in vitro* [50], так и *in vivo* [45] сравнения с уже существующими тестами и методиками, такими как АЧТВ, тест генерации тромбина, тромбоэластография, измерение анти-Ха-активности в плазме крови. Тромбодинамика оказалась более чувствительна к гепарину, чем АЧТВ, чувствительность тромбодинамики была сравнима с чувствительностью анализа анти-Ха и сопоставима или выше, чем у теста генерации тромбина и тромбоэластографии [45]. Помимо этого, тромбодинамика продемонстрировала хорошую дозозависимость от концентрации гепарина. Была определена функция, связывающая значение скорости роста сгустка в тромбодинике и концентрации гепарина в плазме. Это позволяет точно рассчитать правильную дозу препарата, необходимую для достижения эффективной антикоагуляции у отдельного пациента [50]. На основе проведенных исследований были созданы методические рекомендации по индивидуальному подбору дозировок гепарина на основе данных тромбодинамики [51].

Дальнейшее развитие и усовершенствование тромбодинамики как клинического метода привело к интеграции экспериментальных наработок по регистрации автоволны тромбина в уже существующий прибор. Новая методика позволила приблизиться к решению ранее недостижимых задач, таких как интегральная оценка влияния тромбоцитарных патологий на свертывание и контроль терапии прямыми оральными антикоагулянтами [41]. На данный момент эта область находится в стадии активного развития по части клинических исследований.

ГЕМОСТАЗ И ГЕМОДИЛЮЦИЯ

Тесное взаимодействие научной группы с клиницистами Гематологического научного центра также привело к развитию в команде нового направления, связанного с изучением влияния гемодилюции на состояние свертывающей системы крови.

Коррекция ряда патологических состояний требует восполнения объемной кровопотери, для чего в качестве растворов первой линии используют инфузию искусственных плазмозамещающих растворов (ПЗР). Такая инфузия необходима при массивной кровопотере в условиях обширной травмы или при хирургических операциях, ожогах, сепсисе, в акушерстве и так далее [52]. Основной задачей инфузии ПЗР является вос-

полнение объема циркулирующей крови (для поддержания артериального давления, нормального коллоидно-осмотического давления плазмы и ее кислотно-щелочного равновесия, объема сердечного выброса, предупреждения коллапса сосудов, сохранения нормальных реологических характеристик крови и нормальной перфузии органов и тканей) [3].

Частыми осложнениями объемных инфузий ПЗР являются нарушения гемостаза. Поскольку современные ПЗР не содержат компонентов системы свертывания крови, их инфузия в больших объемах вызывает разбавление всех компонентов этой системы. Этот процесс называют гемодилюцией, и он, безусловно, сдвигает различные равновесия в системе свертывания, нарушая баланс про- и антикоагулянтных реакций, что не может не влиять на гемостаз. Как ни странно, общепринятого мнения о том, насколько переливание ПЗР влияет на систему свертывания, долгое время не существовало. Что еще более удивительно, сам вопрос о том, в какую сторону направлено это влияние, также не имел однозначного ответа.

Гемостаз при разбавлении крови (плазмы) различными ПЗР был изучен во многих работах как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако полученные данные были очень противоречивы. Это связано с тем, что существует большое количество различных факторов, которые могут влиять на гемостаз при гемодилюции в противоположных направлениях, в том числе тип и объем перелитого раствора, а также другие факторы, которые могут сопутствовать травме или определенному состоянию пациента, но не связаны прямо с процессом гемодилюции (например, возникновение обширной раневой поверхности, гипотермия, наличие воспаления, сниженные функции тромбоцитов и др.) [53–56]. В своей работе мы задались целью исследовать, как на плазменное звено свертывания влияет сам процесс разбавления крови/плазмы при сохранении всех других условий постоянными. Для этого мы систематически изучили изменения гемостаза при различных степенях разбавления плазмы разными ПЗР *in vitro* (в условиях постоянного pH и концентрации ионов Ca^{2+} в системе) [57].

Так как в клинике после массивных инфузий ПЗР часто наблюдаются микрососудистые и другие кровотечения, большинство клиницистов интуитивно полагает, что разбавление плазмы должно приводить к замедлению свертывания из-за снижения концентраций прокоагулянтных факторов (коагулопатии разбавления) [55, 58]. Это подтверждалось результатами экспериментов, в которых измеряли стандартные показатели свертывания — активированное частичное тромбопластиновое время и протромбиновое время, которые при разбавлении плазмы всегда удлиня-

лись [58, 59]. Однако такая пролонгация наблюдается, только если концентрация прокоагулянтных факторов в плазме снижается на 50–80%, что позволяет предполагать, что данные факторы присутствуют в плазме в большом избытке [59–61]. Ситуация с антикоагулянтами (прежде всего антитромбином III) другая. Их реакции с активными факторами-мишенями подчиняются кинетике второго порядка, что означает, что скорость ингибирования снижается прямо пропорционально уменьшению концентрации ингибитора [62]. Таким образом, мы предположили, что ответом гемостаза на гемодилюцию до разбавления приблизительно в 2.0–2.5 раза может быть ускорение свертывания, так как в этой области разбавлений свертывание еще не подавлено из-за снижения концентраций прокоагулянтных факторов, но оно уже ускорено из-за снижения в концентрациях антикоагулянтов. Это подтверждается работами *in vitro* [63–65] и рядом клинических наблюдений [66–69], которые прямо указывали на вероятность тромботических осложнений при увеличении разбавления плазмы и объемов перелитого ПЗР. Так как система гемостаза представляет собой тонко сбалансированный механизм с десятками участников, среди которых на полных правах присутствуют как прокоагулянтные факторы (протромбин, фибриноген и другие), так и антикоагулянты (антитромбин, протеин С, ингибитор пути тканевого фактора и т.д.), предсказать результат одновременного разбавления всех этих факторов из общих соображений без модельных расчетов невозможно. Баланс при разбавлении в таких системах может смещаться как в одну, так и в другую сторону.

Наши эксперименты по измерению АЧТВ и протромбинового времени при разбавлении плазмы различными ПЗР полностью подтвердили ранее полученные результаты. Это косвенно подтверждает популярную гипотезу о том, что гемодилюция ухудшает свертывание, снижая концентрации прокоагулянтных факторов. Тем не менее, данный факт не может служить прямым доказательством этой гипотезы, так как хорошо известно, что стандартные клоттинговые тесты очень малочувствительны к гиперкоагуляционным состояниям плазмы [70]. Это связано с самой природой тестов протромбинового времени и АЧТВ, которые проводят в условиях максимальной активации свертывания в образце (в присутствии избытка добавленных фосфолипидов, а также избытка активатора свертывания). Кроме того, плазма при проведении этих тестов разбавляется в три раза, поэтому любое дополнительное разбавление образца снизить концентрации всех компонентов системы свертывания еще больше, в область, где скорость коагуляции уже зависит от концентрации прокоагулянтных факторов. Таким образом, стало понятно, что для то-

го, чтобы определить реальное состояние гемостаза в плазме при гемодилюции, надо использовать другие методы, которые являются чувствительными как к гипо-, так и к гиперкоагуляции. Именно поэтому, ранее большое количество работ по изучению гемостаза при гемодилюции было проведено с помощью метода тромбоэластографии [64, 68, 71–73]. Однако разбавление плазмы влияет на различные параметры тромбоэластограммы в противоположных направлениях: оно часто приводит к укорочению измеряемых времен реакции (r) и коагуляции (k), что говорит об ускорении свертывания, но уменьшает максимальную силу сгустка (МА или G), которая зависит от концентрации фибриногена и тромбоцитов в исследуемой плазме, и уменьшение которой принято считать ослаблением свертывания. Таким образом, данные полученные с помощью тромбоэластографии, демонстрируют сложную картину, не позволяющую однозначно судить об изменении баланса системы в сторону гипо- или гиперкоагуляции.

В нашей работе были использованы два других метода интегральной оценки коагуляционного статуса: тест генерации тромбина [74] и измерение скорости роста сгустка в пространстве (тест тромбодинамики) [50]. Оба эти метода используют гораздо более низкую активацию свертывания, чем стандартные клоттинговые тесты. Как было показано, оба они высокочувствительны как к гипо-, так и к гиперкоагуляционным нарушениям свертывания [70, 75]. Кроме того, была прямо измерена скорость полимеризации фибрина в исходной плазме и той же плазме, разбавленной различными ПЗР в два раза ($\pm$ фактор XIII).

Необходимо отметить, что широко распространенный тест генерации тромбина предполагает разбавление плазмы в ходе измерения в полтора раза. Это не позволяет провести измерения в неразбавленной плазме и в плазме, разбавленной менее, чем в полтора раза, поэтому сначала был разработан метод измерения генерации тромбина без дополнительного исходного разбавления, в котором разбавление образца при измерении составляло 1.025 раза [76]. Проведенные эксперименты показали, что при разбавлении плазмы любым ПЗР до 2.0–2.5 раз количество активного тромбина, генерируемого в образце при стандартной активации свертывания (эндогенный тромбиновый потенциал), возрастает. Одновременно увеличивалась максимальная концентрация тромбина, наблюдаемая в образце ($A_{\max}$) и сокращалось время достижения этой максимальной концентрации ($t_{\max}$). Все это свидетельствовало об усилении свертывания (гиперкоагуляции). При более высоких степенях разбавления генерация тромбина начинала снижаться, что, по-види-

мому, было связано уже с сильным разбавлением предшественников прокоагулянтных факторов.

Существование гиперкоагуляции при умеренных степенях разбавления плазмы было также показано нами *in vitro* и *in vivo* (у доноров костного мозга, получающих инфузии физиологического раствора или гидроксипропилкрахмала (HES 130/0.4)) по увеличению скорости роста сгустка в плазме методом тромбодинамики [76–78]. При этом эффект достаточно сильно зависел как от пути активации свертывания (внешнего или внутреннего), так и от типа использованного ПЗР. При увеличении разбавления до двух-трех раз скорость роста сгустка возрастала для различных ПЗР на 25–75% относительно неразбавленной плазмы. Эффект был более выражен при контактном пути активации и использовании коллоидных ПЗР. Это позволяет предположить, что коллоиды могут иметь на образование сгустка двойной эффект. С одной стороны, они при умеренных степенях гемодилюции ускоряют свертывание, как и все остальные ПЗР, а с другой — они могут препятствовать образованию сгустка за счет влияния на отдельные факторы свертывания (например, путем снижения концентраций факторов VIII и фон Виллебранда). При этом сгустки образуются быстро, но могут иметь сниженную прочность.

Для доказательства этого предположения были прямо измерены скорости полимеризации фибрина в растворе фибриногена (4 мг/мл) и том же растворе, разбавленном в два раза различными ПЗР. В результате было показано, что скорость полимеризации не изменяется статистически значимо в присутствии кристаллоидов, но увеличивается (в 1.3–1.8 раза) в присутствии большинства коллоидов ($\pm$ фактор XIII) [79, 80]. Это опровергает ранее существовавшую гипотезу, о том, что коллоидные растворы замедляют скорость полимеризации фибрина, ухудшая тромбин-фибриногеновые взаимодействия и/или взаимодействия фактора XIIIa с фибрин-полимером [81]. Эта гипотеза была основана на данных тромбозаграфии, которая, однако, измеряет не скорость полимеризации, а вязко-эластичные свойства сгустка. Наши предварительные электронно-микроскопические данные показали, что общий вид сгустков и волокон фибрина в них различаются в присутствии разных ПЗР. Так, в цельной крови или крови, разбавленной раствором альбумина (1:1), диаметр волокон составлял примерно 300–450 нм, тогда как при разбавлении раствором гелофузина (1:1) он был снижен (220–300 нм), а сам сгусток состоял из отдельных, не связанных друг с другом кластеров фибрина. В присутствии декстрана 40 кДа (реополиглобулина), наоборот, образовывались длинные и толстые (диаметр волокон 970–1440 нм) параллельно упакованные волокна. Это подтверждает наше пред-

положение о влиянии искусственных коллоидных ПЗР на качество сгустков [79].

Изучение природы гемодилюционной гиперкоагуляции позволило разработать новый ПЗР, позволяющий частично компенсировать эту гиперкоагуляцию. Для этого в стандартный физиологический раствор был добавлен ингибитор тромбина (антитромбин III или искусственный синтетический ингибитор HC-019s-IOC). Эффективность такой стратегии мы подтвердили опытами *in vitro* [76], а также в модели гемодилюционной гиперкоагуляции у крыс *in vivo* [77].

ВЛИЯНИЕ ПОТОКА НА СВЕРТЫВАНИЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Создание детальных моделей системы свертывания крови, которые позволяли описывать динамику пространственного распространения фибринового сгустка в тонком слое непрерываемой плазмы, помогло исследовать механизмы регуляции, связанные с диффузионным транспортом веществ. Логическим продолжением этих исследований стала серия экспериментальных и теоретических работ по влиянию потока плазмы крови на образование и рост фибринового сгустка. Первые экспериментальные работы, начатые в 2003 г., использовали проточные камеры с характерным размером рабочей области от одного до нескольких десятков миллиметров, что приводило к колоссальным расходам плазмы крови на один эксперимент (до нескольких сотен мл) и ограничивало использование ингибиторов контактной активации. Из-за этого и особой геометрии камеры рост сгустка начинался в застойных областях канала, затрудняя определение вклада потока. Эта серия экспериментов не получила позитивного завершения, и следующая серия стартовала только в 2010-х годах. В новой серии экспериментов свертывание крови наблюдалось в стеклянных капиллярах диаметром 0.5–0.8 мм, с протравленной кислотой областью, в которой размещался активатор свертывания. Сложность геометрии и реконструкции получаемого сгустка, а также невысокая воспроизводимость получения областей активации не позволили интерпретировать полученные результаты. Настоящий прорыв в экспериментальных исследованиях влияния потока на свертывание крови случился в только после 2015 г., когда появились и стали доступны новые технологии изготовления проточных камер малого размера и способы регистрации и обработки сигнала [82, 83].

В отличие от экспериментальных работ, теоретические исследования в данной области были более успешны. Так, в работе 2010 г. [28] мы показали, что скорость тока крови может регулировать начало свертывания пороговым образом: до определенных величин сдвиговой скорости пото-

ка время начала тромбообразования очень слабо увеличивается по мере увеличения скорости, а при превышении этой величины нарастает очень быстро, что, по сути, означает выключение свертывания. Ряд параметров модели тромбообразования влияет на величину этого порога: увеличение концентрации фибрин-мономеров, при которой происходит полимеризация и образование сетки, резистентной к потоку, приводит к ее уменьшению, а увеличение размера области активации — к увеличению. Сам эффект достигается за счет комбинации положительной обратной связи активации фактора VII, связанного с тканевым фактором, активированным фактором Ха и эффективного удаления фактора Ха потоком из области активации, лишаящего обратную связь способности инициировать свертывание. Уровень этого триггера (то есть чувствительность коагуляции к потоку) контролируется активностью ингибитора пути тканевого фактора.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИБРИНОЛИЗА

Первые исследования фибринолиза в команде Ф.И. Атауллаханова начались с теоретических работ в 2005 г., но результаты были получены и оформлены только к 2017 г. В работе [84], включающей в себя эксперименты *in vitro* и моделирование *in silico*, нами было показано, что в системе с высоким содержанием тканевого активатора плазминогена (ТПА), урокиназного активатора плазминогена или стрептокиназы за фронтом фибринового сгустка, распространяющегося в пространстве от тканевого фактора, следует фронт растворения сгустка, распространяющийся из той же исходной точки. Скорость распространения фронта лизиса линейно зависела от скорости распространения фронта свертывания (коэффициент корреляции $r^2 = 0.91$). ТПА в высоких концентрациях начинала увеличивать время начала лизиса и снижать скорость распространения лизиса, предположительно из-за истощения запасов плазминогена.

В работе 2020 г. мы исследовали механизмы регуляции тромболизиса, лизиса фибринового сгустка, индуцированного фармакологически [85]. Для этого была разработана реакционно-диффузионно-адвективная модель тромболизиса под воздействием ТПА в окклюзированном сосуде с градиентом давления. Распространение тромболизиса в системе без потока контролировалось преимущественно диффузией ТПА, в то время как транспорт других активных компонентов был несущественным либо из-за их высоких параметров связывания фибрина и короткого времени жизни, либо из-за их исходного равномерного распределения. Через концентрацию основного ингибитора ТПА — ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1) — контролировалась

как степень распространения лизиса, так и форма пространственного распределения фибрина во время лизиса. Интересно, что PAI-1 оставался важным даже тогда, когда его концентрация была на порядок ниже концентрации ТПА, из-за его роли на краю диффундирующего фронта ТПА. При наличии потока конвекция ТПА была критическим процессом, управляющим лизисом; хотя роль концентрации PAI-1 была намного меньше при наличии кровотока, ее влияние возрастало при наличии коллатеральных шунтирующих сосудов, которые значительно снижали поток ТПА через тромб. Это повышало отношение PAI-1/ТПА, тем самым делая ингибирование, вызванное PAI-1, актуальным для регуляции пространственного лизиса вплоть до его остановки.

МЕМБРАННО-ЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ НА ПОВЕРХНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

Ключевые реакции каскада свертывания происходят на богатых отрицательно заряженными фосфолипидами мембранах, что, по всей видимости, позволяет не только локализовать данные реакции в пространстве, но и защитить их от действия потока. Долгое время считалось, что основными клетками, предоставляющими такие мембраны при гемостазе, являются активированные тромбоциты. Исследование механизмов протекающих мембранно-зависимых реакций крови в нашей команде началось в начале 2000-х годов в рамках разработки детальной математической модели свертывания крови [21]. Первоначально вся экспериментальная работа была направлена на валидацию разрабатываемых компьютерных моделей [22]. Однако в это же время в мире заговорили о гетерогенности активированных тромбоцитов и о ведущей роли только одной субпопуляции фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов — так называемых прокоагулянтных тромбоцитов — в связывании факторов свертывания [86]. В связи с этим потребовался пересмотр имеющихся данных об участии тромбоцитов в мембранных реакциях. В рамках данного направления было охарактеризовано связывание факторов свертывания, входящих в комплекс внутренней теназы, с обеими субпопуляциями активированных тромбоцитов. Было показано, что только прокоагулянтные тромбоциты связывают факторы свертывания и как следствие могут участвовать в мембранных реакциях свертывания крови [87].

Затем последовал значительный перерыв в исследовании мембранно-зависимых реакций, а все основные работы были сосредоточены на исследовании механизмов разделения тромбоцитов на субпопуляции [88, 89]. Только спустя почти 10 лет тема мембранных реакций была поднята снова. В частности, продолжилась разработка математи-

ческих моделей [90], а также экспериментальные работы в данном направлении [91, 92].

Так, была обнаружена гомо- и гетеро- мультимеризация ключевого фермента свертывания фактора Ха [91], которая приводит к его удержанию на мембране в присутствии потока крови. Совершенно новым и неожиданным оказался тот факт, что факторы и реакции свертывания оказываются неравномерно распределены на поверхности тромбоцитов, будучи локализованы в небольшой области мембраны [92, 93]. Такое распределение факторов свертывания может приводить к ускорению реакции на порядки и обеспечивать дополнительную защиту от вымывания потоком (за счет сложной ультраструктуры этого региона).

Кроме того, работы данного периода рассматривают не только особенности сборки и функционирования основных ферментативных комплексов свертывания на мембранах тромбоцитов, но также и глобально особенности взаимодействия плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. В частности, роль тромбоцитов в активации контактного пути через фактор XII [94], а также механизмы взаимодействия фактора XIII с субпопуляциями тромбоцитов [91]. Следует отметить, что в области исследования мембранно-зависимых реакций исторически сложилась тесная взаимосвязь между математическими моделями и экспериментами, взаимно дополняющими друг друга.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Первые шаги нашего коллектива по исследованию внутриклеточной сигнализации были связаны с попытками экспериментально выяснить, как управляется формирование прокоагулянтных тромбоцитов [89, 95]. Тем не менее, только использование биофизических подходов и математического моделирования позволило предложить механизм, связанный с интегрированием кальциевых сигналов и коллапсом митохондрий [88], позднее подтвержденный экспериментально [96]. Это дало начало большому направлению исследования внутриклеточной сигнализации клеток, которое вышло за пределы прокоагулянтных тромбоцитов и сейчас фокусируется на разных аспектах метаболизма, сигнализации, разработки клинических методов и выявления патофизиологических механизмов заболеваний [97–103].

ИЗУЧЕНИЕ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ В ПОТОКЕ КРОВИ

Появление в команде новых направлений, связанных с исследованием тромбоцитов и их ро-

ли в свертывании крови, привело к необходимости создания новых экспериментальных и теоретических моделей формирования тромба в условиях потока. Первые экспериментальные исследования в этом направлении были неразрывно связаны с изучением механических особенностей взаимодействия различных субпопуляций активированных тромбоцитов, а также структурных особенностей прокоагулянтных тромбоцитов.

Простейшие проточные камеры изначально применялись для анализа особенностей распределения различных флуоресцентных маркеров в тромбоцитарных агрегатах при помощи конфокальной микроскопии: было показано, что включение прокоагулянтных тромбоцитов в тромбоцитарные агрегаты происходит благодаря наличию у них особой структуры — так называемой «шапки», в которой концентрируются различные альфа-гранулярные белки [93]. Ранее было также показано, что прокоагулянтные тромбоциты могут включаться в агрегаты, состоящие преимущественно из обычных проагрегаторных тромбоцитов, но при этом друг с другом прокоагулянтные тромбоциты практически не взаимодействуют [104].

Прокоагулянтные тромбоциты образуются при достаточно сильных активационных стимулах, однако в большинстве *in vitro* моделей тромбообразования обнаруживаются на поверхности тромбов. Благодаря развитию новых *in vitro* моделей тромбообразования в потоке, а также в сотрудничестве с лабораторией П. Монжана (Университет Страсбурга, Франция) нашей командой было показано, что прокоагулянтные тромбоциты вытесняются на поверхность тромбоцитарных агрегатов в результате процесса контракции: из-за их слабого взаимодействия с остальными тромбоцитами, они механически выдавливаются из сжимающейся центральной части растущего агрегата [82]. Данный феномен также может объяснять обогащение фибрином поверхности тромбов, формирующихся *in vitro* в условиях потока, которое также наблюдается и в гемостатических тромбах *in vivo*, — наряду с поверхностным распределением прокоагулянтных тромбоцитов. Возможно, перераспределение прокоагулянтных тромбоцитов на границу сильно активированного «ядра» сгустка может также способствовать механической дестабилизации внешней части артериального тромба и приводить к ее отслоению от внутренней части сгустка — явлению, наблюдаемому во многих *in vivo* моделях артериального тромбоза.

Разработанные в нашей команде микрофлюидные проточные камеры сегодня используются не только для фундаментальных исследований [82, 83], но и в качестве нового интегрального теста гемостаза: в настоящее время на базе НМИЦ ДГОИ имени Д. Рогачева идут исследования по

апробации и внедрению в клиническую практику диагностического теста, позволяющего оценивать параметры тромбообразования в условиях потока цельной крови.

Для исследования возможных механизмов остановки роста богатого тромбоцитами артериального тромба в команде также активно развивались компьютерные модели тромбообразования [105]. В сотрудничестве с французской командой В. Вольперта была создана модель, основанная на формализме частиц, позволившая исследовать механизм остановки, связанный с образованием богатой фибрином «шапки» тромба, которая обнажается после отрыва внешней части агрегата [106]. В соответствии с данной гипотезой дальнейший рост тромба останавливается из-за низкой адгезионной способности неактивированных тромбоцитов к фибрину. Другой предложенный механизм остановки роста тромба (и переключения в окклюзивный режим) основан на поведении внешней границы растущего тромба и зависимости баланса между прикреплением и откреплением тромбоцитов от локальной скорости сдвига [107]. При помощи данной модели было показано, что переключение в окклюзивный режим может происходить при увеличении длины повреждения: рост гидравлического сопротивления участка сосуда при формировании более длинного агрегата уменьшает критическую скорость сдвига на поверхности растущего тромба (из-за падения общего потока крови) — что приводит к окклюзии. Благодаря развитию *in vivo* моделей тромбоза в артериолах мыши было показано, что внешняя часть тромба — так называемая оболочка — демонстрирует сложную динамику, напоминающую движение вязко-упругой массы [108]. Для исследования физических механизмов данного явления в команде была разработана новая модель роста тромба, учитывающая как стохастические первичные взаимодействия клеток, так и взаимодействия по классическому детерминистическому механизму (описываемому потенциалом Морзе). При помощи данной модели было показано, что «текучесть» внешней части тромба может быть связана именно со стохастическим характером первичных контактов между клетками — в которые, по всей видимости, вовлечено небольшое количество лиганд-рецепторных комплексов [109, 110]. Предложенная модель затем была существенно расширена с целью явного описания ключевых тромбоцитарных агонистов — тромбина и АДФ — и использована для изучения физических механизмов гетерогенной структуры артериального тромба [111]. Следует отметить, что ни одна из предложенных моделей не позволяет описать наблюдаемую в *in vivo* экспериментах динамику неокклюзивного тромба: затухающие циклы роста и срыва отдельных внешних частей тромба, чаще наблюдаемые в артериях мыши, либо бурный рост и плавное уменьшение размеров агрегата, наблюдаемое в микрососудах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свертывание крови представляет собой яркий пример ситуации, когда биофизический подход к исследованию сложной, пространственно-неоднородной и нестационарной системы позволил радикально пересмотреть представления о том, как она работает и зачем нужны те или иные ее части, а также предложить новые методы диагностики. При этом работа биофизиков началась по сути только после того, как само по себе устройство системы было более или менее определено: последние принципиальные белки и реакции в свертывании крови были открыты в 1989–1991 гг.

Открытие автоволнового характера распространения активности тромбина в пространстве, наблюдаемое в определенных условиях, позволило предложить новый чувствительный способ оценки состояния плазменного звена гемостаза, который в настоящее время активно внедряется в клиническую практику. Следует, однако, отдать должное сложности системы гемостаза: несмотря на десятилетия исследований, мы по-прежнему далеки от понимания ключевых вопросов:

Каковы механизмы самоорганизации гемостатического ответа?

Как происходит остановка роста сгустка?

Возможно ли корректировать состояние гемостаза в случае его нарушения с минимальными рисками тромботических осложнений или кровотечений?

Хочется надеяться, что будущие поколения исследователей смогут найти ответы на эти и многие другие важные вопросы.

На сегодняшний день наш коллектив насчитывает несколько десятков ученых и молодых исследователей — студентов, аспирантов, сотрудников и выпускников МГУ имени М.В. Ломоносова, МФТИ и многих других ВУЗов Москвы, которые составляют основную часть Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН и работают не только на базе данного Института, но и в МГУ, НМИЦ ДГОИ имени Рогачева и других научных центрах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (гранты № 22-24-01028 (разделы «Введение», «Феноменологические модели свертывания крови», «Изучение тромбообразования в потоке крови» и «Заключение») и № 21-45-00012 (остальные разделы статьи)).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ф. И. Атауллаханов, В. И. Зарницына, А. Ю. Кондратович и др., *Успехи физ. наук*, **172** (6), 671 (2002).
2. M. C. Cross and P. C. Hohenberg, *Rev. Mod. Phys.*, **65**, 851 (1993).
3. О. А. Морнев, А. В. Панфилов и Р. Р. Алиев, *Биофизика*, **37** (1), 123 (1992).
4. F. I. Ataullakhanov, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 453 (1998).
5. Ф. И. Атауллаханов и Г. Т. Гурия, *Биофизика*, **39** (1), 89 (1994).
6. Ф. И. Атауллаханов, Г. Т. Гурия и А. Ю. Сафрошкина, *Биофизика*, **39**, 99 (1994).
7. V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, and F. I. Ataullakhanov, *Thromb. Res.*, **84**, 225 (1996).
8. V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, and F. I. Ataullakhanov, *Thromb. Res.*, **84**, 333 (1996).
9. V. I. Zarnitsina, et al., *Chaos*, **11**, 57 (2001).
10. C. P. Schenk, et al., *Phys. Rev. E*, **57**, 6480 (1998).
11. Т. К. Старожилова, А. И. Лобанов и Г. Т. Гурия, *Мат. моделир.*, **9** (2), 21 (1997).
12. А. И. Лобанов, Т. К. Старожилова и Г. Т. Гурия, *Мат. моделир.*, **9** (8), 83 (1997).
13. Г. Т. Гурия, А. И. Лобанов и Т. К. Старожилова, *Биофизика*, **43**, 526 (1998).
14. А. И. Лобанов и Т. К. Старожилова, *Мат. моделир.*, **9** (12), 3 (1997).
15. F. I. Ataullakhanov, D. A. Molchanova, and A. V. Pokhilko, *Biofizika*, **40** (2), 434 (1995).
16. V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, and F. I. Ataullakhanov, *Thromb. Res.*, **84** (4), 225 (1996).
17. V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, and F. I. Ataullakhanov, *Thromb. Res.*, **84** (5), 333 (1996).
18. V. I. Zarnitsina, F. I. Ataullakhanov, A. I. Lobanov, and O. L. Morozova, *Chaos*, **11** (1), 57 (2001).
19. M. V. Ovanesov, J. V. Krasotkina, L. I. Ul'yanova, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1572** (1), 45 (2002).
20. M. A. Pantelev, V. I. Zarnitsina, and F. I. Ataullakhanov, *Eur. J. Biochem.*, **269** (8), 2016 (2002).
21. M. A. Pantelev, E. L. Saenko, N. M. Ananyeva, and F. I. Ataullakhanov, *Biochem. J.*, **381** (3), 779 (2004).
22. M. A. Pantelev, N. M. Ananyeva, N. J. Greco, et al., *FEBS J.*, **273** (2), 374 (2006).
23. M. A. Pantelev, M. V. Ovanesov, D. A. Kireev, et al., *Biophys. J.*, **90** (5), 1489 (2006).
24. F. I. Ataullakhanov and M. A. Pantelev, *Pathophysiol Haemost Thromb.* **34** (2-3), 60 (2005).
25. M. A. Pantelev, N. M. Ananyeva, F. I. Ataullakhanov, and E. L. Saenko, *Curr. Pharm. Des.*, **13** (14), 1457 (2007).
26. M. A. Pantelev, A. N. Balandina, E. N. Lipets, et al., *Biophys. J.*, **98** (9), 1751 (2010).
27. A. N. Balandina, A. M. Shibeko, D. A. Kireev, et al., *Biophys. J.*, **101** (8), 1816 (2011).
28. A. M. Shibeko, E. S. Lobanova, M. A. Pantelev, and F. I. Ataullakhanov, *BMC Syst. Biol.*, **4**, 5 (2010).
29. O. A. Fadeeva, M. A. Pantelev, S. S. Karamzin, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **75** (6), 734 (2010).
30. L. A. Parunov, O. A. Fadeeva, A. N. Balandina, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **9** (9), 1825 (2011).
31. N. M. Dashkevich, M. V. Ovanesov, A. N. Balandina, et al., *Biophys. J.*, **103** (10), 2233 (2012).
32. A. D. Kuprash, A. M. Shibeko, R. Vijay, et al., *Biophys. J.*, **115** (12), 2461 (2018).
33. F. I. Ataullakhanov, R. I. Volkova, G. T. Gurii, and V. I. Sarbash, *Biofizika*, **40** (6), 1320 (1995).
34. M. V. Ovanesov, N. M. Ananyeva, M. A. Pantelev, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **3** (2), 321 (2005).
35. M. V. Ovanesov, M. A. Pantelev, E. I. Sinauridze, et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **19** (8), 743 (2008).
36. O. A. Fadeeva, M. A. Pantelev, S. S. Karamzin, et al., *Biochemistry*, **75** (6), 734 (2010).
37. N. P. Soshitova, S. S. Karamzin, A. N. Balandina, et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **23** (6), 498 (2012).
38. E. Lipets, O. Vlasova, E. Urnova, et al., *PLoS One*, **9** (1), e87692 (2014).
39. K. Lobastov, G. Dementieva, N. Soshitova, et al., *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.*, **8** (1), 31 (2020).
40. E. M. Koltsova, A. N. Balandina, K. I. Grischuk, et al., *J. Perinat. Med.*, **46** (3), 251 (2018).
41. E. M. Koltsova, M. A. Sorokina, A. S. Pisaryuk, et al., *PLoS One*, **16** (12), 1 (2021).
42. E. Voroshilina, R. Ovsepyan, E. Plotko, et al., *Bull. RSMU*, **40** (2015).
43. A. N. Balandina, E. M. Koltsova, T. A. Teterina, et al., *PLoS One*, **14** (5), e0216724 (2019).
44. M. A. Gracheva, E. S. Urnova, E. I. Sinauridze, et al., *Leuk. Lymphoma*, **56** (12), 3418 (2015).
45. A. N. Balandina, I. I. Serebriyskiy, A. V. Poletaev, et al., *PLoS One*, **13** (6), e0199900 (2018).
46. E. A. Seregina, A. V. Poletaev, E. V. Bondar, et al., *Thromb. Res.*, **176**, 11 (2019).
47. E. A. Seregina, N. V. Tsvetaeva, O. F. Nikulina, et al., *Blood Cells Mol. Dis.*, **54** (2), 144 (2015).
48. E. A. Seregina, O. F. Nikulina, N. V. Tsvetaeva, et al., *Int. J. Hematol.*, **99** (5), 588 (2014).
49. E. M. Koltsova, E. N. Balashova, A. A. Ignatova, et al., *Pediatr. Res.*, **85** (1), 63 (2019).
50. E. I. Sinauridze, T. A. Vuimo, I. D. Tarandovskiy, et al., *Talanta*, **180**, 282 (2018).
51. Ф. И. Атауллаханов, А. Н. Баландина, Д. М. Варданян и др., *Применение теста тромбодинамики для*

оценки состояния системы гемостаза. Учебно-методические рекомендации (2015).

52. A. Maniatis, P. Van der Linden, and J. F. Hardy, In *Alternatives to Blood Transfusion in Transfusion Medicine*, 2nd ed. (Blackwell Publ. Ltd, Oxford, UK, 2011), part 3, pp. 83–202.
53. G. R. Phillips, D. R. Kauder, and C. W. Schwab, *Postgrad. Med.*, **95** (4), 61 (1994).
54. L. A. Lapointe and K. T. Von Rueden, *AACN Clin. Issues*, **13** (2), 192 (2002).
55. J. F. Hardy, P. De Moerloose, and M. Samama, *Can. J. Anaesth.*, **51** (4), 293 (2004).
56. B. Sorensen and D. Fries, *Br. J. Surg.*, **99** (Suppl. 1), 40 (2012).
57. E. I. Sinauridze, A. S. Gorbatenko, E. A. Seregina, et al., *Sci. Rep.*, **7** (1), 1 (2017).
58. J. R. Hewson, P. B. Neame, N. Kumar, et al., *Crit. Care Med.*, **13** (5), 387 (1985).
59. D. Ciavarella, R. L. Reed, R. B. Counts, et al., *Br. J. Haemost.*, **67** (3), 365 (1987).
60. R. B. Counts, C. Haisch, T. L. Simon, et al., *Ann. Surg.*, **190** (1), 91 (1979).
61. G. A. Allen, A. S. Wolberg, J. A. Oliver, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **2** (3), 402 (2004).
62. J. Jesty, *Blood*, **66**, 1189 (1985).
63. K. Ekseth, L. Abildgaard, M. Vegfors, et al., *Anaesthesia*, **57** (11), 1102 (2002).
64. T. G. Ruttman, M. F. James, and J. F. Viljoen, *Br. J. Anaesth.*, **76** (3), 412 (1996).
65. E. De Smedt, R. and C. Hemker, *Thromb. Haemost.*, **101** (01), 165 (2009).
66. T. G. Ruttman, M. F. Jame, and I. Aronson, *Br. J. Anaesth.*, **80** (5), 612 (1998).
67. S. B. Janvrin, G. Davies, and R. M. Greenhalgh, *Br. J. Surg.*, **67** (10), 690 (1980).
68. K. J. Tuman, B. D. Spiess, R. J. McCarthy, and A. D. Ivankovich, *Anesth. Analg.*, **66** (9), 856 (1987).
69. K. F. J. Ng, C. C. K. Lam, and L. C. Chan, *Br. J. Anaesth.*, **88** (4), 475 (2002).
70. H. C. Hemker and S. Beguin, *Thromb. Haemost.*, **84** (11), 747 (2000).
71. T. G. Ruttman, *Br. J. Anaesth.*, **88** (4), 470 (2002).
72. V. G. Nielsen and M. S. Baird, *Anesth. Analg.*, **90** (3), 541 (2000).
73. V. G. Nielsen, *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **15** (1), 55 (2004).
74. H. C. Hemker, P. Giesen, R. Al Dieri, et al., *Haemost. Thromb.*, **33** (1), 4 (2003).
75. I. V. Gribkova, E. N. Lipets, I. G. Rekhtina, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 29242 (2016).
76. Е. И. Синауридзе, А. С. Горбатенко, И. В. Грибкова и др., *Технологии живых систем*, **5** (1), 3 (2008).
77. Е. И. Синауридзе, С. С. Суров, И. В. Грибкова и др., *Технологии живых систем*, **6** (8), 67 (2009).
78. Е. И. Синауридзе, А. Ю. Буланов, О. В. Щербакова и др., *Терапевтич. архив*, **81** (1), 52 (2009).
79. Е. И. Синауридзе, И. В. Грибкова и С. И. Обыденный, *Гематол. и трансфузиол.*, **59** (S1), 26 (2014).
80. E. I. Sinairidze and I. V. Gribkova, *J. Thromb. Haemost.*, **9** (Suppl. 2), 506 (2011).
81. V. G. Nielsen, *Acta Anesthesiol. Scand.*, **49** (8), 1163 (2005).
82. D. Y. Nechipurenko, N. Receveur, A. O. Yakimenko, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **39** (1), 37 (2019).
83. A. D. Megalinskiy, V. M. Loginova, A. M. Shibeko, et al., *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A*, **16** (1), 38 (2022).
84. A. S. Zhalyalov, M. A. Pantelev, M. A. Gracheva, et al., *PLoS One*, **12** (7), e0180668 (2017).
85. A. M. Shibeko, B. Chopard, A. G. Hoekstra, and M. A. Pantelev, *Biophys. J.*, **119** (3), 638 (2020).
86. G. L. Dale, P. Friese, P. Batar, et al., *Nature*, **415** (6868), 175 (2002).
87. M. A. Pantelev, N. M. Ananyeva, N. J. Greco, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **3** (11), 2545 (2005).
88. A. N. Sveshnikova, F. I. Ataullakhanov, and M. A. Pantelev, *Mol. Biosyst.*, **11** (4), 1052 (2015).
89. Y. N. Kotova, F. I. Ataullakhanov, and M. A. Pantelev, *J. Thromb. Haemost.*, **6** (9), 1603 (2008).
90. T. A. Kovalenko, M. A. Pantelev, and A. N. Sveshnikova, *J. Theor. Biol.*, **435**, 125 (2017).
91. Y. N. Kotova, N. A. Podoplelova, S. I. Obyedenny, et al., *Thromb. Haemost.*, **119** (6), 906 (2019).
92. N. A. Podoplelova, A. N. Sveshnikova, Y. N. Kotova, et al., *Blood*, **128** (13), 1745 (2016).
93. A. A. Abaeva, M. Canault, Y. N. Kotova, et al., *J. Biol. Chem.*, **288** (41), 29621 (2013).
94. N. R. Hill, S. T. Fatoba, J. L. Oke, and J. A. Hirst, *PLoS One*, **11** (7), e0158765 (2016).
95. N. N. Topalov, Y. N. Kotova, S. A. Vasil'ev, and M. A. Pantelev, *Br. J. Haematol.*, **157** (1), 105 (2012).
96. S. I. Obyedenny, A. N. Sveshnikova, F. I. Ataullakhanov, and M. A. Pantelev, *J. Thromb. Haemost.*, **14** (9), 1867 (2016).
97. S. S. Shakhidzhanov, V. I. Shaturny, M. A. Pantelev, and A. N. Sveshnikova, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850** (12), 2518 (2015).
98. A. N. Sveshnikova, A. V. Balatskiy, A. S. Demianova, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **14** (10), 2045 (2016).
99. J. L. Dunster, M. A. Pantelev, J. M. Gibbins, and A. N. Sveshnikova, *Methods Mol. Biol.*, **1812**, 255 (2018).

100. S. I. Obydenyi, E. O. Artemenko, A. N. Sveshnikova, et al., *Haematologica*, **105** (4), 1095 (2020).
101. A. Martyanov, D. S. Morozova, M. A. Sorokina, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (9) 3035 (2020).
102. A. Martyanov, F. A. Balabin, J. L. Dunster, et al., *Biophys. J.*, **118** (11), 2641 (2020).
103. A. Martyanov, A. E. Boldova, M. G. Stepanyan, et al., *Thromb. Res.*, 211, 27 (2022).
104. O. Yakimenko, F. Y. Verholomova, Y. N. Kotova, et al., *Biophys. J.*, **102** (10), 2261 (2012).
105. D. Y. Nechipurenko, A. M. Shibeko, A. N. Sveshnikova, and M. A. Panteleev, *Hamostaseologie*, **40** (4), 524 (2020).
106. A. Tosenberger, F. I. Ataulakhanov, N. Bessonov, et al., *J. Theor. Biol.*, **337**, 30 (2013).
107. V. Belyaev, M. A. Panteleev, and F. I. Ataulakhanov, *Biophys. J.*, **109** (2), 450 (2015).
108. T. J. Stalker, E. A. Traxler, J. Wu, et al., *Blood*, **121** (10), 1875 (2013).
109. V. N. Kaneva, J. L. Dunster, V. Volpert, et al., *Biophys. J.*, **120** (2), 334 (2021).
110. P. V. Trifanov, V. N. Kaneva, S. V. Strijhak, et al., *Supercomput. Front. Innovations*, **5** (4), 67 (2018).
111. A. Masalceva, V. N. Kaneva, M. A. Panteleev, et al., *J. Biomechanics*, **130**, 110801 (2022).

Mechanisms Involved in Regulation of Blood Coagulation: History of Research and Perspectives

D.Y. Nechipurenko*, **, ***, **M.A. Panteleev***, **, ***, ****, **E.I. Sinauridze****, ***,
K.S. Troyanova*, **, **A.D. Megalinsky****, **N.A. Podoplelova****, ***,
A.M. Shibeko**, ***, **A.N. Balandina****, ***,
E.V. Koltsova**, ***, and **F.I. Ataulakhanov***, **, ***, ****

**Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

***Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences,
Srednyaya Kalinikovskaya ul. 30, Moscow, 109029 Russia*

****National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev,
ul. Samory Mashela 1, Moscow, 117997 Russia*

*****Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Moscow, 115184 Russia*

Blood clotting is the most important physiological response in the body to disruption to vascular structure or vessel wall abnormalities. This process is non-stationary, involving many not fully established mechanisms of spatial regulation, and an understanding of this process is essential for the prevention of a large number of life-threatening conditions. This review is focused on investigations into the research of blood clotting processes by a team of biophysicists, alumni and employees of the Biophysics Department of the Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, who created one of the leading Russian scientific schools for experimental and theoretical approaches to the study of the hemostasis system. The review describes the main directions of research, which included many diverse aspects of the problem - from the development of theoretical models of blood coagulation to the development and clinical studies of new methods for assessing the state of the hemostasis system.

Keywords: hemostasis, blood coagulation, fibrin, thrombin, platelets

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ МОНООКСИДА АЗОТА В ЭРИТРОЦИТСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТАХ КРОВИ ПРИ ЕЕ ХРАНЕНИИ И ИХ ОПТИКО-МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

© 2023 г. Н.В. Акулич^{*,#}, В.В. Зинчук^{**}

^{*}Национальная антидопинговая лаборатория, а/г Лесной, 31, Минский район, 223040, Беларусь

^{**}Гродненский государственный медицинский университет, ул. М. Горького, 80, Гродно, 230009, Беларусь

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

Поступила в редакцию 15.01.2022 г.

После доработки 15.01.2022 г.

Принята к публикации 01.11.2022 г.

Методом проточной цитометрии изучено внутриклеточное содержание монооксида азота в эритроцит-содержащих компонентах крови при ее хранении с гемоконсервантом в течение четырех недель. Установлено, что хранение крови сопровождается ростом внутриклеточного содержания монооксида азота в эритроцитах и изменением оптико-морфометрических параметров красных кровяных телец. На ранних этапах хранения эритроцитсодержащие компоненты крови были представлены дискоцитами, на поздних этапах — преобладали сфероциты при возрастании количества микроцитов, накапливающих монооксид азота и имеющих сниженный уровень внутриклеточного гемоглобина.

Ключевые слова: монооксид азота, проточная цитометрия, эритроциты, консервация крови.

DOI: 10.31857/S0006302923010088, EDN: NZYGLR

В последнее время отмечается возрастание интереса к выяснению структурно-функциональных изменений эритроцитов при хранении, лимитирующим качество эритроцитсодержащих компонентов донорской крови [1–3]. Это связано с пониманием того, что эти клетки периферической крови не только играют существенную роль в поддержании гомеостаза, обеспечивая газотранспортные и реологические свойства крови, но и оказывают влияние на кровоток на уровне микроциркуляторного русла и магистральных сосудов [3–5].

Согласно рекомендациям, жизнеспособность эритроцитов влияет на эффективность переливания крови [3]. В практике гемотрансфузиологов описаны негативные последствия таких процедур, возникающие как из-за индивидуальных различий между донором и реципиентов, так и являющиеся следствием хранения эритроцитов [3, 7, 8]. Общеизвестно, что эритроциты для переливания хранят при 1–6°C до трех-семи недель, либо при температуре –65°C и ниже — более длительный период времени. Нахождение клеток в гемоконтейнере с гемоконсервантом в условиях гипотермии не полностью воспроизводит условия *in vivo*. Применяемые для хранения эритроцитов компоненты рас-

творов (аденин, гуанозин, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, маннитол) предназначены для уменьшения функциональных и метаболических изменений в эритроцитсодержащих компонентах крови за счет поддержания энергетического обмена эритроцитов, а также буферной и осмотической стабильности [3]. Несмотря на применяемые растворы, происходит постепенная деградация различных компонентов эритроцитов, в совокупности называемых повреждением при хранении, что приводит к ограничению срока хранения. Так, в работе [3] указывается, что «... в процессе хранения донорских эритроцитов отмечается снижение содержания NO, нарушающее регуляцию микроциркуляции». Поскольку активность L-аргинин-NO-системы эритроцитов может зависеть от морфофункциональных свойств красных кровяных телец, целью исследования является оценка оптико-морфометрических параметров и внутриклеточного содержания NO в эритроцитсодержащих компонентах крови при хранении крови в течение четырех недель.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе Национальной антидопинговой лаборатории (Минский

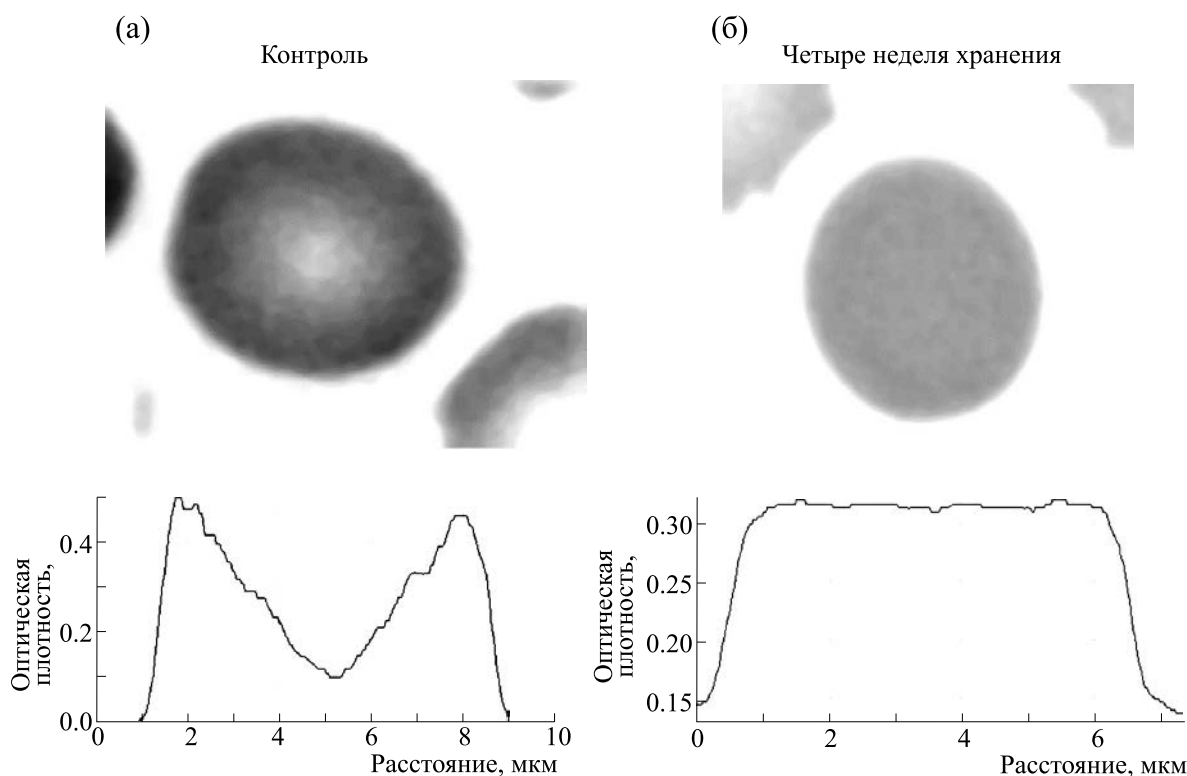


Рис. 1. Оптико-морфологические характеристики эритроцитов при хранении крови: (а) — контроль, (б) — после четырех недель хранения. Вверху — микрофотографии эритроцитов, внизу — соответствующие гистограммы распределения оптической плотности.

р-н, Беларусь). Каждая доза эритроцитов ($400 \text{ мл} \pm 5\%$, гематокрит 70%) на протяжении четырех недель хранилась в пластиковом пакете, предварительно заполненном гемоконсервантом PAGGSM (Фрезениус Каби АГ, Германия), в состав которого входят раствор хлорида натрия, аденин, глюкоза, гуанозин и маннитол. Забор крови добровольцев проводили с использованием $\text{K}_2\text{ЭДТА}$. Кровь была подвергнута лейкофилтрации при сборе, после чего были получены суспензии эритроцитов в соответствии со стандартными процедурами подготовки. Контролем служила кровь добровольцев до хранения. Всего проведено 14 серий исследований.

Оптико-морфометрический анализ фиксированных метанолом и окрашенных эозин метиленовым синим (по Май-Грюнвальду) препаратов крови проводили в течение четырех недель. В исследовании использовали микроскоп OLYMPUS BX-53, дополненный монохроматическим фильтром с длиной волны 540 нм для проведения денситометрических исследований клеток. Для анализа каждого препарата создавали архив, содержащий полутоновые (8-битные) изображения не менее 300 эритроцитов с разных (случайных) участков мазка, содержащих монослой эритроцитов. Микроскопический анализ изображений,

применяемый в исследовании, позволял количественно оценить денситометрические параметры красных кровяных телец (рис. 1). Для оценки площади поверхности эритроцитов (S_{area}) использовали алгоритмы программного обеспечения «Диаморф-ЦИТО» (Россия). Поскольку алгоритм подсчета S_{area} не учитывает выросты цитоплазматической мембраны, ее значения подсчитывали только для диско- и сфероцитов, исключая из анализа эхино- и сфероэхиноцитарные трансформации красных кровяных телец.

Концентрацию гемоглобина, средний объем эритроцита и показатель ширины распределения эритроцитов по объему определяли на гематологическом анализаторе XT 2000i (Sysmex, Япония).

Определения внутриклеточного NO проводили методом проточной цитометрии (цитофлуориметр-сортер FACS ARIA, США). Для этого пробы крови окрашивали моноклональными антителами к линейному маркеру эритроцитов (гликофору A, CD 235 a) и диацетильным производным 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA) (Molecular Probes, США). Уровень внутриклеточного содержания NO коррелирует с интенсивностью флуоресценции DAF-FM [9].

Для пробоподготовки использовали фосфатный буфер FACS Flow (BD Bioscience, США). В

Таблица 1. Содержание монооксида азота и оптико-морфометрические характеристики эритроцитов при хранении крови (Ме (25, 75))

Параметр	До хранения (контроль)	Срок хранения (недели)			
		1-я	2-я	3-я	4-я
Площадь поверхности, мкм ²	139.0 (133.3–141.2)	141.6 (138.7–143.9)	132.0 (128.8–134.0)	114.2 (112.4–115.6)*	109.3 (107.4–110.9)*
Средний объем эритроцита, фл	88.2 (83.0–92.0)	95.4 (91.2–99.1)	114.4 (109.0–119.6)*	108.7 (102.6–111.2)*	105.9 (100.4–107.8)*
Показатель ширины распределения эритроцитов по объему, %	12.3 (12.0–12.8)	13.9 (13.6–14.3)*	16.9 (15.9–17.3)*	19.1* (18.4–19.8)*	17.0 (16.1–17.5)*
Интенсивность флуоресценции нормоцитов, (о.е.)	242.0 (240.0–248.0)	234.7 (233.3–236.8)	307.0 (289.2–315.0)*	327.6 (313.2–337.0)*	310.0 (300.7–315.0)*
Интенсивность флуоресценции микроцитов, (о.е.)	0	0	554.0 (512.0–560.0)*	617.4 (599.0–632.0)*	783.8 (772.7–801.1)*
Значение малоуглового рассеяния луча лазера нормоцитами, (о.е.)	1821.0 (1668.0–1962.0)	1853.5 (1763.0–1978.1)	1805.0 (1713.0–1868.0)*	1895.3 (1788.0–1961.4)*	1636.8 (1612.0–1740.9)*
Значение малоуглового рассеяния луча лазера микроцитами, (о.е.)	0	0	1142.0 (1136.0–1157.0)*	1342.1 (1321.2–1377.0)*	1224.0 (1217.6–1240.1)*

Примечание. * — Достоверные изменения в сравнении с контролем.

каждой пробе анализировали не менее 40000 клеток. Кроме того, на проточном цитофлуориметре определяли содержание гемоглобина в отдельном эритроците. Для этого использовали значения малоуглового лазерного рассеяния, которые коррелируют с концентрацией гемоглобина в клетке [10]. Для исключения влияния двояковогнутой формы эритроцитов на определение клеточного гемоглобина эритроциты превращали в правильный сфероид, обрабатывая клетки додецилсульфатом натрия после их предварительной фиксации глютаровым альдегидом.

Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием программы для персонального компьютера Statistica 10.0. Полученные значения представлены в виде медианы, 25-й и 75-й процентиля. Величина p рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма. Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Достоверность дисперсионного анализа множественных сравнений оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Корреляционный

анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ микроскопических препаратов показал, что в течение первой недели хранения эритроциты характеризовались наличием впадины в центре клетки (пэллор) и выраженным возвышением на периферии (тор), особенности морфологии не выявлены — большинство клеток представлено нормоцитами.

Площадь поверхности эритроцитов контрольных образцов составляла 139.0 (133.3–141.2) мкм², а, хранящихся в течение недели — 141.6 (138.7–143.9) мкм² (табл. 1). Таким образом, различия в величинах площади поверхности зарегистрированы не были. Дальнейшее хранение (в течение двух и более недель) приводило к постепенному превращению нормоцитов в сфероциты, при этом площадь поверхности значительно снижалась — до 114.2 (112.4–115.6) ($p < 0.05$) и 109.3 (107.4–110.9) мкм² ($p < 0.05$) на третьей и четвер-

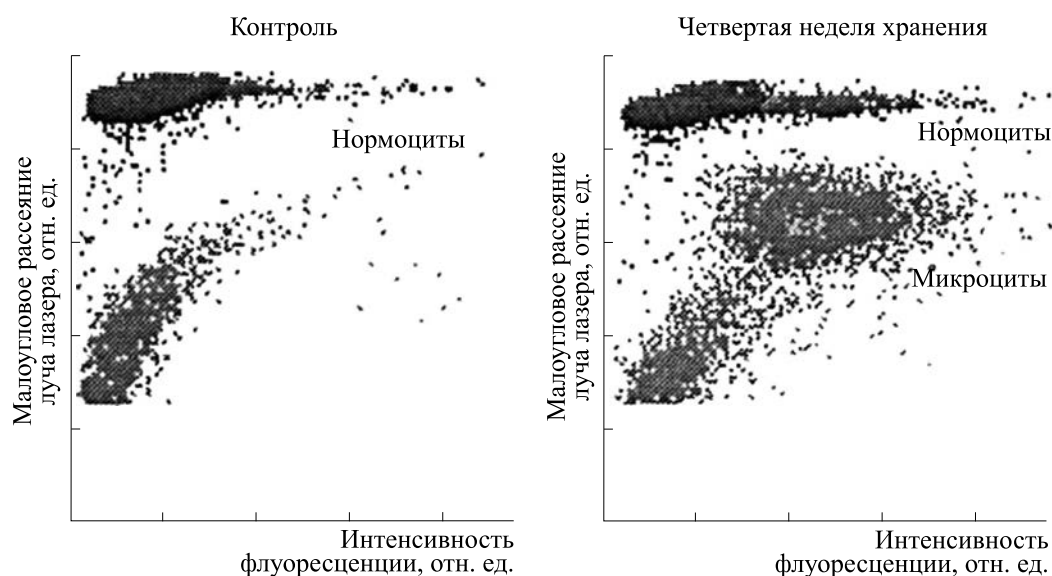


Рис. 2. Внутриклеточное содержание гемоглобина клеток — контроль и хранящейся крови по данным гематологического анализатора ХТ 2000i: гистограмма рассеяния клеток по малоугловому рассеянию луча лазера (FSC) и интенсивности флуоресценции (SFL).

той неделях соответственно. Все эритроциты были представлены сфероцитами, с сохранением высоких значений ширины полувысоты гистограммы распределения эритроцитов по объему.

Величина среднего объема эритроцита, измеренная волюметрическим методом на автоматическом гематологическом анализаторе, наоборот повышалась — с 88.2 (83.0–92.0) до 114.4 (109.0–119.6) фл ($p < 0.05$) — и превышала контрольные значения со второй по четвертую недели наблюдения. При этом и на первой неделе исследования отмечалась тенденция к росту среднего объема, составившего 95.4 (91.2–99.1) фл ($p > 0.05$).

К концу первой недели наблюдения для эритроцитов был характерен рост гетерогенности эритроцитов по объему — 13.9 (13.6–14.3) % ($p < 0.05$), хотя значение анизоцитоза не превышало нормы. Более 80% красных кровяных телец было представлено сфероцитами, у части эритроцитов регистрировался участок пэллора. В мазке отсутствовали агрегаты, что предполагает наличие нормальных значений дзета-потенциала.

Хранение крови в течение двух недель с использованием PAGGSM сопровождалось появлением микроцитов, их количество составляло 17%. Выявлено увеличение среднего объема эритроцитов с 88.2 до 114.4 фл ($p < 0.05$). На некоторых эритроцитах визуализировались спиккулы. Отмечался рост анизоцитоза, показатель ширины распределения эритроцитов по объему достиг наибольших значений к концу третьей недели хранения — 19.1 (18.4–19.8) % ($p < 0.05$), превышая нормальные значения.

Для получения дополнительной информации были проанализированы гистограммы распределения неядерных клеток (эритроцитов и тромбоцитов) образцов по значениям прямого светорассеяния и флуоресценции гематологического анализатора (рис. 2), которые предоставляют вспомогательную информацию. Проведенный анализ позволил выявить среди проб хранящейся более двух недель крови дополнительную популяцию клеток, имеющую меньшие значения прямого светорассеяния. Согласно данным работы [9], такие клетки имеют меньшие линейные размеры и содержание гемоглобина, что коррелирует с микроцитарной группой красных кровяных телец.

Исследования при помощи проточной цитометрии показали (рис. 3), что CD 235-позитивные клетки проб крови до второй недели хранения были представлены нормоцитами, микроциты в образцах отсутствовали. Нормоциты контрольных образцов характеризовались высокой неоднородностью сигнала бокового светорассеяния, после второй недели хранения, популяция этих клеток становилась более однородной. Поскольку для пробоподготовки использовали додецилсульфат натрия, превращающий эритроциты в правильный сфероид, вариации бокового светорассеяния не связаны с ориентацией клеток в потоке проточного цитометра при проведении анализа.

Уровень монооксида азота нормоцитов, измеренный по интенсивности флуоресценции DAF-FM, до первой недели хранения не различался и составлял соответственно 242.0 (240.0–248.0) и

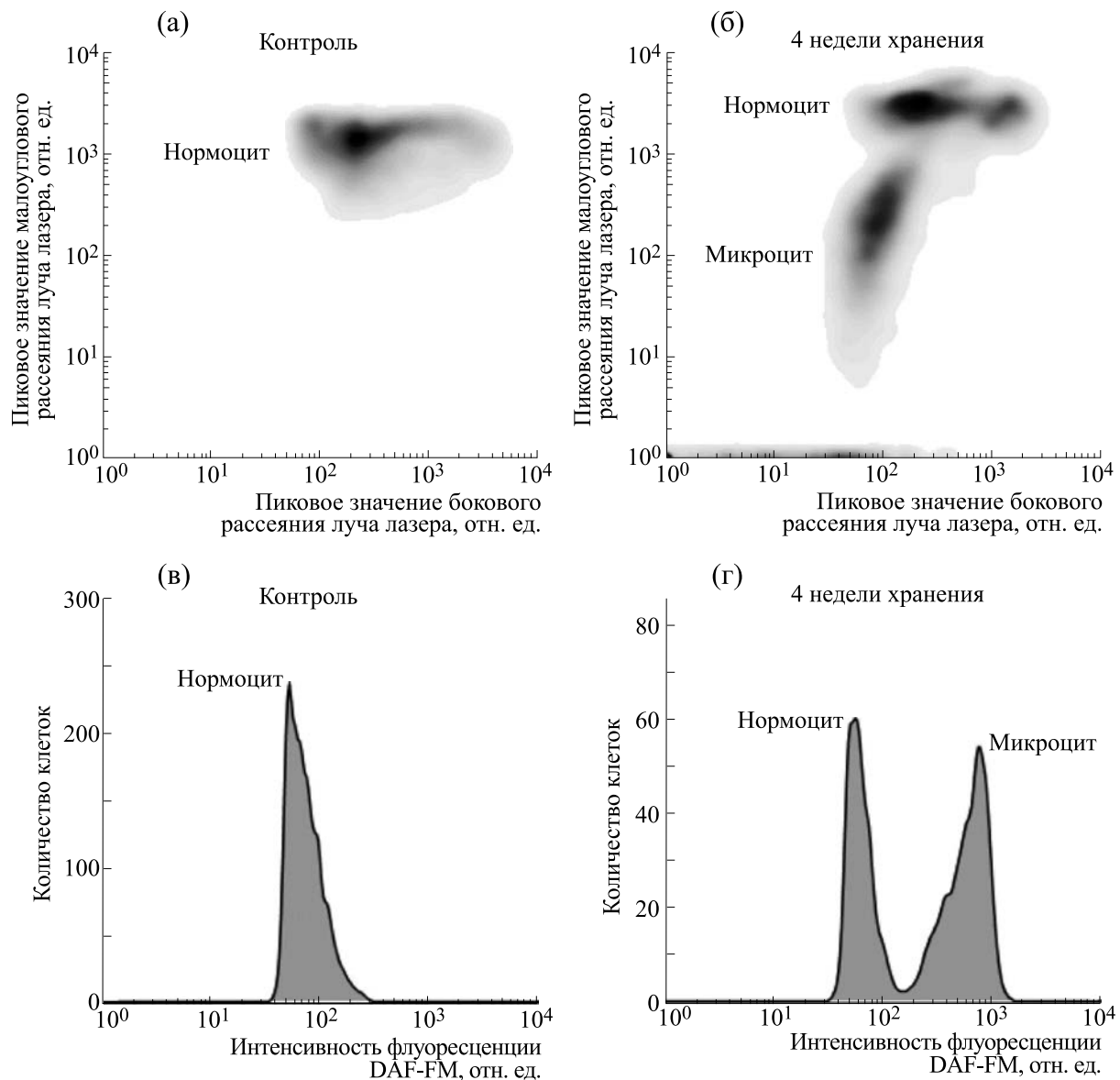


Рис. 3. Сравнительный анализ содержания монооксида азота в эритроцитах крови в процессе хранения (четыре недели): (а) и (б) – гистограмма рассеяния клеток по малоугловому (FSC) и боковому (SSC) рассеянию луча лазера; (в) и (г) – распределение клеток по содержанию монооксида азота (DAF-FM).

234.7 (233.3–236.8) о.е. ($p > 0.05$) в контроле и в крови, хранящейся одну неделю. Значение прямого светорассеяния, свидетельствующее о внутриклеточном содержании гемоглобина, составляло 1821.0 (1668.0–1962.0) о.е. в контроле и 1853.5 (1763.0–1978.1) о.е. ($p > 0.05$) у крови, хранящейся одну неделю.

При увеличении продолжительности хранения эритроцитсодержащих компонентов донорской крови в пробах увеличилось количество микроцитов. Так, доля клеток с низкими значениями прямого светорассеяния постепенно нарастает с 17 до 26% ($p < 0.05$) со второй по третью неделю наблюдения, а затем к четвертой неделе

достигает 70% ($p < 0.05$). Содержание монооксида азота в нормоцитах продолжало постепенно нарастать, увеличиваясь к третьей неделе наблюдения на 35% ($p < 0.05$). Затем уровень NO несколько снизился и превышал значения контроля на 28% ($p < 0.05$).

Наибольшее содержание монооксида азота выявлено в микроцитах. Эти клетки экспрессируют на цитоплазматической мембране линейный маркер эритроцитов (CD 235a) и регистрируются в виде компактного облака на гистограмме при анализе цельной крови на гематологическом анализаторе. Для микроцитов было характерно сниженное количество внутриклеточного гемогло-

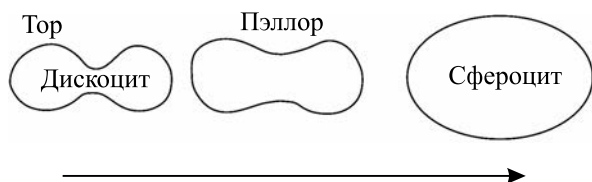


Рис. 4. Трансформация эритроцита в процессе хранения (четыре недели) крови по данным оптико-морфометрического анализа.

бина 1142.0 (1136.0–1157.0) о.е. ($p < 0.05$), на второй неделе наблюдения по сравнению с контролем $p < 0.05$, и этот уровень продолжал сохраняться до завершения периода наблюдения. Принимая во внимание, что доля таких клеток к четвертой недели хранения значительно (более чем в 20 раз) выросла, а интенсивность флуоресценции DAF-FM превышала как уровень флуоресценции нормоцитов на второй неделе хранения ($p < 0.05$), так и интенсивность флуоресценции DAF-FM дискоцитов в контроле, можно констатировать значительный суммарный рост внутриклеточного содержания монооксида азота эритроцитсодержащих компонентов донорской крови при хранении. На основании полученных данных можно предположить, что снижение значений малоуглового рассеяния луча лазера связано с деструкцией и выходом гемоглобина из клеток (рис. 4), т.е. постепенным превращением дискоцита в сфероцит и формированием «теней эритроцитов», содержащих мембранносвязанный гемоглобин и большое количество NO.

Известно, что жизнеспособность красных кровяных телец эритроцитсодержащих компонентов крови не удается поддерживать длительное время, несмотря на низкую температуру хранения, применение консерванта и лейкоредукцию/лейкодеплецию [3]. С использованием метода проточной цитометрии нами была установлена взаимосвязь (рис. 5) между оптико-морфометрическими параметрами эритроцитов и внутриклеточным содержанием монооксида азота: на ранних этапах хранения эритроцитсодержащие компоненты крови были представлены нормоцитами, содержащими меньшее количество монооксида азота, на поздних этапах – преобладали сфероциты с повышенным содержанием NO.

В частности, было установлено, что между средним объемом эритроцита и внутриклеточным содержанием NO существует прямо пропорциональная корреляционная связь ($r = 0.63$, $p < 0.001$). Между площадью поверхности эритроцита и внутриклеточным содержанием NO существует еще более тесная отрицательная корреляционная зависимость ($r = -0.83$, $p < 0.001$), которая свидетельствует о снижении диффузионной поверхности по мере роста внутриклеточного NO. Следует обратить внимание на то, что самый значительный рост монооксида азота отмечен в микроцитарной фракции красных кровяных телец.

Показано, что в хранящейся крови парциальное давление кислорода выше чем в контроле, особенно высоко его значение в супернатанте [12] и верхнем слое клеток. Сатурация гемоглобина

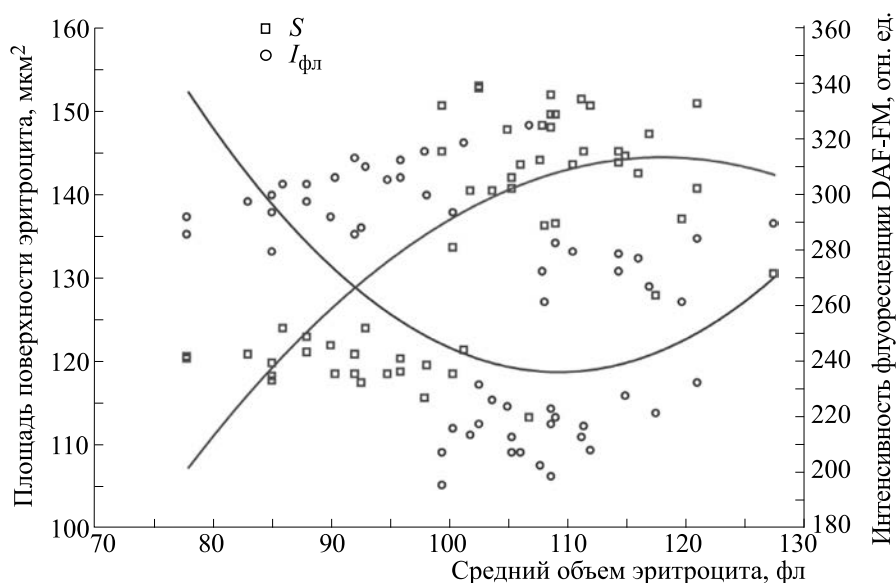


Рис. 5. Зависимость между площадью поверхности эритроцита (левая ось ординат) и внутриклеточным содержанием монооксида азота (правая ось ординат) от объема эритроцита (ось абсцисс).

различается от 41 до 57%, наименьшие значения были характерны для средних по расположению в мешке для хранения слоев клеток. Следовательно, в зависимости от кислородного обеспечения клеток в пакете хранящейся крови в эритроцитах могут происходить как процессы образования NO из L-аргинина, так и скавенжирования монооксида азота. Другим возможным механизмом регулирования уровня внутриклеточного NO при хранении крови является нитритредуктазная реакция [11].

Как следует из полученных данных, в поддержании постоянства внутренней среды организма, и, в частности, в обеспечении кислородтранспортной функции крови в условиях, создаваемых при ее хранении, принимает участие L-аргинин-NO-система эритроцитов [2]. С использованием спектроскопии электронного парамагнитного резонанса и абсорбционной спектроскопии установлено [13], что хранящиеся эритроциты обладают более высокой способностью к скавенжированию монооксида азота, чем в контроле, при этом наилучшей способностью обладают дискоциты. В то же время установлена обратно пропорциональная зависимость между средней концентрацией гемоглобина в эритроците и его способностью к скавенжированию NO [14].

Проведена оценка продукции NO эритроцитами у пациентов с серповидноклеточной анемией, вызванной механическим воздействием (напряжением сдвига) [15]. Исходный уровень продукции монооксида азота у данных пациентов был выше (особенно в субпопуляции дискоцитов пациентов с этим заболеванием по сравнению с контролем. В ответ на это воздействие регистрировали рост NO во всех исследуемых группах наблюдения. Этот выявленный феномен позволяет высказать предположение о влиянии аминокислотного состава и структуры гемоглобина на функционирование NO-системы эритроцитов.

Возможным объяснением описанных в литературе гемодинамических нарушений, связанных с гемотрансфузией, является рост количества микрочастиц эритроцитов (внеклеточных везикул) при хранении крови [11, 16]. При помощи хемолюминесцентного метода показано, что фосфолипидные везикулы имеют большую способность к скавенжированию монооксида азота [17], чем эритроциты. Отмечаемый нами рост микроцитов, экспрессирующих линейный эритроцитарный маркер при хранении крови и содержащих большее, чем эритроциты, количество NO, несомненно вносит вклад в свойства эритроцитсодержащих компонентов консервированной крови.

ВЫВОДЫ

Хранение крови с использованием гемоконсерванта на протяжении четырех недель сопровождается ростом содержания монооксида азота в эритроцитах, определяемого методом проточной цитометрии.

Выявлены закономерности оптико-морфометрических характеристик эритроцитов на различных этапах хранения крови с гемоконсервантом PAGGSM: на первой-второй неделе хранения эритроцитсодержащие компоненты были представлены дискоцитами, на третьей-четвертой неделе преобладали сфероциты.

Установлена взаимосвязь между оптико-морфометрическими параметрами эритроцитов и внутриклеточным содержанием NO на различных этапах хранения крови. Между средним объемом эритроцита и внутриклеточным содержанием NO существует прямо пропорциональная корреляционная связь, а между площадью поверхности эритроцита и внутриклеточным содержанием данного газотрансммиттера — более тесная обратная пропорциональная корреляционная зависимость.

При хранении эритроцитсодержащих компонентов крови происходит рост количества микроцитов, несущих на своей поверхности линейный эритроидный маркер CD 235 а, имеющих сниженный уровень внутриклеточного гемоглобина и накапливающих монооксид азота.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено комитетом по этике УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория». От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Thangaraju, S. Neerukonda, U. Katneni, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 153 (2021).
2. V.V. Zinchuk, D. D. Zhadko, *Nitric Oxide* **1** (84) 45 (2019).
3. А. И. Костин, О. А. Майорова, А. В. Ложкин и др., *Трансфузиология*, **12** (2), 12 (2011).
4. В. В. Зинчук и Е. С. Билецкая, *Биофизика*, **65**, 915 (2020).
5. C. Donadee, N. J. Raat, T. Kaniyas, et al., *Circulation*, **124** (4), 465 (2011).
6. M. García-Roa, M. Del Carmen Vicente-Ayuso, A. M. Bobes, et al., *Blood Transfus.*, **15** (3), 22 (2017).

7. R. Stapley, B. Y. Owusu, and A. Brandon, *Biochem. J.*, **446** (3), 499 (2012).
8. F. J. Willekens, J. M. Werre, Y. A. Groenen-Döpp, et al., *Br. J. Haematol.*, **141** (4), 549 (2008).
9. N. Li, J. Sul, and P. Haydon, *Neuroscitnce*, **23**, 10302 (2003).
10. C. Briggs, R. Rogers, B. Tompson, et al., *Sysmex J. Int.*, **11** (2), 63 (2001).
11. J. T. Alexander, A. M. El-Ali, J. L. Newman, et al., *Transfusion*, **53** (11), 2619 (2013).
12. B. Sandhagen, C. F. Hogman, C-H de Verdier, et al., *Vox Sang*, **55**, 139 (1988).
13. C. Liu, X. Liu, J. Janes, et al., *Redox Biol.*, **2**, 211 (2014).
14. В. П. Реутов, *Успехи биол. наук*, **35**, 189 (1995).
15. S. Suriany, I. Xub H. Liu, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **171**, 143 (2021).
16. A. H. Tayer, N. Amirizadeh, M. Ahmadinejad, et al., *Transfus. Med. Hemother.*, **46** (4), 224 (2019).
17. C. Donadee, N. J. Raat, T. Kaniyas, et al., *Circulation*, **124**, 465 (2011).

Comparative Analysis of the Nitrogen Monoxide Content and Optical-Morphometric Characteristics of Erythrocyte-Containing Blood Components during Storage

N. V. Akulich* and V.V. Zinchuk**

*National Antidoping Laboratory, Lesnoi 31, Minsk Region, 223040 Belarus

**Grodno State Medical University, ul. M. Gorkogo 80, Grodno, 230009 Belarus

Flow cytometry was used to analyze the content of intracellular nitrogen monoxide in erythrocyte-containing blood components during blood storage with hemopreservative for 4 weeks. It was found that storing of blood is accompanied by increased levels of intracellular nitrogen monoxide in erythrocytes and thus by a change in optical and morphometric parameters of red blood cells. In the early stages of storage, erythrocytes were represented by discocytes, and during long storage erythrocytes became more spherical (spherocytes) as the percentage of microcytes that accumulated nitrogen monoxide increased and their intracellular hemoglobin levels were decreased.

Keywords: nitrogen monoxide, flow cytometry, erythrocytes, blood storage

ВЛИЯНИЕ ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ КРОВИ НА ФОНЕ АЦЕТАМИНОФЕН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© 2023 г. А.А. Темнов*, **, А.Н. Склифас*, В.К. Жалимов*, М.Г. Шарапов*, Р.С. Фадеев***, М.И. Кобякова***, Н.И. Кукушкин*, #, **К.А. Рогов******

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

**Московский физико-технический институт (государственный университет), Институтский пер., 9, Долгопрудный Московской области, 141701, Россия

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

****НИИ морфологии человека Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского, ул. Цюрупы 3, Москва, 117418, Россия

#E-mail: nikukushkin@mail.ru

Поступила в редакцию 24.11.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Изучено влияние кондиционированной среды, полученной при культивировании мезенхимальных стволовых клеток, на тяжесть системного воспалительного ответа, вызванного введением ацетаминофена, в том числе его отдаленное влияние на ткани печени. Использование фракции кондиционированной среды <30 кДа оказывало максимальное защитное действие. Белки этой фракции снижают выраженность системной воспалительной реакции и степень фиброза ткани печени в отдаленные сроки после введения токсина. При исследовании тканей печени экспериментальных животных выявлено снижение выраженности гранулоцитарной инфильтрации, коррелирующее со степенью некроза печеночной паренхимы (что подтверждается уровнем цитолитических ферментов). Фракция <30 кДа увеличивала спонтанную и уменьшала индуцированную форбол-12-мириостат-13-ацетатом внутриклеточную продукцию активных форм кислорода. Результаты исследования показывают достоверное увеличение экспрессии макрофаг-ингибирующего фактора и тиреодоксина по сравнению с контролем на фоне повышенной спонтанной продукции активных форм кислорода в нейтрофилах.

Ключевые слова: ацетаминофен, печень, фиброз, стволовые клетки, кондиционированные среды.

DOI: 10.31857/S000630292301009X, EDN: OAFUWG

Передозировка ацетаминофена (АЦ), особенно связанная с истощением системы детоксикации глутатиона, приводит к тяжелым повреждениям паренхимы печени и индукции острой пе-

ченочной недостаточности, прогрессирование которой может привести к смерти больного [1, 2].

Активный метаболит АЦ, N-ацетил-пара-бензохинон, связывается с клеточными белками, приводит к деградации митохондрий гепатоцитов и повреждению митохондриальной ДНК, что вызывает гепатоцеллюлярную гибель [2]. В свою очередь массивный гепатоцеллюлярный некроз и выброс внутриклеточных белков из гепатоцитов в кровь вызывают активацию гранулоцитов и их миграцию в паренхиму печени [3]. Их роль в развитии дальнейшей гепатоцитарной недостаточ-

Сокращения: АЦ — ацетаминофен; NOX2 — НАДФН-оксидаза; АФК — активные формы кислорода; КС — кондиционированная среда; МСК — мезенхимальные стволовые клетки; КС МСК — кондиционированная среда, полученная при культивировании мезенхимальных стволовых клеток; ФМА — форбол-12-мириостат-13-ацетат; МИФ — макрофаг-ингибирующий фактор, NET — нейтрофильные внеклеточные ловушки.

ности в настоящее время активно обсуждается. Некоторые авторы считают, что гиперактивные нейтрофилы усиливают печеночную недостаточность [4–6], в то время как другие исследователи утверждают, что нет прямых доказательств повреждения клеток, связанного с функцией нейтрофилов [7–12]. Однако не вызывает сомнений, что нейтрофилы мигрируют в ткань печени при токсическом воздействии АЦ [3].

Роль оксидного комплекса НАДФН (NOX2), продуцирующего активные формы кислорода (АФК), и его влияние на степень повреждения паренхимы печени неоднозначны. Некоторые авторы показали, что АЦ усиливает активность NOX2 в гепатоцитах, а его ингибирование значительно уменьшает гепатоцеллюлярную недостаточность [13].

Также нет единого мнения о влиянии АФК на процессы регенерации в ткани печени после воздействия АЦ. В частности, авторы работы [14] показали, что активация спонтанной продукции АФК в нейтрофилах будет способствовать регенерации ткани печени после воздействия АЦ, поскольку молекулы АФК, секретируемые нейтрофилами, могут способствовать развитию макрофагов и способствовать процессам регенерации печени после токсического действия АЦ.

С другой стороны, в работе [11] было показано, что у животных с блокировкой NOX2, нейтрофилы которых не могут генерировать АФК, уровень повреждения гепатоцитов, вызванный АЦ, и их способность к регенерации печени такие же, как и в контроле.

Нашими предыдущими исследованиями показано, что кондиционированная среда (КС), и особенно ее фракция <30 кДа, полученная при культивировании мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в атмосфере 10% O₂, оказывает защитное действие при АЦ-индуцированном остром повреждении печени [15, 16].

Отмечено, что клиническое улучшение сопровождается снижением уровня цитолитических ферментов в крови, при этом выраженность центростремительного некроза коррелирует с уровнем гранулоцитарной инфильтрации, наблюдаемой в гистологических срезах.

Цель исследования — сравнить клиническую картину ранних стадий АЦ-индуцированной печеночной недостаточности с функциональной активностью нейтрофилов под действием пептидов КС МСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование острой печеночной недостаточности. Для эксперимента использовали мышесамцов линии Balb/c с массой тела 22–24 г. Всем животным внутрибрюшинно вводили АЦ (270

мг/кг массы тела). Затем животных случайным образом распределяли на три группы. Животным контрольной группы (первая группа, $n = 15$) вводили подкожно культуральную среду с эмбриональной телячьей сывороткой в объеме 0.5 мл. Во второй группе (опытная, $n = 15$) животным вводили подкожно в объеме 0.5 мл КС, полученную в процессе культивирования МСК (общая фракция, концентрация белка 0.5 мг/мл). В третьей группе (опытная, $n = 15$) подкожно в объеме 0.5 мл вводили фракцию КС МСК <30 кДа.

Выделение стволовых клеток костного мозга. Костный мозг извлекали из бедренной кости мышей Balb/c под общей анестезией Зоветилом. Для выделения моноклеарной фракции клеток костного мозга по стандартной методике использовали градиент плотности со стандартным раствором Lympholyte-H (Cedarlane, Канада). Суспензию моноклеарных клеток высевали в чашки Петри и культивировали в среде DMEM с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки в CO₂-инкубаторе во влажной атмосфере с 10% O₂, 5% CO₂ и 85% N₂.

Свойства МСК были подтверждены их остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировкой по стандартной операционной методике с использованием факторов роста [17].

Анализ фенотипического профиля МСК выявил следующие маркеры: 98.7% CD73+, 98.7% CD44+, 94.6% CD105+, 0.1% CD34+, 0.3% CD45+.

Получение кондиционированной среды при культивировании мезенхимальных стволовых клеток. После формирования клеточного монослоя его культуральную среду полностью заменяли и через трое суток объединяли с лизатом МСК.

Получение фракции <30 кДа. КС отделяли ультрафильтрацией через фильтр Minimate TFF Capsule Omega 30K (Pall, США) и выделяли фракцию, содержащую в основном белки с массой <30 кДа.

Гистология. Материалы для гистологического исследования отбирали через 4, 24 и 96 ч, а образцы тканей животных для оценки отдаленных эффектов отбирали через 10 суток после введения АЦ. Образцы биопсии брали у шести животных каждой группы.

Для патоморфологической оценки изменений ткани печени печень фиксировали в нейтральном забуференном 10%-м растворе формальдегида. Патоморфологические изменения в тканях печени оценивали по бальной системе со шкалой от 0 до 3 (0 баллов — без изменений, 1 балл — изменено более 1/3 площади, 2 балла — более 2/3 площади, 3 — 100% области изменений).

Биохимическое обследование. Фермент печени аспартатаминотрансферазу определяли в цельной крови перед экспериментом, а также через 4,

24, 48 и 96 ч после введения АЦ на приборе Re-flatron (ROCH, США).

Оценка внеклеточной ДНК. Концентрацию внеклеточной ДНК определяли с помощью набора для анализа двухцепочечной ДНК Quant-iT PicoGreen (Fisher Scientific, Landsmeer, Нидерланды) по методике, описанной ранее [18]. 10 мкл плазмы добавляли к 90 мкл трис-ЭДТА-буфера (10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5) в 96-луночную культуральную планшете. Каждая лунка содержала 100 мкл раствора PicoGreen (разбавленного 1 : 200 в трис-ЭДТА-буфере). Смесь инкубировали в течение 10 мин в темной комнате при комнатной температуре и измеряли ее флуоресценцию на спектрофлуориметре RF-6000 (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 480 нм и длине волны эмиссии 520 нм.

Выделение мРНК. Суммарную РНК выделяли из 4–6 мг печени с помощью реагентов ExtractRNA («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Образцы печени гомогенизировали в тефлоновом гомогенизаторе в присутствии 1 мл реагента. Лизат инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 18000 g в течение 10 мин. Супернатант переносили в новую пробирку, содержащую 0.2 мл хлороформа. Смесь интенсивно перемешивали, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 18000 g в течение 10 мин при 4°C. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку, содержащую 0.5 мл изопропанола, перемешивали, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 18000 g в течение 10 мин. Осадок дважды промывали 75%-м этанолом. Полученный препарат тотальной РНК растворяли в 50 мкл воды без РНКазы и хранили при –20°C. Качество РНК проверяли по наличию 18s и 28s РНК при электрофорезе в агарозном геле.

Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. Для количественной ПЦР с обратной транскрипцией использовали реагенты компании «Евроген» (Россия). Для синтеза кДНК раствор тотальной РНК и 30 мКс олиго-d(T)15 праймера инкубировали при 70°C в течение 2 мин и сразу переносили на лед. Затем к смеси добавляли 11.5 мкл мастер-микса (1.3 мМ dNTP, 0.02 мкл/мкл ингибитора РНКазы (RiboLock, ThermoFisher Scientific, США), 6 единиц M-MLV-ревертазы и 4 мкл 5-кратного буфера для M-MLV-ревертазы. Для завершения обратной транскрипции образцы инкубировали при 42°C в течение 50 мин. Полученную кДНК использовали для ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными к генам исследуемых белков и эталонного гена. Изменение уровня экспрессии генов рассчитывали по 2-ΔΔCt-методу [19].

Внутриклеточный анализ активных форм кислорода. Индуцируемую и спонтанную окислительную активность оценивали с использованием зонда DCFHDA (Sigma-Aldrich, США) (Ex 485 нм/Em 530 нм). Для оценки индуцируемой окислительной активности клетки инкубировали в питательной среде с форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) (Sigma-Aldrich, США) следующим образом: ФМА добавляли в концентрации 100 нМ в течение 15 мин, промывали свежим сбалансированным солевым раствором Хэнкса и затем инкубировали в растворе Хэнкса с DCFHDA (40 мКс) в течение 15 мин в CO₂-инкубаторе. Для оценки спонтанной окислительной активности клетки инкубировали в растворе Хэнкса без ФМА в течение 15 мин, затем промывали свежим раствором Хэнкса и инкубировали с 40 мКс DCFHDA в течение 15 мин. После окрашивания клетки трижды промывали раствором Хэнкса и анализировали флуоресценцию клеток с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (BD Bioscience, США).

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для обработки непараметрических данных использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биохимическое исследование. Анализ наиболее эффективного способа введения кондиционированной среды животным проводили на первом этапе исследования. Его результаты оценивали по уровню в крови цитолитического фермента аспаратаминотрансферазы, высвобождающегося из разрушенных гепатоцитов под действием токсических продуктов АЦ (рис. 1).

Через 4 ч после начала воздействия АЦ наиболее эффективным способом является внутривенное введение препарата (уровень цитолитического фермента снижается на 19% по сравнению с контролем), а при пероральном и подкожном введении — на 46 и 75% соответственно (рис. 1). Поэтому дальнейшие эксперименты включали подкожное введение АЦ.

Подкожное введение суммарной фракции КС вызывало достоверное снижение уровня цитолитического фермента по сравнению с контролем: на 75% в первые 4 ч и на 50% в первые 24 ч (рис. 2; левые столбцы — контроль; средние «Об. фракция» — общая фракция КС МСК; правые — фракция КС МСК, содержащая белки с массой <30 кДа).

Подкожное введение фракции <30 кДа приводило к максимально значимому снижению уровня аспаратаминотрансферазы в крови в начале

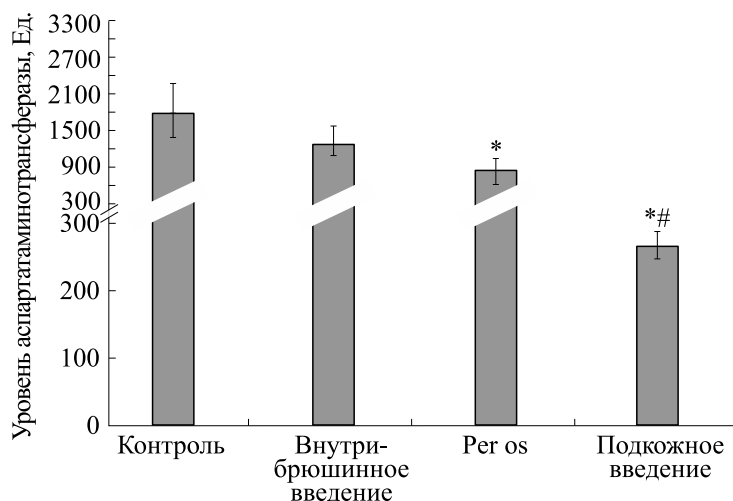


Рис. 1. Влияние метода введения паракринных факторов КС МСК на уровень аспаратаминотрансферазы в крови через 4 ч после введения АЦ; * — различия достоверны при сравнении с контрольной группой, # — различия достоверны при сравнении с другими группами.

острого периода после введения АЦ (85% по сравнению с контролем).

Экспрессия генов. Ингибирование пролиферации гепатоцитов под действием паракринных факторов является одной из возможных причин снижения деструкции печеночной паренхимы в острой фазе недостаточности, вызванной введением КС МСК. В связи с этим были исследованы вызванные КС изменения экспрессии маркера пролиферативной активности белка Ki-67 в тканях печени.

Введение КС (как общей фракции, так и фракции <30 кДа), полученных при культивировании МСК, вызывало резкое снижение экспрессии Ki-67 в первые двое суток (рис. 3; левые столбцы — контроль; средние «Об. фракция» — общая фракция КС МСК; правые — фракция КС МСК, со-

держащая белки с массой <30 кДа). В более поздние сроки (вторые и четвертые сутки) уровень экспрессии Ki-67 повышался более чем в два раза по сравнению с контролем.

Гистология. В контрольной группе максимальный уровень деструкции паренхимы печени наблюдался через 4 ч после введения культуральной среды (контроль) (рис. 4). Портальные вены в тканях контрольного животного полнокровны, обширные полнокровные центрлобулярные зоны печеночных долек слиты. Площадь некроза гепатоцитов колебалась от 35 до 50%. После введения КС зона полнокровия вокруг портальных вен значительно уменьшалась по сравнению с контролем. После введения фракции <30 кДа полнокровные портальные вены не обнаруживались. Площадь зон центрлобулярного полно-

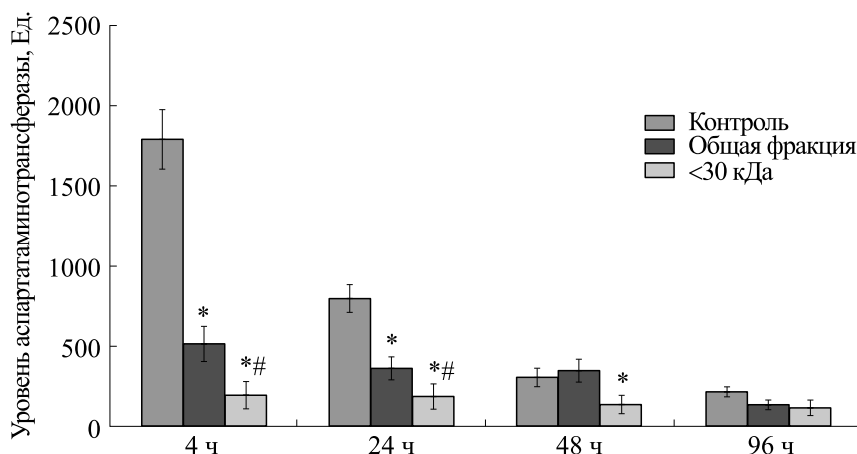


Рис. 2. Динамика влияния КС МСК на уровень аспаратаминотрансферазы в крови на фоне введения АЦ; * — достоверно по отношению к контрольной группе; # — различия достоверны при сравнении с другими группами.

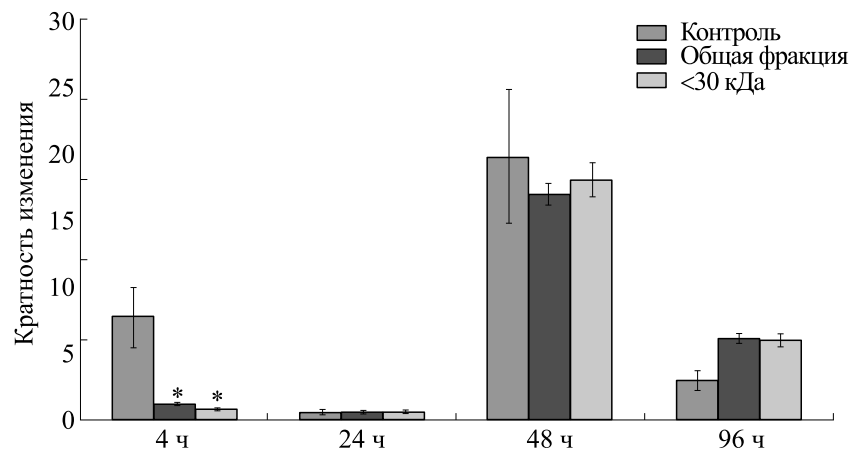


Рис. 3. Влияние КС МСК на уровень экспрессии Ki-67 в ткани печени.

кровя была минимальной по сравнению с таковой после введения тотальной фракции.

Так, введение суммарной фракции кондиционированной среды, полученной при культивировании МСК, через четыре часа после воздействия

АЦ вызвало достоверное уменьшение площади деструкции; использование фракции <30 кДа оказывало максимальный протективный эффект.

Гистологический анализ, проведенный через 24 ч после воздействия АЦ, показал:

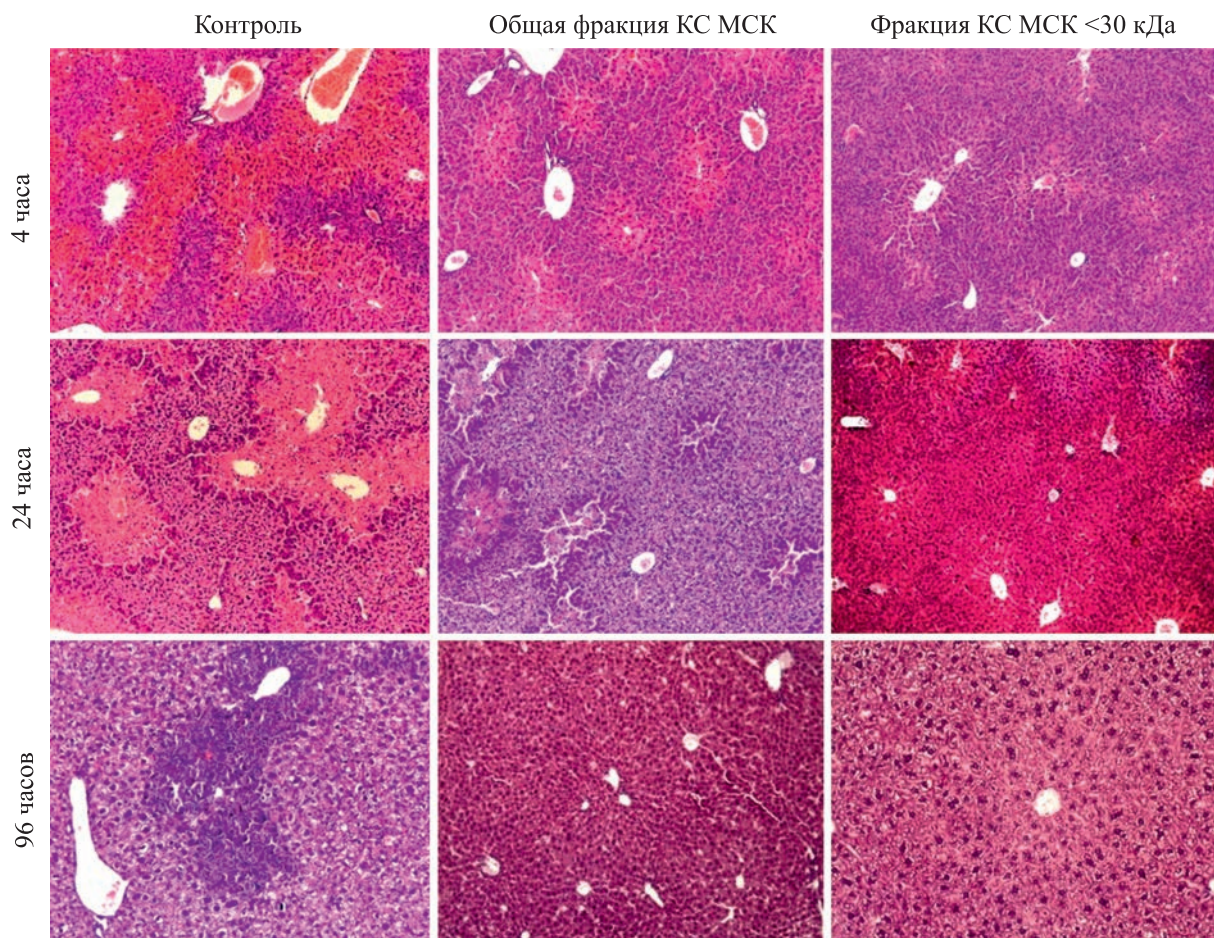


Рис. 4. Гистология печени: динамика влияния КС МСК на фоне введения АЦ. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Таблица 1. Анализ морфологических изменений ткани печени при введении КС на фоне АЦ

Время	Изменения	Контроль	Общая фракция КС	КС <30 кДа
4 ч	Полнокровие портальных вен	2.85 ± 0.11	$1.75 \pm 0.21^*$	$0.40 \pm 0.11^{*#}$
	Центролобулярное полнокровие	2.65 ± 0.12	$1.82 \pm 0.31^*$	$0.67 \pm 0.21^{*#}$
	Дегенерация гепатоцитов	2.74 ± 0.23	$0.81 \pm 0.22^*$	$0.54 \pm 0.11^*$
24 ч	Дегенерация гепатоцитов	2.66 ± 0.22	$1.30 \pm 0.13^*$	$1.45 \pm 0.12^*$
	Центролобулярный некроз	2.60 ± 0.16	$1.45 \pm 0.21^*$	$0.30 \pm 0.12^{*#}$
	Регенерация гепатоцитов	0.70 ± 0.21	$2.01 \pm 0.10^*$	$2.67 \pm 0.22^{*#}$
96 ч	Воспалительная инфильтрация	2.56 ± 0.31	$0.41 \pm 0.11^*$	$0.44 \pm 0.13^*$
	Дегенерация гепатоцитов	2.51 ± 0.31	$0.81 \pm 0.14^*$	$1.20 \pm 0.08^*$
	Регенерация гепатоцитов	0.20 ± 0.08	$1.82 \pm 0.23^*$	$2.67 \pm 0.16^{*#}$

Примечание. Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения; * – различия достоверны при сравнении с контрольной группой, # – различия достоверны при сравнении с другими группами.

– в контрольной группе: обширные, соединенные между собой зоны некроза гепатоцитов в центролобулярных зонах и узкая полоса регенерирующих гепатоцитов (характеризующаяся более интенсивным окрашиванием цитоплазматических клеток) в пограничных областях некроза;

– в опытной группе животных, которым вводили общую фракцию КС МСК: очаги центролобулярного некроза имеют минимальные размеры и встречаются в отдельных долях.

– в опытной группе животных, которым вводили фракцию КС МСК <30 кДа: в центролобулярных зонах долей печени некрозов не наблюдалось, тем не менее эти зоны были умеренно полнокровными.

Гистологический анализ, проведенный через четверо суток после введения АЦ и культуральной среды, показал, что в контрольной группе зоны центролобулярного некроза сменялись обширной воспалительной инфильтрацией, а в других отделах долей печени можно было наблюдать дистрофические изменения гепатоцитов.

В отличие от контрольной группы, в печени животных, которым вводили общую фракцию КС, не наблюдалось воспалительных инфильтратов на всей площади печеночных долей, включая центролобулярную зону. Введение белковой фракции <30 кДа также не вызывало некротических изменений в центролобулярной зоне. В то же время можно было наблюдать многочисленные регенерирующие гепатоциты.

Морфометрический анализ (табл. 1) выявленных изменений показал, что введение белковой фракции <30 кДа снижает уровень повреждения гепатоцитов и выраженность воспалительной ре-

акции, способствует более ранним процессам регенерации.

Отдельно исследовано влияние КС на рост соединительной ткани в отдаленные сроки после токсического действия АЦ.

Так, в контрольной группе (рис. 5) на десятые сутки после воздействия в перипортальной зоне вокруг воротной вены на фоне жировой дистрофии гепатоцитов отмечается нарушение лучевого строения долек (окраска по Пикро–Маллори). Дополнительное окрашивание по Ван-Гизону также выявило нарушение балочной структуры в перипортальной области и прилежащие гепатоциты в состоянии жировой дистрофии. Склеротизованная перипортальная строма сохранила воспалительную инфильтрацию (окраска по Ван Гизону).

Введение общей фракции КС приводило к появлению признаков незначительных склеротических изменений в портальной строме, содержащей одиночные лимфоциты, что подтверждалось окрашиванием по Ван Гизону.

Следует отметить, что минимальный рост соединительной ткани наблюдался при введении кондиционированной среды и особенно ее фракции <30 кДа.

Анализ экспрессии генов. Анализ экспрессии генов показал, что фракция КС <30 кДа индуцирует измененную активность генов с провоспалительными и противовоспалительными эффектами. Данные табл. 2 показывают, что КС вызывает значительное повышение уровня гена, ответственного за синтез тиоредоксина. Повышение экспрессии этого фермента на фоне воздействия АЦ через 24 ч после введения КС сопровождалось

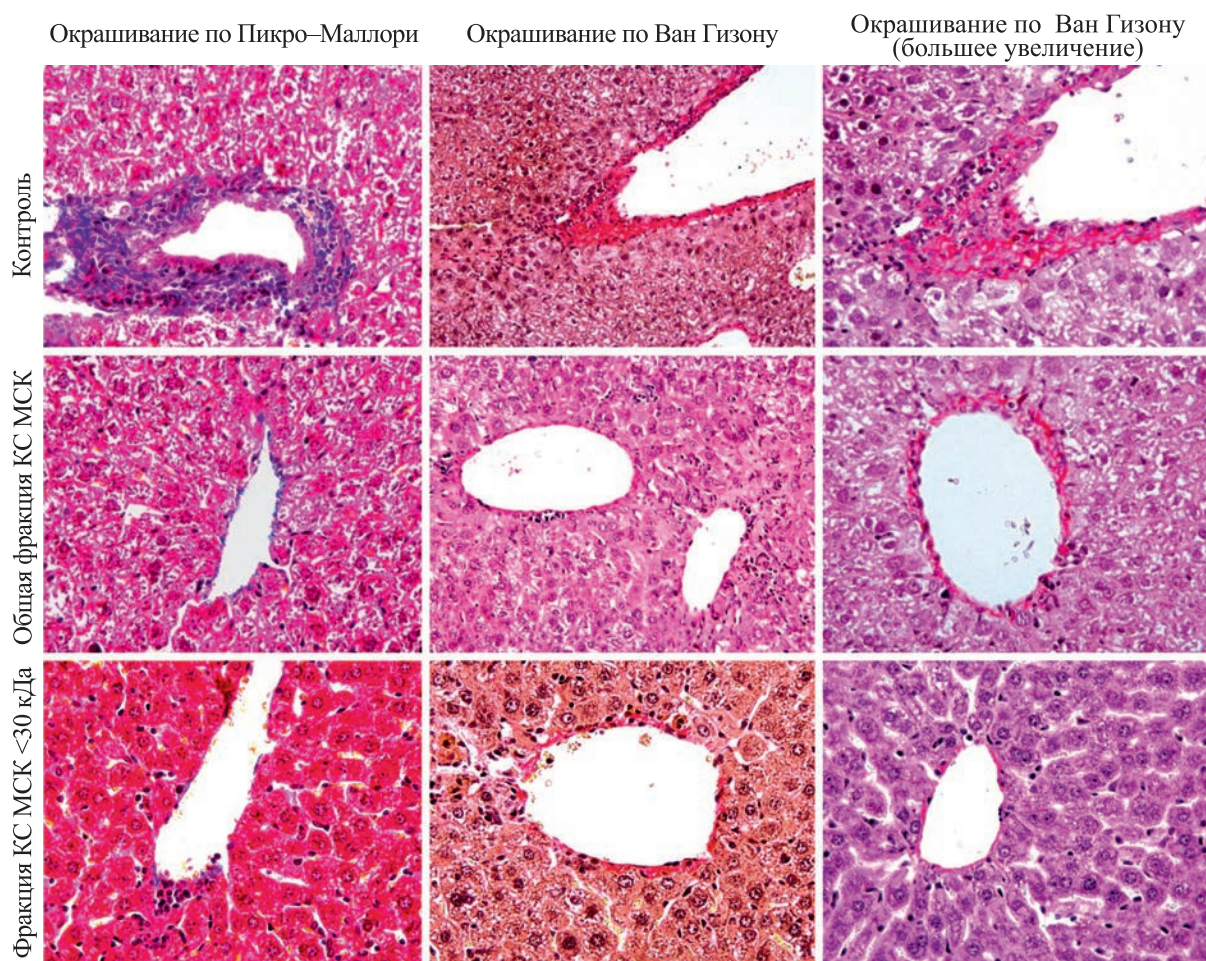


Рис. 5. Влияние КС МСК на рост соединительной ткани в отдаленные сроки после воздействия АЦ.

снижением экспрессии ИЛ-6, обладающего провоспалительной активностью, но повышением экспрессии провоспалительного цитокина (макрофаг-ингибирующего фактора – МИФ).

Продукция активных форм кислорода в нейтрофилах. Продукция АФК является одной из основ-

ных функций нейтрофилов, на которой основан их антибактериальный эффект.

Исследование показало, что через 4 ч после воздействия АЦ уровень спонтанной продукции АФК был таким же, как и в интактном контроле. Достоверные различия с группой интактных жи-

Таблица 2. Изменение уровня экспрессии генов после введения фракции КС МСК<30 кДа на фоне АЦ

Ген	Уровни экспрессии генов по отношению к контрольным значениям			
	4 ч	24 ч	48 ч	96 ч
МИФ	1.3 ± 0.7	$3.2 \pm 1.0^*$	1.1 ± 1.0	0.9 ± 0.4
Галектин	1.1 ± 0.4	1.4 ± 1.3	0.60 ± 0.55	1.4 ± 1.3
Каспаза 3	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.5	0.8 ± 0.6	1.1 ± 0.5
ИЛ6	0.6 ± 0.5	$0.3 \pm 0.2^*$	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.2
Тиоредоксин	1.4 ± 0.7	$1.7 \pm 0.3^*$	1.3 ± 0.5	0.6 ± 0.2

Примечание. Представлены средние значения $\pm$ стандартные отклонения; * – различия достоверны при сравнении с контрольной группой, # – различия достоверны при сравнении с другими группами.

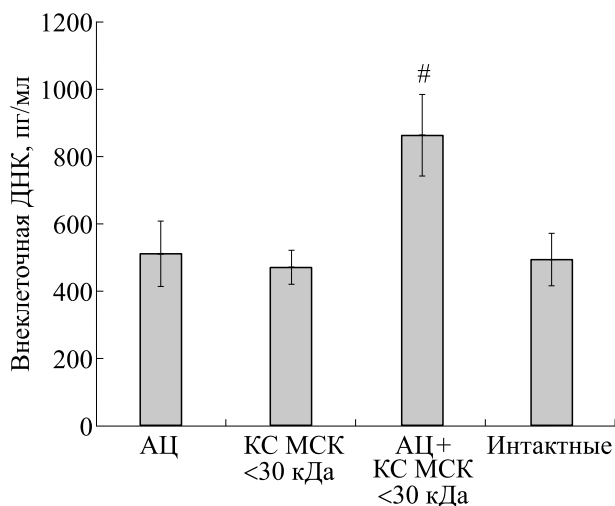


Рис. 6. Влияние КС МСК на спонтанную продукцию АФК в нейтрофилах. По оси ординат — средняя интенсивность флуоресценции клеток (усл. ед.), загруженных DCFHDA; # — различия достоверны при сравнении с другими группами ($p < 0.05$).

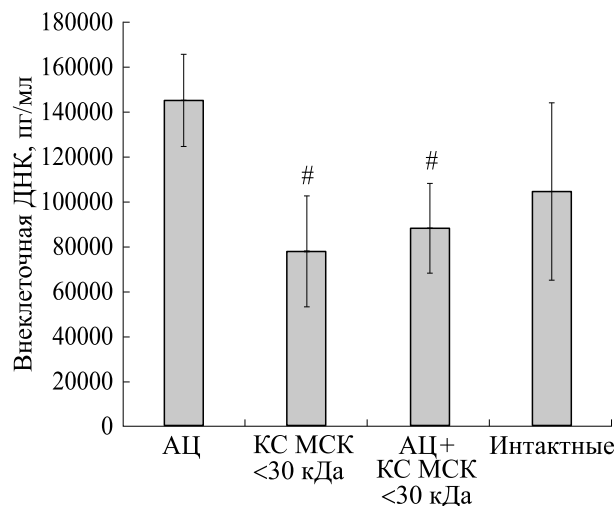


Рис. 7. Влияние КС МСК на ФМА-индуцированную продукцию АФК в нейтрофилах. По оси ординат — средняя интенсивность флуоресценции клеток (усл. ед.), загруженных DCFHDA; # — различия достоверны при сравнении с группой АЦ ($p < 0.05$).

вотных, которым вводили только фракцию КС МСК <30 кДа, также не наблюдались. Однако в группе животных, которым на фоне АЦ вводили фракцию КС МСК <30 кДа, наблюдалось достоверное увеличение спонтанной продукции АФК в нейтрофилах (рис. 6).

Следует отметить, что анализ ФМА-индуцированной продукции АФК в нейтрофилах показал противоположные результаты (рис. 7).

Показатель индуцированной продукции АФК в периферической крови животных, подвергшихся воздействию паракринных факторов КС на фоне АЦ, был достоверно ниже, чем у животных, подвергшихся воздействию АЦ. В то же время паракринные факторы не оказывали существенного влияния на продукцию АФК по сравнению с интактным контролем.

Уровень свободной внеклеточной ДНК. Исследование показало, что уровень внеклеточной ДНК в плазме крови мышей, которым вводили АЦ, достоверно повышался более чем в 30 раз (рис. 8) по сравнению с интактным контролем.

В то же время уровень внеклеточной ДНК в плазме животных, которым вводили фракцию КС МСК <30 кДа на фоне АЦ, был достоверно в три с половиной раза ниже уровня, который наблюдался у животных, получивших только АЦ. Уровень внеклеточной ДНК у животных, которым вводили только КС фракцию <30 кДа, был таким же, как и в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, исследование показало, что КСа, полученная при культивировании МСК в условиях гипоксии (10% O_2), снижает уровень АЦ-ассоциированной деструкции печеночной ткани. Наиболее примечательным выводом из анализа печеночной ткани экспериментальных животных является уменьшение выраженности гранулоцитарной инфильтрации, которая может прямо коррелировать со степенью некроза паренхимы печени, подтвержденной уровнем цитолитического фермента [10]. В поздних наблюдениях

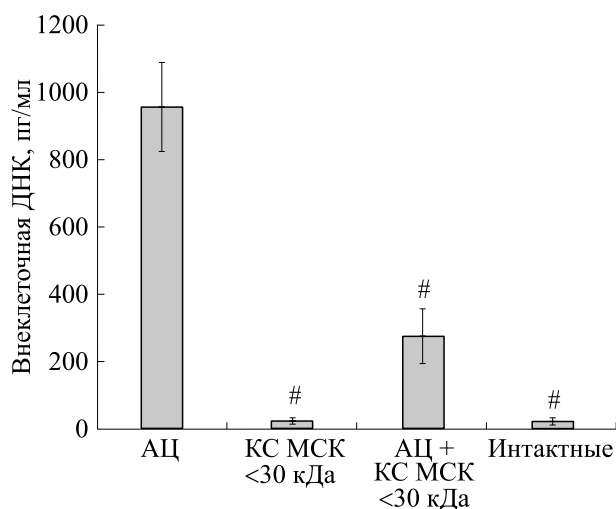


Рис. 8. Влияние КС МСК на уровень внеклеточной ДНК в плазме крови животных на фоне АЦ.

этот эффект достигался уменьшением объема формируемой фиброзной ткани. Это могло быть обусловлено как подавлением пролиферации фибробластов пептидами КС, так и уменьшением выраженности начального воспалительного повреждения паренхимы.

В то же время исследование показало, что КС (особенно его фракция <30 кДа) может по-разному влиять на продукцию АФК в нейтрофилах: усиливает спонтанную продукцию АФК и ингибирует продукцию АФК, индуцированную ФМА.

Наблюдаемый эффект может быть обусловлен следующими фактами: спонтанная продукция АФК в нейтрофилах реализуется за счет уже активированного NOX2, присутствующего в клеточной мембране и паракринные факторы могут воздействовать непосредственно на уже функционирующий комплекс.

В то же время ФМА-индуцированная продукция АФК требует поэтапной активации промежуточных ферментов, в частности протеинкиназы С, и ее ингибирование паракринными факторами может влиять на процесс сборки оксидазного комплекса, что в свою очередь приведет к снижению продукции АФК.

Галектин 1 и тиоредоксин, факторы, присутствующие при КС, также могут влиять на NOX2. В наших предыдущих исследованиях было показано, что условия культивирования существенно влияют на продукцию этих паракринных факторов в стволовых клетках [15]. В условиях гипоксии ($O_2 < 10\%$) значительно усиливалась продукция именно галектина 1 и тиоредоксина, т.е. факторов, способных изменять продукцию АФК.

Галектин 1 является провоспалительным пептидом, который может взаимодействовать с клеточной мембраной нейтрофилов, активируя NOX2, при условии, что клетки были активированы процессом экстравазации тканей [20, 21].

Активация спонтанной продукции АФК в нейтрофилах под действием КС (фракция <30 кДа) будет способствовать регенерации печеночной ткани после воздействия АЦ, так как известно, что молекулы АФК, секретируемые нейтрофилами, могут способствовать как развитию макрофагов, так и процессам регенерации печени после токсического действия АЦ [14]. Следовательно, увеличение спонтанной продукции нейтрофилов под действием фракции КС <30 кДа, продемонстрированное в исследовании, будет способствовать более быстрому восстановлению гепатоцитов, показанному в предыдущей работе [16].

Подавление индуцированной продукции АФК также могло иметь положительный эффект, поскольку было показано, что гиперпродукция АФК на фоне АЦ с последующей дегрануляцией и высвобождением нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) вызывает прогрессирование печеночной недостаточности [22, 23].

Снижение продукции АФК в индуцированных клетках могло быть вызвано изменением активности протеинкиназы С. Ряд авторов показали, что стимуляция и активация нейтрофилов формбол-12-миристан-13-ацетатом приводит к образованию NET. Образование NET после стимуляции ФМА зависит от продукции АФК (через систему NOX2). Однако было показано, что протеинкиназа С и особенно ее изоформа PKC β , участвующие в сборке NOX2, наиболее важны для образования NET [24].

Таким образом, возможно, что паракринные факторы, активируя спонтанную активность NOX2 и ингибируя активность протеинкиназы С, могут ингибировать продукцию АФК, дегрануляцию нейтрофилов и образование NET при клеточной активации и тем самым снижать уровень гепатоцеллюлярной недостаточности. Косвенно это предположение может быть подтверждено данными, показавшими достоверное снижение уровня внеклеточной ДНК относительно АЦ при введении КС.

Следует отметить, что вопрос об участии протеинкиназы С в патогенезе ацетаминофен-индуцированного воспаления печени является актуальным. Например, показано, что при АЦ протеинкиназа С участвует в гепатотоксичности, а применение ингибиторов протеинкиназы С эффективно (до 80%) в снижении некроза гепатоцитов, вызванного АФК [25, 26].

Также гепатопротективным эффектом может обладать тиоредоксин — еще один фактор КС. По литературным данным передозировка АЦ, вызывающая избыточную продукцию АФК, приводит к снижению эндогенной экспрессии тиоредоксина и активации сигнального пути JNK. Таким образом, введение экзогенного тиоредоксина в составе КС может значительно снижать уровень гепатоцеллюлярной недостаточности, о чем свидетельствуют ранее полученные экспериментальные данные [27].

Анализ экспрессии генов показал, что использование КС МСК (фракция <30 кДа) значительно увеличивает экспрессию МИФ и тиоредоксина в ткани печени. Распространено мнение, что МИФ является провоспалительным цитокином, уровень которого повышается при тканевой недоста-

точности и системных заболеваниях [28]. В то же время известно, что уровень экспрессии МИФ и тиоредоксина повышается практически при всех состояниях, связанных с окислительно-восстановительными процессами, которые следуют за стрессом, травмой, дегенерацией, воспалением и гибелью клеток [29–31]. Таким образом, результаты исследования показывают, что при введении КС повышенная спонтанная продукция АФК в нейтрофилах может вызывать повышение уровня МИФ и тиоредоксина в тканях печени относительно контроля.

Пока неясно, почему эффекты перорального и подкожного введения КС МСК сопоставимы. Одной из возможных причин является влияние АЦ на Р-белок кишечника. Литературные данные не содержат сведений о влиянии АЦ на всасывание коротких белковых молекул в кишечнике. Однако ингибирование Р-белка АЦ и усиление всасывания ксенобиотиков в портальную систему печени [32] не позволяет исключить всасывание сигнальных белков через слизистую оболочку кишечника и их прямое проникновение в ткань печени.

ВЫВОДЫ

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Фракция КС <30 кДа оказывала максимальный протективный эффект на печень при введении АЦ.
2. Белки этой фракции снижают выраженность системной воспалительной реакции и степень фиброза ткани печени в отдаленные сроки после введения токсина.
3. Степень выраженности гранулоцитарной инфильтрации коррелирует со степенью некроза печеночной паренхимы (что подтверждается уровнем цитолитических ферментов).
4. Фракция КС <30 кДа увеличивает спонтанную и уменьшает индуцированную внутриклеточную продукцию АФК.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях (1986, 86/609/ЕЕС).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. M. Larson, Clin. Liver Dis., **11**, 525 (2007).
2. M. R. McGill, M. R. Sharpe, C. D. Williams, et al., J. Clin. Invest., **122**, 1574 (2012).
3. H. Jaeschke, C. D. Williams, A. Ramachandran, et al., Liver Int., **32**, 8 (2012).
4. Y. Ishida, T. Kondo, A. Kimura, et al., Eur. J. Immunol., **36**, 1028 (2006).
5. Z. X. Liu, D. Han, B. Gunawan, et al., Hepatology, **43**, 1220 (2006).
6. P. E. Marques, S. S. Amaral, D. A. Pires, et al., Hepatology, **56**, 1971 (2012).
7. C. Cover, J. Liu, A. Farhood, et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., **216**, 98 (2006).
8. H. S. Hou, C. L. Liao, H. K. Sytwu, et al., PLoS One, **7**, e44880 (2012).
9. J. A. Lawson, A. Farhood, R. D. Hopper, et al., Toxicol. Sci., **54**, 509 (2000).
10. C. D. Williams, M. L. Bajt, A. Farhood, et al., Liver Int., **30**, 1280 (2010).
11. C. D. Williams, M. L. Bajt, M. R. Sharpe, et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., **275** (2), 122 (2014).
12. C. D. Williams, A. Farhood, and H. Jaeschke, Toxicol. Appl. Pharmacol., **247**, 169 (2010).
13. J. X. Wang, C. Zhang, L. Fu, et al., Toxicol. Lett., **265**, 38 (2017).
14. W. Yang, Y. Tao, Y. Wu, et al., Nat. Commun., **10** (1), 1076 (2019).
15. A. Temnov, K. Rogov, V. Zhalimov, et al., Hepat. Med., **11**, 89 (2019).
16. A. A. Temnov, K. A. Rogov, A. N. Sklifas, et al., Mol. Biol. Rep., **46** (3), 3101 (2019).
17. H. Yagi, A. Soto-Gutierrez, N. Navarro-Alvarez, et al., Mol. Therapy, **18** (10), 1857 (2010).
18. F. A. von Meijenfeldt, L. C. Burlage, S. Bos, et al., Liver Transpl., **24** (12), 1716 (2018).
19. T. D. Schmittgen and K. J. Livak, Nat. Protoc., **3** (6), 1101 (2008).
20. J. Almkvist, C. Dahlgren, H. Leffler, et al., J. Immunol., **168** (8), 4034 (2002).
21. M. T. Elola, M. E. Chiesa, and N. E. Fink, Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., **141** (1), 23 (2005).
22. J. Liu, M. Jiang, Q. Jin et al., Front. Pharmacol., **12**, 723881 (2021).
23. F. A. von Meijenfeldt, R. T. Stravitz, J. Zhang, et al. Hepatology, **75** (3), 623 (2022).
24. R. D. Gray, C. D. Lucas, A. MacKellar, et al., J. Inflamm. (Lond.), **10** (1), 12 (2013).
25. B. Saberi, M. Shinohara, M. D. Ybanez, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol., **295** (1), C50 (2008).
26. B. Saberi, M. D. Ybanez, H. S. Johnson, et al., Hepatology, **59** (4), 1543 (2014).
27. B. W. Lee, B. S. Jeon, and B. I. Yoon, J. Appl. Toxicol., **38** (7), 1008 (2018).
28. T. Shimizu, R. Abe, H. Nakamura, et al., Biochem Biophys Res Commun., **264** (3), 751 (1999).

29. A. Kudrin and D. Ray, *Immunol. Cell Biol.*, **86** (3), 232 (2008).
30. H. Lue, R. Kleemann, T. Calandra, et al., *Microbes Infect.*, **4**, 449 (2002).
31. J. Yodoi, H. Nakamura, and H. Masutani, *Biol. Chem.*, **383**, 585 (2002).
32. A. Novak, G. D. Carpini, M. L. Ruiz, et al., *J. Pharm. Sci.*, **102** (10), 3830 (2013).

Paracrine Effects of Stem Cell Conditioned Medium on Production of Oxygen Reactive Species in Blood Neutrophils in Acetaminophen-Induced Liver Failure

A.A. Temnov*, **, A.N. Sklifas*, V.K. Zhalimov*, M.G. Sharapov*, R.S. Fadeev***, M.I. Kobayakova***, N.I. Kukushkin*, and K.A. Rogov****

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

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

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

****Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Center of Surgery, ul Tsurupy 3, Moscow, 117418 Russia

The current study examined the effects of mesenchymal stem cells-derived conditioned medium on the severity of systemic inflammatory response induced by the administration of acetaminophen, as well as its long-term effects on hepatic tissues. A conditioned medium fraction <30 kDa showed maximum protective effect. Proteins of this fraction reduce the degree of systemic inflammatory response and liver tissue fibrosis long after the toxin administration. Liver tissues from experimental animals were examined, and a correlation between the reduction of granulocytic infiltration scoring and the degree hepatic parenchymal necrosis was demonstrated (confirmed by the cytolytic enzyme level). The <30 kDa fraction increased the spontaneous but decreased phorbol-12-myristate-13-acetate-induced intracellular production of reactive oxygen species. Results from this study show that the level of macrophage migration inhibitory factor and expression of thioredoxin significantly increase as compared to controls during increased spontaneous production of reactive oxygen species in neutrophils.

Keywords: acetaminophen, liver, fibrosis, stem cells, conditioned media

ЧАСТОТНЫЕ И ВРЕМЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ НАСЕКОМЫХ В ОПТИЧЕСКОМ ДИАПАЗОНЕ

© 2023 г. С.И. Зиенко^{*,#}, В.Л. Жбанова^{*,##}

^{*}Филиал Национального исследовательского университета «МЭИ» в Смоленске,
Энергетический проезд, 1, Смоленск, 214013, Россия

[#]E-mail: stanislav-zienko@rambler.ru

^{##}E-mail: vera-zhbanova@eandex.ru

Поступила в редакцию 27.01.22 г.

После доработки 29.06.22 г.

Принята к публикации 14.09.22 г.

Исследованы свойства монохромной, дихромной и трихромной зрительной системы насекомого в частотной и временной области. В основе метода исследования лежит представление оптической среды зрительной системы насекомого в виде динамического звена, имеющего вход и выход. Для аппроксимации спектральных кривых применена функция Гаусса. Исследование инерционных свойств такого звена во временной области выполнено путем подачи на его вход сигналов в форме δ -функции или единичной функции. Установившиеся вынужденные колебания на выходе исследуемого динамического звена определяются при подаче на вход гармонического воздействия. Предложена методика построения кривых спектральной чувствительности для монохромного, дихромного и трихромного зрения насекомых в частотной области, установлено, что спектры обладают свойствами сверхширокополосных сигналов. Обнаружено, что динамическое звено зрительной системы насекомого обладает свойством усиления оптического сигнала на участках ультрафиолета и синей части спектра во временной и частотной области. Выявлено, что при частоте равной и выше частоты диэлектрической релаксации оптическая среда зрительной системы насекомого не реагирует на электромагнитное излучение. Это явление в наибольшей степени проявляется в ультрафиолетовой и синей части спектра. Установлено, что показатель широкополосности оптических сигналов μ изменяется от 0.41 до 1.21, таким образом, зрительная система насекомого обладает сверхширокополосными свойствами. Показано, что число периодов световых колебаний в зрительной системе насекомых, имеющей спектр в форме кривой Гаусса, связано с показателем μ простым соотношением. Выявлено, что при частоте, равной и выше частоты диэлектрической релаксации, оптическая среда зрительной системы насекомого не реагирует на электромагнитное излучение. Это явление в наибольшей степени проявляется в ультрафиолетовой и синей части спектра. Полученные новые знания могут найти применение при создании матричных твердотельных фотоприемников в ультрафиолетовой и синей части спектра.

Ключевые слова: монохромное зрение, насекомые, спектр, динамическое звено, импульсная характеристика, переходная характеристика.

DOI: 10.31857/S0006302923010106, EDN: OAIXWK

Насекомые — крупнейшая группа живых организмов, населяющих нашу планету. Несмотря на различный образ жизни устройство зрительной системы почти у всех насекомых одинаково: это фасеточный глаз [1–4]. Он состоит из омматидий — отдельных глазков, которые смотрят в различных направлениях. В каждой омматидии есть своя линза; она фокусирует свет на нескольких фоторецепторных клетках, объединенные в зрительную палочку. Свет, воздействуя на эти клетки, вызывает последовательность нервных импульсов, передаваемых в мозг насекомого по зрительному нерву. Очевидно, основное преимуще-

ство фасеточного глаза состоит в том, что такой глаз обладает большим углом обзора. Многим же млекопитающим, и человеку в том числе, приходится поворачивать голову. Однако за такое преимущество глазу насекомого пришлось пожертвовать резкостью изображения, ведь резкость зависит от диаметра отверстия, через которое свет входит в оптическую систему. Острота зрения или разрешающая способность характеризует способность глаза различать степень расчлененности объектов, в том числе отличать две точки от одной более крупной. Для фасеточного глаза существует простая зависимость между рас-

стоянием до объекта и числом различных деталей: чем ближе объект, тем больше деталей видит насекомое.

Характерно то, что зрительные клетки, как и твердотельные фотополупроводниковые материалы, поглощают фотоны определенной энергии, отраженные окружающими предметами или исходящие непосредственно от источника. Они воспринимают лучистую энергию в определенном диапазоне длин волн и отличают свет от теплового воздействия лучей. Зрительную клетку фасеточного глаза может возбудить единичный фотон, кроме того, она обладает свойством анализа поляризации света и восприятия, невидимых человеком лучей на определенной длине волны.

Цветовое зрение насекомых основано на использовании двух или трех фотоприемников с разными спектральными характеристиками. Под фотоприемниками понимают определенный тип фоторецепторов со специфическим зрительным пигментом. Спектральная чувствительность фотоприемника определяется свойствами зрительного пигмента и условиями проникновения света к фоторецепторам.

Для различения цветов необходимо присутствие максимум двух фотоприемников. Однако фасеточные глаза термитов имеют только один фотоприемник, поэтому они неспособны к цветовому зрению. В связи с этим условно выделяют три типа зрения: монохромное, дихромное и трихромное. Их графики, построенные по данным работы [3], представлены на рис. 1б,в.

Максимальная чувствительность единственного фотоприемника термитов проявляется при излучении с длиной волны около 500 нм (рис. 1а). У жуков-бронзовок в наличии два фотоприемника, поэтому они способны к цветовому зрению (рис. 1б). Существуют насекомые, которые способны различать цвета только одной (верхней или нижней) половиной фасеточного глаза. Так, у стрекозы единственный фотоприемник верхней половины глаза обнаруживает максимум светочувствительности в области 420 нм, в нижней его половине найдены два фотоприемника с пиками чувствительности при 515 и 619 нм (рис. 1в).

Для упрощения анализа на рис. 1 выделены три характерных участка длин волн: А — первый, Б — второй и В — третий. Анализ кривых, изображенных на рис. 1, показывает, что спектральные кривые на участках Б по форме близки к друг другу и, следовательно, насекомые разного происхождения имеют одинаковую светочувствительность. Участок А на рис. 1б расположен в ультрафиолетовом диапазоне, невидимом для человека. В то же время у насекомых спектр для красного цвета, в отличие от глаза человека, здесь отсутствует. В настоящее время установлено, что у

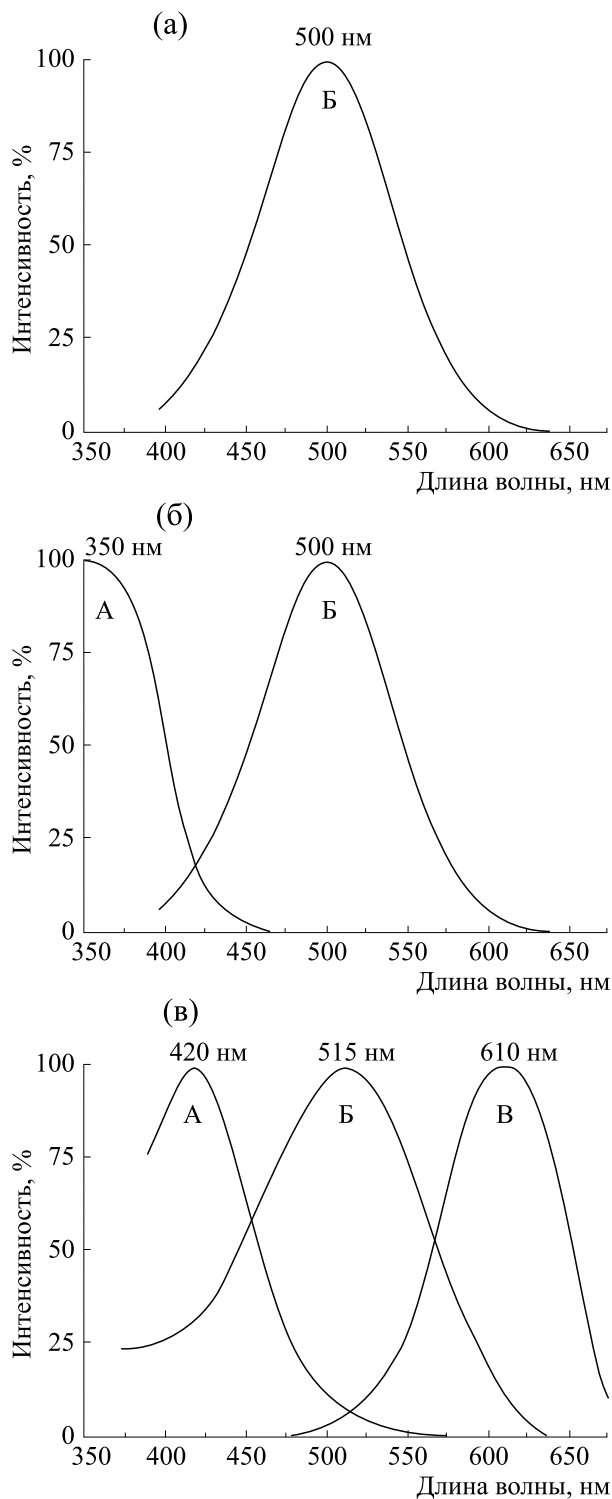


Рис. 1. Графики относительной спектральной чувствительности глаз насекомых разных типов зрения: монохромного (а), дихромного (б) и трихромного (в).

большинства насекомых есть ультрафиолетовый, синий и зеленый фоторецепторы.

Особенностью света, в котором протекает процесс зрительного восприятия насекомыми,

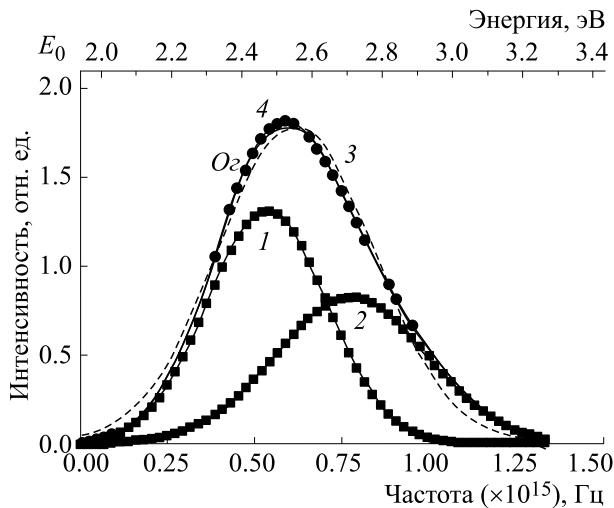


Рис. 2. Дифференциальная функция распределения монохромного зрения насекомого в диапазоне частот $G(f)$ (сплошная кривая); аппроксимация функции $G(f)$ кривыми Гаусса (кривые 1 и 2); O_2 — огибающая спектра; 3 — аппроксимация одной кривой Гаусса, 4 — групповое время задержки.

являются его малые временные интервалы. Например, для длины волны 600 нм (оранжевый цвет), период колебаний равен ~ 2 фс, что соответствует фемтосекундному масштабу времени. Это означает фактически полную реализацию возможностей оптического сигнала. Один период оптического колебания — предельная длительность светового импульса и одновременно предельная «скорость» оптического отклика материальной среды.

Оптика импульсов из малого числа колебаний светового поля интересна как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. Надо иметь в виду, что фемтосекундные оптические импульсы, содержат внутри себя всего несколько периодов электромагнитных колебаний [5, 6]. В литературе эти вопросы практически не рассматривались. Между тем решение этих задач имеет большой научный и практический интерес.

Цель работы заключается в исследовании зрительной системы насекомых различного происхождения в частотной и временной области. В рамках цели были поставлены следующие задачи:

- построение кривых спектральной чувствительности зрения насекомых в диапазоне частот;
- исследование импульсных и переходных характеристик динамического звена;
- изучение частотных характеристик динамического звена.

Следует учесть, что в-основном биологические системы имеют нелинейную зависимость согласно психофизиологическому закону Вебера—Фехнера. И зрительная система насекомых —

не исключение. При решении поставленных задач в исследовании будет применяться необходимый математический аппарат, в том числе — линейный.

ПОСТРОЕНИЕ КРИВЫХ СПЕКТРАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗРЕНИЯ НАСЕКОМЫХ В ДИАПАЗОНЕ ЧАСТОТ

Вначале рассмотрим процесс построения кривой спектральной чувствительности для монохромного зрения насекомых. Переход от шкалы длин волн к шкале энергии выполняли по формуле $E = 1240/\lambda$, где λ в нм и E в эВ (рис. 2). Затем находили начальное значение энергии E_0 , при котором интенсивность равна нулю. В данном случае $E_0 = 1.945$ эВ.

После этого переходили к шкале частот. Ее находили следующим образом. Из шкалы энергии E вычитали энергию E_0 , в результате получали шкалу локальной энергии $E - E_0$. Затем учитывали переход от энергии E к энергии $E - E_0$ с помощью коэффициента $m = E_n/(E_n - E_0)$, где E_n — энергия, соответствующая пику спектральной кривой; рассчитывали частоту по формуле: $f = mv$. Здесь $v = (E - E_0)/h$, $h = 4.1 \cdot 10^{-15}$ эВ·с — постоянная Планка. Окончательно имеем $f = (m/4.1) \cdot (E - E_0) \cdot 10^{15}$ Гц. В расчете за единицу частоты принимали величину равную 10^{15} Гц [7, 8]. По такой же методике строили частотные спектры для дихромного (кривая Б) и трихромного (кривая В) зрения насекомых (рис. 3а,б).

Что касается спектров дихромного (кривая А, рис. 1б) и трихромного (кривые А и Б, рис. 1в) зрения, они содержат фононную компоненту. Для ее устранения переходили от шкалы длин волн к шкале частот. В качестве примера рассмотрим процесс преобразования кривой А (рис. 1б). На рис. 4 показана спектральная кривая А в частотном диапазоне, нормированная по площади, равной единице. Для того чтобы вычесть линейный наклонный фон из исходного спектра, задавали значение функции в виде уравнения прямой: $y = kx + b$. Для данных указанных на рис. 4, значение $k = 2.9$ и $b = -0.52$. В этом случае базовая линия имеет вид пунктирного отрезка прямой 1. Результат вычитания, выполненный с помощью математического пакета Origin [9], представлен на рис. 3а в виде кривой А. Аналогичным образом строили спектральные кривые А и В, изображенные на рис. 1в.

Спектры, изображенные на рис. 2 и 3а,б, нормировали по площади, равной единице. Другими словами, выполнялось условие нормировки:

$$\int_0^\infty G(f)df = 1. \quad (1)$$

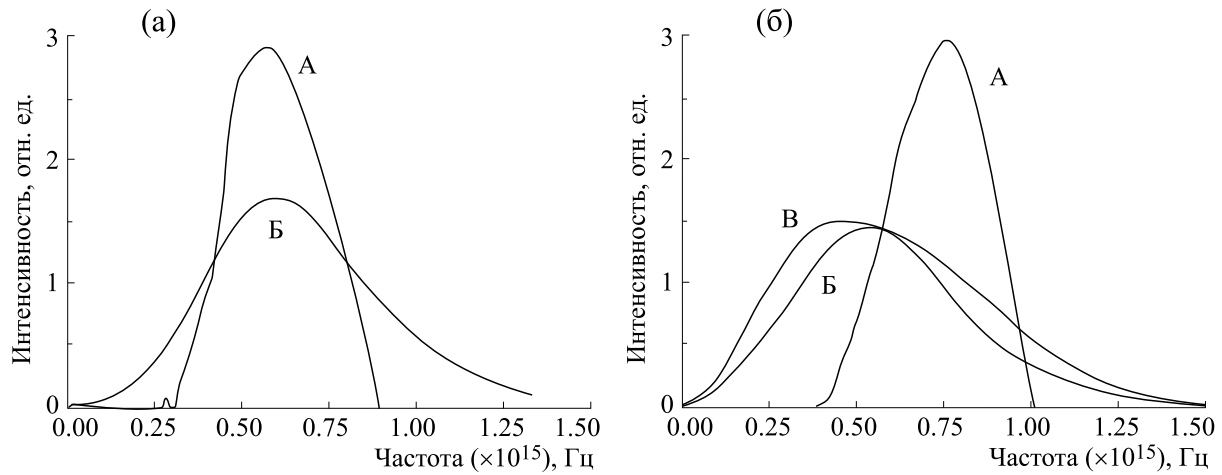


Рис. 3. Дифференциальные функции распределения дихромного (а) и трихромного (б) зрения насекомых в диапазоне частот.

Важным параметром спектральной линии является ее ширина, которая является мерой ее монохроматичности. Если $\Delta f/f_m \ll 1$, то колебания во времени описываются гармонической функцией.

Вместе с тем, когда Δf и f_m сопоставимы по величине, в оптике нет четкого определения характерной величины их отношения. В то же время в радиотехнических приложениях для оценки ширины спектра вводится показатель широкополосности, который определяется из следующего соотношения [10]:

$$\mu = \frac{\Delta f}{f_m} = \frac{f_{\max} - f_{\min}}{(f_{\max} + f_{\min}) / 2}, \quad (2)$$

где f_m , $f_{\min}$ и $f_{\max}$ — средняя, минимальная и максимальная частоты энергетического спектра, $\Delta f = f_{\max} - f_{\min}$ — ширина полосы частот сигнала на его полувысоте.

Численные значения спектральных кривых, изображенных на рис. 2 и 3а,б, и вспомогательных данных (E_0 и m), используемых при их построении, представлены в табл. 1.

Сигналы в диапазоне $0.25 \leq \mu \leq 2$ называют сверхширокополосными. При этом сверхширокополосные сигналы с $\mu = 2$ относятся к видеосигналам, с $0.1 \leq \mu \leq 0.2$ — к широкополосным и с $\mu \leq 0.001$ — к узкополосным.

Узкополосные и сверхширокополосные сигналы существенно отличаются друг от друга. Узкополосные синусоидальные сигналы обладают уникальными свойствами. При таких широко используемых преобразованиях, как сложение, вычитание, интегрирование, дифференцирование их форма остается прежней. Здесь и далее под формой понимается закон изменения сигнала во времени. Преобразованные сигналы могут различаться только амплитудой и сдвигом во времени. В противоположность им у сверхширокополосного сигнала при указанных (и других) преобра-

Таблица 1. Основные параметры спектральных кривых насекомых в частотной области

Тип зрения	Участок	$f_m, \times 10^{15}$ Гц	$\Delta f, \times 10^{15}$ Гц	H , отн. ед.	E_0 , эВ	m	μ	$f_r, \times 10^{15}$ Гц
Монохромное	А	0.60	0.52	1.77	1.94	4.61	0.86	0.81
Дихромное	А	0.57	0.34	2.91	1.80	2.27	0.60	0.43
	Б	0.60	0.57	1.68	1.94	4.61	0.9	0.89
Трихромное	А	0.76	0.33	2.96	1.80	8.64	0.43	0.37
	Б	0.55	0.65	1.43	2.15	3.80	1.18	0.80
	В	0.49	0.61	1.50	1.95	5.00	1.21	0.69

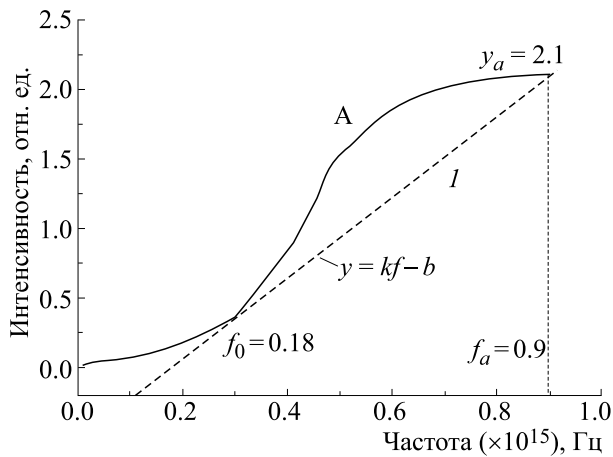


Рис. 4. Задание базовой линии (пунктир) в виде линейной функции.

зованиях изменяются не только параметры, но и форма [11, 12]. В табл. 1 приведены рассчитанные по формуле (3) значения μ для разных типов зрения насекомых. Можно видеть, что величина μ находится в диапазоне $1.21 \geq \mu \geq 0.43$, и по определению зрительная система насекомых разного типа обладает свойствами сверхширокополосных сигналов.

ИМПУЛЬСНЫЕ И ПЕРЕХОДНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИНАМИЧЕСКОГО ЗВЕНА

Оптическую среду зрительной системы насекомого удобно представить для анализа в виде динамического звена, имеющего вход и выход. Во временной области для исследования инерционных свойств такого звена выполняют путем подачи на его вход сигналов в форме δ -функции или единичной функции $1(t)$. Реакцию звена на δ -функцию называют импульсной (временной) характеристикой $g(t)$, а на единичную функцию $1(t)$ — переходной характеристикой $h(t)$. Функции $g(t)$ и $h(t)$ связаны между собой соотношением:

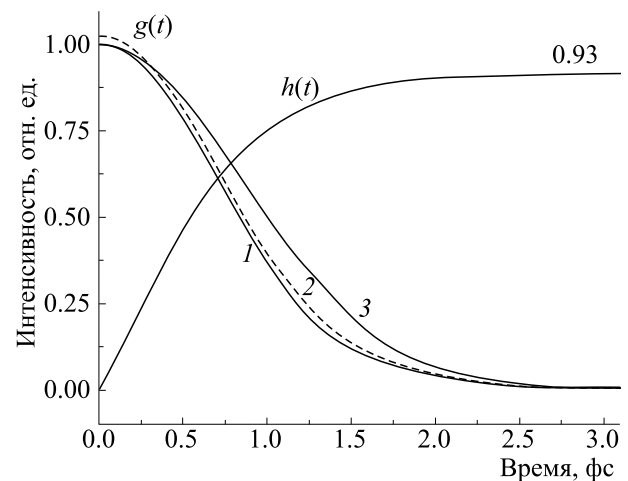


Рис. 5. Модуль (кривая 1) импульсной характеристики и мнимая компонента (кривая 2) комплексной импульсной характеристики монохромного зрения насекомого. Сплошная линия — численный расчет, пунктир — аппроксимация кривой Гаусса.

$$h(t) = \int_0^t g(\tau) d\tau. \quad (3)$$

Импульсную (временную) характеристику находят по формуле обратного преобразования Фурье:

$$g^*(t) = \int_0^\infty G(f) \exp(-2\pi f t) df. \quad (4)$$

Вначале решение интеграла (5) выполнено численным методом для монохромного зрения (функция $G(f)$, рис. 2). Результаты расчета для модуля импульсной характеристики приведены на рис. 5 (кривая 1). Численный метод дает высокую точность расчета, но не позволяет установить влияние параметров частотного спектра (f_m и Δf) на временные характеристики переходного процесса. Для установления их влияния аппроксимируем функцию $G(f)$ одной кривой (кривая 3 на рис. 2) и двумя кривыми Гаусса (пики 1 и 2 на

Таблица 2. Параметры аппроксимации частотного спектра монохромной системы зрения

Число кривых Гаусса	Номер кривой на рис. 2	Площадь, отн. ед.	Пик, $\times 10^{15}$ Гц	Ширина, $\times 10^{15}$ Гц	Амплитуда, отн. ед.
1	3	0.99	0.62	0.44	1.78
2	1	0.56	0.54	0.41	1.31
	2	0.44	0.76	0.49	0.82

рис. 2) [13]. Параметры аппроксимации приведены в табл. 2.

Когда спектр описывается одной кривой Гаусса (2), модуль импульсной (временной) характеристики $g(t)$ может быть получен из решения соотношений (2) и (4) в аналитическом виде [14]:

$$g(t) = C \exp(-at^2), \quad (5)$$

где коэффициент $C = 1$ — амплитуда импульсной характеристики, параметр $a = 3.5\Delta f^2$. Из соотношения (6) можно видеть, что форма импульсной (временной) характеристики определяется шириной спектра Δf и не зависит от пиковой частоты. Расчетная графическая зависимости $g(t)$, построенная с учетом данных табл. 2, приведены на рис. 5 в виде кривой 3.

В случае аппроксимации спектра двумя кривыми Гаусса импульсная (временная) характеристика имеет вид [15–17]:

$$g(t) = \{A_1^2(t) + A_2^2(t) + 2A_1(t)A_2(t) \cos(2\pi\Omega t)\}^{1/2}, \quad (6)$$

где $A_1(t) = C_1 \exp(-\alpha_1 t^2)$, $A_2(t) = C_2 \exp(-\alpha_2 t^2)$, $\alpha_1 = 3.5\Delta f_1^2$, $\alpha_2 = 3.5\Delta f_2^2$, $\Omega = f_2 - f_1$.

Результаты расчета по формуле (7) с учетом данных табл. 2 представлены на рис. 5 в виде кривой 2. В данном случае результаты аналитического расчета хорошо согласуются с данными численного анализа (кривая 1, рис. 5). Это связано с тем, что, как показывает анализ уравнения (7), форма кривой $g(t)$ зависит не только от ширины спектра Δf , но от разности пиковых частот $\Omega = f_2 - f_1$. В то же время аппроксимация спектра одной кривой Гаусса позволяет получить простое аналитическое соотношение (6) для оценки длительности переходного процесса в оптической среде глаза насекомого.

Импульсная (временная) характеристика по физическому смыслу отражает нелинейные свойства процесса перехода глаза насекомого из закрытого состояния в открытое состояние. Соотношение (6) с учетом соотношения (2) можно привести к виду

$$g(t) = \exp(-3.5\mu^2(t/T_m)^2), \quad (7)$$

где $T_m = 1/f_m$ — период колебаний. Длительность переходного процесса t_n оценим на уровне 0.03, затем, полагая $t_n = nT_0$, где n — число периодов колебаний, находим связь числа колебаний с показателем широкополосности:

$$n = 1/\mu. \quad (8)$$

В соответствии с данными табл. 1 минимальное значение показателя широкополосности составляет $\mu_{\min} \approx 0.4$ и максимальное — $\mu_{\max} \approx 1.2$. Согласно выражению (9) это соответствует дли-

тельности переходного процесса монохромного зрения насекомых, равной от 0.8 до 2.5 периодов колебаний света.

В общем случае интеграл (4) с учетом соотношения (6) не имеет аналитического решения. Численное решение его с данными, представленными в табл. 1, приведено в виде графика $h(t)$ на рис. 5. Можно видеть, что значение переходной характеристики меняется от 0 до максимального, равного $h(\infty) = 0.93$. В тоже время при $t = \infty$ можно получить для $h(\infty)$ простое соотношение: $h(\infty) = C \cdot 0.47 / \Delta f$. Коэффициент C — имеет размерность — число фотонов в единицу времени (одну фемтосекунду). Коэффициент передачи (по мощности) динамического звена находится как в работе [18]:

$$k_{\max} = h(\infty)/1(t) = C \cdot 0.47 / \Delta f, \quad (9)$$

где $1(t)$ — единичная функция или функция Хевисайда.

Из соотношения (10) следует, что когда ширина спектра не превышает критического значения $\Delta f_{\text{кр}} = 0.47 \cdot 10^{15}$ Гц, коэффициент передачи больше единицы. Следовательно, в такой ситуации динамическое звено обладает свойством усиления оптического сигнала. Согласно данным табл. 1 этому условию удовлетворяют участки А дихромного и трихромного спектра глаза насекомых.

Для исследования данного явления было выполнено численное решение интеграла (5) для участков А и Б дихромного (рис. 3а) и участков А, Б и В трихромного зрения (рис. 3б). Результаты расчета в виде графиков $g(t)$ представлены на рис. 6а,б. Затем по известным значениям $g(t)$ выполняли численное решение интеграла (4). Графические зависимости $h(t)$ приведены там же на рис. 6а,б.

Численные значения $k_{\max}$ для участков А и Б дихромного и участков А, Б и В трихромного зрения на основании данных численного расчета (рис. 6а,б) представлены в табл. 3. В ней также приведены величина времени нарастания t_n , измеренное на уровне 0.1,...,0.9 от максимального значения для каждого из участков. Здесь также приведены данные для монохромного зрения.

Анализ данных табл. 3 показывает, что участкам А дихромного и трехмерного зрения, в отличие от других, соответствуют повышенные значения $k_{\max}$, равные 1.69 и 1.72. Это указывает на существование в зрительной системе насекомых механизма усиления оптического излучения в ультрафиолетовой и синей части спектра. Данный результат согласуется с результатами исследования, опубликованные в научной литературе [1]. В ней отмечается высокая чувствительность фасеточных глаз к ультрафиолету и синему свету

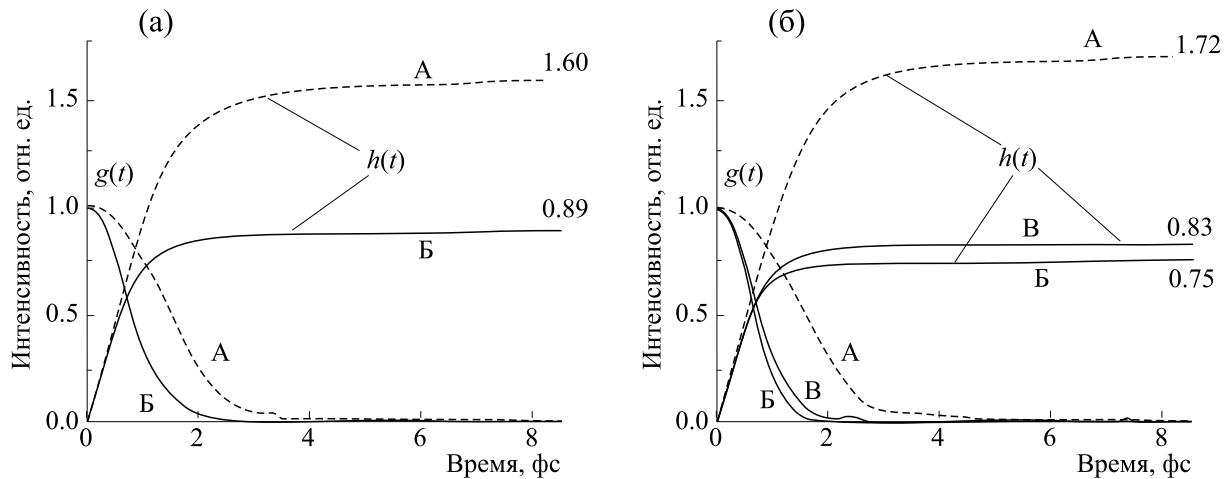


Рис. 6. Импульсные (временные) $g(t)$ и переходные характеристики $h(t)$ для дихромного (а) и трихромного зрения (б). Численные значения $t_{\max}$ указаны напротив соответствующих кривых $h(t)$.

и проявляется у всех насекомых. Исключение красных лучей из видимой части спектра не обязательно, например, дневные бабочки и мухи реагируют на красный цвет [2, 3].

Важное значение для переходного процесса имеют потери энергии ΔE . Их величину находили с помощью равенства Парсеваля [19]:

$$\Delta E = \int_0^{\infty} g^2(t) dt. \quad (10)$$

Численные значения энергии ΔE для различных типов зрения приведены в табл. 3. Анализ этих данных показывает, что эффект усиления света на участке А дихромного и трихромного зрения сопровождается заметными потерями энергии равными ~ 1.11 и ~ 1.20 эВ. На других участках спектра подобные потери, примерно, в два раза меньше.

ЧАСТОТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИНАМИЧЕСКОГО ЗВЕНА

Частотные характеристики описывают установившиеся вынужденные колебания на выходе исследуемого динамического звена при подаче на вход гармонического воздействия. Частотные ха-

рактеристики являются энергетическими характеристиками системы, которые устанавливают связь между спектрами входного и выходного сигналов, представляющих прямое преобразование Фурье от функции времени $g(t)$.

По известной зависимости $g(t)$ вычисляли комплексную частотную характеристику $r^*(f)$. Для этого использовали формулу прямого преобразования Фурье [7, 20]:

$$r^*(f) = \int_0^{\infty} g(t) \exp(-2\pi jft) dt. \quad (11)$$

Функция (12) содержит вещественную $a(f)$ и мнимую части $b(f)$.

$$k^*(f) = a(f) + j \cdot b(f). \quad (12)$$

Модуль функции (13) вычисляли по формуле

$$k(f) = \sqrt{a^2(f) + b^2(f)}. \quad (13)$$

Величину фазового сдвига находили по формуле:

$$\varphi(f) = -\arctg \frac{b(f)}{a(f)}. \quad (14)$$

Таблица 3. Численные параметры временных характеристик

Тип зрения	Участок	$k_{\max}$	t_n , фс	ΔE , эВ
Монохромное	Б	0.93	1.35	0.63
Дихромное	А	1.60	2.10	1.11
	Б	0.88	1.00	0.59

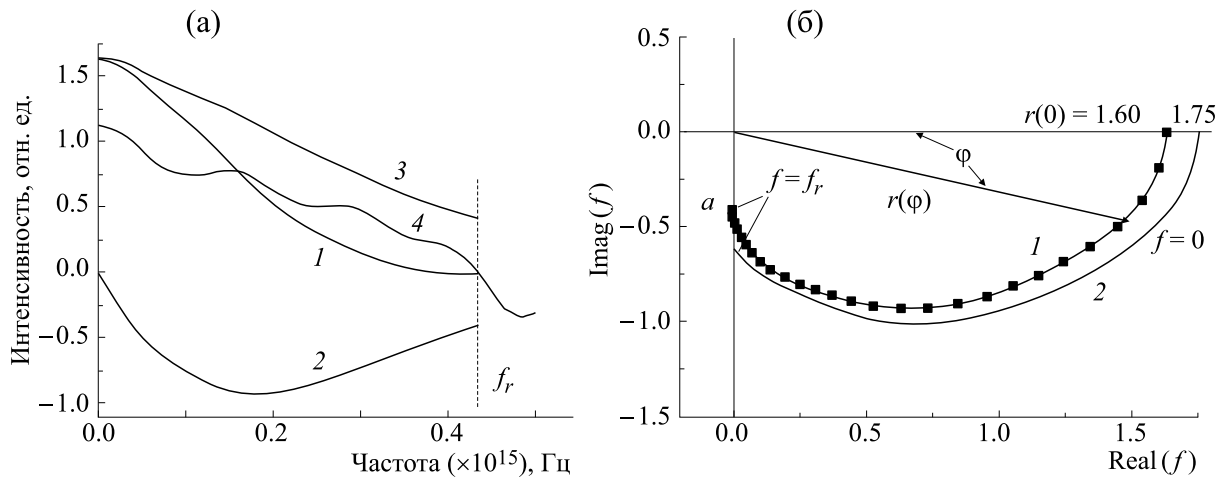


Рис. 7. Частотные характеристики зрительной системы насекомого: (а) — амплитудно-частотные характеристики (участок А дихромного зрения), 1 — вещественная составляющая спектра $a(f)$, 2 — мнимая составляющая спектра $b(f)$, 3 — модуль $r(f)$, 4 — групповое время запаздывания; (б) — амплитудные фазочастотные характеристики, (участок А), 1 — дихромное зрение, 2 — трихромное зрение.

Для оценки временных процессов используют понятие группового времени запаздывания. В общем случае групповое время запаздывания определяется первой производной фазового спектра (15) со знаком минус:

$$\tau(f) = -\frac{1}{360} \cdot \frac{d\phi}{df}. \quad (15)$$

Здесь фазовый угол $\phi(f)$ измеряется в угловых градусах, нормирующий множитель имеет величину 360° . Графические амплитудно-частотные характеристики и амплитудные фазочастотные характеристики зрительной системы насекомого, приведены на рис. 7а и 7б соответственно. Кривая 4, изображенная на рис. 7а, показывает зависимость группового времени запаздывания от частоты. При частоте, равной частоте диэлектрической релаксации f_r , производная $d\phi/df$ в соотношении (16) равна нулю, оптическая среда зрительной системы насекомого не реагирует на электромагнитное излучение. По существу, частота f_r представляет собой предельное значение частоты, при которой оптическая среда не реагирует на оптическое излучение. При этом вещественная составляющая комплексного спектра (кривая 1, рис. 7а) принимает нулевое значение, т. е. активные потери энергии отсутствует, а модуль $r(f)$ (кривая 3, рис. 7а) становится, как следует из формулы (14), равным мнимой компоненте (кривая 2, рис. 7а). В последнем случае зрительная система насекомого проявляет емкостные свойства. Поэтому в точке a (рис. 7б) происходит завершение кривой годографа радиус-вектора

зрительной системы насекомого. Тот факт, что на рис. 7б амплитудные фазочастотные характеристики не охватывают начала координат, свидетельствуют об устойчивости режима усиления. Значения частоты диэлектрической релаксации f_r для зрительных систем насекомых различного происхождения приведены в табл. 1. Из сопоставления этих данных можно видеть, что дихромное и трихромное зрение на участке А имеют частоту f_r , которая по величине меньше пиковой частоты f_m , тогда как другие типы зрения имеют обратную картину.

Численное значение модуля частотной характеристики $r(0)$ находим из соотношения (12), полагая в нем частоту $f = 0$:

$$r(0) = \int_0^\infty g(t)dt. \quad (16)$$

Соотношение (17) совпадает с интегралом (4), если в нем положить $t = \infty$. Тогда $r(0) = k_{\max}$ и, следовательно, эффект усиления света у дихромного и трихромного зрения (участок А) проявляется и в частотной области. Это явление можно объяснить, если рассмотреть закон Бугера–Ламберта для поглощения света

$$I = I_0 \exp(-ax), \quad (17)$$

где a — положительный показатель поглощения; x — толщина поглощающего слоя; I_0 — интенсивность света, входящего в среду; I — интенсивность света, прошедшего слой толщиной x .

Впервые особенности среды с отрицательным поглощением света рассмотрел советский физик В.А. Фабрикант. Им было показано, что для такой среды закон (18) имеет другой вид:

$$I = I_0 \exp(|a|x),$$

где $|a|$ — положительная величина, что соответствует не ослаблению, а усилению света по мере продвижения его через вещество. Иначе говоря, в усиливающей среде показатель поглощения среды становится отрицательным. Этим объясняется то, что подобную среду иногда называют средой с отрицательным показателем поглощения. Это означает, что в такой среде лавинообразно возрастает число фотонов за счет актов вынужденного излучения.

ВЫВОДЫ

1. Предложена методика построения кривых спектральной чувствительности для монохромного, дихромного и трихромного зрения насекомых в частотной области.

2. Установлено, что показатель широкополосности оптических сигналов μ изменяется от 0.41 до 1.21 и, по определению (2), зрительная система насекомого обладает сверхширокополосными свойствами.

3. Показано, что число периодов световых колебаний в зрительной системе насекомых, имеющей спектр в форме кривой Гаусса, связано с показателем μ простым соотношением: $n = 1/\mu$.

4. Обнаружено динамическое звено зрительной системы насекомого, обладающее свойством усиления оптического сигнала на участках ультрафиолета и синей части спектра во временной и частотной области.

5. Выявлено, что при частоте равной и выше частоты диэлектрической релаксации оптическая среда зрительной системы насекомого не реагирует на электромагнитное излучение. Это явление в наибольшей степени проявляется в ультрафиолетовой и синей части спектра.

6. Полученные новые знания могут найти применение при создании матричных твердотельных фотоприемников в ультрафиолетовой, и синей части спектра.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. П. Тыщенко, Физиология насекомых (Высшая школа, М., 1986).
2. M. J. Klowden, *Physiological Systems in Insects*. Academ. Press, 2007. 688 p.
3. Nation J. L. *Insect Physiology and Biochemistry*, 2nd Edition (CRC Press, 2008).
4. B.-M. Song and Ch.-H. Lee, *Front Neural Circuits*, **12**, 16 (2018). DOI: 10.3389/fncir.2018.00016
5. В. Г. Беспалов, С. А. Козлов, А. Н. Петров и др. *Фемтосекундная оптика и фемтотехнология* (Университет ИТМО, СПб., 2018).
6. Ю. А. Шполянский, Автореф. дисс. ... докт. физ.-мат. наук (Университет ИТМО, СПб., 2010).
7. С. И. Зиенко и В. Л. Жбанова, *Прикладная физика*, № 3, 46 (2021). DOI: 10.51368/1996-0948-2021-3-39-46
8. S. I. Zienko and V. L. Zhbanova, *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, **21** (6), 828 (2021). DOI: 10.17586/2226-1494-2021-21-6-828-836
9. О. П. Исакова, Ю. Ю. Тарасевич и Ю. И. Юзюк, *Обработка и визуализация данных физических экспериментов с помощью пакета Origin* (Книжный дом «Либриком», М., 2009).
10. О. В. Лазоренко и Л. Ф. Черногор, *Радиофизика и радиоастрономия*, **13** (2), 166 (2008).
11. *Ultra-wideband Radar Technology*, Ed. by D. James and P. E. Taylor (CRC Press, Boca Raton, 2000).
12. Э. В. Семенов, Автореф. дисс. ... докт. техн. наук (М., 2012).
13. А. В. Коваленко, С. М. Вовк и Е. Г. Плахтий, *Журн. прикладной спектроскопии*, **88** (2), 297 (2021).
14. Я. Б. Зельдович и А. Л. Мышкис, *Элементы прикладной математики* (Наука, М., 1972).
15. S. I. Zienko and D. S. Slabkovsky, *Technical Physics Letters*, **45** (46), 537 (2019).
16. S. I. Zienko and D. S. Slabkovsky, *Optics and Spectroscopy*, **127** (3), 564 (2019).
17. С. И. Зиенко и Д. С. Слабковский, *Прикладная физика*, № 1, 36 (2020).
18. М. П. Туманов, *Теория линейных систем автоматического управления: Учебное пособие* (МГИЭМ, М., 2005).
19. И. С. Гоноровский, *Радиотехнические цепи и сигналы* (Радио и связь, М., 1986).
20. В. В. Пасынков и В. С. Сорокин, *Материалы электронной техники*, 3-е изд. (Издательство «Лань», СПб.: 2001).

Frequency and Time Domain Characteristics of the Insect Visual System in Optic Flow

S.I. Zienko* and V.L. Zhbanova*

**Branch of National Research University "Moscow Power Engineering Institute" in Smolensk,
Energeticheskii proezd 1, Smolensk, 214013 Russia*

Frequency and time domain properties of the monochromatic, dichromatic, and trichromatic visual system in an insect have been studied. The research method is based on the representation of the optical flow field of the insect visual system in the form of a dynamic link with an input and output. The Gaussian function was used to approximate the spectral curves. The study of the inertial properties of such a link in the time domain was performed by applying signals to its input in the form of a δ -function or a unit function. The steady-state forced oscillations at the output of the investigated dynamic link are determined when a harmonic effect is applied to the input. A technique for constructing spectral sensitivity curves for monochrome, dichromatic, and trichromatic vision of insects in the frequency domain is proposed; it has been established that the spectra exhibit the properties of ultra wideband signals. It has been found that the dynamic link of the insect visual system is capable of amplifying the optical signal over ultraviolet and blue parts of the spectrum in the time and frequency domain. It has been revealed that at a frequency equal to or higher than the frequency of dielectric relaxation, the optical flow field of the insect's visual system does not sense electromagnetic radiation. This phenomenon is most pronounced in ultraviolet and blue parts of the spectrum. It has been established that the optical signal wideband index μ varies from 0.41 to 1.21; thus, the visual system of an insect has ultra wideband properties. It has been shown that the number of periods of light oscillations in the visual system of insects, which has a spectrum in the form of a Gaussian curve, is related to the exponent μ by a simple relationship. New knowledge gained can be used for creation of matrix solid-state photodetectors in ultraviolet and blue parts of the spectrum.

Keywords: monochrome vision, insects, spectrum, dynamic link, impulse response, transient response

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОРОТКОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ГОМОГЕНАТЕ СЕРДЦА КРЫСЫ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

© 2023 г. А.А. Тимошин*, #, В.Л. Лакомкин*, А.А. Абрамов*, Э.К. Рууге*, **

*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, 3-я Черепковская ул., 15а, Москва, 121552, 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 30.09.2022 г.

После доработки 11.11.2022 г.

Принята к публикации 16.11.2022 г.

Работа посвящена исследованию защитного действия такого митохондриально-направленного препарата, как пластомитин, в условиях гиперпродукции короткоживущих активных форм кислорода в организме животных. Изучена интегральная скорость генерации высокотоксичных кислородных радикалов в условиях окислительного стресса, инициированного введением в организм животных доксорубина, и защитного эффекта, вызываемого действием пластомитина. Эксперименты проводились на гомогенатах сердец крыс с использованием метода ЭПР. Установлено, что в результате введения крысам доксорубина достоверно увеличивается на 26% скорость образования короткоживущих активных форм кислорода в гомогенате, а в случае совместного применения доксорубина и пластомитина этот эффект в значительной степени подавляется.

Ключевые слова: активные формы кислорода, антиоксидант, гидроксилламин, доксорубин, пластомитин, спиновая ловушка, электронный парамагнитный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302923010118, EDN: OAJYWX

Известно, что образование короткоживущих высокотоксичных активных форм кислорода (АФК) является одним из основных факторов, вызывающих существенные и необратимые повреждения органов и тканей [1]. Для защиты биологических структур от повреждающего действия АФК в лабораторной и клинической практике широко применяются препараты, способные эффективно перехватывать эти короткоживущие соединения, оказывая тем самым антиоксидантное действие.

В данной работе исследовалось защитное действие такого митохондриально-направленного препарата, как пластомитин (SkQ, ионы Скулачёва) [2, 3]. При этом важной задачей являлся анализ действия этого антиоксиданта в условиях гиперпродукции АФК, инициированной введением в организм доксорубина (антибиотик антрациклинового ряда, используемый для лечения злокачественных новообразований), обладающего дозозависимым кардиотоксическим дей-

ствием, способным стимулировать образование АФК в ткани миокарда [4–6].

В данной работе такие исследования проводились на гомогенатах сердец крыс с использованием метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Основной целью работы являлось изучение интегральной скорости генерации высокотоксичных кислородных радикалов в условиях окислительного стресса, инициированного введением в организм животных доксорубина и защитного эффекта, вызываемого действием пластомитина.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Эксперименты проводили на нормотензивных крысах линии Wistar (самцы массой 320–380 г). Животных содержали в биоклинике НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России в клетках по 5 особей со свободным доступом к сухим кормам и воде. Световой режим контролировали (12:12 ч — свет : темнота) при достаточной смене объемов воздуха и температуре 19–23°C.

Все животные были произвольным образом разделены на три группы. Животные первой

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, SkQ — пластомитин (ионы Скулачёва), ЭПР — электронный парамагнитный резонанс.

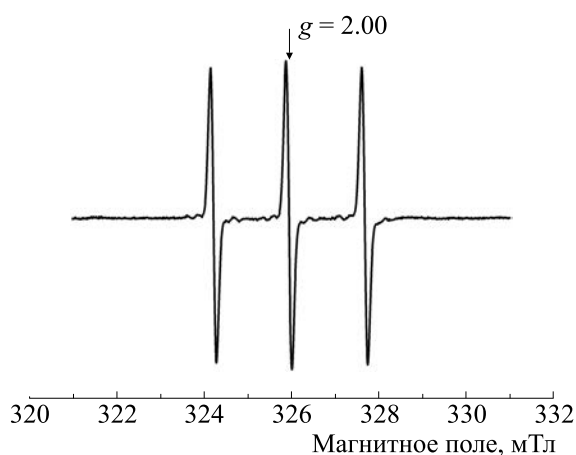


Рис. 1. Спектр ЭПР нитроксильных радикалов, образующихся при введении СРН в гомогенат сердца крысы.

группы (контроль) получали подкожно физиологический раствор. Вторая и третья группы животных получали доксорубин в дозе 2 мг/кг подкожно еженедельно в течение четырех недель. Животные из третьей группы в течение всего этого периода наряду с доксорубином получали также ежедневно подкожно пластомитин (в 50%-м водном пропиленгликоле) в дозе 0.32 мг/кг. При таком введении крысам доксорубина у них инициировалось развитие сердечной недостаточности [7], а пластомитин мог оказывать защитное действие как митохондриально направленный перехватчик короткоживущих кислородных радикалов.

Через четыре недели всех животных забивали передозировкой уретана, после чего у них вскрывали грудную клетку, изолировали сердце и промывали его в физиологическом растворе, после чего замораживали в жидком азоте. Далее полученные образцы миокарда животных всех трех экспериментальных групп хранили в жидком азоте и размораживали непосредственно перед их анализом методом ЭПР.

После размораживания образцы ткани сердечной мышцы гомогенизировали. При этом для каждого образца навеску ткани миокарда, отмытую от крови, измельчали ножницами, после чего продавливали через сито с отверстиями диаметром 0.8 мм, после этого перетирали в стеклянном гомогенизаторе с автоматическим приводом вместе со средой гомогенизации (из расчета 100 мг ткани на 300 мкл среды). Все манипуляции проводили при температуре 0–4°C. В качестве среды гомогенизации использовали раствор Кребса–Хенселейта. Полученный грубый гомогенат осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 4000 об/мин, полученный супернатант сразу же исследовали методом ЭПР.

Для регистрации образования короткоживущих активных форм кислорода в образцы супернатанта, соответствующие всем экспериментальным группам, добавляли водный раствор спиновой ловушки, в качестве которой применяли гидроксиламин СРН ((3S)-1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметилпирролидин-3-карбоксилат) [8, 9], конечная концентрация которого в образцах составляла 1 мМ. Полученные пробы вводили в газопроницаемые капилляры объемом 35 мкл, которые помещали в кварцевую трубку внутренним диаметром 4 мм, продуваемую воздушным потоком при комнатной температуре и расположенную в активной зоне резонатора ЭПР-спектрометра.

Регистрацию спектров ЭПР проводили на спектрометре X-диапазона модели E-109E (Varian, США). Амплитуда ВЧ-модуляции магнитного поля составляла 0.1 мТл при частоте 100 кГц. СВЧ-мощность спектрометра устанавливали на уровне 10 мВт, а частота СВЧ-излучения всегда составляла 9.14 ГГц. Запись серии сигналов ЭПР проводили в течение 30 мин после добавления СРН к образцам гомогената, за это время записывали 7 спектров. Для анализа содержания полученных парамагнитных аддуктов измеряли амплитуды высокопольной компоненты их спектров.

Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с использованием пакета программ Origin 8 (OriginLab Corp., США). Все данные представлены как среднее значение $\pm$ ошибка среднего. Кратность повторения опытов составляла не менее пяти-шести экспериментов. Для проверки статистической достоверности эффектов использовали двусторонний *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы исследовали образование короткоживущих АФК в ткани сердечной мышцы с использованием в качестве спиновой ловушки гидроксиламина СРН [8, 9]. Как известно, короткоживущие кислородные радикалы присоединяются к молекуле данной спиновой ловушки с образованием ковалентной связи. Продуктом этой реакции являются стабильные нитроксильные радикалы (спиновые аддукты), имеющие характерный спектр ЭПР.

На рис. 1 представлен характерный спектр ЭПР нитроксильных радикалов, образующихся при добавлении СРН в гомогенат ткани миокарда. Из рисунка видно, что этот спектр представляет собой триплет узких линий. Такой сигнал, как известно, соответствует спектру нитроксильных радикалов, обладающих быстрым и изотропным молекулярным движением, образующихся в результате взаимодействия СРН с короткоживущими кислородными радикалами [8, 9].

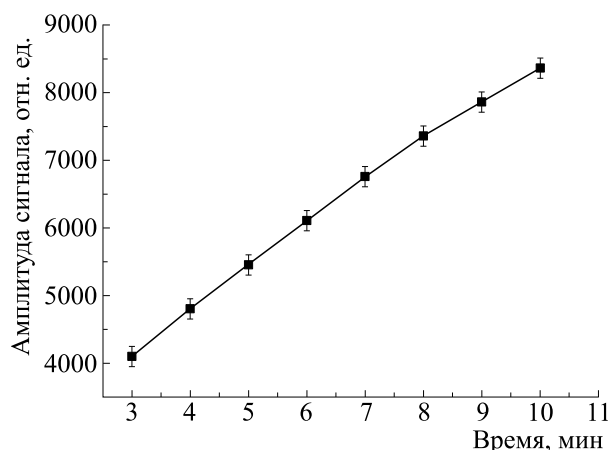


Рис. 2. Кинетика амплитуды высокопольной компоненты сигналов ЭПР нитроксильных радикалов, образующихся в модельной системе, содержащей СРН и ксантин—ксантиноксидазу. По оси абсцисс — время с момента введения СРН в реакционную среду.

Важно отметить, что реакция данной спиновой ловушки с различными окислителями приводит к образованию и накоплению практически одинаковых нитроксильных радикалов, поскольку такие ловушки на основе гидросиламина не демонстрируют специфической реакционной способности к определенному типу свободнорадикальных АФК и не допускают поэтому идентификации АФК по спектру ЭПР. Тем не менее, на специфичность обнаружения супероксида указывает ингибирование сигнала ЭПР при добавлении в реакционную среду супероксиддисмутазы [9].

Кроме того, способность СРН эффективно перекхватывать супероксидные анион-радикалы была показана в данных экспериментальных условиях на модельной системе, содержащей ксантин и ксантиноксидазу в фосфатном буфере при pH 7.4. На рис. 2 представлена характерная кинетика изменения амплитуды высокопольной компоненты сигналов ЭПР образующихся в такой системе нитроксильных радикалов. Из этого рисунка видно, что их концентрация практически линейно увеличивается.

Следовательно, в данных экспериментальных условиях в результате взаимодействия СРН с супероксидными анион-радикалами, образующимися в системе «ксантин—ксантиноксидаза», происходит образование стабильных нитроксильных радикалов, регистрируемых методом ЭПР. При этом форма спектров радикалов, регистрируемых в такой модельной системе, не отличается от формы сигналов ЭПР этих парамагнитных соединений, образующихся в результате взаимодействия СРН с короткоживущими АФК в гомогенате ткани миокарда (данные не приведены).

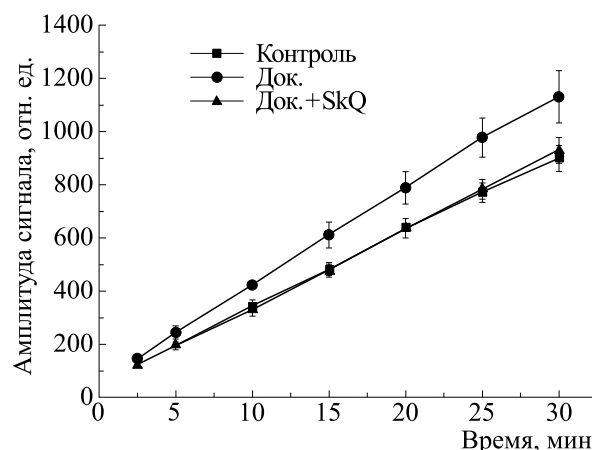


Рис. 3. Кинетики амплитуды высокопольной компоненты сигналов ЭПР нитроксильных радикалов, образующихся после добавления СРН в гомогенат ткани миокарда крыс, соответствующих трем экспериментальным группам. По оси абсцисс — время с момента введения СРН в образцы гомогената.

В другой части работы исследовали кинетики формирования и накопления стабильных нитроксильных радикалов при введении СРН в образцы гомогената ткани миокарда. Для всех экспериментальных групп животных рассчитывали усредненные кинетики образования этих парамагнитных соединений, полученные результаты представлены на рис. 3. Из этого рисунка видно, что во всех трех группах животных после введения СРН в образцы гомогената наблюдалось увеличение содержания в пробах парамагнитных нитроксильных радикалов, и во всех случаях кинетика этого роста могла быть хорошо аппроксимирована линейной зависимостью. Исходя из этих зависимостей, для всех экспериментальных групп оценивали скорость образования нитроксильных радикалов, результаты представлены на рис. 4.

Из этого рисунка видно, что при переходе от контрольной группы к животным, получавшим доксорубин, скорость образования парамагнитных аддуктов увеличивалась на 26%, а в случае совместного применения доксорубина и пластомицина она практически не отличалась от своего значения, полученного в контроле.

Таким образом, несмотря на то, что введение СРН осуществлялось не в интактный организм животных, а в гомогенат ткани сердечной мышцы после ее замораживания и оттаивания, в препаратах, соответствующих всем экспериментальным группам, происходит генерация короткоживущих кислородных радикалов с образованием спиновых аддуктов, регистрируемых методом ЭПР. При этом в результате введения крысам доксорубина достоверно увеличивается скорость образования короткоживущих АФК в гомогенате, а в

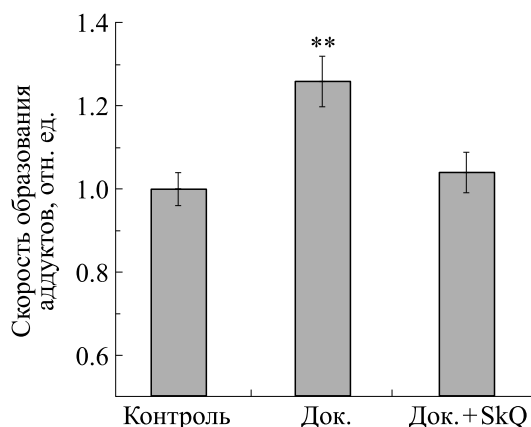


Рис. 4. Усредненные значения скорости образования нитроксильных радикалов, соответствующие трем экспериментальным группам; ** — $p < 0.05$ относительно контроля.

случае совместного применения доксорубина и пластомитина этот эффект в значительной степени подавляется.

Следует отметить также, что данный эффект, полученный нами на модели гомогената ткани сердца крысы, хорошо согласуется с данными других авторов, показывающих эффективное действие пластомитина как перехватчика короткоживущих АФК [7].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Е.В. Щербаченко за помощь в эксперименте.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследование выполнялось 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Bolli, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **5**, 249 (1991)
2. V. P. Skulachev, V. N. Anisimov, Y. N. Antonenko, et al., *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, **1787** (5), 437 (2009).
3. В. Л. Лакомкин и В. И. Капелько, *Кардиология*, **49** (10), 55 (2009).
4. M. A. Mitry and J. G. Edwards, *IJC Heart & Vasculture*, **10**, 17 (2016).
5. H. Nohl, L. Gille, and K. Staniek, *Zeitschrift Fur Naturforschung. C*, **53** (3–4), 279 (1998).
6. P. K. Singal, N. Iliscovic, T. Li, et al., *FASEB J.*, **11** (12), 931 (1997).
7. А. А. Абрамов, В. Л. Лакомкин, А. В. Просвирнин и др., *Кардиология*, **59** (6), 35 (2019).
8. C. L. Hawkins and M. J. Davies, *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, **1840** (2), 708 (2014).
9. S. I. Dikalov, Y. F. Polienko, and I. Kirilyuk, *Antioxidants & Redox Signaling*, **28** (15), 1433 (2018).

EPR Study of the Generation of Short-Lived Reactive Oxygen Species in Rat Heart Homogenate

A.A. Timoshin*, V.L. Lakomkin*, A.A. Abramov*, and E.K. Ruuge*, **

*Chazov National Medical Research Centre for Cardiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

**Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/2, Moscow, 119991 Russia

The aim of the present study was to investigate the protective effects of a mitochondrial-targeted antioxidant such as plastomitin through ROS hypergeneration in animals. The average rate of the generation of highly reactive oxygen radicals during oxidative stress, induced by doxorubicin injection in rats and a protective impact of plastomitin use were investigated. The experiments were carried out with rat heart tissue homogenates using EPR spectroscopy. It was found that in case of doxorubicin injection in rats, there is a significant 26% increase in the rate of short-lived reactive oxygen species generation in the homogenate but when doxorubicin and plastomitin were used in combination, this effect was greatly suppressed.

Keywords: reactive oxygen species, antioxidant, hydroxylamine, doxorubicin, plastomitin, spin trap, electron paramagnetic resonance

УДК 577.3

СРАВНЕНИЕ ДИНАМИКИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ И ВЫЖИВАЕМОСТИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИХ ТОТАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ИОНАМИ УГЛЕРОДА В ПИКЕ БРЭГГА ИЛИ РЕНТГЕНОВСКИМИ ЛУЧАМИ

© 2023 г. Е.А. Кузнецова*, #, О.М. Розанова*, Е.Н. Смирнова*, С.И. Глухов*, Т.В. Сирота*, Т.А. Белякова**, Н.П. Сирота*

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

**Физико-технический центр Физического института им. П.Н. Лебедева,
Академический пр., 2/110, Протвино, Московская область, 142281, Россия

#E-mail: kuzglu@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.09.2022 г.

После доработки 15.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

В работе определены: выживаемость мышей, облученных ускоренными ионами углерода (450 МэВ/нуклон) в пике Брэгга или рентгеновским излучением в дозе 6,5 Гр; методом ДНК-комет — уровни повреждений ДНК (%TDNA) в лейкоцитах крови мышей за сутки до и через 1–23 сут после облучения ионами углерода и через 1–28 сут после воздействия рентгеновского излучения в той же дозе. Обнаружено большее повреждающее действие ионов углерода по сравнению с рентгеновскими лучами по критериям выживаемости и %TDNA, а также у индивидуальных животных существенные вариации %TDNA, которые, по-видимому, могут служить причиной индивидуальных различий при развитии нестабильности генома в отдаленные сроки. Можно полагать, что более высокий %TDNA лейкоцитов после облучения ионами углерода по сравнению с рентгеновским излучением, его больший диапазон и несинхронность изменений у индивидуумов в пострадиационном периоде связаны с возникновением кластерных повреждений в ДНК и дисфункцией митохондрий, а также обусловлены генетическими и эпигенетическими факторами. Полученные результаты указывают на необходимость оценки состояния лейкоцитов крови животных с гетерогенным генетическим фоном методом ДНК-комет перед облучением для формирования группы с близкими значениями %TDNA. Выявленные различия у индивидуальных лабораторных животных требуют дальнейшего изучения для совершенствования животных моделей в свете развития персонифицированной биомедицины.

Ключевые слова: метод ДНК-комет, рентгеновское излучение, ускоренные ионы углерода, повреждения ДНК лейкоцитов, индивидуальные животные.

DOI: 10.31857/S000630292301012X, EDN: OALBXD

Изучение биологических эффектов ускоренных частиц на живые организмы связано с решением проблем космобиологии и медицины. Так, в ограниченном количестве специализированных клиник в качестве радиотерапии применяют облучение опухолей тяжелыми частицами, в частности, ионами углерода. Специфика передачи энергии ускоренных тяжелых частиц биологическим образцам заключается в максимальном выделении энергии в пике Брэгга, что вызывает глу-

бокие изменения структуры хроматина [1]. В отличие от пучка ускоренных частиц, направленного на локальный участок тела пациента, воздействие тяжелых заряженных частиц при пилотируемых космических полетах может осуществляться на весь организм. Высокоэнергетические частицы (10^6 – 10^{21} эВ) и фотоны из внеземных источников, находящихся внутри и вне нашей галактики, индуцируют повреждения ДНК культивируемых клеток и клеток крови космонавтов, даже несмотря на низкие дозы и небольшие мощности доз [2, 3]. Основным неблагоприятным эффектом действия ионизирующих излучений при радиотерапии и долговременных

Сокращения: %TDNA — уровень повреждений ДНК, ЛПЭ — линейная передача энергии, АФК — активные формы кислорода.

космических полетах является повышенный риск возникновения злокачественных новообразований [1, 4]. Поэтому изучение отдаленных биологических эффектов воздействия ускоренных частиц на моделях животных актуально для понимания последствий, как космических полетов, так и применяемых протоколов лечения онкологических пациентов. В качестве объекта радиобиологических исследований традиционно используют мышей, в частности, для выявления биологических эффектов облучения берут пробы крови. Использование крови мышей представляется интересным, поскольку основное количество лейкоцитов мыши — это лимфоциты, являющиеся клетками иммунной системы, с одной стороны, и наиболее радиочувствительными клетками крови, с другой. Результатом воздействия фотонов и ускоренных частиц является поражение клеточных структур, в частности, ДНК, в которой регистрируют различные повреждения — разрывы, повреждение или утрата оснований, сшивки; особенностью действия ускоренных ионов на клетки является индукция кластерных повреждений ДНК, то есть близко расположенных множественных нарушений структуры хромосомы [1, 5].

Одним из современных методов, выявляющих широкий спектр повреждений ДНК индивидуальных клеток (одно- и двухнитевые разрывы, апуриновые/апириимидиновые сайты, реализующиеся в разрывы ДНК при высоком pH), является щелочная версия метода ДНК-комет [6]. Метод является высокочувствительным, не требует большого количества биологического материала, что позволяет проводить мониторинг уровня повреждений ДНК клеток крови облученных животных в течение их жизни в разные сроки после облучения. Поскольку, как правило, в группе животных регистрируют средние значения изучаемых показателей, то в свете развития персонализированной биомедицины особый интерес также заключается в изучении показателей у индивидуальных животных на протяжении длительного пострадиационного периода.

Цель работы: оценить выживаемость и уровни повреждений ДНК (%TDNA) лейкоцитов крови у индивидуальных животных в отдаленные сроки после воздействия на мышей ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 6.5 Гр, сравнить динамику изменений уровней повреждений ДНК лейкоцитов с таковой после воздействия рентгеновского излучения в той же дозе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах аутбредных мышей колонии SHK (масса 31–35 г, $n = 60$), полученных в фили-

але «Столбовая» НЦБМТ ФМБА, которых разводили и содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пушино, Московская область) при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, естественном световом дне и свободным доступом к пище и воде. Мыши содержались в полипропиленовых клетках по 10 особей.

Облучение. Мышей, предварительно анестезированных смесью ксилазин–золептила (Interchemie Werken, BV, Нидерланды; Virbac Sante Animale, Франция), облучали тотально в индивидуальных хорошо вентилируемых контейнерах на установке «Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70» НИЦ «Курчатовский институт» — ИФВЭ (Протвино, Московская обл.) — моноэнергетическим пучком ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 6.5 Гр, как описано в работе [7]. Расчетная величина линейной передачи энергии (ЛПЭ) ионов углерода при позиционировании мышей в модифицированном пике Брэгга составляла 100 кэВ/мкм. Дозиметрию во время облучения проводили по показаниям монитора и ТЛД-дозиметров типа ММТ. Профили пучка и равномерность поперечного облучения контролировали с помощью радиохромной пленки EBТ-3 (Caf-Chromic, США). Параллельно другие группы мышей были облучены в дозе 6.5 Гр на рентгеновской установке «РУТ-250-15-1» (ЦКП «Источники излучений» ИБК РАН, Пушино, Московская обл.) при мощности дозы 1.12 Гр/мин, напряженности 200 кВ, силе тока 20 мА, фильтры 1 мм Al и 1 мм Cu, фокусное расстояние 37 см, ЛПЭ = 2 кэВ/мкм. Дозиметрию проводили по методу Фрике в присутствии бензойной кислоты с помощью дозиметра VA-J-18.

Метод ДНК-комет. Для определения уровня повреждения ДНК в лейкоцитах крови у каждой мыши за сутки до, а также в разные периоды после облучения на протяжении 23–28 суток надрезали кончик хвоста, брали по 5 мкл крови и помещали в пробирки с фосфатно-солевым буфером, pH 7.2, содержащим 0.001 моль/л ЭДТА. Цельную кровь мышей разбавляли этим раствором в шесть раз. Слайды для анализа ДНК-комет готовили по методике [8] и анализировали под флуоресцентным микроскопом «ЛЮМАМ И-3» (ЛОМО, Санкт-Петербург). Для экспериментов *in vitro* из крови интактных мышей аналогичным образом готовили слайды, которые облучали на льду на рентгеновской установке «РУТ-250-15-1» с той же мощностью дозы, как указано выше. Сразу после облучения слайды помещали в лизирующий раствор и проводили все процедуры согласно работе [8]. Изображения комет были сняты цифровой камерой CoolPix 995 (Nikon, Япония) и обработаны с помощью специально разработанного программного обеспечения, содержащего алгоритмы расчета стандартных параметров комет [9]. Уровень повреждения выражали в процентах

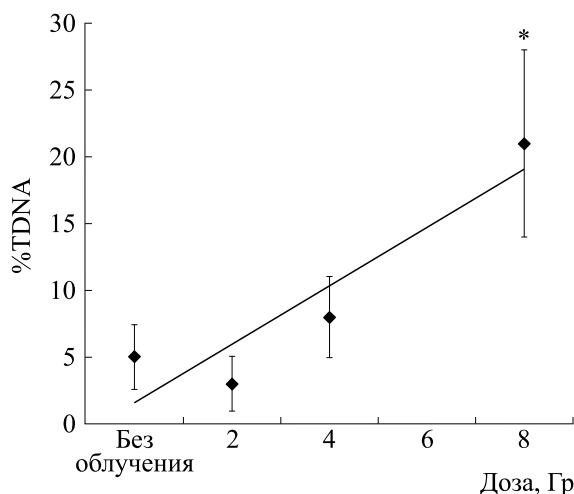


Рис. 1. Средние значения %TDNA лейкоцитов крови после облучения рентгеновскими лучами слайдов, содержащих клетки крови, в диапазоне доз 0–8 Гр; * — достоверные отличия от необлученных ($p < 0.05$).

ДНК, содержащейся в хвосте кометы, относительно общего количества ядерной ДНК (%TDNA). Для каждой экспериментальной единицы анализировали по три слайда, фотографируя не менее 50 клеток на слайд, как описано в работе [10].

Определение выживаемости. Для определения 30-суточной выживаемости использовали 20 мышей, которые были разделены на две группы. Были проведены два независимых эксперимента. После облучения в течение месяца ежедневно учитывали гибель животных и по итогам наблюдения определяли 30-суточную выживаемость, динамику гибели и среднюю продолжительность жизни погибших мышей.

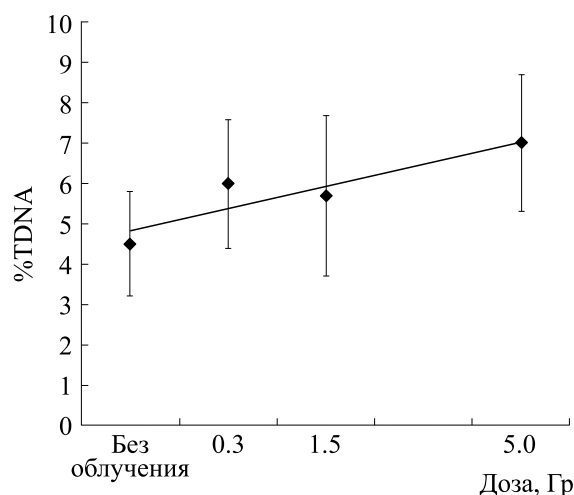


Рис. 2. Средние значения %TDNA лейкоцитов крови через сутки после воздействия на мышей рентгеновского излучения в диапазоне доз 0–5 Гр.

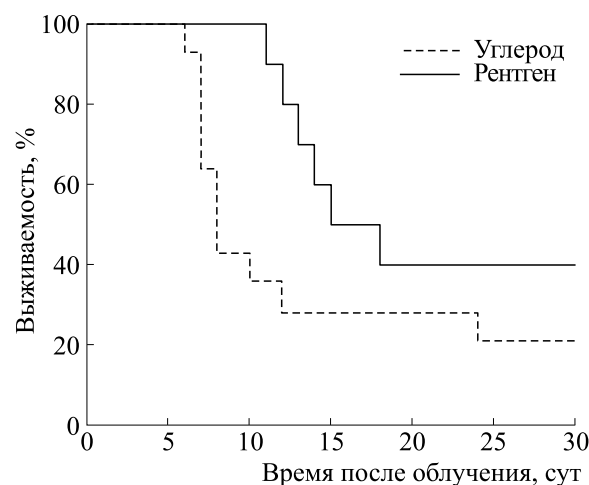


Рис. 3. Динамика выживаемости мышей после тотального облучения ионами углерода и рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр.

Статистическая обработка результатов. Анализ статистической достоверности отличий проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), расчет p -value достоверности уровней значимости производили методом последующего теста Турки (Turkey HSD *post-hoc* test), а также с использованием t -критерия Стьюдента. Показатели выживаемости мышей сравнивали с помощью непараметрических критериев: Гехана—Вилкоксона для оценки продолжительности жизни погибших от облучения животных и логрангового критерия для сравнения 30-ти суточной выживаемости. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 показана зависимость %TDNA лейкоцитов крови от дозы сразу после воздействия рентгеновского излучения на кровь мыши *in vitro*. Облучение клеток в дозах 0–8 Гр проводили в составе агарозных слайдов на льду для исключения репарации ДНК. Видно, что с увеличением дозы растут значения %TDNA.

На рис. 2 показана зависимость %TDNA лейкоцитов крови через сутки после облучения мышей рентгеновским излучением в диапазоне доз 0–5 Гр. Различия в уровнях остаточных повреждений ДНК при облучении лейкоцитов при этих дозах в условиях *in vivo* не были выявлены. При данной постановке эксперимента регистрировали лишь остаточные нерепарированные повреждения.

На рис. 3 представлены кривые выживаемости мышей, облученных в дозе 6.5 Гр в пике Брэгга ионами углерода и для сравнения — рентгеновским излучением. Основная гибель мышей при

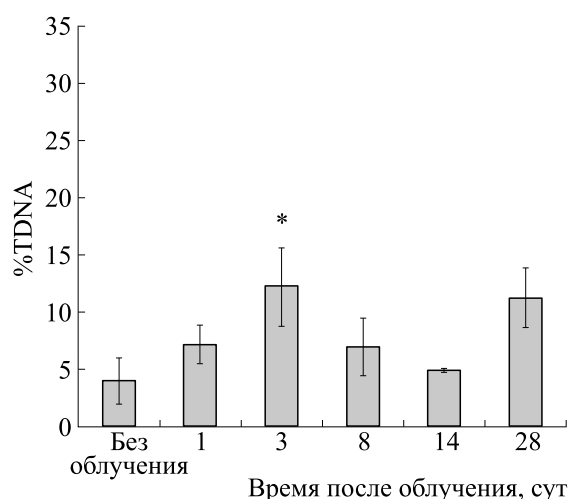


Рис. 4. Средние значения %TDNA лейкоцитов крови через 1–28 сут после воздействия на мышей рентгеновского излучения в дозе 6.5 Гр ($M \pm SD$); * – достоверные отличия от необлученных мышей ($p < 0.05$).

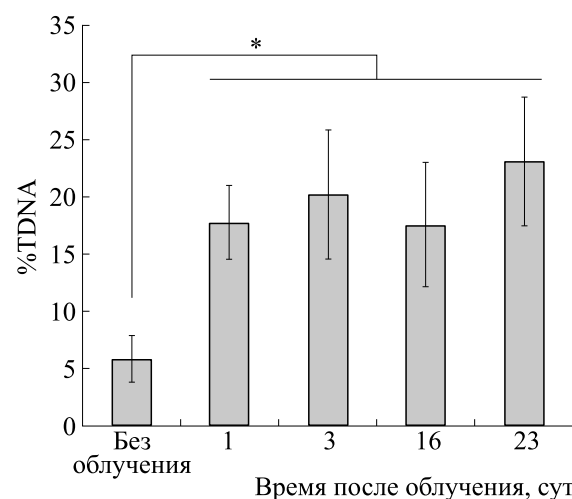


Рис. 5. Средние значения %TDNA лейкоцитов крови через 1–23 сут после облучения мышей ионами углерода в дозе 6.5 Гр ($M \pm SD$); * – достоверные отличия от необлученных мышей ($p < 0.05$).

облучении ионами углерода наблюдалась с шестых по девятые сутки в отличие от рентгеновского излучения, где животные начинали гибнуть только с двенадцатых суток, что может быть обусловлено разным характером течения лучевой болезни: развитие желудочно-кишечного синдрома после действия ионов углерода и костномозгового синдрома после рентгеновского излучения. В период развития острой лучевой болезни во всех группах наблюдалось прогрессивное снижение массы тела животных и угнетение двигательной активности. Максимальная потеря веса на 30% в группе мышей после рентгеновского излучения наблюдалась через 11–15 суток, а в группе, облученной ионами, критическое снижение веса наблюдалось уже на 5–7 сутки. Средняя продолжительность жизни погибших при облучении ионами углерода мышей составила 9 ± 3 суток, а при рентгеновском облучении – 16 ± 3 суток. Динамика гибели мышей после воздействия рентгеновских фотонов и ионов достоверно различалась ($p < 0.05$), и к 30 суткам при облучении ионами углерода выживаемость составила 21%, а для рентгеновского излучения – 40%.

В параллельных экспериментах изучали динамику изменения %TDNA лейкоцитов крови у выживших животных примерно в те же сроки после воздействия на мышей ионов углерода и рентгеновского излучения. На рис. 4 показана динамика изменений средних значений %TDNA лейкоцитов крови через 1–28 суток после воздействия на мышей рентгеновского излучения в дозе 6.5 Гр. Как видно из этого рисунка, достоверные отличия %TDNA от контрольного уровня наблюдались на 3 сут после облучения. На рис. 5 показаны средние значения %TDNA лейкоцитов в течение периода 1–23 суток после облучения иона-

ми углерода. Видно, что уже через сутки %TDNA достоверно увеличивался по сравнению с таковым до облучения и оставался высоким вплоть до 23 суток ($p < 0.05$).

Поскольку нами выявлены резкие различия в динамике уровней %TDNA лейкоцитов крови, индуцированных рентгеновским и ионным излучениями, действие которых еще более значимо проявились по критерию выживаемости мышей, было интересно проанализировать индивидуальные вариации уровней повреждений ДНК у выживших мышей. На рис. 6 показана динамика индивидуальных изменений %TDNA лейкоцитов крови через 1–28 суток после воздействия рентгеновского излучения. У всех мышей на третьи сут-

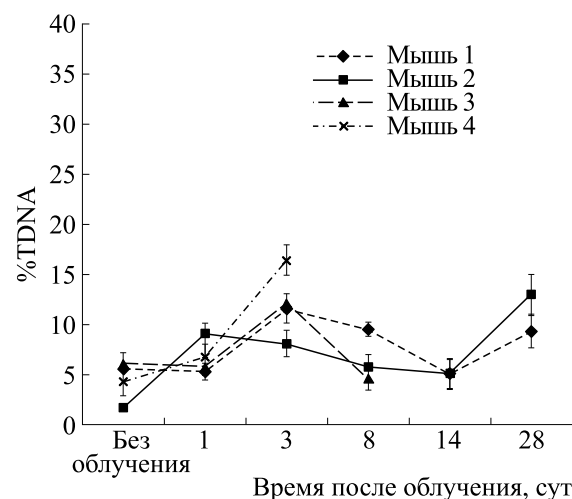


Рис. 6. Динамика изменений %TDNA у индивидуальных мышей через 1–28 сут после облучения рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр ($M \pm SEM$).

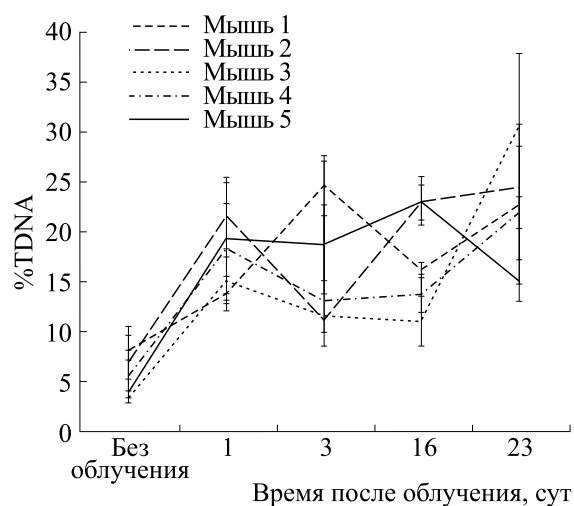


Рис. 7. Динамика изменений %TDNA у индивидуальных мышей через 1–23 сут после облучения ионами углерода в дозе 6.5 Гр ($M \pm SD$).

ки наблюдались достоверные отличия значений %TDNA от соответствующего контроля. Индивидуальная динамика изменений %TDNA у мышей, выживших к 28 суткам после облучения, была сходная. На рис. 7 показана динамика индивидуальных изменений %TDNA лейкоцитов крови на 1–23 сутки после облучения ионами углерода. Различия %TDNA на 16 сутки после облучения между мышами №№ 1 и 2, 2 и 3, 2 и 4, 3 и 5, а также на 23 сутки между мышами 2 и 4, 2 и 5, 3 и 5, 4 и 5 статистически достоверны ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования динамики изменений %TDNA у животных в отдаленные сроки (до месяца) после радиационного воздействия предварительно были проанализированы зависимости величин %TDNA лейкоцитов крови мышей от дозы рентгеновского излучения *in vitro* и *in vivo*, поскольку нужно было оценить возможности щелочной версии метода ДНК-комет для регистрации повреждений ДНК в этом типе клеток. В большинстве работ по определению молекулярных повреждений ДНК, выполненных этим методом, используются, как правило, культуры клеток, высокие дозы облучения, а при облучении животных повреждения регистрируются в короткие сроки после облучения (до 4–6 ч). Лишь в небольшом количестве работ регистрируют биологические эффекты воздействия тяжелых ионов в сильно отдаленные сроки — до одного года [11]. Кривая «доза–эффект» облученных рентгеновскими фотонами лейкоцитов *in vitro* имела линейный характер (рис. 1) и существенно отличалась от кривой, полученной при облучении мышей

in vivo (рис. 2), где уровень %TDNA практически не зависел от дозы. Это объясняется тем, что при облучении клеток в агарозных слайдах при 4°C процессы репарации ДНК практически отсутствовали, и регистрировался индуцированный облучением уровень повреждений ДНК. Через сутки после облучения мышей (рис. 2) регистрировались остаточные повреждения ДНК лейкоцитов после реализации как репарации ДНК, так и клеточного обновления. Известно, что в клетках через 20–24 ч после воздействия фотонов в основном заканчивается репарация всех типов повреждений ДНК [12]. Следует отметить, что как при облучении *in vitro*, так и *in vivo* наблюдались большие величины стандартного отклонения, что указывало на гетерогенность радиационного ответа клеток крови. Очевидно, что наблюдаемая гетерогенность ответа связана не с различным ответом субпопуляций лейкоцитов, поскольку, как было показано, лимфоциты и гранулоциты не различаются по уровню повреждений ДНК в интервале доз 0.93–5.43 Гр [13].

Влияние гетерогенности радиационного ответа у отдельных животных по критерию уровня повреждений ДНК в последующих экспериментах было проанализировано при действии облучений с разной ЛПЭ: рентгеновскими фотонами с ЛПЭ = 2 кэВ/мкм и ускоренными ионами углерода с ЛПЭ = 100 кэВ/мкм. Исходя из кривых на рис. 1 и 2, была выбрана доза 6.5 Гр, при которой изучали динамику изменений %TDNA как у индивидуумов, так и в группе, а также анализировали выживаемость мышей примерно в одни и те же сроки пострadiационного периода. Данные по 30-суточной выживаемости мышей, которая является базовой биологической характеристикой объекта и исследуемого излучения, демонстрируют значительно большее повреждающее действие ускоренных ионов углерода по сравнению с рентгеновским излучением (рис. 3) — за счет резкой гибели мышей в более ранние сроки после облучения ионами углерода, что согласуется с величиной и динамикой уровней повреждений ДНК, которые характеризуются повышением %TDNA относительно контроля при рентгеновском облучении на третьи сутки, а после воздействия ионов углерода — уже на первые сутки (рис. 4 и 5). Динамика изменений значений %TDNA на 3, 6–14 и 23–28 сутки в целом похожа при обоих видах облучения, что, по-видимому, обусловлено процессами клеточного обновления в органах и тканях, связанных с продукцией клеток крови и формированием иммунитета. Использование метода ДНК-комет для определения повреждений ДНК в клетках крови представляется важным для оценки лучевой реакции разных клеток в отдаленные сроки.

ленные сроки. Лейкоциты мышей представлены в основном лимфоцитами (считающимися наиболее радиочувствительными среди клеток крови), и более высокие (по сравнению с рентгеновским излучением) уровни повреждений ДНК лейкоцитов при воздействии ионов углерода, по-видимому, отражают в какой-то степени реакцию других активно делящихся и поэтому высокочувствительных клеток организма — кишечника и костного мозга, что может свидетельствовать о разнице в стадиях развивающейся после воздействия фотонов и ионов лучевой болезни — желудочно-кишечной или костномозговой.

Очевидно, что повышенный уровень %TDNA у ^{12}C -облученных мышей связан с особенностями воздействия ионов углерода, которые индуцируют многочисленные, сложные по структуре, расположенные близко друг к другу повреждения ДНК, трудно реparableемые или не реparableемые [5, 14]. Возможно, что репарация таких специфических повреждений ДНК не может в достаточной мере реализоваться в наблюдаемые после облучения углеродом сроки, что согласуется с данными литературы о механизмах и путях репарации повреждений при действии ионизирующих излучений с высокими значениями ЛПЭ [14].

Сохраняющийся высокий уровень повреждений ДНК через 23 суток после облучения ионами углерода может быть обусловлен не только сохранением нерепарированных и результатом ошибочной репарации сложных кластерных повреждений ДНК, но и атаками активных форм кислорода и азота (АФК/А), внутриклеточная генерация которых продолжается и в пострadiационном периоде. Например, в гамма-облученных фибробластах человека обнаружили дозозависимую продукцию АФК, уровень которых возрастал с третьих по седьмые сутки после облучения, как в цитоплазме клеток, так и в митохондриях [5]. Ранняя и поздняя генерация радиационно-индуцированных митохондриальных АФК/А опосредуют изменения числа копий митохондриальной ДНК, мутации и экспрессию генов, аутофагию и апоптоз, повреждение ядерной ДНК и нестабильность генома. Примечательно, что сохранение радиационных эффектов, приводящих к митохондриальной дисфункции в клетках-потомках, имеет серьезные последствия для жизнедеятельности клеток и организма [15]. Если при воздействии фотонами в основном генерируются высокорeакционные радикалы, то при облучении тяжелыми частицами увеличивается выход генотоксичных молекулярных продуктов, таких

как H_2O_2 . Электростатически нейтральные молекулы H_2O_2 легко проникают сквозь мембраны и повреждают клеточные органеллы [5]. Митохондрии, которые потребляют около 90% кислорода в организме и генерируют большую часть АФК, являются также одной из вероятных клеточных мишеней при облучении тяжелыми ионами, поскольку расположены близко к ядру и занимают существенную долю объема клетки. Индуцированная ионами углерода генерация АФК может быть также обусловлена дисфункцией митохондрий, которая существенно зависит от характеристик генотоксического воздействия [16–18].

Следует отметить, что при анализе средних значений %TDNA в группе облученных мышей также регистрировались большие стандартные отклонения, что, по-видимому, связано с различиями в уровнях повреждений ДНК лейкоцитов у индивидуумов. Можно было предположить, что радиочувствительность мышей зависит от спонтанного уровня %TDNA у индивидуумов. Спонтанный уровень повреждений ДНК в клетках необлученных животных отражает физиологические процессы возникновения и репарации повреждений, поскольку ДНК постоянно подвергается окислению и спонтанной тепловой и гидролитической деградации в условиях нормального метаболизма организма [19]. Однако в наших экспериментах спонтанные уровни повреждений ДНК в лейкоцитах крови мышей не отличались существенной вариабельностью и были низкими — менее 10%. Динамика индивидуальных изменений %TDNA у мышей, выживших к 28 суткам после рентгеновского облучения, была сходная (рис. 6). В отличие от этого, при облучении ионами углерода наблюдались различия минимальных и максимальных значений %TDNA в одни и те же сроки у разных индивидуумов и достоверные отличия %TDNA на 16 и 23 сутки между отдельными индивидуумами (рис. 7). Эти отличия между индивидуумами могут быть связаны с различиями в репарации сложных повреждений ДНК и отличиями метаболизма ДНК, ассоциированными с особенностями генома и эпигенетической регуляцией: аутбредные мыши SHK, как известно, отличаются большей генетической гетерогенностью [20]. Поскольку ускоренные ионы углерода имеют высокую относительную биологическую эффективность и низкий коэффициент кислородного усиления по сравнению с рентгеновскими лучами, то необходимо дальнейшее изучение биологических эффектов ^{12}C -облучения, связанных с участием АФК в отдаленные сроки после облучения в условиях *in vivo* [21].

Таким образом, выявлена вариация уровней повреждений ДНК лейкоцитов крови как в группах животных, так и у индивидуальных мышей в отдаленные сроки после облучения ионами углерода; при сравнении динамики изменений %TDNA при облучении ионами углерода с таковой при воздействии рентгеновского излучения у индивидуальных животных обнаружено, что и диапазон значений %TDNA, и их вариабельность наиболее явно выражены при облучении ионами углерода, что свидетельствует о большей нестабильности генома после воздействия ионов. Значение уровня повреждений ДНК в клетках крови лабораторных животных в формировании отдаленных последствий на организменном уровне требует дальнейшего исследования для разработки новых и совершенствования традиционных тест-систем с использованием моделей животных в свете развития как персонализированной биомедицины, так и применения их для доклинического исследования источников ядерной медицины.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность сотруднику лаборатории ионного лучевого комплекса НИЦ «Курчатовский институт» В.А. Пикалову за помощь в организации и проведении экспериментов на оборудовании радиобиологического стенда на углеродном пучке У-70 и сотруднику лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН С.И. Заичкиной за инициирование данного исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00381-21-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с соответствующими национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных. План экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биобезопасности и биоэтике (протокол № 4/2018).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O. Mohamad, B. J. Sishc, J. Saha, et al., *Cancers*, **9**, 66 (2017). DOI: 10.3390/cancers9060066
2. M. Moreno-Villanueva, M. Wong, T. Lu, et al., *npj Microgravity*, **3**, 14 (2017). DOI: 10.1038/s41526-017-0019-7
3. I. Vavitsas and K. Kalachani, *AIP Conf. Proc.*, **2075**, 200018 (2019). DOI: 10.1063/1.5099028
4. S. Muralidharan, S. P. Sasi, M. A. Zuriaga, et al., *Front. Oncol.*, **5**, 231 (2015). DOI: 10.3389/fonc.2015.00231
5. E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin, and D. Pain, *Cancer Lett.*, **327**, 48 (2012). DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.012
6. A. R. Collins, A. A. Osoez, G. Brunborg, et al., *Mutagenesis*, **23** (3), 143 (2008).
7. E. A. Kuznetsova, N. P. Sirota, I. Y. Mitroshina, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **96** (10), 1245 (2020). DOI: 10.1080/09553002.2020.1807640
8. E. A. Kuznetsova, A. R. Dyukina, I. A. Chernigina, et al., *Bull. Eksperim. Biologii i Meditsiny*, **155** (6), 757 (2013). DOI: 10.1007/s10517-013-2245-7
9. N. K. Chemeris, A. B. Gapeyev, N. P. Sirota, et al., *Mutat. Res.*, **558**, 27 (2004).
10. D. P. Lovell and T. Omori, *Mutagenesis*, **23** (3), 171 (2008).
11. K. Datta, S. Suman, B. V. Kallakury, et al., *PLoS One*, **7** (8), e42224 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0042224
12. А. И. Газиев, *Радиационная биология. Радиоэкология*, **39** (6), 630 (1999).
13. M. H. Lankinen, L. M. Vilpo, and J. A. Vilpo, *Mutat. Res.*, **352** (1–2), 31 (1996).
14. J. M. Danforth, L. Provencher, and A. A. Goodarzi, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 910440 (2022). DOI: 10.3389/fcell.2022.910440
15. S. Kobashigawa, K. Suzuki, and S. Yamashita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414**, 795 (2011).
16. K. I. Matsumoto and M. Ueno, Y. Shoji et al., *Free Radic. Res.*, **55** (4), 450 (2021). DOI: 10.1080/10715762.2021.1899171
17. D. Averbek and C. Rodriguez-Lafrasse, *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (20), 11047 (2021). DOI: 10.3390/ijms222011047.
18. R. B. Richardson and M. E. Harper, *Oncotarget*, **7** (16), 21469 (2016). DOI: 10.18632/oncotarget.7412
19. N. Chatterjee and G. C. Walker, *Environ. Mol. Mutagen.*, **58** (5), 235 (2017). DOI:10.1002/em.22087
20. <http://www.andreevka.msk.ru/product.htm>
21. W. Tinganelli and M. Durante, *Cancers (Basel)*, **12** (10), 3022 (2020). DOI: 10.3390/cancers12103022

Comparison of the Dynamics of DNA Damage in Blood Leukocytes and Survival of Mice after Total Body Irradiation with Bragg Peak Carbon Ions or X-Rays

E.A. Kuznetsova*, O.M. Rozanova*, E.N. Smirnova*, S.I. Glukhov*, T.V. Sirota*,
T.A. Belyakova** and N.P. Sirota *

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

***Physical-Technical Center of Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences,
Akademicheskii proezd 2/110, Protvino, Moscow Region, 142281 Russia*

This study has determined a survival rate of mice irradiated with accelerated carbon ions (450 MeV/nucleon) in the Bragg peak or X-ray at a dose of 6.5 Gy, using the comet assay. Levels of DNA damage (%TDNA) in blood leukocytes from mice were measured 1 day before, 1–23 days after exposure to carbon ions and 1–28 days after exposure to X-ray radiation at the same dose. According to survival and % TDNA parameters, it was found that a damaging effect of carbon ions is greater than that of X-rays and substantial variations in % TDNA, which occur in individual animals, could appear to cause individual differences in the development of genome instability in the long term. It is assumed that a higher % TDNA in leukocytes after carbon ion exposure compared to that of X-rays, a wide range of variations and asynchronous changes in individuals in the post-irradiation period are associated with the induction of clustered DNA damages and mitochondrial dysfunction, and are also due to genetic and epigenetic factors. The results obtained point to the need to assess the state of blood leukocytes in animals with a heterogeneous genetic background using the comet assay before irradiation in order to form a group with similar %TDNA values. The revealed differences in individual laboratory animals require further study in order to improve animal models in the light of the development of personalized biomedicine.

Keywords: comet assay, X-ray irradiation, accelerated carbon ions, DNA damage in leukocytes, individual animals

ДИНАМИКА ТЕМПЕРАТУРЫ И МАССЫ ТЕЛА У ОБЛУЧЕННЫХ МЫШЕЙ: ЗАВИСИМОСТИ «ДОЗА–ЭФФЕКТ» И «ВРЕМЯ–ЭФФЕКТ»

© 2022 г. Ю.А. Зрилова*, **, #, О.В. Никитенко*, ***, Т.М. Бычкова*, ***, И.М. Парфенова*, Т.А. Караулова*, А.А. Иванов*, ***

*ГНЦ РФ – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, ул. Живописная, 46, Москва, 123098, Россия

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

***ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Хорошевское шоссе, 76а, Москва, 123007, Россия
#E-mail: uzrilova@gmail.com

Поступила в редакцию 07.09.2022 г.

После доработки 13.09.2022 г.

Принята к публикации 14.09.2022 г.

В эксперименте на аутбредных мышах-самцах ICR CD-1, облученных в широком диапазоне доз γ -облучения ^{60}Co от 7.4 до 9.4 Гр, при 30-суточной выживаемости от 100 до 5% исследованы зависимости «доза–эффект» и «время–эффект» показателей температуры и массы тела животных при острой лучевой болезни. В ходе развития острой лучевой болезни уже в латентный период происходит снижение температуры тела, определяемой с помощью дистанционного инфракрасного термометра, на фоне снижения массы тела. Максимальное дозозависимое снижение температуры тела отмечено в разгар лучевой болезни, в период выраженной гибели животных. В восстановительный период отмечена нормализация температуры тела на фоне восстановления массы тела. Показатель температуры тела облученных мышей рассматривается в качестве важного критерия их астенизации и может быть использован как в теоретических, так и в прикладных исследованиях.

Ключевые слова: лучевая болезнь, мыши, инфракрасная термометрия, энергетический потенциал, доза–эффект, время–эффект.

DOI: 10.31857/S0006302922060131, EDN: OAWSHK

В ходе экспериментов на облученных мышах мы обнаружили принципиальное различие в изменении их температуры тела по сравнению с собаками и человеком в ходе острой лучевой болезни [1, 2]. В острый период лучевой болезни у человека и собак отмечено повышение температуры тела, тогда как у мышей обнаружено ее понижение [3]. Динамическое дистанционное измерение температуры тела мышей стало возможным после широкого распространения в медицинской практике ручных инфракрасных термометров и появления отдельных сообщений [4] о применении этих приборов в экспериментальной работе. Как известно [5, 6], важным признаком развития острой лучевой болезни является астенизация, выражающаяся, в частности, в снижении массы тела. В то же время снижение массы тела у мышей приводит к истощению их энергетического потенциала [7], что, в свою очередь, обуславливает невозможность поддержания температуры тела на нормальном уровне.

Целью нашей работы стало сравнение динамики снижения температуры и массы тела у мышей, облученных в широком диапазоне доз радиации. Достижение поставленной цели позволит получить сведения о главных радиобиологических зависимостях: «доза–эффект» и «время–эффект». Полученные при этом данные должны расширить наши представления о роли энергетического потенциала организма животных в патогенезе острого лучевого поражения. Решение этой задачи позволит дать экспериментаторам простой инструмент для объективной оценки уровня астенизации животных в ходе лучевой болезни, а также использовать этот тест для дополнительной характеристики эффективности противолучевых средств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на аутбредных мышах-самцах ICR CD-1 ($n = 260$) SPF-категории с исход-

Таблица. Выживаемость мышей ICR CD-1, облученных γ -квантами ^{60}Co и средняя продолжительность жизни павших животных

Группа	Доза облучения, Гр	Число мышей	Выживаемость за 30 суток, %	Средняя продолжительность жизни павших мышей ($M \pm m$), сут
1	7.4	40	100	—
2	7.8	40	98	20 ± 0
3	8.2	40	72	15 ± 4
4	8.6	40	68	15 ± 5
5	9.0	40	18	14 ± 2
6	9.4	40	5	13 ± 2
7	Ложнооблученные	20	100	—

ной массой тела 36–37 г, полученных из Питомника экспериментальных животных РАН (Пушино, Московская обл.).

Мышей содержали на стандартном кормовом рационе *ad libitum* и водопроводной воде в конвенциональных условиях по десять особей в клетке при температуре 20–23°C. Группы облученных ($n = 40$) и ложнооблученных ($n = 20$) животных формировали из равнозначных по массе мышей.

Учет гибели животных проводили ежедневно в течение 30 суток.

Тотальное облучение мышей γ -квантами ^{60}Co проводили в специально изготовленной клетке из радиационно-проницаемого материала, по одному животному в ячейке, по десять мышей в клетке, в боковом положении по отношению к направлению излучения источника, в дозах: 7.4, 7.8, 8.2, 8.6, 9.0 и 9.4 Гр, одновременно в течение 406 с, при переменной мощности дозы в зависимости от удаленности клетки с мышами от источника излучения. Контрольных (ложнооблученных) животных помещали в установку без включения источника.

Для определения температуры тела мышей использовали бесконтактный инфракрасный термометр марки GP-300 (Harbin Xiande Technology Development, Китай), диапазон измерений 32.0–42.9°C, точность измерений $\pm 0.2^\circ\text{C}$, а также более совершенный термометр модели WF-1000 (B. Well Swiss AG, Швейцария), диапазон измерений 10–50°C, точность измерений $\pm 0.2^\circ\text{C}$. Температуру тела у мышей измеряли в области живота ежедневно. Массу тела измеряли на электронных весах SF-400 с ценой деления 1 г.

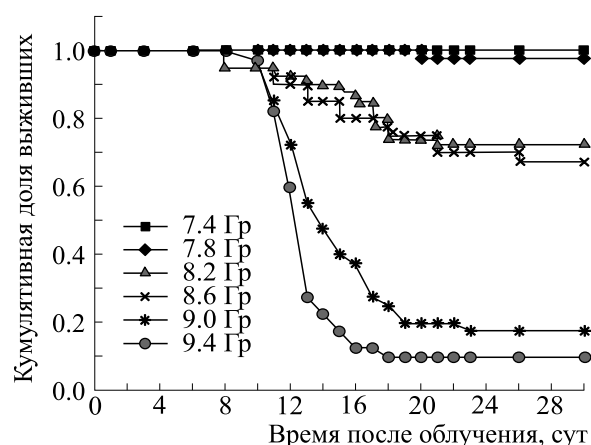
Статистический анализ с определением средней арифметической (M), скользящей средней (SMA) и средней ошибки (m), а также оценка результатов функциональных зависимостей и коэффициента корреляции (R^2) проведены с помо-

щью вычисления средневзвешенного значения показателей в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о 30-суточной выживаемости облученных мышей и средней продолжительности жизни павших животных показаны в табл. 1, а данные о динамике выживаемости — на рис. 1.

Как видно, по данным в табл. 1 и на рис. 1 видна отчетливая дозовая зависимость по 30-суточной выживаемости облученных мышей и средней продолжительности жизни павших животных. При сопоставлении динамики выживаемости в различных дозовых группах, снижении выживаемости, а также снижении продолжительности жизни павших после облучения животных отчетливо проявляется S-образный характер дозовой зависимости радиобиологических эффектов, подтверждаемый прямолинейной зависимостью

**Рис. 1.** Динамика выживаемости мышей, облученных γ -квантами ^{60}Co в разных дозах.

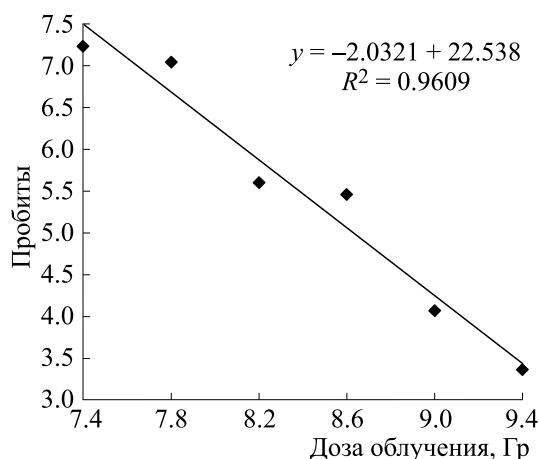


Рис. 2. Зависимость «доза–эффект» выживаемости облученных мышей ICR CD-1 (пробиты).

«доза облучения – выживаемость», выраженной в пробитах (рис. 2). Таким образом, выбранный нами диапазон доз облучения и шаговый интервал по дозе облучения 0.4 Гр убедительно описывает зависимость «доза–эффект» по классическим радиобиологическим показателям.

На рис. 3а показана динамика температуры тела мышей в ходе 30-суточного наблюдения. Наибольшее снижение температуры тела мышей отмечается в группах мышей со средней и высокой летальностью (от 8.6 до 9.4 Гр). У мышей, облученных в минимально летальных дозах и нелетальной дозе (от 7.4 до 8.2 Гр), также отмечено снижение температуры тела, однако оно было ме-

нее выражено. В восстановительный период температура тела практически нормализовалась, за исключением группы 9.4 Гр, в которой выжило одно животное.

Динамика температуры тела в ходе острой лучевой болезни (рис. 3а) хорошо согласуется с динамикой массы тела у этих животных (рис. 3б). Однако следует отметить, что в восстановительный период наблюдается значительное колебание средней массы тела, проявляющееся в нелогичном временном повышении показателя, что связано с гибелью наиболее слабых животных.

Представление о зависимости «доза–эффект» на десятые и семнадцатые сутки после облучения, т.е. в период разгара острой лучевой болезни, по показателям температуры тела и массы тела дает рис. 4. Как видно на рис. 4а, на десятые сутки после облучения в период, предшествующий массовой гибели животных (рис. 1), отмечается прямая зависимость снижения температуры тела от дозы облучения. Небольшое отклонение от этой закономерности отмечено при дозе 8.6 Гр. По нашему мнению, повышенная температура тела у этих животных может быть связана с развитием оппортунистической инфекции [8] при достаточно высокой сохранности массы тела у этих животных (рис. 4б), т.е. энергетического потенциала.

На семнадцатые сутки после облучения, завершающие период массовой гибели облученных мышей, отмечено временное повышение температуры тела в группе мышей, облученных в дозе 7.8 Гр (рис. 4а), что также может быть обусловлено развитием оппортунистической инфекции на

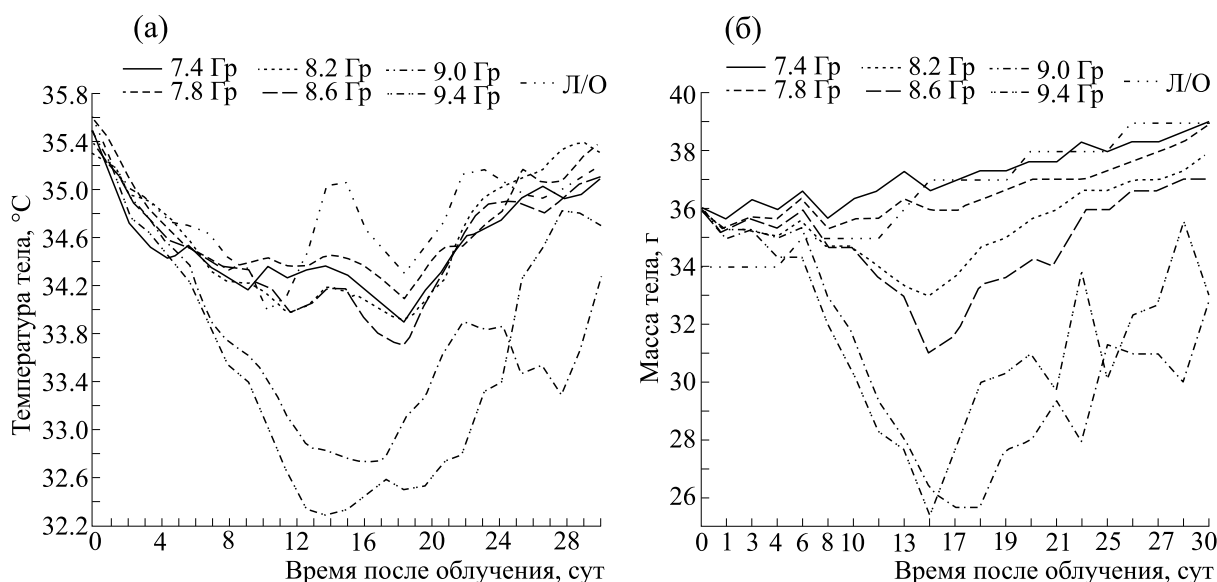


Рис. 3. Динамика температуры тела (а) и массы тела (б) мышей ICR CD-1, облученных γ-квантами ^{60}Co в дозах: 7.4, 7.8, 8.2, 8.6, 9.0 и 9.4 Гр (скользящая средняя SMA).

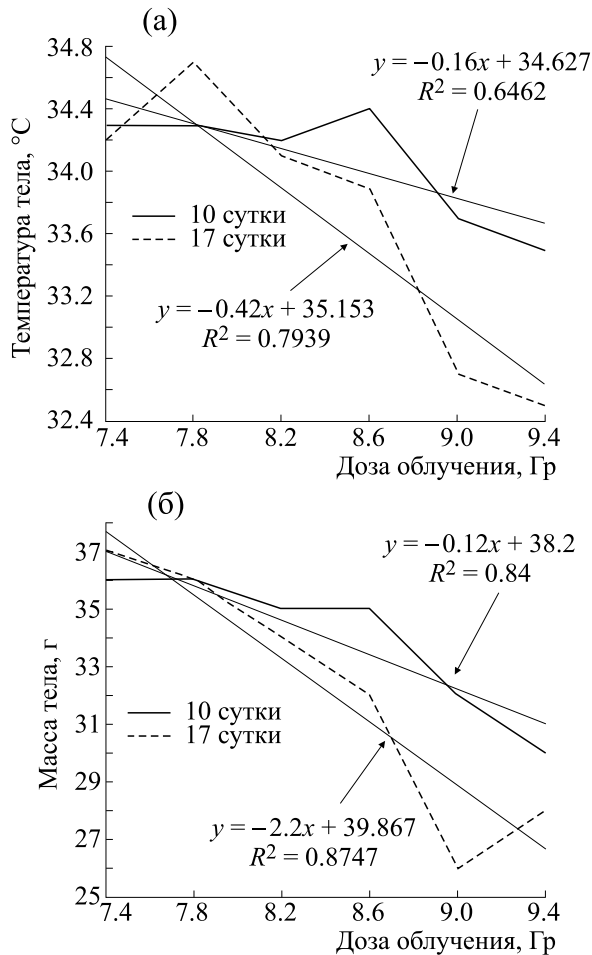


Рис. 4. Зависимости «доза–эффект» снижения температуры тела (а) и массы тела (б) мышей ICR CD-1 в разгар острой лучевой болезни на десятые и семнадцатые сутки после облучения γ -квантами ^{60}Co . Температура тела ложнооблученных мышей составляла на десятые сутки 34.4°C , на семнадцатые сутки – 34.7°C .

фоне достаточного сохранения энергетического потенциала (рис. 4б).

Начиная с дозы 8.2 Гр и до 9.4 Гр отмечено дозозависимое снижение температуры тела до минимальных значений при максимальной дозе облучения. В этот срок отмечена удовлетворительная корреляция между показателями температуры и массы тела (рис. 3а,б). Судя по величине коэффициента корреляции R^2 , падение массы тела, т.е. снижение энергетического потенциала, опережает снижение температуры тела.

Выявленное в наших экспериментах снижение температуры тела мышей в разгар острой лучевой болезни мы склонны объяснить очевидным, судя по катастрофическому снижению массы тела, снижением энергетического потенциала.

Расходы энергетического потенциала на поддержание температуры тела пропорциональны поверхности тела и величине основного обмена. По литературным данным [5] мыши и крысы относятся к видам с высоким уровнем основного обмена – более 100 кал/кг сутки, тогда как человек и собаки имеют основной обмен порядка 30–40 кал/кг сутки. Таким образом, вполне вероятно, что выявленная у мышей температурная реакция будет характерна и для крыс, но не характерна для овец, ослов и обезьян, имеющих низкий основной обмен. Высказанное предположение может стать предметом дополнительного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя вышеизложенное, следует заключить, что в диапазоне доз облучения, вызывающих костномозговую форму острой лучевой болезни у мышей, отмечены следующие закономерности.

В период разгара острой лучевой болезни происходит резкое дозозависимое снижение температуры тела мышей.

Максимальное снижение температуры тела облученных мышей совпадает по времени с максимальным снижением их массы тела, что указывает на зависимость температуры тела грызунов от энергетического потенциала.

Показатель температуры тела облученных мышей является важным критерием их уровня астеннизации, что может быть использовано для оценки динамики развития лучевой болезни при различных видах облучения, а также эффективности противолучевых средств.

Исходя из полученных данных представляется целесообразным в качестве лечебных средств при острой лучевой болезни применение препаратов, восполняющих энергетический потенциал организма, в частности, аденозинтрифосфат.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты выполнены в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Г. Д. Селидовкин и А. В. Барабанова, *Радиационная медицина. Том II. Радиационные поражения человека* (ИздАТ, М., 2001).

2. П. Д. Горизонтов, В. А. Разоренова, М. Ф. Сбитнева и др., Радиационная биология. Радиоэкология, **57** (5), 529 (2017).
3. Ю. А. Зрилова, Т. М. Бычкова, Т. А. Караулова и др., Бюлл. эксперим. биологии и медицины, **173** (5), 643 (2022).
4. Y. Kawakami, R. Sielski, and T. Kawakami, J. Visual. Exp., (139), e58391 (2018).
5. Н. Г. Даренская, Радиационная медицина. Том I. Теоретические основы радиационной медицины (Изд-дАТ, М., 2004).
6. K. Tanigawa, J. Radiat. Res., **62** (1), i15-i20 (2021).
7. J. Terrien, M. Perret, and F. Aujard, Front. Biosci. (Landmark Ed.), **16** (4), 1428 (2011).
8. В. Н. Мальцев, Количественные закономерности радиационной иммунологии (Энергоиздат, М., 1983).

Dynamics of Temperature and Body Weight in Irradiated Mice: the Dose–Effect and Time–Effect Relationships

Yu.A. Zrilova*, **, O.V. Nikitenko*, *, T.M. Bychkova*, ***, I.M. Parfenova*,
T.A. Karaulova*, and A.A. Ivanov*, ****

**A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency,
Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123098 Russia*

****N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

****Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76a, Moscow, 123007 Russia*

In an experiment on outbred male ICR CD-1 mice irradiated at a wide range of doses of gamma irradiation ^{60}Co from 7.4 to 9.4 Gy with a 30-day survival rate from 100 to 5%, the dose-effect and time-effect relationships in relation to animals' temperature and body mass index during acute radiation sickness were studied. The latent phase of acute radiation sickness is already related to a decrease in body temperature, which is determined using a remote infrared thermometer, in presence of body weight loss. A maximum dose-dependent fall in body temperature was observed in the critical phase of acute radiation sickness, when animals die in large numbers. In the recovery phase, body temperature returned to normal with subsequent body weight gain. Body temperature of irradiated mice is considered as an important criterion for their asthenia and can be used both in theoretical and applied studies.

Keywords: radiation sickness, mice, infrared thermometry, energy potential, dose–effect, time–effect

УДК 612.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА ЛЕГКИХ ВСЛЕДСТВИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОИНТЕНСИВНЫХ АКУСТИЧЕСКИХ КОЛЕБАНИЙ НА РЕЗОНАНСНОЙ ЧАСТОТЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. С.П. Драган*, В.И. Кезик*, А.В. Богомолов*, С.В. Дроздов*

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

*E-mail: s.p.dragan@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.10.2022 г.

После доработки 04.10.2022 г.

Принята к публикации 25.10.2022 г.

Экспериментально определена зависимость увеличения объема легких лабораторных животных от уровня высокоинтенсивного низкочастотного звука на резонансной частоте их дыхательной системы. Эксперименты проведены на 16 кроликах. Измерение резонансной частоты дыхательной системы осуществляли в диапазоне частот от 5 до 100 Гц с шагом 3 Гц с применением модифицированной двухмикрофонной техники. Определив резонансную частоту, в легкие подавали тональный сигнал на этой частоте с регулируемой амплитудой звука от 120 до 138 дБ. Результаты измерений свидетельствуют, что резонансные частоты дыхательной системы кроликов снизились в среднем на 13%, что соответствует увеличению объема легких на 33% за счет открытия резервных альвеол. Зарегистрированное явление повышения объема легких при воздействии стимулирующего высокоинтенсивного звукового сигнала на резонансной частоте может быть использовано для повышения эффективности биоакустической стимуляции легких человека в интересах увеличения объема дыхательной системы.

Ключевые слова: объем легких, импеданс дыхательной системы, двухмикрофонный метод, резонансные частоты дыхательной системы, биоакустическая стимуляция дыхательной системы.

DOI: 10.31857/S0006302923010143, EDN: OAXIKR

Развитие спорта высоких достижений требует совершенствования методов повышения функциональных резервов организма. При этом важную роль для обеспечения физической работоспособности имеет функция дыхания [1]. Повышение функциональных резервов дыхательной системы осуществляется путем улучшения легочной вентиляции и газообмена в легких [2–4]. В восстановительной медицине аналогичные задачи решаются при проведении реабилитационных мероприятий, направленных на устранение нарушений легочной вентиляции и газообмена в легких пациентов [1, 5].

Повышение функциональных резервов организма с помощью немедикаментозных методов и средств, основанных на физических явлениях, является приоритетным направлением развития профилактической медицины.

В настоящее время в спортивной и восстановительной медицине активно используется технология биоакустической стимуляции дыхатель-

ной системы. Технология основана на взаимодействии высокоинтенсивной низкочастотной звуковой волны с дыхательной системой человека на резонансной частоте этой системы [6, 7]. За счет резонансных явлений высокоинтенсивный звук через воздухоносные пути проходит к альвеолам с минимальными потерями энергии [8, 9]. Звуковое давление высокой интенсивности вызывает раскрытие резервных альвеол, а физический массаж приводит к уменьшению тонуса гладких мышц дыхательных бронхиол и, как следствие, к увеличению их поперечного сечения. Раскрытие резервных альвеол и увеличение поперечного сечения дыхательных бронхиол увеличивает жизненную емкость легких и улучшает газообмен [10, 11]. Это, соответственно, приводит к повышению функциональных резервов дыхательной системы человека [8, 12]. В настоящее время аппаратно-программный комплекс биоакустической стимуляции дыхательной системы прошел технические, токсикологические и клинические испытания в целях государственной регистрации как медицинское изделие.

Сокращение: УЗД – уровень звукового давления.

В результате пятидневного курса биоакустической стимуляции дыхательной системы (ежедневный сеанс включал три стимуляции длительностью по три минуты, с перерывами между ними в одну минуту) у 98.3% спортсменов зарегистрировано увеличение жизненной емкости легких на 5–15%. В процессе стимуляции в дыхательную систему подавался высокоинтенсивный низкочастотный сигнал с уровнем звукового давления (УЗД) до 130 дБ и частотой, изменяющейся от 22 до 36 Гц. Фазы вдоха-выдоха синхронизировали с изменением частоты: при увеличении частоты спортсмен делал выдох, а при снижении частоты – вдох. Для синхронизации ритма дыхания со сканированием частоты была использована световая индикация – ритм дыхания подбирался индивидуально для каждого спортсмена и, как правило, составлял две-три секунды. Диапазон частот (от 22 до 36 Гц) был определен по результатам измерений резонансных частот дыхательной системы более чем у ста спортсменов [1].

Однако вопрос о влиянии уровня звукового давления на эффективность биоакустической стимуляции остается неисследованным. В этой связи проведен цикл экспериментальных исследований по определению зависимости увеличения объема легких лабораторных животных от уровня высокоинтенсивного низкочастотного звука на резонансной частоте дыхательной системы. Для определения искомой зависимости необходимо точно определять резонансные частоты дыхательной системы. Одним из современных методов, который используется в клинической практике наблюдения за динамикой восстановительных процессов в дыхательной системе человека, является метод форсированных осцилляций или более поздняя его модификация – импульсная осциллометрия [13, 14]. В базовом варианте импульсной осциллометрии осуществляется измерение импедансных характеристик и определение резонансных частот дыхательной системы в диапазоне от 5 до 35 Гц. Существуют методики, охватывающие более высокие частоты – до 300 и даже до 800 Гц [15–17]. В работе [18] авторы используют стандартный двухмикрофонный метод измерения импедансных характеристик дыхательного тракта. Однако применение этого метода для исследования резонансных частот дыхательного тракта весьма проблематично. Вызвано это тем обстоятельством, что в стандартном двухмикрофонном методе нижняя граница частотного диапазона находится выше 50 Гц, а основной резонанс дыхательного тракта существенно ниже и составляет менее 35 Гц. В этой связи и был применен модифицированный метод двух микрофонов, позволяющий осуществлять измерения в заданном частотном диапазоне [19].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерение резонансных частот дыхательного тракта осуществляли на декапитированных кроликах при подсоединении трахеи к измерительному комплексу. Подготовку животного к измерениям проводили следующим образом. Сначала производилась неполная декапитация, при которой шейный отдел позвоночника с находящимся в нем спинным мозгом и магистральными сосудами пересекался на уровне третьего-четвертого позвонка с сохранением целостности трахеи. Животное умерщвляли. После этого обнажали трахею, и на нее, выше щитовидного хряща, накладывали зажим, чтобы предотвратить заброс крови в легкие. Далее голову полностью отделяли от туловища, трахею отделяли от пищевода, а щитовидный хрящ вместе с зажимом отсекали. Декапитированное животное укладывали на горизонтальную поверхность рядом с установкой так, чтобы соединить трахею без перекосов и натяжений с трубкой измерительной установки. После соединения трахеи с трубкой и обеспечения герметичности этого соединения запускали измерительный комплекс.

Всего использовано 16 кроликов породы «Советская шиншилла» массой 2.5–3.0 кг.

Измерения резонансных частот легких кроликов проведены модифицированным двухмикрофонным методом и осуществлены на специально созданном стенде. Легкие кролика, обладающие свойствами акустического резонатора, присоединяли трахеей к волноводу, представляющему собой трубу постоянного сечения [10]. На одной стороне волновода был установлен громкоговоритель, формирующий полигармонический сигнал, состоящий из тональных частот в заданном диапазоне с шагом 3 Гц [6]. С другой стороны волновод заканчивался торцевой стенкой, перпендикулярной оси волновода. В центре стенки имелось круглое отверстие со вставленной в него трубкой, на которую герметично надевали трахею животного.

Импедансные характеристики рассчитываются на основе результатов измерений звукового давления в двух сечениях волновода P_1 и P_2 и разности фаз φ_{12} между сигналами давления в этих точках. По этим данным для каждой частоты рассчитываются значения модуля и аргумента комплексного коэффициента отражения ($\bar{r} = r e^{i\theta}$) по следующим формулам [7, 9, 19]:

$$r = \frac{\sqrt{(N^2 - 1)^2 + 4N^2(\cos^2 kL + \cos^2 \varphi_{12}) - 4N(N^2 + 1)\cos \varphi_{12} \cdot \cos kL}}{N^2 + 1 - 2N \cos(kL + \varphi_{12})},$$

$$\theta = 2kl_2 + \arctg \left[\frac{2N \sin kL (N \cos kL - \cos \varphi_{12})}{N^2 - 1 - 2N \cos kL (N \cos kL - \cos \varphi_{12})} \right],$$

где r – модуль комплексного коэффициента отражения $\bar{r}$, θ – аргумент комплексного коэффициента отражения, k – волновое число, φ_{12} – разность фаз сигналов регистрируемых с двух микрофонов, L – расстояние между микрофонами, $N = P_1/P_2$ – отношение амплитуд давления, измеренных в двух точках волновода, l_2 – расстояние от первого микрофона до торцевой стенки волновода.

Коэффициент поглощения α вычисляли по формуле:

$$\alpha = 1 - r^2.$$

По величинам модуля коэффициента отражения (r) и его аргумента (θ) рассчитывали компоненты безразмерного удельного акустического импеданса легких кролика $Zl = Rl + iYl$ для каждой частоты по формулам [8, 19, 20]:

$$Rl = \frac{1 - r^2}{1 + r^2 - 2r \cdot \cos \theta},$$

$$Yl = \frac{2r \sin \theta}{1 + r^2 - 2r \cdot \cos \theta}.$$

Измерение компонентов импеданса на каждой тональной частоте проводили одновременно, что существенно уменьшает продолжительность процедуры исследования [7, 9].

Экспериментально определяют частотные зависимости коэффициента поглощения (α) и компоненты безразмерного удельного акустического импеданса (Rl и Yl) дыхательной системы. На резонансной частоте f_{00} коэффициент поглощения α дыхательной системы достигает максимального значения, а реактивная компонента импеданса (Yl) изменяется от отрицательных значений к положительным (график пересекает ось абсцисс). Эти свойства позволяют с высокой точностью определять резонансную частоту дыхательной системы в заданном диапазоне частот [7, 9]. Резонансная частота дыхательной системы характеризует емкость легких [8, 21, 22]. Уменьшение регистрируемой резонансной частоты свидетельствует об увеличении емкости легких, что характеризует эффективность биоакустической стимуляции [10, 23].

Первоначально измерения резонансной частоты легких кроликов проведены в частотном диапазоне от 5 до 100 Гц с шагом 3 Гц при суммарном уровне звукового давления тестового по-

лигармонического сигнала не выше 120 дБ. По результатам каждого измерения определены резонансные частоты f_{00} и компоненты безразмерного удельного акустического импеданса. Поскольку импедансометрия дыхательной системы животных проводится на частотах выбранного диапазона с заданным шагом, возникает необходимость в определении контролируемых параметров на частотах, находящихся между ближайшими частотами тестового полигармонического сигнала. Для этого используется вычислительный метод кубической сплайн-интерполяции [24]. Определение первоначальных значений резонансных частот дыхательной системы на полигармоническом тестовом сигнале производится методом сплайн-интерполяции. В результате измерений и расчетов получены значения резонансных частот f_{00} , при которых $Yl = 0$, а коэффициент поглощения принимает максимальное значение ($\alpha_{\max}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе определяли резонансную частоту легких каждого кролика (f_{00}). УЗД полигармонического сигнала составлял менее 100 дБ на каждой гармонике. На рис. 1 в качестве примера приведены типичные графики $Yl(f)$, $Rl(f)$ и $\alpha(f)$ для одного из кроликов (№ 8 в табл. 1). Графики представлены вблизи резонансной частоты. Параметры дыхательной системы, вычисленные с помощью сплайн-интерполяции для этого кролика, имели следующие значения: $f_{00} = 28.1$ Гц, $D(f_{00}) = 0.26$ Гц⁻¹ (определение параметра D см. ниже), $\alpha(f_{00}) = 0.648$, $Rl(f_{00}) = 3.92$. При последующей процедуре исследования изменения объема легких в зависимости от амплитуды тонального сигнала его частота принималась равной ближайшему к f_{00} целому числу. Индивидуальная резонансная частота легких рассматриваемого кролика и соответствующая частота тонального стимулирующего сигнала принималась равной $f_0 = 28$ Гц.

Характер частотных зависимостей $Yl(f)$, $Rl(f)$ и $\alpha(f)$ у всех кроликов практически идентичен, различались лишь индивидуальные числовые показатели, определяемые для каждого кролика. Эти параметры приведены в табл. 1.

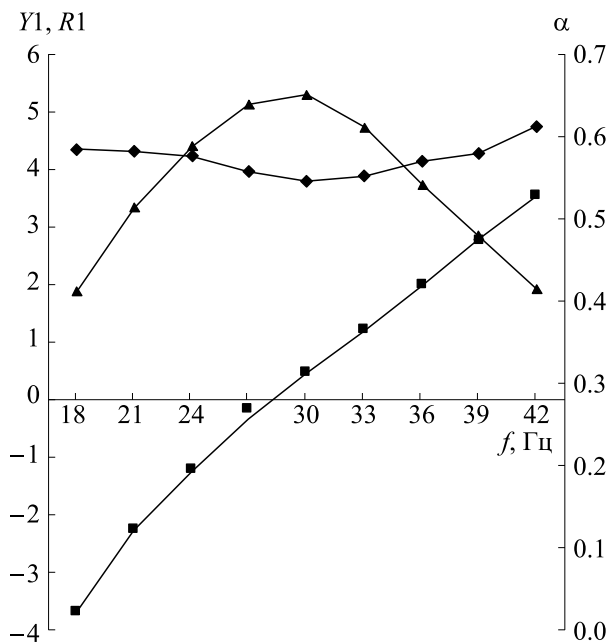


Рис. 1. Экспериментальные зависимости $Y1(f)$ (квадраты, левая ось ординат), $R1(f)$ (ромбы, левая ось ординат) и $\alpha(f)$ (треугольники, правая ось ординат), полученные для кролика № 8 на полигармоническом сигнале частоты f , Гц (ось абсцисс).

В таблице приведены статистические характеристики экспериментальной группы кроликов по каждому параметру. Разброс параметров (т.е. коэффициенты вариации) составил от 12.7% до 20.3%, что характерно для биологических объектов и свидетельствует о достоверной воспроизводимости результатов измерений.

Далее измерения проводили только на тональном сигнале с частотой, равной индивидуальной резонансной частоте легких исследуемого кролика (f_0). Время между измерениями на полигармоническом сигнале и измерениями на тональном сигнале резонансной частоты составляло не более 1 мин. Для обеспечения идентичности условий измерений на полигармоническом и тональном сигнале манипуляции с кроликом между измерениями не проводили.

Измерения с экспериментальными кроликами проведены на пяти УЗД тонального сигнала. Для каждого УЗД тонального сигнала регистрировали значения звукового давления P_1 и P_2 в двух точках и разность фаз φ_{12} между ними. По этим данным рассчитывались значения активной и реактивной компонент импеданса $R1$ и $Y1$, а также УЗД в плоскости торцевой стенки, у входа в дыхатель-

Таблица 1. Параметры дыхательной системы кроликов, полученные на полигармоническом сигнале

№ кролика	f_{00} , Гц	$D(f_{00})$, Гц ⁻¹	$\alpha(f_{00})$	$R1(f_{00})$	f_0 , Гц
1	31.4	0.32	0.490	6.00	31
2	22.3	0.28	0.654	3.85	22
3	26.1	0.21	0.752	2.99	26
4	32.2	0.26	0.649	3.90	32
5	23.6	0.25	0.504	5.77	24
6	31.1	0.26	0.653	3.87	31
7	24.5	0.22	0.720	3.25	25
8	28.1	0.26	0.648	3.92	28
9	32.2	0.24	0.531	5.34	32
10	31.9	0.21	0.571	4.79	32
11	26.5	0.33	0.527	5.40	26
12	30.0	0.25	0.597	4.48	30
13	30.0	0.30	0.490	6.00	30
14	23.6	0.24	0.584	4.63	24
15	27.3	0.24	0.588	4.59	27
16	34.0	0.20	0.568	4.84	34
Среднее значение	28.4	0.25	0.595	4.60	28.4
Стандартное отклонение	3.67	0.038	0.079	0.93	3.6
Коэффициент вариации, %	12.9	15.1	13.3	20.3	12.7

Таблица 2. Измеренные и рассчитанные значения характеристик легких кролика на тональном сигнале

№ п/п, i	f_0 , Гц	P_1 , дБ	P_2 , дБ	φ_{12} , град	$R1$	$Y1$	α	P_0 , дБ	f_{res} , Гц
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Измеренные значения				Вычисленные значения				
1	28	119.6	120.0	3.6	4.39	−0.42	0.60	120.0	29.6
2		125.2	125.6	3.8	4.50	−0.35	0.59	125.7	29.4
3		133.3	133.7	3.2	4.90	0.33	0.56	133.7	26.7
4		135.2	135.6	3.1	4.90	0.55	0.56	135.6	25.9
5		136.8	137.2	3.0	5.00	0.69	0.55	137.2	25.3

ную систему кролика — P_0 . Средние значения P_0 составили: 120, 126, 134, 136 и 138 дБ. При этом стандартное отклонение по каждому уровню не превышало 1.2 дБ. В табл. 2 в качестве примера приведены значения регистрируемых и рассчитанных показателей одного из кроликов (№ 8) для пяти УЗД P_0 .

Для расчета значения резонансной частоты на каждом уровне громкости тонального сигнала использованы значения $Y1_i$ из табл. 2 (столбец 7) и величины тангенса угла наклона частотной зависимости реактивной компоненты ($Y1$) при переходе через «0», т.е. на частоте первоначального резонанса f_{00} . Параметр D (тангенс угла наклона) определяется по результатам измерения функции $Y1(f)$ на первом этапе с полигармоническим сигналом:

$$D = \left. \frac{dY1(f)}{df} \right|_{f=f_{00}}.$$

Величина D равна значению производной функции $Y1(f)$ в точке резонанса. На практике D определяется отношением $\Delta Y1/\Delta f$, рассчитанным по зависимости $Y1(f)$ в области перехода ее через ноль. Расчет резонансной частоты (f_{resi}) при измерениях на тональном сигнале проведен по формуле

$$f_{\text{resi}} = f_0 - \frac{Y1_i}{D}.$$

Вычисленные по этой формуле резонансные частоты (см. табл. 2, столбец 10) заметно уменьшаются с ростом УЗД. Для приведенных данных это снижение достигает 14.5%.

Результаты измерения свидетельствуют, что с ростом УЗД (табл. 2, столбец 9) происходит изменение импедансных характеристик легких кролика. Активная компонента импеданса ($R1$) немного возрастает от значения 4.39 до 5.0. Однако если бы это было вызвано нелинейными явлениями звукопоглощения [25], то рост активной компоненты был бы более существенным при достигну-

тых УЗД. Более значимые изменения зарегистрированы у реактивной компоненты импеданса ($Y1$), которая изменяется от −0.42 до +0.69. Увеличение реактивной компоненты безразмерного удельного акустического импеданса ($Y1$) свидетельствует об уменьшении резонансной частоты легких кролика с ростом амплитуды тонального сигнала [8].

В табл. 3 приведены вычисленные значения f_{resi} и P_{0i} для 16 кроликов на пяти ступенях УЗД тонального сигнала.

Анализ результатов измерений и расчетов свидетельствует, что увеличение амплитуды тонального сигнала, как правило, приводит к снижению резонансной частоты дыхательной системы. В табл. 3 только у одного животного при увеличении амплитуды падающей волны с 120.1 до 125.6 дБ произошло увеличение резонансной частоты с 27.9 до 28.3 Гц (кролик № 11). В трех случаях зарегистрировано отсутствие изменений резонансной частоты (кролики №№ 11, 13 и 16, выделено жирным). При сравнении двух связанных выборок очень удобен критерий знаков [26]. Связанными называют такие выборки, в которых каждому наблюдению в опыте соответствует свой контроль. Здесь каждому последующему значению резонансной частоты дыхательной системы конкретного кролика, соответствует предшествующая резонансная частота. В соответствии с критерием знаков [26], для выборки из 16 наблюдений максимальное число знаков (т.е. увеличение резонансной частоты), при которых различия в парных сравнениях можно считать существенными с $P_{\text{КЗ}} = 0.05$ или $P_{\text{КЗ}} = 0.01$ составит четыре и два случая соответственно. Таким образом, в соответствии с критерием знаков зарегистрированное снижение резонансной частоты дыхательной системы кроликов при действии высокоинтенсивного тонального сигнала является статистически значимым.

Кроме того, в табл. 4 представлены среднегрупповые значения резонансных частот легких обследованных кроликов и соответствующие им

Таблица 3. Резонансные частоты легких кроликов, полученные на пяти ступенях УЗД тонального сигнала P_{0i}

№ кролика	f_{res1} , Гц	f_{res2} , Гц	f_{res3} , Гц	f_{res4} , Гц	f_{res5} , Гц	P_{01} , дБ	P_{02} , дБ	P_{03} , дБ	P_{04} , дБ	P_{05} , дБ
1	37.4	37.0	32.5	31.6	31.1	120.6	126.2	134.4	136.4	138.0
2	23.6	22.7	21.0	20.5	20.5	119.3	124.9	133.0	135.0	136.6
3	26.1	25.3	22.7	22.2	21.8	119.5	125.1	133.3	135.2	136.9
4	32.7	32.2	30.9	30.5	30.2	120.5	126.2	134.4	136.4	138.0
5	28.9	28.4	25.8	24.7	24.7	119.8	125.4	133.5	135.4	136.9
6	32.7	32.2	29.9	29.3	29.2	120.5	126.1	134.3	136.3	137.9
7	26.2	26.0	24.3	24.2	24.2	119.6	125.2	133.3	135.2	136.8
8	29.6	29.4	26.7	25.9	25.3	120.0	125.7	133.7	135.6	137.2
9	33.8	33.4	31.1	30.4	30.0	120.8	126.4	134.5	136.3	137.9
10	34.7	34.0	30.7	30.2	29.7	120.8	126.4	134.4	136.3	137.9
11	27.9	28.3	26.7	26.0	26.0	120.1	125.6	133.5	135.4	137.0
12	31.1	30.8	28.7	27.8	27.3	120.3	125.8	133.8	135.7	137.2
13	30.6	30.6	29.2	28.6	28.5	120.7	126.2	134.2	136.1	137.7
14	27.8	27.4	24.5	24.0	23.3	119.8	125.4	133.4	135.2	136.8
15	28.4		24.6	23.6	22.7	119.8		133.3	135.1	136.7
16	35.3	35.3	33.6	33.1	32.0	121.2	126.8	134.9	136.8	138.4

Примечание. Полужирным шрифтом выделены случаи отсутствия изменений резонансной частоты (кролики №№ 11, 13 и 16).

значения t -критерия Стьюдента (сравниваются выборки f_{res2} , f_{res3} , f_{res4} и f_{res5} с выборкой f_{res1} , см. табл. 3). В таблице представлены также статистические характеристики УЗД высокоинтенсивного тонального сигнала для пяти уровней сигнала. Достоверное изменение среднегрупповой резонансной частоты дыхательной системы кроликов (с доверительной вероятностью 95%) происходит, начиная с третьего уровня звукового давления (P_{03} , P_{04} и P_{05}), когда величина t -критерия

Стьюдента превышает его критическое значение $t_{критич}$ ($\alpha = 0.05$).

На рис. 2 представлены изменения резонансных частот легких кроликов относительно первоначального значения (f_{res}/f_{res1}) в зависимости от УЗД тонального сигнала падающей волны (P_0).

Относительные изменения частоты представлены по отношению к резонансной частоте, определенной на первом уровне громкости тонального сигнала. Можно отметить, что при УЗД,

Таблица 4. Среднестатистические значения резонансных частот легких кроликов и УЗД воздействующего высокоинтенсивного тонального сигнала P_{0i}

Статистические характеристики	f_{res1} , Гц	f_{res2} , Гц	f_{res3} , Гц	f_{res4} , Гц	f_{res5} , Гц	P_{01} , дБ	P_{02} , дБ	P_{03} , дБ	P_{04} , дБ	P_{05} , дБ
Среднее	30.4	30.2	27.7	27.0	26.7	120.2	125.8	133.9	135.8	137.4
Стандартное отклонение	3.8	4.0	3.7	3.7	3.6	0.55	0.56	0.58	0.58	0.59
Минимум	23.6	22.7	21.0	20.5	20.5	119.3	124.9	133.0	135.0	136.6
Максимум	37.4	37.0	33.6	33.1	30.2	121.2	126.8	134.9	136.8	138.4
t -критерий Стьюдента		0.16	2.08	2.56	2.89					
$t_{критич}$ ($\alpha = 0.05$)		2.05	2.04	2.04	2.04					

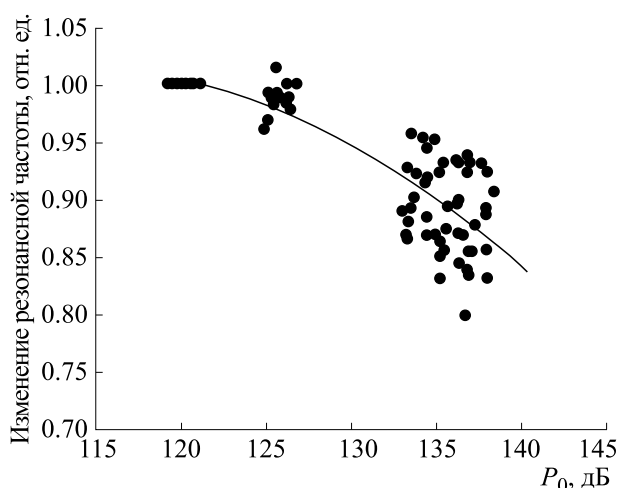


Рис. 2. Относительные изменения резонансной частоты легких кроликов (ось ординат) в зависимости от уровня звукового давления падающей волны тонального сигнала P_0 , дБ (ось абсцисс).

равном 120 дБ, резонансная частота, измеренная на тональном сигнале, мало отличалась от результатов измерений на полигармоническом сигнале с тем же суммарным УЗД 120 дБ. Но уже при УЗД тонального сигнала, равном 134 дБ, зарегистрировано статистически значимое снижение частоты.

На рисунке представлена линия тренда – регрессионная зависимость относительного снижения частоты ($y = f_{res1}/f_{res1}$) в зависимости от УЗД падающей волны ($x = P_0$). Уравнение регрессии имеет следующий вид:

$$y = -0.00024x^2 + 0.0536x - 2.011.$$

Коэффициент детерминации $R^2 = 0.728$, стандартная ошибка оценки составляет 0.03, коэффициент Фишера $F = 206$.

Таким образом, с увеличением УЗД падающей волны резонансные частоты легких кроликов статистически значимо уменьшаются по сравнению с первоначальными значениями, в среднем от 0.4 до 3.8 Гц. Максимальное уменьшение частоты составило 6.3 Гц. УЗД в падающей волне, в среднем составили от 120.2 до 137.4 дБ. Разброс в значениях на каждой ступени увеличения УЗД составил в среднем по всем данным менее 2 дБ, см. табл. 4.

В работах [7, 9] показано, что математической моделью легких можно считать резонатор Гельмгольца. Поэтому снижение резонансной частоты легких можно объяснить увеличением объема легких кроликов. Расчет увеличения объема V_i относительно первоначального объема V_1 легких кроликов, в зависимости от значений зарегистрированных резонансных частот f_{resi} проведен для

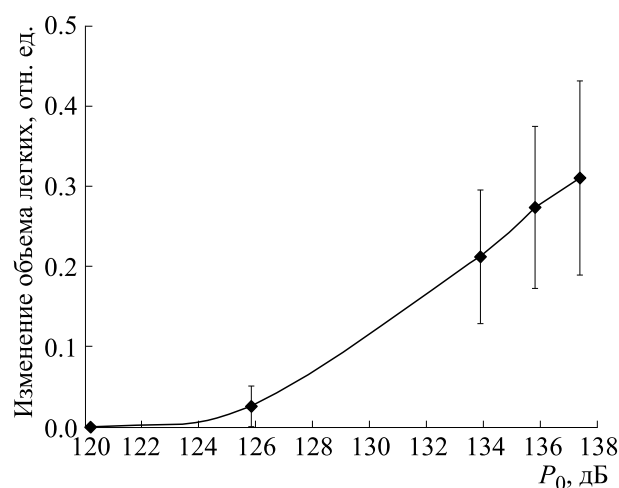


Рис. 3. Относительное изменение объема легких кроликов (ось ординат) в зависимости от уровня звукового давления падающей волны тонального сигнала P_0 , дБ (ось абсцисс).

пяти уровней звукового давления ($i = 1, \dots, 5$) по формуле:

$$\frac{V_i - V_1}{V_1} = \left(\frac{f_{res1}}{f_{resi}} \right)^2 - 1.$$

Приведенное выше выражение является следствием формулы для определения резонансной частоты резонатора Гельмгольца при неизменных параметрах горла:

$$f_i = \frac{c}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{V_i}},$$

где f_i – частота резонанса для объема полости резонатора, равного V_i , $K = S_0/h_0$ – проводимость горла резонатора, S_0 – площадь горла резонатора, h_0 – длина горла резонатора, c – скорость звука в воздушной среде.

На рис. 3 представлены расчетные среднестатистические данные относительного увеличения объема легких кроликов $(V_i - V_1)/V_1$ и размах стандартного отклонения этого увеличения в зависимости от УЗД тонального сигнала падающей волны (P_0).

С увеличением УЗД падающей волны (P_0) происходит снижение резонансной частоты, что объясняется соответствующим увеличением объема легких у кроликов. Зависимость имеет практически линейный характер, увеличение УЗД на 2 дБ приводит к уменьшению резонансной частоты на 2%. Расчетные значения относительного изменения объема увеличиваются на 6% при повышении УЗД на 2 дБ. Следует отметить, что начиная с УЗД, равного 126 дБ, происходит увеличение объема легких в среднем на ~3%, а при УЗД, равном

134 дБ, увеличение объема легких достигает в среднем 21% и далее пропорционально возрастает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют, что резонансные частоты дыхательной системы кроликов при увеличении уровня стимулирующего звука статистически значимо снижаются. В процессе эксперимента геометрические характеристики легких не изменялись, поэтому это обстоятельство свидетельствует об увеличении объема легких за счет открытия резервных альвеол. Сопоставление результатов биоакустической стимуляции спортсменов при УЗД, равном 130 дБ, когда было зарегистрировано увеличение объема легких на 5–15%, и представленных экспериментальных данных по кроликам, когда при уровне 130 дБ наблюдаемое увеличение объема легких составляет в среднем примерно 10%, свидетельствует об идентичности процессов (раскрытия альвеол).

Таким образом, зарегистрированное явление повышения объема легких при воздействии стимулирующего высокоинтенсивного звукового сигнала на резонансной частоте может быть использовано для повышения эффективности биоакустической стимуляции легких спортсменов. При повышении УЗД стимулирующего сигнала до 134 дБ можно ожидать увеличения объема дыхательной системы у спортсменов до 20%, что приведет к повышению функциональных резервов организма и, как следствие, к повышению физической работоспособности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-29-00808).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с животными осуществлялась согласно требованиям протокола исследований в полном соответствии с Женевской конвенцией 1985 г. «Международные принципы биомедицинских исследований с использованием животных» и Хельсинкской декларации 2000 года о гуманном отношении к животным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. А. Киш, Е. В. Голобородько, С. М. Разинкин и А. М. Комлев, *Вестн. восстановительной медицины*, **20** (6), 119 (2021).
2. А. И. Дьяченко, М. В. Веремьева и Е. С. Фомина, *Росс. журн. биомеханики*, **21** (2), 188 (2017).
3. Н. И. Иванов, В. Н. Зинкин и Л. П. Сливина, *Росс. журн. биомеханики*, **24** (2), 216 (2020).
4. M. S. Howe and R. S. McGowan, *J. Acoust. Soc. Am.*, **133** (4), 2340 (2013).
5. F. Detterbeck, M. Gat, D. Miller, et al., *Ann. Thoracic Surg.*, **95** (3), 968 (2013).
6. С. П. Драган и А. В. Богомолов, *Мед. техника*, **293** (5), 19 (2015).
7. A. V. Bogomolov and S. P. Dragan, *Dokl. Biochemistry and Biophysics*, **464** (1), 319 (2015).
8. С. П. Драган, В. И. Кезик и А. В. Богомолов, *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 2, 181 (2022).
9. A. V. Bogomolov, S. P. Dragan, and G. G. Erofeev, *Dokl. Biochemistry and Biophysics*, **487** (1), 247 (2019).
10. С. П. Драган, А. В. Богомолов и В. И. Кезик, *Росс. журн. биомеханики*, **24** (2), 187 (2020).
11. A. I. Dyachenko, M. V. Veremyeva, and E. S. Fomina, *Physics of Wave Phenomena*, **28** (1), 14 (2020).
12. В. А. Ивашин, В. И. Кезик и В. П. Соловьев, *Саратовский науч.-мед. журн.*, **13** (4), 907 (2017).
13. D. Kaczka and R. Dellacá, *Crit. Rev. Biomed. Engineer.*, **39** (4), 337 (2011).
14. H. J. Smith, P. Reinhold, and M. D. Goldman, *European Respiratory Monograph* (2005).
15. В. Н. Зинкин, В. И. Свиловый и И. М. Ахметзянов, *Профилактическая и клиническая медицина*, **40** (3), 280 (2011).
16. И. Ю. Коваленко, А. В. Степанов, А. Б. Селезнев и др., *Вестн. Росс. воен.-мед. академии.*, **58** (2), 249 (2017).
17. B. Zhou, B. J. Bartholmai, S. Kalra, et al., *J. Acoust. Soc. America*, **149** (2), 1318 (2021).
18. C. Thamrin, K. E. Finucane, B. Singh, et al., *Ann. Biomed. Engineer.*, **36** (1), 162 (2008).
19. С. П. Драган и И. В. Лебедева, *Акуст. журн.*, **38** (2), 174 (1992).
20. А. О. Iskhakova, M. D. Alekhin, and A. V. Bogomolov, *Information and Control Systems*, **104** (1), 15 (2020).
21. А. И. Дьяченко, Е. Б. Мехеда и Ю. А. Шулагин, *Росс. журн. биомеханики*, **14** (1), 86 (2010).
22. V. I. Korenbaum and A. D. Shiryaev, *Acoust. Physics*, **66** (5), 548 (2020).
23. M. A. Safronova, A. D. Shiryaev, and V. I. Korenbaum, *Acoust. Physics*, **67** (4), 433 (2021).
24. Дж. Алберг, Э. Нильсон и Дж. Уолш, *Теория сплайнов и ее приложения* (Мир, М., 1972).
25. С. П. Драган и И. В. Лебедева, *Акуст. журн.*, **44** (2), 206 (1998).
26. Е. В. Гублер и А. А. Генкин, *Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях* (Медицина, Л., 1973).

Investigation of Changes in Lung Volume Caused by High-Intensity Acoustic Oscillations at the Resonant Frequency of the Respiratory System

S.P. Dragan*, V.I. Kezik*, A.V. Bogomolov*, and S.V. Drozdov*

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

This paper presents an experimentally determined dependency of an increase in the volume of the lungs of laboratory animals on the level of high-intensity low-frequency sound at the resonant frequency of their respiratory system. Experiments were conducted on 16 rabbits. A modified two-microphone technique was used for the measurement of the resonant frequency of the respiratory system in the frequency range from 5 Hz to 100 Hz for a step in frequency of 3 Hz. Having determined the resonant frequency, a tone signal was delivered to the lungs at this frequency with an adjustable sound amplitude from 120 to 138 dB. The measurement results indicate that the resonant frequencies of the respiratory system in rabbits decreased by an average of 13%, that corresponds to an increase in lung volume by 33% due to the opening of the alveolar oxygen reserve. The observed phenomenon relating to lung volume increase under the influence of a stimulating high-intensity sound signal at a resonant frequency can be used to enhance the effectiveness of bioacoustic stimulation of human lungs in order to increase the volume of the respiratory system.

Keywords: lung volume, impedance of the respiratory system, two-microphone method, resonance frequencies of the respiratory system, bioacoustic stimulation of the respiratory system

ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРЕДНЕРЕСТОВОЙ И НЕРЕСТОВОЙ МИГРАЦИЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЯ СЕМЕЙСТВА ТЕРПУГОВЫХ РЫБ (НА ПРИМЕРЕ ОДНОПЕРОВОГО ТЕРПУГА)

© 2023 г. А.Н. Четырбоцкий*,*, А.Н. Вдовин**, В.А. Четырбоцкий***

*Дальневосточный геологический институт ДВО РАН,
просп. 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, 690022, Россия

**Тихоокеанский филиал ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии («ТИНРО»),
пер. Шевченко, 4, Владивосток, 690091, Россия

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

#E-mail: chetyrbotsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 25.10.2022 г.

Принята к публикации 27.10.2022 г.

Предложена пространственно-временная модель динамики терпуговых рыб в период их преднерестовых и нерестовых массовых миграций. Модель разработана на материале оригинальных верифицированных многолетних наблюдений и промышленных уловов в заливе Петра Великого (Японское море), запись уравнений динамики плотности самцов/самок и массовых суточных перемещений рыб выполнена в терминах уравнений переноса. Эти уравнения представлены в форме модифицированных уравнений Патлака–Келлера–Сегеля, согласно которым поток объектов/субстанции направлен вдоль градиентов введенных функций зон стимулов. Полагается, что в преднерестовый период происходят морфофизиологическая (биохимическая терморегуляция и ряд других эндогенных процессов) и поведенческая адаптации к достаточно длительному и энергозатратному нересту, где стимулом массовых перемещений рыб выступает их пребывание в комфортных для них в этот период условиях среды. При нересте стимул обуславливает поиск распределенных в прибрежной области дна водоема удобных и хорошо аэрированных выступов его рельефа. Моделирование связанных со стимулами действий выполнено на основании сведений о предпочтительных глубинах преднерестовой зоны рыб и особенностях распределений комфортных для них участков нереста. Полагается, что интенсивность суточных перемещений пропорциональна их линейному размеру (чем крупнее рыба, тем быстрее она движется). В уравнениях для этапа нереста учитывается пространственная конкуренция самцов, что в естественных условиях наблюдается только в окрестности нерестовых участков. Вне этих участков самцы продолжают поиски новых удобных для нереста участков. Для самок стимулом передвижений выступают скопления самцов, сигналом о скоплении которых могут выступать некоторые выделяемые самцами субстанции (например, выделяемая самцами слизь) или визуальный контакт. Учитывается диффузия распределения рыб и вязкость среды обитания (диффузия скорости). Начальное распределение рыб задается их усредненным за многолетний период наблюдений июльским распределением в заливе Петра Великого.

Ключевые слова: миграция рыб, нерест, уравнения Патлака–Келлера–Сегеля, зона адаптации.

DOI: 10.31857/S0006302923010155, EDN: OBCFQP

Характер пространственно-временной последовательности этапов жизненного цикла рыб отражает особенности их эволюционного пути развития. Так, в преднерестовый этап поколения нерестовых мигрирующих видов рыб регулярно преодолевают значительные расстояния, чтобы затем образовать нерестовые скопления. Для терпуговых рыб это область первой сотни метров морских глубин, которая обычно к моменту начала преднерестовой миграции уже достаточно для

них прогрета и аэрирована. Именно здесь происходит их приспособление к продолжительному энергозатратному периоду последующего нереста. К тому же повышенная температура этих глубин интенсифицирует процессы созревания их половых продуктов. И здесь же рыбы усиленно питаются, компенсируя затраты энергии на формирование половых продуктов.

Согласно наблюдениям, самцы первыми покидают преднерестовую зону и поднимаются к

местам нереста, что связано с расчисткой нерестового участка и подготовкой галечного грунта для строительства нерестового бугра [1]. Перед занятием нерестовых участков самцы прогоняют более или менее крупных рыб. Вслед за ними сюда отправляются и самки для откладывания икры, которую затем оплодотворяют самцы. Интересно заметить, что многократное спаривание и увеличение плотности в скоплениях обеспечивает репродуктивный успех в условиях идеального распределения самок [2, 3].

Постановка задач математического моделирования преднерестовых и нерестовых миграций морских рыб не является важной темой предметно ориентированных публикаций, что, по-видимому, обусловлено трудностями выбора универсальных (или относительно стандартных) схем из-за различий в стратегии размножения, этологии нереста и характера миграций. На наш взгляд, основная причина такой ситуации состоит в мобильности перемещений рыб и малости их размеров по сравнению с остальными характерными размерами. Количественные измерения показателей у плавающих рыб и обследование нерестилищ на порядок сложнее аналогичных исследований в сухопутной среде. Между тем актуальность таких исследований определяется теоретическими и прикладными аспектами. Во-первых, активные перемещения рыб дают искаженную оценку промысловых запасов, что может отразиться на рациональной эксплуатации промысловой части популяции. Кроме того, полученные результаты могут оказаться полезными для краткосрочного прогнозирования промысловой обстановки.

Цель работы состоит в разработке компактной численной 1D-модели преднерестовой и нерестовой миграций массовых самцов и самок, где в рамках единого механизма рассматриваются проблемы преднерестовой приспособляемости и таксиса рыб, конкуренция самцов за место нерестового участка. Под таксисом здесь понимаются массовые направленные перемещения, обусловленные неоднородностью пространственного распределения некоторого стимула [4]. Для решения поставленных задач вводится понятие этапа адаптации, по завершения которого самцы и следующие за ними самки уходят на нерест. Для самок в качестве стимула их передвижений выступают скопления самцов, сигналом о таком скоплении могут являться выделяемые ими некоторые химические вещества (например, выделяемая самцами характерная слизь). Для оценки адекватности модели и понимания сущности результатов моделирования выполнен ряд вычислительных экспериментов на примере терпуга

Pleurogrammus azonus, который является наиболее массовым представителем семейства терпуговых Hexagrammidae, включающего в себя три рода и 9 видов [5].

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Количественным основанием для построения модели является система уравнений Патлака—Келлера—Сегеля [6, 7]. Суть положений ее механизма состоит в принятии положения о направленных массовых перемещениях особей в поле гетерогенного распределения некоторой функции, которая в терминах работ [7, 8] именуется стимулом или так называемым медленным таксисом. В частности, стимулом для насекомых выступают распределения концентрации их пищевого субстрата [7], а для бактерий водоносных пластов — распределение концентрации их питательных веществ [9]. Полагается, что поток непосредственно самих объектов пропорционален распределению стимула. Иная ситуация положена в основу моделей [10, 11], где интенсивность перемещений пропорциональна градиенту стимула. Подобным образом этот градиент «управляет» характером усредненных за сутки скоростей объектов изучения.

В системе уравнений Патлака—Келлера—Сегеля допускается, что объект наделен таксисом к некоторым характеристикам окружающей среды (такими как температура, соленость, рельеф местности и т. д.), то есть он способен воспринимать некоторый внешний сигнал [12]. Здесь рассматриваются четыре типа таких распределений, посредством которых моделируется направленное массовое перемещение нерестовых рыб: градиент зоны адаптации, градиент зоны нереста и распределение самцов уже непосредственно перед нерестовыми участками (в этот период самки перемещаются вслед за самцами и, кроме того, на этих участках самцы конкурируют между собой за оплодотворение икры).

При построении модели принимаются такие допущения:

1. Динамика распределения плотности рыб следует уравнению переноса, где еще дополнительно учитывается диффузия их плотности и естественная смертность.
2. Вводятся понятия зоны адаптации и зоны действия стимулов.
3. Динамика скорости перемещений пропорциональна градиенту зоны стимула и вязкости среды.

4. Длительность преднерестового адаптационного этапа t^* , по его завершению рыбы поднимаются в зону нереста.

5. Поскольку перед нерестом самцы прогоняют от нерестовых кладок других рыб, то на этом этапе самцы конкурируют между собой за участки мест кладок.

6. По сравнению с самцами у самок отмечается несколько иной переход из зоны адаптации на

нерест, после которого они направлено следуют за самцами.

7. На границах среды отсутствуют потоки компонентов системы.

8. Для динамических переменных заданы начальные распределения.

Согласно принятым допущениям, запись уравнений модели принимает вид

$$\left\{ \begin{array}{l} \partial_t M = \partial_x (U_M M) - \beta_M M + D_M \partial_{xx} M, \\ \partial_t F = \partial_x (U_F F) - \beta_F F + D_F \partial_{xx} F, \\ \partial_t U_M = \partial_x (k_{11} R - k_{12} M) + D_M^{(U)} \partial_{xx} U_M, \\ \partial_t U_F = \partial_x (k_{21} R + k_{22} M) + D_F^{(U)} \partial_{xx} U_F, \\ \partial_x M|_{a,b} = \partial_x F|_{a,b} = 0 \text{ и } \partial_x U_M|_{a,b} = \partial_x U_F|_{a,b} = 0, \\ M(x, 0) = M_0(x), F(x, 0) = F_0(x), U_M(x, 0) = U_F(x, 0) = U_0(x). \end{array} \right. \quad (1)$$

где x и t — пространственная и временная координаты; $M(x, t)$, $U_M(x, t)$, $F(x, t)$, $U_F(x, t)$ — плотности распределений, скорости самцов и самок; β_M и β_F — коэффициенты естественной смертности; $R(x, t)$ — функция зоны стимулов; D_M , D_F , $D_M^{(U)}$, $D_F^{(U)}$ — коэффициенты диффузии (первый подстрочный индекс указывает на соответствующую переменную: M — самец, F — самка); $\{k_{ij}, i, j = 1, 2\}$ — зависящие от времени неотрицательные коэффициенты пропорциональности. Их временная за-

висимость отражает неравномерность вклада стимулов в динамику системы уравнений (1). Коэффициенты k_{11} и k_{21} характеризуют степень «привлекательности» стимулов, а k_{12} и k_{22} — пространственную конкуренцию самцов за нерестовые участки и направленное движение самок вслед за самцами уже непосредственно при нересте.

Функции зоны стимулов $\{R_i, i = 1 \div 3\}$ определяются таким представлением:

$$R(x) = \begin{cases} R_1(x), & \text{при } t < t^*, \\ R_2(x), & \text{самцы при } t > t^*, \\ R_3(x) = [R_1(x) + R_2(x)] / 2, & \text{самки при } t > t^*, \end{cases}$$

где характер распределения каждого из них в наибольшей степени соответствует наблюдениям; $R_1(x)$ характеризует общую для самцов и самок зону стимула на этапе адаптации, а $R_2(x)$ и $R_3(x)$ — их зоны стимулов переходов на этап нереста. Отличное от нуля начальное движение рыб $U_0(x) \neq 0$ обусловлено гормональным фоном их организма,

что обычно выражается в окраске отдельных частей тела рыб. В частности, у терпуга — это напоминающая поднятое забрало черная маска [13].

Численное решение системы уравнений (1) выполняется матричной прогонкой, вычислительная схема которой следует записи

$$A_i^{(t)} Y_{i-1}^{(t+1)} - B_i^{(t)} Y_i^{(t+1)} + C_i^{(t)} Y_{i+1}^{(t+1)} = -F_i^{(t)},$$

где i — номер узла схемы ($I = 1 \div n$, N — число узлов); $\{A_i^{(t)}, B_i^{(t)}, C_i^{(t)}; i = 2 \div N\}$ — набор матриц 4×4 ;

$$Y_i^{(t+1)} = (M_{i,t+1}, F_{i,t+1}, U_{i,t+1}^{(M)}, U_{i,t+1}^{(F)})', i = 2 \div N.$$

Элементы матриц следуют выражениям

$$\left\{ \begin{array}{l} A_i^{(t)} = \text{diag} \left(\frac{\Delta t}{\Delta x} U_{i-1/2,t}^{(M)} + \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_M, \frac{\Delta t}{\Delta x} U_{i-1/2,t}^{(F)} + \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_F, \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_U^{(M)}, \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_U^{(F)} \right) \\ B_{1,1} = \frac{\Delta t}{\Delta x} U_{i+1/2,t}^{(M)} + 1 + 2 \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_M + \beta_M \Delta t, \quad B_{2,2} = \frac{\Delta t}{\Delta x} U_{i+1/2,t}^{(F)} + 1 + 2 \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_F + \beta_F \Delta t \\ B_{3,3} = 1 + 2 \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_U^{(M)}, \quad B_{4,4} = 1 + 2 \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_U^{(F)} \\ B_{3,3} = 1 + 2 \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_U^{(M)}, \quad B_{4,4} = 1 + 2 \frac{\Delta t}{\Delta x^2} D_U^{(F)} \\ A_{3,1} = \frac{\Delta t}{\Delta x} k_{1,2}, \quad B_{3,1} = -A_{3,1}, \quad A_{4,1} = -\frac{\Delta t}{\Delta x} k_{2,2}, \quad B_{4,1} = -A_{4,1} \\ F_i^{(t)} = (M_{i,t+1}, F_{i,t+1}, U_{i,t+1}^{(M)} + \frac{\Delta t}{\Delta x} k_{1,1} \Delta R_i, U_{i,t+1}^{(F)} + \frac{\Delta t}{\Delta x} k_{2,1} \Delta R_i) \end{array} \right. , \quad (2)$$

где функция $\text{diag}(\cdot)$ – функция построения диагонали матрицы, Δt и Δx – размеры вычислительной сетки.

ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ

Детализация функций и коэффициентов системы уравнений (1) здесь выполнена на основании усредненных многолетних наблюдений преднерестовых и нерестовых миграций однопервого терпуга. Учитываются также наблюдаемые условия его жизненного цикла. Так, $R(x)$ из выражений (2) в зоне адаптации $[x_1, x_2]$ оказывается близким к нормальному распределению, а в прибрежной зоне нереста $[x_0, x_3]$ – близким ло-

гнормальному распределению [14, 15]. Применительно для $R(x)$ здесь уместно особенно подчеркнуть именно смысловой характер указанных распределений: в первом случае это распределение обусловлено влиянием многих слабо взаимосвязанных случайных величин, каждая из которых вносит малый вклад относительно общей суммы; основание формирования логнормального распределения случайных величин составляет процесс, где действие каждого добавочного фактора на случайную величину пропорционально ее добавочному уровню [16]. По-видимому, такая ситуация отражает эволюцию рыб. Согласно сказанному, здесь принимается следующая аппроксимация этих функций

$$R(x, t) = \begin{cases} R_1(x) = A_1 \exp[-a \cdot (x - x_1)^2 (x_2 - x_1)^{-2}], & \text{при } t < t^*, \\ R_2(x) = A_2 x \exp(-bx), & \text{самцы при } t > t^*, \\ R_3(x) = [R_1(x) + R_2(x)] / 2, & \text{самки при } t > t^*, \end{cases} \quad (3)$$

где коэффициенты A_1 , A_2 и a вычисляются на основании наблюдений. В частности, для терпуга интервал зоны нагула и адаптации рыб $x_1 = 40$ м, $x_2 = 90$ м, а зоны нереста $x_0 = 5$ м, $x_3 = 25$ м [17]; коэффициенты $A_1 = 1$ ед. (единиц) и $a = 0.25$ оценивали подбором; коэффициенты $A_2 = 14.8147$ ед. · м⁻¹ и $b = 0.085$ м⁻¹ оценивали методом наименьших квадратов на основании линейного соотношения, которое получено после взятия логарифма от обеих частей выражения для $R_2(x)$. Для представления $R_2(x)$ вместо логнормального представления функции зоны стимула используется более простая кривая Рикера [18],

которая по своей форме во многом подобна этому представлению.

В последующих вычислениях для каждого из распределений $\{R_i(x), i = 1 \div 3\}$ выполнена единичная нормировка (сумма его членов приведена к единице). Нормированные распределения зон стимулов модели (1) представлены на рис. 1.

Границы изменения аргументов функций зон стимулов расширены на весь диапазон глубин, что не соответствует принятым на практике представлениям (обычно указываются конкретные значения [13]). Такая ситуация обусловлена незначительными отличиями этих функций от нуля вне указанных интервалов, так и нахождения рыб в других глубинных пределах. Так, определенная

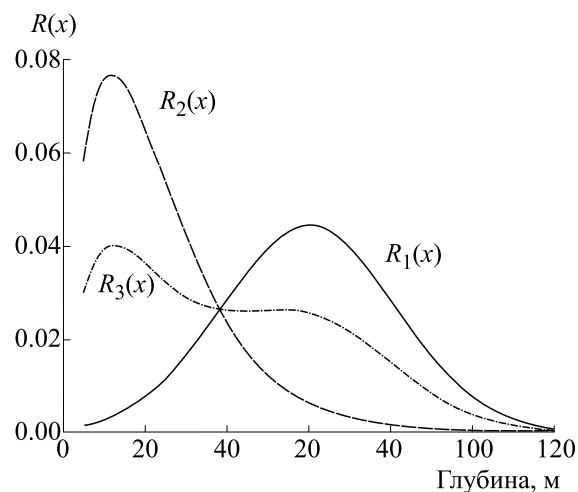


Рис. 1. Нормированные распределения зон стимулов в модели (1).

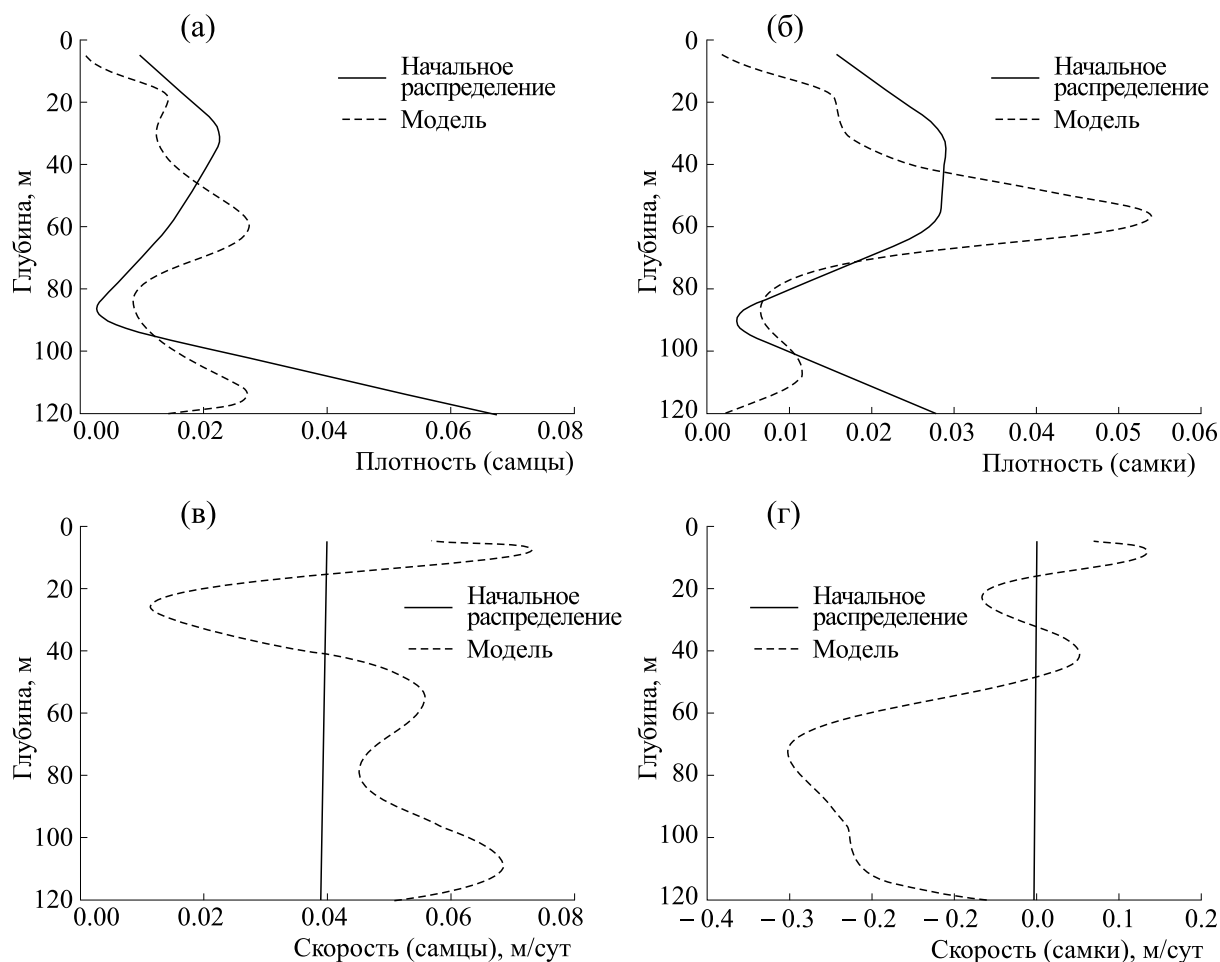


Рис. 2. (а)–(г) – Плотности модельных распределений и скорости перемещений: на 60-е сутки моделирования.

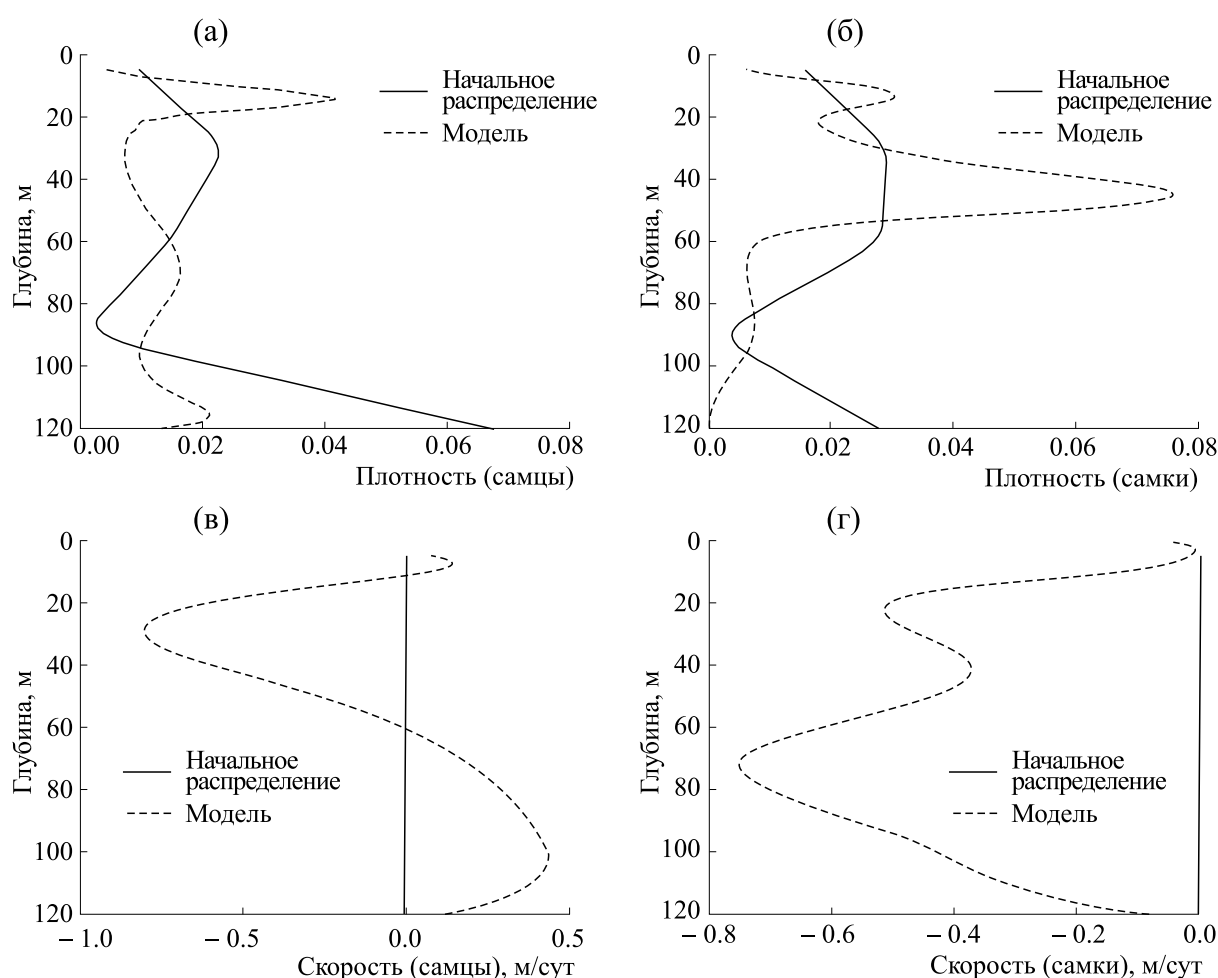


Рис. 3. (а)–(г) –Плотности модельных распределений и скорости перемещений: на на 110-е сутки моделирования.

доля половозрелых рыб не участвует в нересте, что связано с патологиями половых продуктов.

Численные значения параметров модели (1) представлены в табл. 1. Плотности модельных распределений и скорости перемещений, соответствующие разным периодам моделирования, представлены на рис. 2 и 3.

Анализ представленных на графиках кривых дает следующую предметную интерпретацию. Для самцов 60-е сутки (рис. 2а,в) являются продолжением их движения из зоны адаптации в зону нереста, на что указывает повышенное зна-

чение плотности в районе 20 м и направление суточных перемещений/скоростей самцов. На 60-е сутки самки в основном еще пребывают в зоне их преднерестовой адаптации (рис. 2б,г). Тогда же начинается их перемещение в зону нереста. На 110-е сутки (рис. 3) основная часть самцов находится в таком интервале глубин нереста, где отмечается низкая скорость их перемещений. Для самок отмечается аналогичная картина. Имеется также определенное запаздывание по временам следования самок на нерест.

Сопоставление кривых на рис. 2 и 3 показывает, что длительность введенного здесь адаптаци-

Таблица 1. Численные значения параметров модели

$\Delta t = 1$ сутки	$D_M = 0.95 \text{ м}^2 \text{ сутки}^{-1}$	$D_M^{(U)} = 2.1 \text{ м}^2 \text{ сутки}^{-1}$	$k_{11} = 9.8 \text{ сутки}^{-1}$
$\Delta x = 5$ м	$D_F = 0.9 \text{ м}^2 \text{ сутки}^{-1}$	$D_F^{(U)} = 2.1 \text{ м}^2 \text{ сутки}^{-1}$	$k_{21} = 9.8 \text{ сутки}^{-1}$
$\beta_M = 10^{-3} \text{ сутки}^{-1}$	$\beta_F = 10^{-3} \text{ сутки}^{-1}$	$k_{12} = 10^{-5} \text{ сутки}^{-1}$	$k_{22} = 0.7 \text{ сутки}^{-1}$

онного этапа для самок на 20–30% выше, чем у самцов. Представляется, что это связано с особенностями формирования половых продуктов самок, массы гонад которых в несколько раз превосходят массу гонад самцов [19].

Изменение направлений суточных скоростей (с плюса на минус и обратно) отражает рыскание рыб в зонах их адаптации и стимулов, которое вызвано неоднородностью морской среды и гетерогенностью популяционной структуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана компактная 1D численная модель преднерестовой и нерестовой миграций рыб, которая основана на уравнениях системы Патлака–Келлера–Сегеля, введен этап преднерестовой адаптации рыб, введена зон действия стимулов. В модели в рамках единого механизма реализуются следующие процессы: преднерестовая адаптация рыб, конкуренция самцов за участки нереста; на этапе нереста самки направлено следуют за самцами (таксис). Разработан механизм коммуникации, согласно которому самцы первыми следуют на нерестовые участки, что стимулирует последующее перемещение самок.

Следуя положениям модели, массовые перемещения рыб обусловлены фиксированными в водных глубинах градиентами зоны действий стимулов, в качестве которых выступают комфортные для преднерестовой адаптации глубины, хорошо аэрированные и удобные для нереста выступы участков дна, распределения самцов. Анализ результатов показывает: при нерестовой миграции самцы перемещаются быстрее самок, хотя и дольше на находятся на нерестилищах; самые медленные перемещения отмечены для промежуточной зоны, где проходит адаптация; непрерывность переходов между этапами; длительность введенного здесь адаптационного этапа на 20–30% выше, чем у самцов. Результаты численных экспериментов показали непрерывность переходов между этапом преднерестовой адаптации рыб и этапом нереста.

Согласно построенной модели функции зоны адаптации и зон стимулов нереста определены на всем интервале глубин. Такое допущение приводит к разнонаправленности суточных скоростей, которые интегрально обуславливают основное направление к нерестовой зоне. Принятия такого допущения оказывается отражением природного факта пропуска нереста части половозрелых рыб.

Представляется, что введение в рассмотрение функций распределений стимулов имеет определенное применение при моделировании пространственно-временной динамики биологических объектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность д.б.н. В.В. Суханову и к.б.н. В.Е. Гомелюк за многочисленные обсуждения и консультации по рассматриваемым в работе вопросам.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Абрамов, Зоологич. журн., **32** (6), 1198 (1953).
2. С. И. Павлов, Изв. Самарского науч. центра РАН, **11** (1), 34 (2009).
3. A. Toleuchanov, M. Panfilov, and A. Karatauev, in *Communications in Computer and Information Science. Mathematical Modeling in Technological Processes* (Springer, 2015), Vol. 549, pp. 177–189.
4. Ю. Н. Тютюнов, А. Д. Загребнева, Ф. А. Сурков и А. И. Азовский, Биофизика, **54**, (3), 508 (2009).
5. N. Takajoshi, Res. Popul. Ecd., **35** (1), 45 (1993).
6. В. Н. Говорухин, А. Б. Моргулис и Ю. В. Тютюнов, Докл. РАН, **372** (6), 730 (2000).
7. E. F. Keller and L. A. Segel, J. Theor. Biol., **30**, 225 (1971).
8. А. В. Никитина, Изв. ЮФУ. Технические науки, № 7 (96), 173 (2009).
9. Y. V. Tyutyunova, L. I. Titovab, and I. N. Senina, Ecol. Complexity **31**, 170 (2017).
10. В. Н. Говорухин и А. Д. Загребнева, Компьютерные исследования и моделирование, **12** (4), 831 (2020).
11. А. Б. Моргулис и К. К. Ильин, Вестн. ВГУ. Сер. Физика. Математика, № 2, 114 (2019).
12. А. Б. Моргулис, Вестн. ЮУрГУ. Сер. «Математика. Механика. Физика», **11** (3), 28 (2019).
13. В. Н. Гомелюк, Вопросы ихтиологии, **27** (6), 991 (1987).
14. R. De Graaf and P. Dam, in *Salish Sea Ecosystem Conf.* (2014) p. 6. <https://cedar.wvu.edu/ssec/2014ssec/Day1/6>.
15. W. E. Ricker, *Computation and Interpretation of Biological Statistics of Fish Populations. Bull.* 191 (Ottawa, 1975).
16. А. Н. Колмогоров, в сб. *Теория вероятностей и математическая статистика* (Наука, М., 1986).
17. А. Н. Вдовин, Изв. ТИНРО, **123**, 16 (1998).
18. M. D. Robarts and J. F. Piatt, J. Fish Biol., **54** (5), 1050 (2005).
19. А. Н. Вдовин и А. Н. Четырбоцкий, Труды ВНИРО, **170**, 26 (2018).

Numerical Modeling of Pre-Spawning and Spawning Migrations of the Representative of the Family Hexagrammidae: The Case of the Arabesque Greenling

A.N. Chetirbotsky*, A.N. Vdovin**, and V.A. Chetirbotsky***

**Far East Geological Institute, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

***Pacific Branch of Research Institute of Fishery and Oceanography ("TINRO"),
per. Shevchenko 4, Vladivostok, 690091 Russia*

****Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

This paper presents a spatio-temporal model of greenling dynamics during pre-spawning and spawning mass migrations. The developed model is based on original verified long-term observations and data on industrial fishing in the Peter the Great Bay (Sea of Japan), and the equations of the dynamics of the density of males/females and the mass daily movements of fish are written in terms of the transfer equations. These equations are written in the form of the modified Patlak–Keller–Segel equations, according to which the flow of objects/substances is directed along the gradients of stimulus introduced. It is believed that in the pre-spawning season, adaptation in morpho-physiological (biochemical thermoregulation and a number of other endogenous processes) and behavioral responses of fish to sufficiently long and energy-consuming spawning can occur, where the stimulus for mass movements of fish is optimal environmental conditions for spawning events. During the spawning period, selected sites will be found in convenient and well-aerated embayments located at the bottom of reservoir in the coastal area. Modeling of stimuli-related movements is performed based on information about the preferred water depths of the fish's pre-spawning area and relevant features relating to a selection of suitable bedding sites. It is assumed that the intensity of daily motion is proportional to their linear size (the larger the fish becomes, the faster it is). The equations for the spawning stage take into account the spatial competition of males, but in natural conditions it is observed only in the vicinity of spawning areas. Being away from these areas, males continued to look for new sites good for the spawn. For females, their movement is provoked by males that assembled in schools, the signal of which can be certain chemical elements released by males (for example, mucus secretion from males) or visual contact. The diffusion of fish distribution and the viscosity of the habitat (velocity diffusion) are taken into account. The initial distribution of fish is given according to the average distribution of fish in July over a long-term observation period in the Peter the Great Bay.

Keywords: fish migration, spawning, Patlak–Keller–Segel equations, adaptation zone

ЛЕЧЕБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВЫСОКОДОЗОВОЙ ИНГАЛЯЦИИ ГАЗООБРАЗНОГО ОКСИДА АЗОТА ПРИ ПОСТКОВИДНОМ СИНДРОМЕ, ДИАБЕТЕ И ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

© 2023 г. А.Ф. Ванин^{*,#}, А.В. Пекшев^{**}, Е.В. Печёнкин^{***}, А.Б. Вагапов^{**}, Н.А. Шарапов^{**}

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

^{**}Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана,
2-я Бауманская ул., 5/1, Москва, 105005, Россия

^{***}Ставропольский государственный медицинский университет,
ул. Мира, 310, Ставрополь, 355017, Россия

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

Поступила в редакцию 21.11.2022 г.

После доработки 21.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Сообщается о лечебном действии высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота (не менее 1000 ppm) пациентам с постковидным синдромом, диабетом и ВИЧ-инфекцией. Предполагается, что в качестве лечебного агента могут выступать производные газообразного оксида азота (NO) – катионы нитрозония (NO^+), появляющиеся в крови и тканях органов пациентов в результате реакции диспропорционирования молекул NO, связывающихся попарно с ионами Fe^{2+} , входящими в состав трансферрина или в пул лабильного (свободного) железа. Не исключено, что лечение ВИЧ-инфекции (как и ранее обнаруженное лечебное действие газообразного NO на пациентов с COVID-19) могло быть обусловлено S-нитрозирующим действием катионов нитрозония на тиоловые группы протеаз вируса и хозяина. Благоприятное действие катионов NO^+ , возникающих из газообразного NO у пациентов с постковидным синдромом и диабетом также может быть обусловлено ингибирующим действием этих катионов на тиоловые группы белков, функционирующих в системе апоптоза.

Ключевые слова: ингаляция оксида азота, динитрозильные комплексы железа, постковидный синдром, диабет, ВИЧ-инфекция, «ПЛАЗОН».

DOI: 10.31857/S0006302923010167, EDN: OBGWMC

Ранее в работе [1] экспериментально было показано, что последовательная ингаляция сирийских хомячков, инфицированных коронавирусом SARS-Cov-2, распыленными растворами биядерного динитрозильного комплекса железа с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) и диэтилдитиокарбама-та (ДЭТК) обеспечивает подавление у хомячков указанной инфекции. Предполагается, что этот благоприятный результат был обусловлен токсическим действием на процесс репликации коронавируса катионов нитрозония (NO^+), высвобождавшихся из Б-ДНКЖ-GSH при их разрушении молекулами ДЭТК. Аналогичный результат

был получен в опытах с воздействием Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК и Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом + N-метил-D,L-глюкаминдителиокарбамат соответственно на бактерии *Escherichia coli* и опухолевые клетки MCF-7 [2, 3]. Высвобождавшиеся при этом из Б-ДНКЖ-GSH и Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом катионы нитрозония оказывали на бактериальные и опухолевые клетки резко выраженное цитотоксическое действие.

В связи с этим есть основание предполагать, что обнаруженное нашей группой подавление коронавирусной инфекции у больных COVID-19 высокодозовой ингаляцией газообразного оксида азота (NO) с концентрацией не менее 1000 ppm [4] могло быть также обусловлено превращением в организме человека нейтральных молекул NO в катионы нитрозония, которые и обеспечивали лечение этих больных. Вопрос – каким образом могло осуществляться такое превращение – будет

Сокращения: ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, Б-ДНКЖ – биядерная форма динитрозильных комплексов железа, Б-ДНКЖ-GSH – биядерные динитрозильные комплексы железа с глутатионом, ДЭТК – диэтилдитиокарбамат.

обсужден далее в настоящей публикации. В ней мы попытались также проверить, не оказывает ингаляция газообразного NO, сопряженная с появлением в организме человека катионов нитрозония, благоприятное действие на пациентов с постковидным синдромом, диабетом и ВИЧ-инфекцией. Полученные результаты показывают, что этот эффект действительно имеет место.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Техническое обеспечение. В исследованиях были использованы аппараты «Скальпель-коагулятор-стимулятор воздушно-плазменный СКС-ВП/NO-01 «ПЛАЗОН»» (ТУ 9444-001-96571701-2007, зав. №№ 348 и 382), произведенные ООО «ЦВТМ при МГТУ имени Н.Э. Баумана» (Москва, Россия) в 2012 и 2014 гг. соответственно, регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00583 от 21 марта 2012 г., снабженные специально разработанными ингаляционными манипуляторами — плазмохимическими генераторами газообразного оксида азота из атмосферного воздуха. Описание конструкции манипуляторов и основные физико-химические параметры формируемых ими NO-содержащих газовых потоков приведены в [4].

Исследования микроциркуляции крови у добровольцев с различными патологиями, оцениваемой величиной показателя микроциркуляции в относительных перфузионных единицах, было проведено методом лазерной доплеровской флоуметрии (длина волны излучения 1064 нм) с использованием лазерного доплеровского флоуметра ЛАЗМА-МЦ1 производства ООО НПП «ЛАЗМА» (Москва, Россия), датчик прибора размещался на среднем пальце левой руки. Прибор позволяет измерять показатель микроциркуляции в диапазоне 5–50 перфузионных единиц с пределами допускаемого отклонения $\pm 20\%$.

Изучение динамики образования в крови метгемоглобина при различных параметрах ингаляции выполнены на здоровых добровольцах — соавторах данной статьи А.В.П., А.Б.В. и Н.А.Ш. — с использованием пульсоксиметра RAD-57 производства компании Masimo Corp. (США), позволяющего измерять содержание в крови метгемоглобина в диапазоне 0–15% с погрешностью 0.5%. Датчик пульсоксиметра также размещался на среднем пальце левой руки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Благоприятное действие высокодозовой ингаляции газообразного NO при постковидном синдроме. Клинические исследования, проведенные амбулаторно у трех пациентов с различными проявлениями постковидного синдрома, подвергнутых с их добровольного информированного согласия

воздействию ингаляционного оксида азота, дали следующие результаты.

Пример 1. Пациентка Д., 67 лет. Диагноз: последствия перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 тяжелой степени тяжести, внебольничная двухсторонняя бронхопневмония тяжелой степени тяжести, КТ-3-4 (70% поражения легких), пневмомедиастинум, дыхательная недостаточность I–III степени, ишемическая болезнь сердца, кардиосклероз атеросклеротический, гипертоническая болезнь 3 степени, риск 4, НК IIА, ФК2, сахарный диабет 2 типа впервые выявленный. Спустя три месяца после стационарного лечения и реабилитации обратилась за помощью с жалобами на постковидный синдром, характеризующийся общей слабостью, хронической дыхательной недостаточностью, одышкой при нагрузке, депрессией, плохом сне и аппетите, повышением артериального давления, тахикардией, плохим качестве жизни. Принимала назначенные при выписке из стационара препараты без выраженной положительной динамики. На момент обращения пациентки по данным КТ легких: признаки остаточных изменений после перенесенной двусторонней полисегментарной пневмонии с исходом в пневмофиброз. Множественные бронхоэктазы, легочная гипертензия, аортокальциноз. Очаговые изменения в легких, вероятно вторичного характера.

С добровольного согласия пациентки проведены сеансы высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота по предложенной нами методике: с помощью аппарата «ПЛАЗОН», снабженного ингаляционным манипулятором, в обе ноздри больной при ее спонтанном дыхании с расстояния 8 см при концентрации оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин один раз в день проводилась ингаляционная терапия и дополнительно кожная поверхность спины в проекционной зоне легких, спереди область легких и сердца обрабатывались высокодозовыми потоками оксида азота с расстояния 8 см с концентрацией 1100 ppm в течение 5 мин один раз в день всего в течение 10 суток. При этом пациентка никаких других медицинских препаратов не получала. С первых сеансов проводимого лечения отметила значительное улучшение дыхательной функции, сатурация во время сеанса поднялась с 86 до 93%, улучшилось психологическое состояние. Отмечает, что в разы улучшилось качество жизни, стала проходить одышка, появилась жизненная активность, начала увеличивать физическую нагрузку, которую ранее невозможно было выполнить, стабилизировались сон и аппетит. К большому удивлению и радости пациентки также стабилизировался пульс и артериальное давление с 170/100 до 135/95 мм рт. ст., через месяц давление нормализовалось без приема гипотензивных средств. Через месяц курс высокодозовой терапии газооб-

разного оксида азота повторили с отличными результатами и выраженной положительной динамикой. Отдаленные результаты отслежены на протяжении шести месяцев: качество жизни хорошее, витальные функции стабильные.

Пример 2. Пациентка Б., 32 года. Диагноз: ранний климакс. Жалобы на отсутствие месячных на протяжении шести месяцев, исчезновение либидо, появившуюся депрессию, снижение жизненной активности, прекращение продукции яйцеклеток яичниками по данным гинекологических, инструментальных и лабораторных исследований, наличие высокого показателя фолликулостимулирующего гормона — 120 мМЕ/мл, подтверждающего ранний климакс. Безуспешное лечение у гинекологов на протяжении пяти месяцев. Анамнестически пациентка ранее была здорова, вредных привычек нет, оперативных вмешательств не было, хронических заболеваний не отмечалось. С 2020 по 2021 гг. прививалась двухкомпонентной вакциной от COVID-19, трижды болела COVID-19 средней и легкой степени тяжести, после чего развился ранний климакс, диагностированный гинекологами.

С добровольного согласия пациентки проведены сеансы высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота по предложенной нами методике: с помощью аппарата «ПЛАЗОН», снабженным ингаляционным манипулятором, в обе ноздри больной при ее спонтанном дыхании с расстояния 8 см при концентрации оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин один раз в день проводилась ингаляционная терапия, при этом дополнительно кожная поверхность низа живота в проекционной зоне яичников и сзади в крестцово-копчиковой зоне обрабатывалась высокодозовыми потоками оксида азота с расстояния 8 см с концентрацией 1100 ppm в течение 5 мин один раз в день в течение 10 суток. Причинно-следственная связь проводимой процедуры ярко выражена и очевидна, учитывая положительные отзывы самой пациентки и полученные результаты, при этом никаких медицинских препаратов пациентка не получала. С первых сеансов проводимого лечения отметила улучшение психологического состояния, появилась жизненная активность, стабилизировались сон и аппетит. К большой радости пациентки после проведенного курса лечения через месяц появились стабильные месячные, восстановилось либидо. По данным УЗИ через два месяца обнаружены яйцеклетки в яичниках, биохимическое подтверждение восстановления функции яичников характеризовалось снижением показателя фолликулостимулирующего гормона до 40 мМЕ/мл, а затем и до 12 мМЕ/мл, нормализацией уровня половых гормонов. К большому удивлению гинекологов диагноз ранний климакс был снят. Отдаленные результаты отслежены на протяжении шести ме-

сяцев: исход благоприятный, месячные стабильные, жалоб нет, инструментально и лабораторно гинекологическая патология не выявлена.

Пример 3. Пациентка К., 67 лет. Диагноз: двусторонний ограниченный пневмоплеврофиброз, хронический бронхит, саркоидоз, бронхиолит, хронический ринофарингит, постковидный синдром.

Жалобы на одышку, свистящий звук на выдохе, хронический кашель, осиплость голоса, синдром хронической усталости, повышение артериального давления, плохой сон, депрессию, периодические сильные головные боли, потерю веса.

Считает себя больной с 2018 г., когда на фоне полного благополучия стала периодически терять сознание, появилась одышка. В результате обследования легких выявлен ограниченный пневмоплеврофиброз и саркоидоз. Выполняла назначенное лечение — без эффекта. В октябре 2021 г. болела COVID-19 средней степени тяжести. Рентгенологически диагностирована идиопатическая интерстициальная пневмония. Лечилась самостоятельно. Прививку от COVID-19 не делала. В апреле 2022 г. повторно болела COVID-19 средней степени тяжести. Лечилась самостоятельно. В дальнейшем состояние ухудшалось, сохранялась длительно повышенная температура, одышка, назначенное врачами лечение (курс оксигенобаротерапии) не улучшило общее состояние.

С добровольного согласия пациентки проведены сеансы высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота по предложенной нами методике: с помощью аппарата «ПЛАЗОН», снабженным ингаляционным манипулятором, в обе ноздри больной при ее спонтанном дыхании с расстояния 8 см при концентрации оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин один раз в день проводилась ингаляционная терапия и в течение 1 мин обрабатывалась оксидом азота через рот задняя стенка глотки, при этом дополнительно кожная поверхность впереди и сзади в проекционной зоне легких обрабатывалась высокодозовыми потоками оксида азота с расстояния 8 см при концентрации 1100 ppm в течение 5 мин один раз в день всего в течение шести суток. При этом других медицинских препаратов пациентка не получала. С первых сеансов проводимого лечения отметила улучшение дыхательной функции, стала глубже дышать, прошел свистящий звук на выдохе, и самое удивительное для пациентки — уже с первого сеанса прошел кашель, который не проходил более трех месяцев, сразу прошла осиплость голоса. Также улучшилось психологическое состояние, увеличился прилив энергии, ушла хроническая усталость, нормализовалось артериальное давление, улучшился сон, в целом значительно улучшилось качество жизни. Прошла одышка при физической нагрузке и подъеме по лестнице на

третий этаж, чего ранее не было. По данным измерений пульсоксиметром сатурация у пациентки увеличилась с 93 до 96–98%, пульс нормализовался. Качество жизни хорошее, витальные функции стабильные. Биохимические анализы в пределах нормы. Отдаленные результаты отслежены на протяжении двух месяцев: исход благоприятный, сохраняется достигнутая положительная динамика, пациентка регулярно выполняет умеренные физические нагрузки, проходит пешком от 8 до 10 км в день без одышки. Запланировано дальнейшее обследование, компьютерная томография легких и повторный курс ингаляционной терапии высокодозовыми потоками оксида азота.

Благоприятное действие высокодозовой ингаляции газообразного NO при диабете. Пациентка К., 56 лет. Диагноз: сахарный диабет 2 типа (на протяжении 12 лет), синдром диабетической стопы нейроишемической формы, состояние после удаления 4, 5 пальцев правой стопы. Жалобы на синдром хронической усталости, гипертоническую болезнь II ст., периодические боли в нижних конечностях, похолодание стоп. Контроль уровня гликемии с помощью таблетированных медицинских препаратов и инъекций инсулина. Гликированный гемоглобин до проводимого нами лечения – 8.4%. Больная находится под контролем эндокринолога и принимает периодическое стационарное лечение в хирургическом отделении «диабетическая стопа».

С добровольного согласия пациентки проведены сеансы высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота по предложенной нами методике: с помощью аппарата «ПЛАЗОН», снабженного ингаляционным манипулятором, в обе ноздри больной при ее спонтанном дыхании с расстояния 8 см при концентрации оксида азота 1100 ppm в течение 5 мин один раз в день проводилась ингаляционная терапия, при этом дополнительно кожная поверхность спины в проекционной зоне поджелудочной железы и спереди в области печени обрабатывалась высокодозовыми потоками оксида азота с расстояния 8 см с концентрацией 1100 ppm в течение 5 мин один раз в день всего в течение десяти суток. При этом пациентка продолжала выполнять назначения эндокринолога по приему сахароснижающих препаратов под контролем уровня глюкозы крови. Никаких других медицинских препаратов пациентка не получала. С первых сеансов проводимого лечения отметила улучшение психологического состояния, прилив энергии, ушла хроническая усталость, нормализовалось артериальное давление, улучшилось качество жизни, стабилизировался уровень глюкозы крови. Со слов пациентки возникло ощущение омоложения организма. По данным биохимических исследований после проведенного курса лечения снизился гликирован-

ный гемоглобин до 5.0%, нормализовались показатели гликемического профиля практически до нормогликемии. Качество жизни хорошее, витальные функции стабильные. Отдаленные результаты отслежены на протяжении шести месяцев: исход благоприятный, нормогликемия с коррекцией диетой и сахароснижающими препаратами.

Благоприятное действие высокодозовой ингаляции газообразного NO при ВИЧ-инфекции. Пациент Х., 32 года. Диагноз: ВИЧ-инфекция, занесенная при выполнении стоматологического лечения. Антиретровирусная терапия с 25 марта 2019 г. Самочувствие нормальное, патологических изменений не наблюдается. Результаты исследований в апреле 2022 г.: количество лимфоцитов и CD4+ лимфоцитов (Т-хелперов) в 1 мкл крови 2500 и 620 соответственно, вирусная нагрузка 438 копий РНК ВИЧ в 1 мл плазмы. Пациенту предоставлен аппарат «ПЛАЗОН» с ингаляционным манипулятором для домашнего применения. В августе 2022 г. – первый курс высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота: 1100 ppm, 6 мин, один или два раза в день в течение трех недель. Результаты исследований в сентябре 2022 г.: количество лимфоцитов и Т-хелперов в 1 мкл крови 2400 и 650 соответственно, вирусная нагрузка – менее 40 копий РНК ВИЧ в 1 мл плазмы (снижение более чем 10 раз). Побочные эффекты не зафиксированы. В октябре 2022 г. – второй курс высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота: 1100 ppm, 6 мин, один или два раза в день в течение четырех недель. Результат количественного ПЦР исследования на ВИЧ в ноябре 2022 г. – копии РНК ВИЧ в крови не обнаружены.

Полученные результаты анализов представлены на рис. 1.

Высокодозовая NO ингаляция не влияет на гемодинамические показатели человека. Исследование влияния высокодозовой NO-ингаляции на гемодинамические показатели добровольцев, а именно на микроциркуляцию крови (пациенты с различными патологиями) и динамику образования метгемоглобина показало, что не происходило никакого изменения микроциркуляции после пятиминутной NO-ингаляции при спонтанном дыхании добровольцев через нос (рис. 2), несмотря на поступление молекулярного оксида азота в их кровь.

О последнем можно было судить по образованию в крови добровольцев метгемоглобина, являющегося биологическим маркером оксида азота, в зависимости от продолжительности ингаляции и содержания NO в области дыхания (рис. 3 и 4).

Демонстрируемое на рис. 3 и 4 снижение уровня метгемоглобина, последующее после введения оксида азота, было обусловлено восстановлением

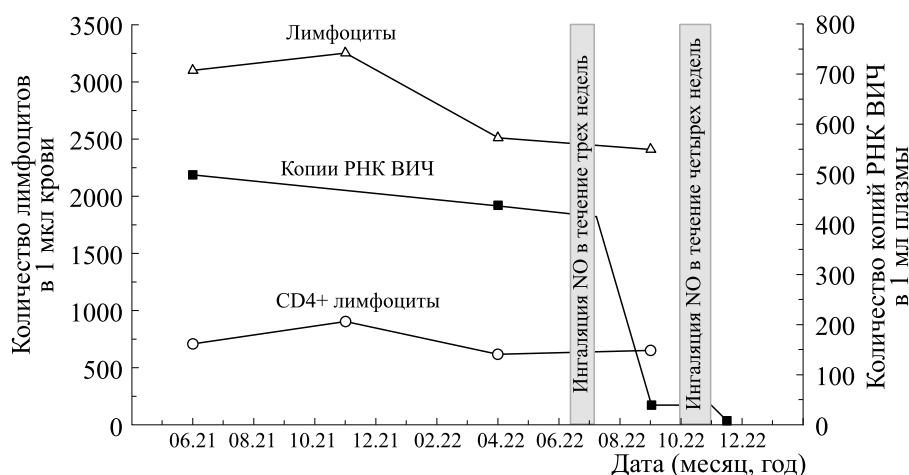


Рис. 1. Количество лимфоцитов и копий РНК вируса в крови пациента X. до и после двух курсов высокодозовой ингаляции газообразного оксида азота: $C_{NO} \sim 1100$ ppm, $\tau_{инг} = 6$ мин, один или два раза в сутки.

метгемоглобина в гемоглобин под действием цитохром-b5-редуктазы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показывает, что высокодозовая ингаляция газообразного оксида азота пациентов с различными патологиями — постковидным синдромом, сахарным диабетом или ВИЧ-инфекцией — приводит к существенному ослаблению этих патологий. При этом вряд ли этот эффект мог быть обусловлен нейтральными молекулами NO, поступающими в кровь из легких. Дело в том, что при NO-ингаляции не обнаруживалось ни эффекта системной гипотензии [5], ни какого-либо изменения микроциркуляции (настоящая работа), которые должны были иметь место в организме животных и человека в результате взаимодействия нейтральных молекул NO с мишенью их биологического действия — растворимой гуанилатциклазой [6]. Во что же могли превращаться эти молекулы в тканях животных и человека? Первое предположение — значительная часть молекул NO, связываясь в эритроцитах с гемовой группой гемоглобина, могла окисляться кислородом до нитрита/нитрата с одновременным превращением гемоглобина в метгемоглобин [7]. Однако ЭПР-исследования крови крыс при их ингаляции газообразным NO при концентрации 400 ppm в течение 1 ч показали, что в крови этих животных устанавливается стационарная концентрация нитрозильных комплексов гемоглобина в концентрации 6 мкмоль на кг веса животного [5]. При последующей передаче NO в такой концентрации из этих комплексов на стенки кровеносных сосудов ее было бы вполне достаточно для заметного снижения си-

стемного артериального давления в организме крыс. В пользу этого предположения свидетельствует следующий факт. Как было показано в работе [8], при внутривенном введении крысам в качестве донора NO Б-ДНКЖ-GSH в концентрации всего 2 мкмоль на кг веса животного артериальное давление у крыс снижалось более чем на 60%. Таким образом, отсутствие гипотензивного действия NO при его высокодозовом (не менее 1000 ppm) ингаляционном введении в организм животных и человека вряд ли могло быть обусловлено исчезновением NO в результате его взаимодействия с гемоглобином.

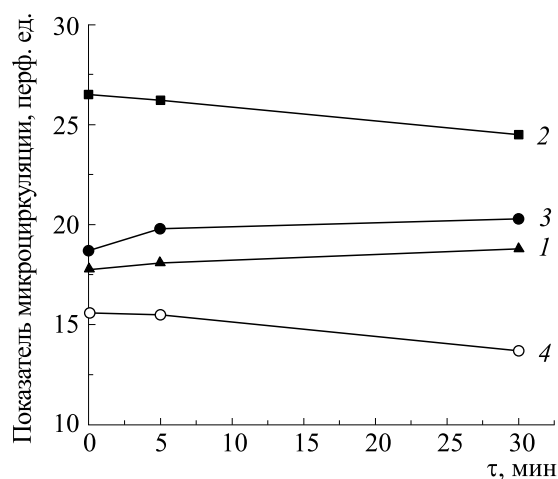


Рис. 2. Показатель микроциркуляции крови до и после пятиминутной ингаляции оксида азота (1000–1100 ppm) у пациентов с различными заболеваниями: 1 — 55 лет, условно здоровый; 2 — 67 лет, постковидный синдром; 3 — 56 лет, диабет 2 типа; 4 — 25 лет, ревматоидный артрит, вторая стадия.

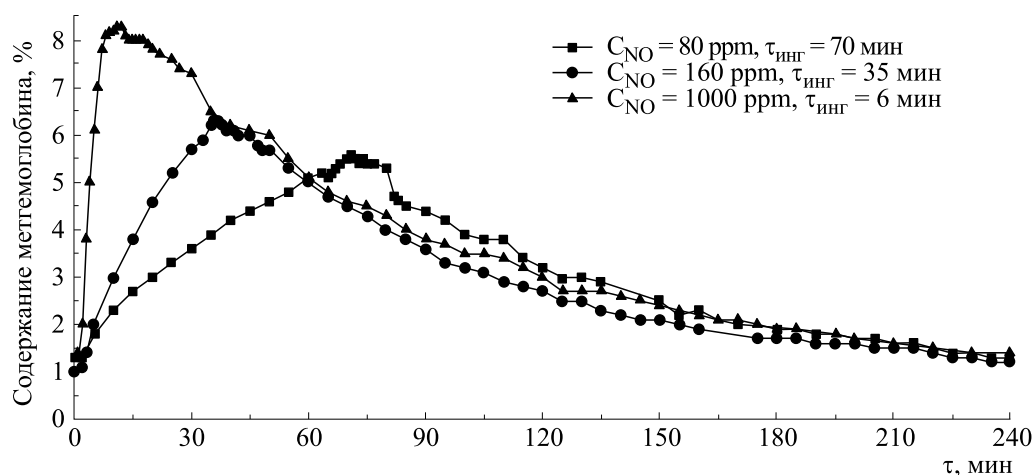


Рис. 3. Динамика изменения содержания в крови добровольца метгемоглобина в зависимости от времени ингаляции $\tau_{\text{инг}}$ и содержания оксида азота C_{NO} в области дыхания.

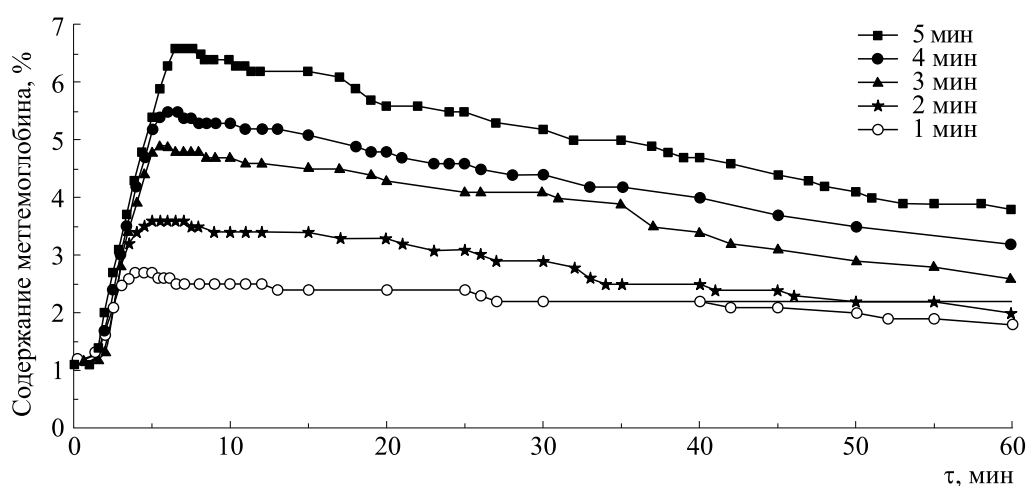
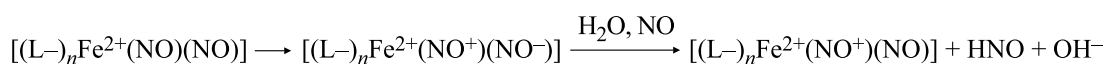


Рис. 4. Динамика изменения содержания в крови добровольца метгемоглобина в зависимости от времени ингаляции $\tau_{\text{инг}}$ при содержании оксида азота с области дыхания $C_{\text{NO}} \sim 1000$ ppm.

Остается другое предположение, высказанное в начале статьи: что в организме животных и человека газообразный оксид азота при его ингаляционном введении мог превращаться в катионы нитрозония (NO^+), не способные взаимодействовать с растворимой гуанилатциклазой и тем самым не способные вызывать расслабление сосудов, но способные подавлять репликацию вирусов и, возможно, улучшать состояние пациентов при постковидном синдроме, диабете и ВИЧ-инфекции.

В соответствии с представлениями о приведенном на схеме 1 механизме образования динитрозильных комплексов железа как с тиолсодержащими (RS^-), так и с не содержащими тиол (L^-) лигандами [9, 11], превращение NO в NO^+ при NO -ингаляции могло происходить в результате реакции диспропорционирования молекул NO при их попарном связывании с ионами двухвалентного железа, приводящем к появлению в живых организмах соответствующих динитрозильных комплексов железа:



Предполагается, что в результате диспропорционирования, т.е. взаимного одноэлектронного окисления-восстановления молекул NO, в лигандном окружении железа появляются катион нитрозония NO^+ и анион нитроксила NO^- . Последний, связываясь с протоном, превращается в молекулу нитроксила, выходящую из комплекса с последующим включением в освободившееся место третьей молекулы NO. Что касается катиона нитрозония, он может связаться с какими-либо нуклеофилами, например, с имеющимися в крови или межклеточной жидкости анионами хлора с образованием нитрозил-хлорида Cl^-NO^+ , способным переносить катион нитрозония на мишени его биологического действия, например, на тиоловые группы белков с образованием соответствующих S-нитрозотиолов [12].

При последующем включении второй молекулы NO в образовавшийся после выхода из комплекса катиона NO^+ моонитрозильный комплекс железа мог начинаться новый цикл реакции диспропорционирования молекул NO с высвобождением образующихся ионов NO^+ и NO^- и так далее с появлением в организме человека и животных значительного количества катионов нитрозония.

Таким образом, отсутствие ожидавшегося гипотензивного действия газообразного NO при его ингаляции на организм человека и животных могло быть обусловлено трансформацией молекул NO на ионах Fe^{2+} (как на своеобразной «наковальне») в ионы NO^+ и NO^- с последующим негативным действием катионов нитрозония на соответствующие тиолсодержащие белки.

Естественно, возникает вопрос о происхождении железа, включающегося в организм человека и животных в процессах, приведенные на схеме 1. В крови в этих процессах могло участвовать железо, включенное в трансферрин, восстанавливавшееся до двухвалентного состояния оксидом азота по механизму восстановительного нитрозирования [13] с последующим образованием белок-связанных динитрозильных комплексов железа с включением в эти комплексы в качестве лигандов аминокислотных компонентов трансферрина, не содержащих тиоловых групп. В тканях органов в образование динитрозильных комплексов железа могло включаться внутриклеточное слабосвязанное («свободное») железо, имеющееся во всех клетках и тканях [14].

Сказанное выше касается системного артериального давления, т.е. давления в большом круге кровообращения, в стенки сосудов которого, как мы полагаем, при NO-ингаляции из крови поступают не молекулы NO, а катионы нитрозония, не способные вызывать расслабление сосудов. Иная ситуация должна реализоваться для малого круга кровообращения, т.е. артериального давления в

легких. В этом органе стенки кровеносных сосудов подвергаются действию непосредственно ингалируемой газовой фазы, содержащей молекулы NO, а не катионы нитрозония. Это и приводит к тому, что в легких, т.е. в малом круге кровообращения, при NO-ингаляции имеет место отчетливо регистрируемое различными исследователями снижение артериального давления, т.е. эффект гипотензии [15, 16]. Аналогичная ситуация имела место в опытах *in vitro* на изолированных сосудах при действии на них газообразного NO: наблюдавшееся в этих опытах расслабление сосудов полностью снималось в присутствии ингибиторов мишени молекулярного NO – растворимой гуанилатциклазы [17].

Как уже предполагалось в работах [1, 18], наиболее вероятной мишенью катионов нитрозония, вызывавших подавление коронавирусной инфекции, могли выступать тиоловые группы жизненно важных для репликации коронавируса протеаз хозяина и вируса. Не исключено, что те же белки выступают в качестве основной мишени катионов нитрозония также и при ингаляции газообразным NO пациента с ВИЧ, что и приводило к ослаблению этой инфекции. Возможно, что дезактивация ВИЧ происходила не только в крови, но и в тканевых резервуарах – хранилищах вируса (санктуариях), формируемых им в основном в тканях центральной нервной системы и в лимфоидной ткани кишечника [19].

Что касается благоприятного действия NO-ингаляции на постковидный синдром, обусловленный, как полагают многие авторы [20–22] ухудшением состояния эндотелия сосудов, не исключено, что в этом случае оно могло определяться S-нитрозирующим воздействием NO^+ на тиолсодержащие белки, участвующими в процессах апоптоза [23, 24]. Подавление функциональной активности этих белков в результате этого воздействия могло блокировать гибель клеток и тканей по апоптотическому механизму [24], обеспечивая тем самым возможность функционирования разнообразных метаболических процессов, способствующих усилению жизнедеятельности клеток и тканей, т.е. их выживанию.

Аналогичный механизм подавления склонности клеток и тканей к апоптозу мог быть также причиной улучшения состояния больной диабетом при воздействии на нее NO-ингаляции.

В заключение следует отметить, что включение тиолсодержащих лигандов в образующиеся в крови и тканях динитрозильные комплексы железа должно приводить к стабилизации этих комплексов и, более того, обеспечивать высвобождение из них не только катионов нитрозония, а и образующихся при их одноэлектронном восстановлении тиолами молекул NO [9–11], способных при связывании с растворимой гуанилатциклазой вызывать расслабление сосудов и тем са-

мым гипотензию [6]. Обнаружение этого эффекта в экспериментах с высокодозовой NO-ингаляцией животных могло бы стать доказательством предполагаемого в настоящей статье механизма благоприятного действия ингаляции газообразного оксида азота на человека и животных. Такого рода проверку мы предполагаем провести в ближайшее время.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в инициативном порядке.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Процедуры, выполненные в работе с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. В. Шиповалов, А. Ф. Ванин, О. В. Пьянков и др., Биофизика, **67** (5), 969 (2022).
2. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys., **79**, 93 (2021).
3. А. Ф. Ванин, Д. И. Телегина, В. Д. Микоян и др., Биофизика, **67** (5), 938 (2022).
4. Е. В. Печёнкин, А. В. Коврижкин, А. В. Пекшев и др., Биофизика, **67** (6), 1251 (2022).
5. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., Биофизика, **66** (1), 183 (2021).
6. L. J. Ignarro, Pharmacol. Toxicol., **67**, 1 (1990).
7. P. C. Ford, Inorg. Chem., **49**, 6226 (2010).
8. A. A. Timoshin, V. L. Lakomkin, A. A. Abramov, et al., Eur. J. Pharmacol., **765**, 525 (2015).
9. A. F. Vanin, Cell Biochem. Biophys., **77**, 279 (2019).
10. А. Ф. Ванин, Биофизика, **65**, 4, 421 (2020).
11. A. F. Vanin, Appl. Magn. Reson., **51**, 851 (2020).
12. V. Yu. Titov and A. N. Osipov, Redox Rep., **22**, 2 (2017).
13. T. H. Han, J. M. Fucuto, and J. C. Liao, Nitric Oxide Biol. Chem., **10**, 74 (2004).
14. Q. Li, C. Li, H. K. Mahtani, et al., J. Biol. Chem., **289**, 19917 (2014).
15. A. S. Hurtsen, I. Z. Nilsson, E. M. Dogan, et al., Drug Design, Development & Therapy, **14**, 635 (2020).
16. F. Blasina, L. Vaamonde, F. Silvera, et al., Pulmonary Pharmacol. Ther., **54**, 68 (2019).
17. Yu. P. Vedernikov, P. I. Mordvintsev, I. V. Malenkova, et al., Eur. J. Pharmacol., **211**, 313 (1992).
18. А. Ф. Ванин, Биофизика, **65**, 818 (2020).
19. S. Castro-Gonzalez, M. Colomer-Lluch, and R. Serra-Moreno, AIDS Research and Human Retroviruses, **34**, 9, 739 (2018).
20. Н. Н. Петрищев, О. В. Халепо, Ю. А. Вавиленкова и др., Региональное кровообращение и микроциркуляция, **19**, 3 (2020).
21. М. Ю. Мартынов, А. И. Боголепов и А. Н. Ясмано-ва, Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, **121**, 93 (2021).
22. L. Perico, A. Benigni, F. Casivaghi, et al., Nat. Rev. Nephrol., **17**, 46 (2021).
23. A. K. V. Iyer, Y. Rojansakul, and N. Azad, Nitric Oxide Biol. Chem., **42**, 9 (2014).
24. Y. M. Kim, H. T. Chung, R. L. Symmons, et al., J. Biol. Chem., **275**, 10954 (2000).

Therapeutic Effects of High-Dose Inhaled Nitric Oxide Gas against Post-COVID Syndrome, Diabetes or AIDS

A.F. Vanin*, A.V. Pekshev**, E.V. Pechyonkin***, A.B. Vagapov**, and N.A. Sharapov**

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

**N.E. Bauman Moscow State Technical University, 2-ya Baumanskaya ul. 5/1, Moscow, 105005 Russia

***Stavropol State Medical University, ul. Mira 310, Stavropol, 355017 Russia

A therapeutic effect of high-dose nitric oxide gas inhalation (more than 1000 ppm) on patients with post-COVID syndrome, diabetes or AIDS is shown. It has been proposed that nitrosonium cations (NO^+), derivatives of nitric oxide gas, the emergence of which in the blood or organ tissues of patients is related to disproportion reaction of NO molecules, forming a co-ordinate bond with the Fe^{2+} ion, carried by transferrin or entered into the labile (free) iron pool may act as a therapeutic agent. It is quite probable that treatment of HIV infection (as well as the earlier revealed effect of NO gas on the patients with COVID-19) could be provided by the effects of S-nitrosylation of NO^+ cations on thiol groups of viral proteases and host proteins. A beneficial effect of NO^+ cations which emerged in the reaction of NO gas molecules in patients with post-COVID syndrome or diabetes can be also associated with an inhibitory effect of these cations on the thiol-containing proteins that are involved in apoptosis.

Keywords: nitric oxide inhalation, dinitrosyl iron complexes, post-COVID syndrome, diabetes, HIV-infection, "PLASON"

О ВОЗМОЖНОСТИ НЕИНВАЗИВНОГО ИЗУЧЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АВТОНОМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. В.П. Нестеров*, А.И. Бурдыгин*, К.Б. Иванов*, С.М. Коротков*,
К.В. Соболев*, С.И. Сороко*, И.В. Шемарова*

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
просп. Тореза, 44, Санкт-Петербург, 194223, Россия

#E-mail: nesterov@iephb.ru

Поступила в редакцию 02.09.2022 г.

После доработки 26.09.2022 г.

Принята к публикации 27.09.2022 г.

Оценена возможность применения разработанного метода артериальной пьезопульсометрии для неинвазивного изучения особенностей функционирования периферических механизмов автономной регуляции сердечно-сосудистой системы у пациентов, отличающихся по возрасту и состоянию своего здоровья. Акцентируется значимость определения variability параметров пульсовых волн артериального давления крови в качестве меры оценки участия и роли компонентов нейроэндокринного (симпато-адреналового) эфферентного звена в формировании быстрой и хорошо регулируемой ответной реакции системной гемодинамики, использующей в качестве эффекторов миоциты левого желудочка сердца. Обсуждается целесообразность персонализированного использования метода артериальной пьезопульсометрии при пульсометрической диагностике функционального состояния и характера автономной регуляции функций сердечно-сосудистой системы у пациентов для раннего выявления патологических состояний и нарушений деятельности периферических механизмов, обеспечивающих адекватное кровоснабжение у человека.

Ключевые слова: автономная регуляция сердца, variability, спектральный анализ.

DOI: 10.31857/S0006302922060179, EDN: OBNEKE

Заболевания сердечно-сосудистой системы (ССС) находятся на первом месте среди причин смертности населения в развитых странах мира. При естественном старении организма человека в условиях воздействия на него патофизиологических факторов функциональное состояние этой системы постепенно ухудшается. Важнейшую роль в жизнеобеспечении его организма играют механизмы автономной (вегетативной и эндокринной) регуляции ССС. Ухудшение нормаль-

ного функционирования этих механизмов нарушает соответствие системного кровотока потребностям организма в кислороде и питательных веществах и снижает сложившуюся в процессе эволюции человека способность его функциональных систем к саморегуляции и адаптации к непрерывно изменяющимся условиям среды. Поэтому еще со времен древней китайской медицины большое внимание уделялось пульсовой диагностике как основе неинвазивного контроля за состоянием здоровья человека при его лечении. С этой целью в мире постоянно совершенствуются и разрабатываются новые способы функциональной диагностики, выявляющие патофизиологические изменения ССС на ранних стадиях развития, еще в отсутствие клинической картины, когда возможна наиболее эффективная терапия.

Методом, сочетающим в себе простоту и точность неинвазивной оценки получаемой информации, является компьютерная пульсометрическая диагностика ССС. Среди вариантов этого метода наиболее распространенными стали спо-

Сокращения: ССС — сердечно-сосудистая система, ПАДК — пульсовое артериальное давление крови, ЛЖС — левый желудочек сердца, V_{pp} — скорость роста пульсового давления крови, АПП — артериальная пьезопульсометрия, АДК — артериальное давление крови, V_{maxPP} — максимальная скорость прироста пульсового давления крови, RW — отраженная волна, PPn — нормализованное пульсовое давление крови, TNN — длительность кардицикла, AIx — индекс аугментации, HF — высокочастотный диапазон, LF — низкочастотный диапазон, ULF — ультранизкочастотный диапазон, ГК — гуморальные катехоламины, ВНС — вегетативная нервная система, $*TP_r$ — спектральная мощность колебаний параметров волны ПАДК, ЧСС — частота сердечных сокращений.

собы, использующие регистрацию колебаний объема пульсовых волн артериального давления крови (ПАДК) – «объемная сфигмография» [1]. Плетизмографический датчик устанавливается на поверхности пульсирующего участка тела над близко прилегающей артерией. Однако регистрируемый при этом сигнал включает дополнительную составляющую, обусловленную колебаниями капиллярного и венозного кровенаполнения, а также неуправляемыми изменениями объема структурных компонентов тканей, находящихся между пульсирующей артерией и прижатым датчиком. Это сглаживает контур графика волны ПАДК, что снижает точность анализа и информативность метода. Литературные и наши собственные данные показали перспективность использования для такого анализа технологии дифференциальной сфигмографии [2] на основе пьезодатчиков, что обеспечивало бы более высокую точность диагностики по сравнению с объемной сфигмографией. Исходя из этого, нами были разработаны новые пульсометрические способы (Патенты РФ на изобретения, 2006–2020 гг.; руководитель и основной разработчик – д.б.н. В.П. Нестеров) неинвазивного изучения функционального состояния ССС и характера ее регуляции у человека. Важным постулатом для нас при этом было то, что нагнетательная функция сердца, обеспечивающая адекватное кровоснабжение органов и тканей у пациента, определяется не только центральным нервным контролем, но и зависит от характера регуляции сократительной способности и активности мышечных эффекторов ССС – в основном кардиомиоцитов левого желудочка сердца (ЛЖС). При этом учитывали, что сократительные характеристики мышечных эффекторов не только отражают особенности возбуждения со стороны эфферентного звена системы автономной (нейрогуморальной) регуляции, но и сами количественно отражаются в величинах функциональных параметров пульсовых волн артериального давления крови. Существенным являлось и то, что дифференциальная функция скорости роста пульсового давления крови (V_{pp}) от аргумента t не зависела от неуправляемых колебаний объема тканей под датчиком. Эти и другие представления легли в основу нашего выбора дифференциальной сфигмографии как перспективного аналитического способа, на основе которого можно было разработать новую версию неинвазивного метода для оценки *in vivo* функциональных характеристик кардиомиоцитов ЛЖС, а также выявления специфики формирования активности периферических механизмов автономной регуляции мышечных эффекторов ССС у человека. К настоящему моменту времени завершен определенный этап НИОКР, накоплен опыт проведения обследования разных по возрасту и состоянию здоровья па-

циентов, полученные результаты по частям опубликованы в центральных научных журналах и представлены на разных форумах. Возникла необходимость собрать их вместе и в виде новых биотехнологических наработок изложить их в разделе «Материалы и методы» соответствующего научного журнала, акцентируя новые диагностические возможности метода артериальной пьезопульсометрии (АПП). Такие исследования открывали перспективу неинвазивного изучения физиологических механизмов, участвующих в обеспечении оптимального и устойчивого динамического равновесия кровоснабжения органов и тканей обследуемых лиц. В данной работе рассматриваются и анализируются основные результаты, полученные в последнее время нашим коллективом в ходе разработки инновационного метода АПП с целью неинвазивного анализа периферических механизмов автономной регуляции насосной (инотропной) функции ССС у человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано более 140 условно здоровых (без патологии ССС в анамнезе) мужчин и женщин в возрасте 18–86 лет в нормальных условиях физического и эмоционального покоя. Было выполнено более 220 сеансов спектрального анализа, в каждом из которых регистрация длилась (в основном) от 5 до 10 мин после предварительного отдыха. При анализе параметров волны ПАДК оценивали и функциональное состояние ССС, и активность периферических механизмов ее автономной регуляции у пациентов. При таком обследовании в одну сессию регистрации анализировалось до 300–800 пульсовых волн артериального давления крови (АДК), что обеспечивало необходимую статистическую точность усредненного результата спектрального анализа. Результаты индивидуальных анализов объединяли в соответствующие возрастные группы и в них определяли средние значения для выявления возрастной или гендерной специфики анализируемых параметров.

В основе метода АПП лежат разработанные нами компьютерный комплекс дифференциальной сфигмографии и соответствующие алгоритмы, способы и устройства. Аппаратную базу этого комплекса составляют два синхронно функционирующих пьезокерамических датчика и адаптер-преобразователь, осуществляющий интерфейс между ними и персональным компьютером. Пьезодатчики непосредственно преобразовывают локальные механические толчки пульсирующих артерий в электрические сигналы, которые регистрируются графически в виде кривых скорости пульсового изменения величины АДК в прилегающих к датчикам артериальных сосудах.

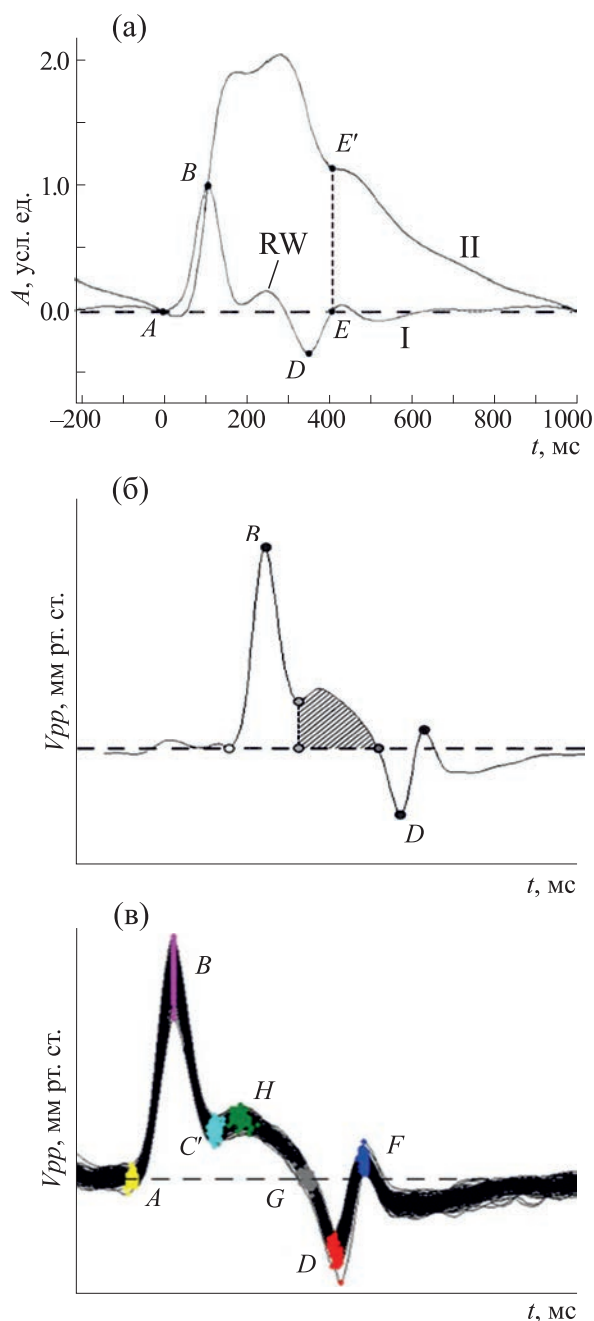


Рис. 1. (а) — График дифференциальной пьезопульсограммы (I) и соответствующая сфигмограмма (II), зарегистрированные с *a. radialis* испытуемого М. (82 года); точка *E* — момент закрытия аортального клапана. По оси ординат — амплитуда волн ПАДК, усл. ед. (б) — График усредненного кардиоцикла с расчетными точками, заштрихованная часть — накладка отраженной волны *RW*. (в) — Вспомогательный график, вертикальный разброс точек *B* отражает вариabельность параметра $V_{\max PP}$. Основа рисунков взята из работы [3].

Опытные образцы этого комплекса прошли клинические испытания в НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава РФ, а также в Санкт-Петербургской

клинической больнице РАН. Испытания показали, что данный метод неинвазивно и достоверно оценивает параметры пульсовых волн АДК у человека и не оказывает негативного воздействия на его организм.

Разработанное программное обеспечение визуализирует локальные изменения ПАДК в виде волновых графиков дифференциальных пьезопульсограмм и осуществляет непрерывную запись, преобразование, математическую обработку и отображение результатов на мониторе персонального компьютера. На рис. 1а для сравнения приведены графики основных рассматриваемых пульсометрических методов — дифференциальной сфигмографии (рис. 1а, I) и объемной сфигмографии (рис. 1а, II), где по оси Y отложены значения амплитуды волн ПАДК в усл. ед., а по оси X — время t в мс. На рис. 1б представлен график зависимости скорости V_{pp} (мм рт. ст./с) изменения величин параметров волны ПАДК от t . Величина ПАДК = $PP = САД - ДАД$, где PP — англ. «pulse pressure», $САД$ — систолическое, а $ДАД$ — диастолическое АДК. График дифференциальной пьезопульсограммы является первой производной графика зависимости V_{pp} от t ($V_{pp} = dPP/dt$). Это определяет математически однозначное расположение на графике расчетной точки *A* как точки начала фазы изгнания крови, соответствующей моменту открытия аортального клапана. В этой точке величина ПАДК равна диастолическому артериальному давлению крови, что позволяет провести через эту точку горизонтальную (нулевую) изолинию, определяющую площадь под или над кривой графика и отражающую прирост или уменьшение артериального давления крови в левом желудочке сердца. Используется принятая в медицине размерность артериального давления — мм рт. ст. График дифференциальной пьезопульсограммы каждого кардиоцикла имеет вид волнообразного контура с характерными перегибами и пересечениями с нулевой линией, что позволяет с более высокой точностью по сравнению с объемной сфигмографией анализировать динамику амплитудно-временных параметров таких графиков на основе разработанных устойчивых компьютерных алгоритмов выделения расчетных точек. На рис. 1б представлен вариант расстановки расчетных точек на дифференциальном графике пульсовой волны АДК, используемый в нашей работе [3].

В качестве универсального параметра используется точка *B* абсолютного положительного экстремума на графике дифференциальной пьезопульсограммы. Амплитуда этой точки оценивает максимальную скорость роста систолической волны ПАДК — $V_{\max PP}$. Эта величина не зависит от изменений объема тканей под датчиком и на эту точку никогда не накладывается отраженная от общего сосудистого сопротивления обратная

(отраженная) волна (RW, reflected wave), соответствующая заштрихованной площади на рис. 1б). Эти свойства точки *B* позволяют наиболее точно, неинвазивно и удобно оценивать сократительную способность миокарда ЛЖС по ординате этой точки, а по ее абсциссе — момент достижения наибольшей скорости роста величины V_{pp} . Точка *C* — момент достижения максимальной величины нормализованного пульсового давления крови (PPn) в фазу изгнания крови из ЛЖС, если площадь $CG \leq 0$; точка *D* — момент развития максимальной скорости снижения величины ПАДК на катакrotическом участке пульсовой волны, которая, как можно видеть на рис. 1а и 1б, сначала выравнивается с величиной АДК на входе в аорту (нижний экстремум), а затем из-за превышения АДК в аорте над внутрижелудочковым АДК в начале фазы расслабления ЛЖС створки аортального клапана начинают закрываться до момента его полного перекрытия, который обозначен нами точкой *E* (принято считать, что этот момент соответствует инцизуре на графике сфигмограммы, как на рис. 1а, что совпадает с нашими данными). Момент, обозначенный точкой *E*, наиболее близок к точке пересечения линии графика анакrotического подъема дикrotической волны с нулевой изолинией; *F* — момент достижения максимальной скорости прироста дикrotической волны АДК; *G* — момент достижения максимальной величины ПАДК (PP) в фазу изгнания крови из ЛЖС, если интеграл площади $CG > 0$. В этом случае ПАДК из-за наложения RW увеличивается относительно нормализованной величины (PPn) на долю, пропорциональную RW в процентах, что учитывается при компьютерной калибровке сигнала с помощью сфигмоманометра. Интервал *B–B* (аналог RR-интервала комплексов QRS при электрокардиографии) в данной работе в соответствии с международными стандартами [4] называется длительностью кардиоцикла (TNN), а ошибка его определения равна ± 1 мс при частоте дискретизации сигнала 1 кГц. Все сказанное свидетельствует о высокой точности метода АПП при анализах колебаний параметров пульсовых волн АДК, отражающих функционирование регуляторных систем, поддерживающих необходимый уровень артериальной гемодинамики у пациентов. Соотнося измеренную сфигмоманометром величину ПАДКсф (= САДсф - ДАДсф), которая включает и возможную добавку RW к ПАДК, со средней величиной пульсового давления крови, вычисленной в этот же период путем интегрирования по площади *ABC* при $CG \leq 0$ или *ABG* при $CG > 0$, (при наложении RW на волну ПАДК) в условных единицах компьютерной «оцифровки», определяли калибровочный коэффициент пропорциональности. С его помощью единицы «оцифровки» автоматически пересчитывали и выражали величину параметра PP (или

PPn) в соответствующих им единицах измерения (мм рт. ст.). Аналогично, используя вычисленную значимость единиц «оцифровки», оценивали величины параметров V_{maxPP} (в мм рт. ст./с) для дальнейших исследований. Эти параметры после калибровки использовали в качестве физиологических индикаторов или маркеров, которые рассматривались с целью выявления возможных признаков возникновения риска сердечно-сосудистых заболеваний.

При оценке показателей гемодинамики использовали только положительные величины аугментации волны ПАДК (над изолинией). Это уточняло смысл определения индекса аугментации ($AI_x = RW \cdot 100 / PP$, %), как показателя, который указывает на сколько процентов в среднем увеличивается каждая нормализованная волна ПАДК (PPn) из-за наложения на нее RW. Вертикальный разброс (вариабельность) расчетных точек *B* на графиках, сложенных по одной и той же абсциссе (рис. 1в), отражает активность механизмов системы регуляции величины V_{maxPP} . Горизонтальный разброс точек *B* на графиках, сложенных таким же образом, но по одной и той же ординате, отражает вариабельность сердечного ритма (рассчитывается по величине TNN). Вариабельность этих параметров оценивали посредством измерения спектральной мощности колебаний точки *B* по частотным диапазонам, рекомендованным международными стандартами для оценки вариабельности сердечного ритма. При этом исходили из собственных, а также ранее установленных данных литературы, свидетельствующих о сходстве волновой структуры колебаний TNN и ПАДК [5].

Анализировали частотные диапазоны, связанные с разными звеньями системы автономной регуляции: высокочастотный диапазон (Д-НФ, 0.15–0.4 Гц), отражающий мощность колебаний дыхательных волн; низкочастотный диапазон (Д-ЛФ, 0.04–0.15 Гц), отражающий мощность колебаний вазомоторных волн с частотой близкой к 0.1 Гц, и ультранизкочастотный диапазон (Д-УЛФ, 0.003–0.04 Гц), отражающий мощность колебаний параметров наиболее медленных волн ПАДК, который обычно связывают с психоэмоциональными воздействиями. В Д-УЛФ реализуется регуляторная активность гуморальных катехоламинов (ГК) — адреналина и норадреналина, выделяющихся из мозгового вещества коры надпочечников и действующих на те же адренорецепторы миоцитов ССС, на которые действует и нейромедиатор симпатических эфферентных нервных волокон. ГК высвобождаются, как мы полагаем, в виде порций определенного количества молекул, которые условно можно для краткости назвать «квантами» ГК. Эти «кванты» ГК, не дожидаясь равновесного распределения в крови, сразу взаимодействуют с адренорецепто-

рами миоцитов ССС и волнами с длительностью от ~33 с до ~6.5 мин усиливают амплитуду колебаний параметров пульсовых волн АДК. Известный «очень низкочастотный» Д-VLF (0.03–0.04 Гц), не несущий существенной информации, рассматривался как пограничная полоса между Д-LF и Д-ULF. Поскольку в эту полосу чаще попадали крайние фрагменты Д-ULF, диапазоны VLF и ULF объединяли и анализировали их как единый диапазон Д-ULF.

Сердечная недостаточность, возникающая чаще при ишемической болезни сердца, является основной причиной смерти при патологиях ССС и при старении организма человека. При этом ухудшается функциональное состояние стенок артериальных сосудов из-за развития атеросклероза, т.е. их уплотнения за счет разрастания соединительной ткани и сужения просвета сосудов, что приводит к увеличению их жесткости (arterial stiffness). Эти изменения сопровождаются ростом скорости распространения пульсовой волны АДК, как по аорте и артериям от сердца (V_{ao} и V_{ar} , м/с), так и обратно к сердцу (отраженная волна RW). Два синхронно работающих канала в методе АПП не сложно по выполнению оценивают эту жесткость по скорости пробега точки B волн ПАДК между двумя пьезодатчиками [6]. Такой способ соответствует «золотому стандарту» принятой оценки жесткости стенок артерий. Вариабельность параметров V_{maxPP} и PPn отражает внутриклеточные процессы, запускаемые рецепторами сарколеммы кардиомиоцитов, и на нее в норме не влияют колебания волн RW . Основной причиной накладки RW на катакрату волны ПАДК может быть ее ускоренный возврат по артериальному сосуду с повышенной жесткостью ее стенки, вызванной воздействием различных по природе физиологически активных факторов, что и обеспечивает попадание RW в полость ЛЖС еще до полного закрытия аортального клапана. Величина RW при этом может служить мерой оценки аугментации пульсовой волны АДК, которая, наряду с величинами скоростей распространения ПАДК по артериальным сосудам (V_{ao} и V_{ar}), также может служить физиологическим маркером жесткости стенок артерий. Гемодинамические последствия повышения этой жесткости рассматриваются как предикторы сердечно-сосудистых заболеваний (ишемическая болезнь сердца, инфаркта миокарда, инсульта и др.) [7].

При спектральном анализе использовали метод математического преобразования по Lomb-Scargle («Lomb-Scargle periodogram») [8]. Этот метод позволял более точно по сравнению с распространенным методом Фурье («Fast Fourier transform») оценивать участие гуморальных катехоламинов в автономной регуляции ССС у обследуемых лиц. Это является существенным, поскольку «разброс» величин изучаемых пара-

метров содержит информацию об активности периферических механизмов системы автономной регуляции. Каждый из выбранных для спектрального анализа параметров пульсовых волн АДК ($*V_{maxPP}$, $*PPn$ и $*TNN$; отмечены — $*$) во все выделенные периоды жизни обследуемых обладает собственным спектром частот колебаний с определенной мощностью ($*TP_f$). Из них с целью более подробного анализа были выделены укороченные фрагменты $*P_f$, входящие в виде суммы в величины $*TP_f$, соответствующие принятым частотным диапазонам — $*P_f(HF)$, $*P_f(LF)$ и $*P_f(ULF)$. Вариабельность этих фрагментов, как мы полагаем, отражает функционирование определенных периферических механизмов важнейших систем автономной регуляции ССС. Разброс их колебаний в границах соответствующих диапазонов частот дает возможность оценки их функциональной активности, отражающей процессы синаптической передачи регуляторных сигналов от окончаний симпатических и парасимпатических эфферентных волокон вегетативной нервной системы (ВНС), а также сигналов от нейроэндокринной системы, переносимых ГК. Таким образом, спектральная мощность колебаний каждого из основных выбранных параметров ($*V_{maxPP}$, $*PPn$ и $*TNN$) в разработанном методе АПП представлена как суммарный результат спектрального анализа колебаний фрагментов $*P_f$ сотен пульсовых волн пьезопульсограммы одного сеанса регистрации пульса у одного пациента. При этом вариабельные фрагменты, складываясь в своем частотно-временном диапазоне, образуют одно общее диаграммное пространство, площадь которого единой величиной оценивает функциональную активность конкретного эфферента. Это обеспечивает высокую точность анализов величин, характеризующих спектральную мощность вариабельности показателей в каждом диапазоне частот для каждого параметра со своей размерностью: $*V_{maxPP}$ — (мм рт. ст./с)²; $*PPn$ — (мм рт. ст./с)² и $*TNN$ — мс². В данной работе было решено ограничиться анализом параметров, которые непосредственно отражают функционирование механизмов, обеспечивающих формирование вариабельных контуров пульсовых волн артериального давления крови, т.е. $*V_{maxPP}$ и $*PPn$. Частотно-временной анализ вариабельности сердечного ритма благодаря широкому и медицинскому, и коммерческому использованию методологии ЭКГ очень хорошо изучен и ему посвящена обширная литература. Поэтому далее результаты спектрального анализа вариабельности параметра $*TNN$ обсуждаться не будут. Основные результаты представлены в виде средней величины $\pm$ стандартная ошибка среднего; о статистической достоверности различий между средними значениями судили по t -критерию

Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода пьезопульсометрического анализа пульсовых волн артериального давления крови дала возможность неинвазивно и количественно оценивать у широкого круга разных пациентов функциональное состояние и индивидуальные особенности автономной регуляции их ССС. Метод АПП в данной статье был применен с целью расширения знаний о функционировании периферических механизмов эфферентного звена автономной регуляции функций системы кровообращения и изучения специфичности распределения спектральной мощности вариабельности параметров пульсовых волн АДК у человека. Работы в этом направлении были мотивированы более ранними результатами упрощенного контурного анализа волн ПАДК у молодой женщины 20 лет (В.) и у пожилого мужчины 75 лет (М.). При регистрации с *a. carotis* были получены данные: у В. — частота сердечных сокращений (ЧСС) равна 75 уд/мин, $AIx = 13.6 \pm 4.5\%$, $V_{maxPP} = 339 \pm 33$ мм рт. ст./с и у М. — ЧСС = 55 уд/мин, $AIx = 26.3 \pm 2.3\%$, $V_{maxPP} = 626 \pm 25$ мм рт. ст./с. Видно, что сниженный (по сравнению с девушкой) сердечный ритм у пожилого М. сопровождается статистически значимыми повышениями величин AIx и V_{maxPP} . С учетом этих результатов был проведен дополнительный сравнительный контурный анализ сократительных характеристик пульсовых волн АДК у расширенного состава лиц разного возраста и пола [9]. Результаты этого анализа показали, что гендерный и возрастной факторы проявляются в виде лишь не ярко выраженных тенденций при сопоставлении средних величин их пульсовых параметров (величины V_{maxPP} , PPn и др. у мужчин были несколько выше, чем у равновозрастных женщин), но их различия при стандартном (5–10 мин) обследовании оставались статистически недостоверными ($p > 0.05$). Поэтому в данной работе, с учетом вышеизложенного, в каждом частотном и возрастном диапазоне результаты оценки параметров пульсовых волн АДК обследованных женщин и мужчин для повышения репрезентативности объединяли в одни группы.

Регуляция сокращений миоцитов ЛЖС, обеспечивающих инотропную и, в целом, насосную функцию сердца, в значительной степени определяется активацией их сарколеммальных β_1 -адрено- и М-холинорецепторов эфферентами ВНС, а также катехоламинами, выделяющимися из мозгового вещества коры надпочечников. Это позволяет предполагать, что у человека основными периферическими механизмами автономной

регуляции нагнетательной функции ССС являются разнонаправленные симпатико-адреналовые (+) и холинергические (–) взаимодействия с соответствующими рецепторами сарколеммы кардиомиоцитов. Сравнительная оценка влияния изменений возраста на спектральную мощность колебаний параметров пульсовых волн АДК, вызванных этими воздействиями, показала, что эти результаты отражают многообразие факторов, влияющих на физико-химическое состояние сократительных систем мышечных эффекторов, обеспечивающих уровень кровоснабжения органов и тканей. Такая причина становится основанием изменений индивидуальной вариабельности величин параметров волн ПАДК, которые выбраны в качестве физиологических маркеров функционального состояния системы автономной регуляции их мышечных эффекторов. Следует отметить выявленное в ходе данного исследования некоторое осложнение с получением результатов. С одной стороны, при контурном анализе волн ПАДК и упрощенном определении величин $*TR_f$ разновозрастных пациентов мы видим явные и направленные тенденции возрастных изменений спектральной мощности колебаний (или соответствующей функциональной активности) окончаний эфферентов. С другой стороны, из-за невозможности усреднить спектральные мощности вариабельности $*P_f$ и $*TR_f$ и выполнить стандартную статистическую обработку, мы сталкиваемся с ограничениями из-за большого разброса регистрируемых экспериментальных величин. Все это убеждает в целесообразности применения метода АПП в условиях персонализированного обследования пациентов. О специфичности индивидуального распределения и уровнях функциональной активности регулирующих эфферентных окончаний ВНС и гуморальных катехоламинов, выделяющихся из коры надпочечников, наглядно свидетельствуют полученные результаты, представленные в табл. 1 и 2. В табл. 1 можно видеть средние значения величин спектральной мощности колебаний показателей $*TR_f$, суммарно отражающих вариабельность фрагментов $*P_f$ и характеризующих функциональную активность параметров $*V_{maxPP}$ и $*PPn$ трех разных возрастных этапов жизни пациентов. Обращает на себя внимание пониженная функциональная активность эфферентных окончаний ВНС и ГК коры надпочечников, воздействующих на соответствующие рецепторы кардиомиоцитов ЛЖС у пациентов наиболее старшей (III) группы, и сходство характера распределения повышенных активностей этих же эфферентов, воздействующих на те же рецепторы мышечных эффекторов в более молодых группах (I и II этапы).

Общее представление, сформированное на основе усредненных результатов изучения характе-

Таблица 1. Результаты спектрального анализа параметров пульсовых волн АДК (*a. carotis*) (возрастная групповая зависимость)

Возрастные этапы/Показатели	I этап (18–30 лет) (<i>n</i> = 27)	II этап (31–65 лет) (<i>n</i> = 29)	III этап (66–86 лет) (<i>n</i> = 18)
*VmaxPP, (мм рт. ст./с)²			
*TP_f	398 ± 28	389 ± 23	337 ± 43
*P_f(ULF)	125 (31%)	133 (34%)	127 (38%)
*P_f(LF)	99 (25%)	90 (23%)	62 (18%)
*P_f(HF)	176 (44%)	166 (43%)	147 (44%)
*PPn, (мм рт. ст.)²			
*TP_f	401 ± 35	393 ± 21	359 ± 36
*P_f(ULF)	93 (23%)	108 (27%)	107 (30%)
*P_f(LF)	95 (24%)	82 (21%)	62 (17%)
*P_f(HF)	212 (53%)	203 (52%)	190 (53%)

Примечание. *n* – Число обследованных пациентов; *P_f – спектральные мощности колебаний фрагментов, входящих в соответствующие частотные диапазоны, и выраженные в относительных процентах от величин *TP_f. Полу жирным начертанием выделены величины *TP_f и *P_f с наибольшей вариабельностью в абсолютных значениях среди возрастных периодов.

ра распределения функциональной активности компонентов эфферентного звена, возбудило интерес к изучению возрастной зависимости характеристик индивидуальной вариабельности функциональной активности эфферентных окончаний ВНС и ГК надпочечников, воздействующих на рецепторы кардиомиоцитов ЛЖС. В табл. 2 показаны результаты обследования отдельных испытуемых разного возраста. У них по величинам *P_f оценивали спектральную мощность вариабельности отдельных фрагментов, составляющих общую величину *TP_f. Можно видеть, что даже при случайном и единичном выборе испытуемых обнаруживается определенная тенденция направленного возрастного снижения спектральной мощности колебаний показателя *TP_f, характеризующего вариабельность параметров *VmaxPP и *PPn пульсовых волн АДК пациентов. Тем не менее, сохраняется желательность использования персонализированного подхода при систематическом проведении анализов автономной регуляции функций ССС у человека неинвазивным методом АПП. В заключение можно прокомментировать представленные в табл. 2 результаты персонального обследования ряда участников нашего исследования.

Вначале помещены результаты спектрального анализа вариабельности параметров *VmaxPP и *PPn пульсовой волны АДК пациентки младшей группы (20 лет). Можно видеть, что наибольшую активность, обеспечивающую характерный для ее возраста высокий эмоциональный сердечный

ритм, необходимый для поддержания оптимальной гемодинамики, проявляют эфференты симпатического отдела ВНС (диапазон *P_f(LF)). Другая картина складывается при рассмотрении величин показателей характерных для следующей по возрасту группы обследуемых (31–65 лет). Для женщины 50 лет из этой группы характерным является повышенная величина регуляторной активности угнетающего трансммиттера парасимпатического эфферента, действующего на М-холинорецепторы (*P_f(HF)) миоцитов ЛЖС. В этой же возрастной группе был выделен также мужчина 50 лет для расширения знаний об особенностях регуляции параметров ПАДК в самой большой по численности обследуемой группе. Было выполнено более 15 сессий регистрации его пьезопульсограмм для наибольшей точности и надежности оценки активности механизмов системы автономной регуляции параметров пульсовых волн АДК. Представленные комплекты из трех величин *P_f наиболее близко отражают вариабельность средних величин показателей его пульсограмм. Можно видеть, что для его системы автономной регуляции мышечных эффекторов ССС является характерным поддержание повышенной активности симпатического (*P_f(LF), 51% от *TP_f) и парасимпатического (*P_f(HF), 45% от *TP_f) эфферентов ВНС. Можно считать это отражением воздействия высокой активности симпатических эфферентов на β1-адренорецепторы миоцитов его ЛЖС и защитной реакции со стороны HF-эфферентов, угнетающих эффекты LF-

Таблица 2. Результаты спектрального анализа параметров пульсовых волн АДК (*a. carotis*) (возрастная индивидуальная зависимость)

Показатели / Обследуемые	$*TP_f$	$*P_f(\text{ULF})$	$*P_f(\text{LF})$	$*P_f(\text{HF})$
$*V_{\max PP}$, (мм рт. ст./с) ²				
Ж., 20 лет	555	114 (21%)	329 (59%)	112 (20%)
Ж., 50 лет	432	117 (27%)	112 (26%)	202 (47%)
М., 50 лет	330	96 (29%)	169 (51%)	65 (20%)
Ж., 57 лет	348	257 (74%)	49 (14%)	42 (12%)
Ж., 70 лет	245	123 (50%)	68 (28%)	54 (22%)
М., 85 лет	202	96 (48%)	14 (6%)	92 (46%)
$*PP_n$, (мм рт. ст.) ²				
Ж., 20 лет	539	82 (16%)	339 (64%)	112 (20%)
Ж., 50 лет	390	140 (36%)	81 (21%)	169 (43%)
М., 50 лет	304	61 (20%)	107 (35%)	136 (45%)
Ж., 57 лет	370	255 (69%)	44 (12%)	71 (19%)
Ж., 70 лет	308	126 (41%)	94 (31%)	88 (29%)
М., 85 лет	238	100 (42%)	30 (13%)	108 (45%)

Примечание. $*P_f$ — спектральные мощности колебаний фрагментов, входящих в соответствующие частотные диапазоны, и выраженные в относительных процентах от величин $*TP_f$. Полужирным начертанием выделены величины $*P_f$ с наибольшей вариабельностью среди фрагментов, составляющих в сумме соответствующие величины $*TP_f$ (100%) у обследуемых пациентов.

эфферентов. В результате у него наблюдается не-стабильное периодическое повышение ЧСС (до 85 уд/мин). В этой же группе была выбрана еще одна женщина (57 лет), которая обратила на себя внимание тем, что у нее возбуждающим регуляторным механизмом уже много лет оставалось практически только эндокринное воздействие гуморальных катехоламинов ($*P_f(\text{ULF})$, 69% от $*TP_f$). С этим связано и то, что для нее был характерен высокий ритм сокращений сердца (ЧСС = 86 уд/мин) при пониженной активности эфферентов ВНС. Эту же женщину пригласили через 13 лет вновь стать добровольцем и войти в старшую возрастную группу в качестве одного из примеров. Как показали результаты, увеличение ее возраста существенно не изменило характер распределения функциональной активности ее периферических механизмов регуляции параметров пульсовых волн АДК. По-прежнему ее основным возбуждающим регуляторным воздействием оставалась регуляция в ультранизком частотном диапазоне ($*P_f(\text{ULF})$, 41% от $*TP_f$), при этом сохранялись высокий ритм сокращений сердца (ЧСС = 88 уд/мин) и низкое АДК (86/57 мм рт. ст.). В старшую возрастную группу в качестве примера был включен 85-летний мужчина. Для него характерными были низкая ($*P_f(\text{LF})$, 13% от $*TP_f$) активность симпатических эфферен-

тов ВНС, но высокая активность ультранизких (ГК; $*P_f(\text{ULF})$, 42% от $*TP_f$) и высокочастотных (парасимпатических эфферентов; $*P_f(\text{HF})$, 45% от $*TP_f$) регулирующих транзиттеров, воздействующих на соответствующие параметры пульсовых волн АДК. Такое соотношение активностей компонентов периферического эфферентного звена, видимо, было необходимо для поддержания оптимальных условий сокращения миокарда его ЛЖС. Спектральный анализ вариабельности фрагментов стандартных частотных диапазонов, выполненный в настоящей работе, впервые был применен нами при анализе у этого же пожилого мужчины эффекта стрессового воздействия острой травматической боли на функциональную активность системы автономной регуляции мышечных эффекторов ССС [10].

Анализ полученных результатов показал, что характер распределения средних величин, отражающих колебания функциональной активности компонентов периферического эфферентного регуляторного звена при использованном количестве испытуемых, отличается от закона нормального распределения Гаусса–Лапласа. Возможно, это является причиной затруднений при применении методов статистической обработки результатов, но дает возможность получения реальных оценок «online» распределения активно-

сти эфферентов во всех частотных диапазонах, что повышает достоверность функциональной диагностики. Можно предположить, что нейрогуморальные транзиттеры сразу, по-видимому, не дожидаясь локального равновесного распределения, активируют сарколеммальные β_1 -адрено- и М-холинорецепторы, вызывая разные по спектральной мощности колебаний пиковые сократительные ответы кардиомиоцитов ЛЖС. Это позволяет сделать вывод о правильности выбора метода АПП для неинвазивного анализа периферических механизмов регуляции функций ССС у обследуемых. При этом следует сказать, что наибольших успехов при проведении этих анализов добивались, применяя персонализированный подход к обследованию пациентов. Можно видеть, что результаты индивидуального спектрального анализа помогают выявлять специфическое участие отдельных компонентов в общем периферическом механизме автономной регуляции ССС, обеспечивающей адекватное функционирование системы кровообращения у человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью инновационного метода артериальной пьезопульсометрии получены новые результаты, свидетельствующие о возможности неинвазивного изучения особенностей функционирования периферических механизмов автономной регуляции сердечно-сосудистой системы у пациентов, отличающихся по возрасту и состоянию своего здоровья. Расширение масштаба использования метода АПП с использованием спектрального анализа вариабельности параметров пульсовых волн артериального давления крови может способствовать развитию новых способов неинвазивной диагностики участия и роли компонентов периферического нейрогуморального эфферентного звена в формировании быстрой и хорошо регулируемой ответной реакции системной гемодинамики, использующей в качестве эффекторов кардиомиоциты ЛЖС и обеспечивающей запрос организма пациента об адекватном удовлетворении потребностей его органов и тканей в кислороде и питательных веществах. Сравнительное исследование показало, что для каждого обследуемого пациента становится возможным выполнение неинвазивного анализа специфических для него периферических механизмов автономной регуляции ССС, необходимых для формирования диагностического заключения о функциональном состоянии системы его кровообращения и об относительном участии и роли эфферентных волокон ВНС и эндокринных гуморальных катехоламинов в регуляторном воздействии на β_1 -адрено- и М-холинорецепторы сарколеммы кардиомиоцитов ЛЖС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность всем коллегам за бескорыстную помощь в сборе необходимой пульсометрической информации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-0152-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья людей с соблюдением всех принципов гуманности и этических норм (Хельсинкская декларация WMA, 2013 г.). Все добровольцы дали информированное согласие на участие в исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. Р. Палеев и И. М. Каевецер, *Атлас гемодинамических исследований в клинике внутренних болезней* (Медицина, М., 1975).
2. В. С. Логвинов, в кн. *Пульсовая диагностика тибетской медицины*, под ред. Ч. Ц. Цыдыпова (Наука, Новосибирск, 1988), сс. 90–108.
3. В. П. Нестеров, А. И. Бурдыгин, С. В. Нестеров и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **55** (6), 433 (2019).
4. *Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use*, *Circulation*, **3** (6), 1043 (1996).
5. J. A. Taylor and D. L. Eckberg, *Circulation*, **93** (8), 1527 (1996).
6. В. П. Нестеров, А. И. Бурдыгин и С. В. Нестеров, *Физиология человека*, **43** (6), 54 (2017).
7. W. N. Wilmer, J. D. Scott, I. B. Wilkinson, et al., *J. Clin. Hyperten.* **10** (4), 295 (2008).
8. J. H. Skotte and J. Kristiansen, *Biomed. Eng. Online*, **13**, 138 (2014).
9. В. П. Нестеров, А. И. Бурдыгин, К. Б. Иванов и др., *Успехи геронт.* **33** (1), 74 (2020).
10. В. П. Нестеров, А. И. Бурдыгин, К. Б. Иванов и др., *Успехи геронт.* **34** (6), 870 (2021).

On the Possibility of Non-Invasive Study of the Peripheral Mechanisms of Autonomous Regulation of the Human Cardiovascular System

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

**Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
prosp. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

The aim of this study was to evaluate the possibility of using the developed method of arterial piezopulsometry for non-invasive study of peculiarities of the functioning of peripheral mechanisms of autonomic regulation of the cardiovascular system in patients of different age and health state. Study emphasizes the importance of determining the variability of the parameters of blood pressure pulse waves as a measure of assessing the participation and role of the components of the neuroendocrine (sympatho-adrenal) efferent link in the formation of a fast and well-regulated response of systemic hemodynamics, using myocytes of the left ventricle of the heart as effectors. This paper discusses the possibility and expediency of personalized use of the arterial piezopulsometry method for pulsometric diagnostics of the functional state and nature of autonomic regulation of the functions of cardiovascular system in patients in order to be able to detect earlier pathological conditions and disorders of peripheral mechanisms that ensure adequate blood supply in humans.

Keywords: autonomic regulation of the heart, variability, spectral analysis

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ, СВЯЗАННЫЕ С ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИЕЙ МЕМБРАН, И НАПРАВЛЕНИЯ ИХ КОРРЕКЦИИ

© 2023 г. Д.В. Вильянен*, Н.И. Пашкевич**, М.М. Борисова-Мубаракшина*,[#], С.С. Осочук**,^{##}

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

**Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
просп. Фрунзе, 27, Витебск, 210009, Республика Беларусь

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

^{##}E-mail: oss62@mail.ru

Поступила в редакцию 10.11.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Несмотря на значительный прогресс в лечении ожоговой болезни, смертность при данной патологии может превышать 50% при поражении свыше 30% площади тела вследствие развития синдрома полиорганной дисфункции. В обзоре рассматриваются наиболее важные молекулярно-биологические механизмы развития синдрома полиорганной дисфункции, реализующиеся через свободнорадикальную деструкцию плазматических мембран, митохондрий, вторичную продукцию свободных радикалов поврежденными митохондриями, модификацию митохондриальной ДНК и использование ее как триггера воспалительных процессов в периферических органах и системах. Рассматриваются вторичные изменения в системе транспорта липидов крови и их роль в генерализации полиорганной дисфункции и гормонального дисбаланса. С позиции патогенетических сдвигов метаболизма обосновывается применение антиоксидантов, в частности хинонов, в комплексе с модуляторами липидного обмена для снижения активности воспалительного процесса и гормонального дисбаланса при терапии ожоговой болезни.

Ключевые слова: ожоговая болезнь, активные формы кислорода, окислительный стресс, синдром полиорганной дисфункции, антиоксиданты, пластохинон.

DOI: 10.31857/S0006302923010X180, EDN: OBHWBC

Экспериментальные и клинические исследования показали, что тяжелые ожоги, вне зависимости от их причины, приводят к выраженному воспалительному ответу и гипоксии. При этом последовательность событий и взаимодействие различных участников этих процессов противоречивы и недостаточно изучены [1], в том числе в связи с отличиями в реализации молекулярно-биологических механизмов ожоговой болезни в зависимости от площади ожогов, их выраженности и степени вторичного поражения органов.

При ожогах вследствие повреждения клеток происходит высвобождение молекулярных паттернов, связанных с повреждением, — молекул, способных инициировать неинфекционный вос-

палительный ответ, — мочевой кислоты, ферритина, гистонов, профилина 1, енолазы 1, фибронектина и др. [2]. При этом увеличивается образование активных форм кислорода (АФК) [3], что запускает процессы свободнорадикального окисления и индуцирует развитие окислительного стресса. Кроме того, такие молекулярные паттерны взаимодействуют с сенсорными рецепторами на макрофагах, нейтрофилах и эндотелиальных клетках, такими как толл-подобные рецепторы (TLR) [4, 5], рецепторы, подобные домену олигомеризации (NLR) [6], конечные продукты гликирования (AGE) [7] и рядом других рецепторов, которые запускают продукцию факторов транскрипции, управляющих продукцией провоспалительных цитокинов.

Вышеописанные процессы сопровождаются увеличением активности надпочечников и выделением большого количества кортизола и катехоламинов. В течение 24 ч после ожога развивается

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, СПОД — синдром полиорганной дисфункции, ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты, мтДНК — митохондриальная ДНК.

распределительный шок [8], характеризующийся повышением проницаемости капилляров, повышением гидростатического давления в микроциркуляторном русле, перемещением белков и жидкости из сосудов в интерстициальное пространство, ростом сосудистого сопротивления, снижением сердечного выброса и гиповолемией. Таким образом, тяжелый ожог (свыше 30% кожных покровов) требует неотложной инфузионной терапии [9]. Отсроченная инфузионная терапия при таких поражениях, как правило, приводит к развитию синдрома полиорганной дисфункции (СПОД), являющегося ведущей причиной смерти пациентов с тяжелыми ожогами [10]. У пациентов с тяжелой ожоговой травмой (площадь ожогов свыше 30%), частота поражения печени колеблется от 25 до 60%. В 20–40% случаев наблюдаются поражения миокарда [11], что в большей степени способствует гемодинамическим нарушениям и приводит к летальному исходу в течение первых 24–48 ч после ожоговой травмы. Смертность от СПОД увеличивается в зависимости от объема поражения органов и может превышать 75% [12–15], а при поражении почек может достигать 100% [16]. Схематически развитие синдрома полиорганной дисфункции при кожных ожогах представлено на рис. 1.

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ В РАЗВИТИИ СИНДРОМА ПОЛИОРГАННОЙ ДИСФУНКЦИИ

Основными факторами развития СПОД являются воспалительный ответ и гипоксия [17], которые, как было описано выше, являются следствием тяжелых ожоговых травм. При этом происходит снижение активности перфузии органов и их ишемизация [15]. И воспаление, и гипоксия индуцируют повышенное образование внутри- и внеклеточных АФК и инициируют развитие окислительного стресса, который является одной из наиболее значимых причин поражения печени, почек и легких при ожогах [18, 19]. Отсроченная инфузионная терапия отягощает течение болезни за счет распространения окислительного стресса, связанного с повышенной продукцией не только активных форм кислорода, но и азота в органах-мишенях [20], а также распространения молекулярных паттернов, связанных с повреждением.

Образующиеся в течение воспаления иммунными клетками внеклеточные АФК в первую очередь повреждают плазматические мембраны клеток и нарушают их целостность. Считается, что активация свободнорадикального окисления в отдаленных от ожога органах осуществляется, в том числе, посредством роста продукции АФК инфильтрированными в органы нейтрофилами [24]. Повреждение плазматических мембран при-

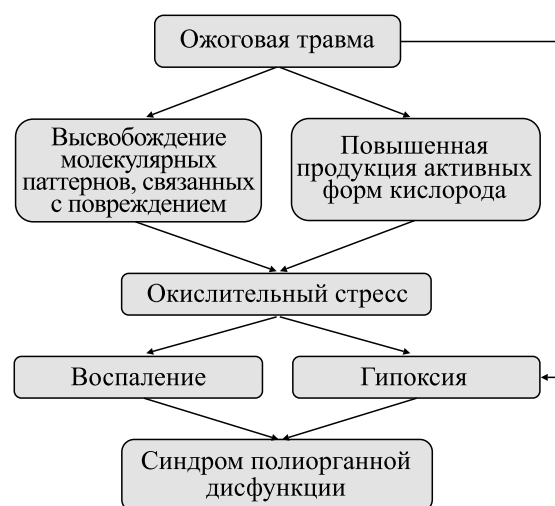


Рис. 1. Основные причины развития синдрома полиорганной дисфункции при ожоговой травме.

водит к нарушению регуляции ионного гомеостаза и высвобождению клеточного содержимого в межклеточное пространство, что способствует еще большему распространению молекулярных паттернов, связанных с повреждением. Возникающий при этом осмотический шок провоцирует развитие гиперкалиемии [21, 22], которая значительно ухудшает прогноз тяжелообожженных пациентов. Повышенная проницаемость плазматических мембран для Ca^{2+} усугубляет течение СПОД и повышает смертность среди пациентов с сепсисом [23].

Повреждение плазматических мембран приводит к повышению продукции внутриклеточных АФК (в особенности, митохондриями). Медиаторы воспаления могут вызвать повышение уровня NO внутри клеток, который связывается с сайтом связывания кислорода в комплексе IV дыхательной цепи в мембранах митохондрий. Это вызывает утечку электронов на молекулярный кислород с комплексов I и III с образованием супероксидного анион-радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [25]. В реакции дисмутации $\text{O}_2^{\cdot-}$, спонтанной или катализируемой супероксиддисмутазой, происходит генерация пероксида водорода (H_2O_2); кроме того, $\text{O}_2^{\cdot-}$ может быть восстановлен до H_2O_2 компонентами дыхательной электрон-транспортной цепи, например, убинохиноном [26]. В условиях гипоксии, которая, в свою очередь, также может быть индуцирована воспалением, происходит высвобождение ионов железа из ферритина, и реакция пероксида водорода с ионами Fe^{2+} (реакция Фентона) приводит к образованию гидроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$), чрезвычайно реакционноспособной АФК.

Было показано, что тяжелые ожоги вызывают поражения митохондрий мышечной ткани [27], почек [28] и сердца [29]. Повреждение митохондрий сопровождается не только снижением продукции АТФ [30, 31] и повышением генерации АФК [32], но и нарушением регуляции экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты [31]; это может приводить к так называемой вторичной продукции свободных радикалов или вторичному окислительному стрессу. В результате происходит повреждение субклеточных структур, приводя не только к значительным метаболическим нарушениям, но и к смерти клетки посредством активации апоптоза или некроза [33, 34] или аутофагии [35]. Одним из важнейших патогенетических звеньев ожоговой болезни является повреждение митохондрий сердечной мышцы, поскольку количество митохондрий в кардиомиоцитах составляет 20–40% их объема [36] и снижение их метаболической активности неминуемо приведет к нарушению гемодинамики и ишемизации органов. Деструкция митохондрий сопровождается выделением митохондриальной ДНК (мтДНК), имеющей высокую чувствительность к воздействию свободных радикалов из-за отсутствия в ее составе гистоновых белков [37]. Вследствие повреждения мтДНК снижается активность синтеза митохондриальных белков [38]. Поврежденная мтДНК может выступать в качестве активатора инфламмосомы 3 (NLRP3 – пиринового домена NOD-подобных рецепторов), которая активирует каспазу1 (сериновую протеиназу, расщепляющую белковый предшественник провоспалительных цитокинов), что приводит к высвобождению интерлейкинов IL-1 β и IL-18, способствующих вторичному апоптотическому и некротическому повреждению органов [38]. Наибольшее количество NLRP3 продуцируется в клетках Купфера [39], являющихся и основными источниками фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и IL-6 [40], также принимающих активное участие в повреждении печени. Кроме того, известно, что мтДНК способна диффундировать в кровотока, а повышение ее концентрации в крови ассоциировано со СПОД [41].

Таким образом, при ожоговой болезни в ходе активации свободнорадикальных и других патологических процессов происходит нарушение циркуляции крови и перфузии органов, что приводит к развитию СПОД. Молекулярные механизмы реализации СПОД тесно взаимосвязаны и усиливают друг друга, при этом одним из основных деструктивных процессов является окислительный стресс.

ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА И СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ

Возникающее при обширных ожоговых травмах поражение печени обуславливает снижение активности ее синтетической функции, в частности, за счет снижения количества апопротеинов С-II, С-III и А-I [42]. Учитывая, что эти апопротеины регулируют активность сывороточных липопротеинлипаз и лецитин-холестерол-ацилтрансферазы, абсолютно логичным становится описанное в работе [43] снижение количества холестерина липопротеинов низкой плотности, холестерина липопротеинов высокой плотности и увеличение содержания триацилглицеридов у пациентов на третьи сутки после ожога тела с площадью поражения более 40%. Интересно отметить, что в клинических исследованиях хирургических ожоговых отделений [44, 45] показана взаимосвязь низкого уровня холестерина с повышенной восприимчивостью к инфекциям и негативным прогнозом исхода ожоговой болезни, особенно у пожилых людей. Авторы работы [46] выявили обратную корреляционную зависимость между уровнем IL-6 и холестерином, при этом низкий уровень холестерина и высокая концентрация IL-6 были связаны с длительностью пребывания пациента в стационаре. На основании полученных результатов авторы делают заключение, что поддержание высокого уровня холестерина в крови является обязательным компонентом успешной терапии ожоговой болезни. Вместе с тем известно, что холестерин используется как транспортная форма эссенциальных жирных кислот и изменение его количества должно быть ассоциировано с изменением их метаболизма. Действительно, в более ранних работах, посвященных исследованию липидного обмена при ожоговой болезни [47, 48] описано снижение содержания фосфолипидов, эфиров холестерина, а также количества эссенциальных (ω 3 и ω 6) полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК).

Продемонстрировано снижение количества арахидоновой кислоты (C20:4n6) на 55.7%, линолевой кислоты (C18:2n6) на 31.6%, при этом количество эйкозатриеновой кислоты (C20:3n3) было снижено на 49.5%, а количество пальмитиновой (C16:0) и олеиновой (C18:1n9) увеличено на 12.1 и 63.0% соответственно [49]. Такая картина может быть обусловлена повышенным окислением ПНЖК и увеличением продукции провоспалительного простагландина E2 (PG-E2) и тромбоксанов [50], а увеличение соотношения ω 6/ ω 3 ПНЖК может указывать на провоспалительную направленность этих изменений, поскольку биологически активные метаболиты, продуцирующиеся из ω 3 ПНЖК, обладают противовоспалительной активностью, а продукты ω 6 ряда, напро-

тив, — провоспалительной активностью [51]. Такая точка зрения подтверждается позитивными результатами использования $\omega 3$ ПНЖК для лечения ультрафиолетовых ожогов [52] и резолвина D2 (продукт $\omega 3$ ПНЖК) для экспериментального лечения глубоких кожных ожогов [53].

Помимо указанного известно, что кожные покровы являются гормонально активной тканью, способной продуцировать адренокортикотропный гормон и кортизол [54], являющиеся чрезвычайно важными регуляторами стрессорного обмена веществ. Возникающий при ожогах гормональный дисбаланс и разрыв взаимодействий в гипоталамо-гипофизарной оси [55] могут быть обусловлены, в том числе, и нарушением продукции гормонов в поврежденных кожных покровах. С учетом того, что кортизол синтезируется из холестерина, вторичное снижение его содержания в отсроченном послеожоговом периоде может способствовать развитию гормонального дисбаланса и послужить причиной сниженной реакции надпочечников на введение адренокортикотропного гормона, а снижение содержания самого адренокортикотропного гормона [56] — следствием нарушения его продукции в кожных покровах.

Таким образом, вовлечение вторичных изменений липидного обмена в патогенетические механизмы ожоговой болезни не вызывает сомнения и должно учитываться при разработке новых способов ее лечения.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ В ТЕРАПИИ ОЖОГОВОЙ БОЛЕЗНИ И СИНДРОМА ПОЛИОРГАННОЙ ДИСФУНКЦИИ

Умеренное образование АФК необходимо для нормального функционирования клетки, так как некоторые из АФК выполняют роль мессенджеров в сигнальной системе клетки (например, пероксид водорода). Повышенное образование АФК приводит к деструктивным процессам. Зависимость течения клеточных процессов от уровня внутриклеточных АФК можно проследить на примере лизосомального экзоцитоза. Лизосомы играют ключевую роль при восстановлении клеточных компонентов, быстро устраняя поврежденные компоненты. Так, было показано, что действие АФК на лизосомальный экзоцитоз имеет двухфазный характер: в то время как небольшие количества АФК активируют экзоцитоз через активацию специфических ионных каналов TRPML1, высокие концентрации АФК ингибируют этот процесс [57].

Важность поддержания физиологически допустимого уровня АФК для предотвращения развития патологических процессов в клетке, как было

описано выше, неоспорима. Для контроля над уровнем АФК внутри клеток существует антиоксидантная система, состоящая из ряда ферментов (супероксиддисмутаза, пероксидаза, пероксиредоксины, каталаза и др.) и низкомолекулярных соединений (глутатион, восстановленные пиридиннуклеотиды (НАДФН и НАДН), убихинон, мочевиная кислота). Однако в условиях интенсивного окислительного стресса ресурсов собственной антиоксидантной системы клетки становится недостаточно. Для борьбы с окислительным стрессом при различных заболеваниях и травмах используют экзогенные антиоксиданты.

Учитывая значительную роль активации свободнорадикальных процессов в формировании СПОД при ожогах, были предприняты попытки использования антиоксидантов при лечении ожоговой болезни. Так, в исследовании [56] для лечения пациентов с ожогами использовали 10 мл антиоксидантной смеси, включавшей 100 мг сквалена, 30 мг витамина С, 10 мг коэнзима Q₁₀, 5 мг цинка, 3.6 мг бета-каротина, 30 мг биофлавоноидов и 55 мкг селена. Однако пероральный прием этих антиоксидантов не привел к значимым изменениям в про- и антиоксидантной системе обследованных. В работе [58] на ожоговую поверхность наносили липосомы с дигидрокверцитином и глицином. Используемая липосомальная композиция вызывала улучшение регенерации кожи и восстанавливала волосные фолликулы и сальные железы.

Однако для защиты плазматических мембран и митохондрий в первую очередь необходимы липофильные антиоксиданты — молекулы, способные проникать в мембраны и защищать их от перекисного окисления липидов. Перспективными кандидатами на роль таких соединений являются природные хиноны — убихинон и пластохинон, а также их синтетические производные (рис. 2).

Общими структурными элементами этих соединений являются хиноновая гидрофильная «голова» и гидрофобный «хвост», чаще всего изопреноидный, но в синтетических аналогах имеющий иное строение. Такая структура обеспечивает хинонам амфифильность, что хорошо сказывается на их способности проникать в мембраны. Хиноны функционируют в качестве переносчиков электронов, кроме того, выполняют антиоксидантную функцию, а также обладают мембраностабилизирующим действием. Антиоксидантную функцию хиноны осуществляют, в основном, за счет хиноновой «головы», которая играет роль редокс-активного центра и вступает в окислительно-восстановительные реакции. Антиоксидантная роль «хвоста» хинонов была продемонстрирована для пластохинона: в модельных системах было показано, что изопреноидный «хвост» способен нейтрализовать синглетный

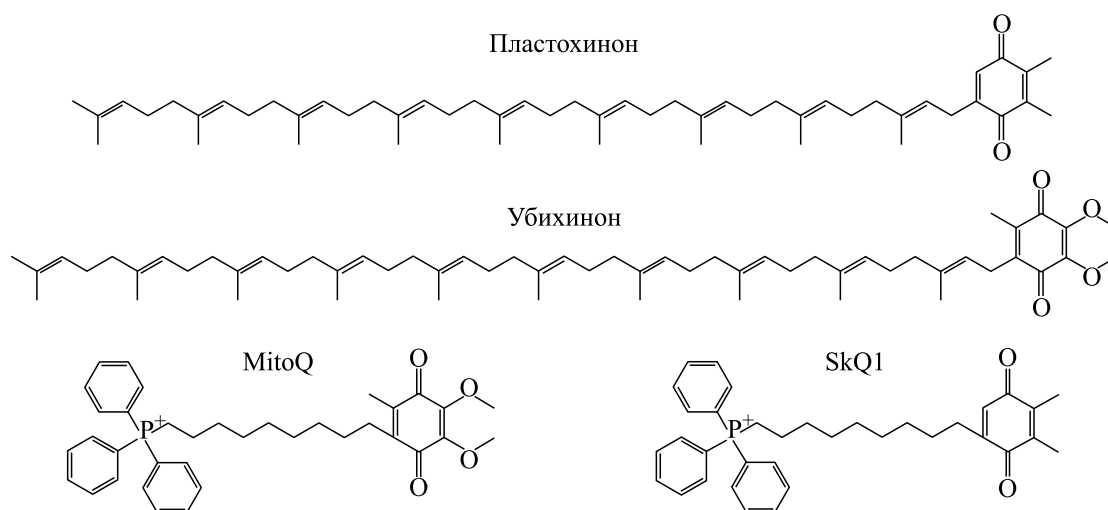


Рис. 2. Структурные формулы пластохинона, убихинона, митохондриально-направленного производного убихинона — MitoQ, митохондриально-направленного производного пластохинона — SkQ1.

кислород по химическому механизму с образованием пероксида водорода, при этом сам пластохинон превращается в гидроксипластохинон (так называемый пластохинон С). Для мембраностабилизирующих свойств хинонов важна и хиноновая составляющая, и боковая изопреноидная цепь. На модельных липидных везикулах, имитирующих состав плазматических мембран *E. coli*, было продемонстрировано [59], что убихинон повышает устойчивость мембран в условиях осмотического стресса посредством двух механизмов: полярная «голова» убихинона обеспечивает снижение коэффициента проницаемости мембраны за счет увеличения порядка упаковки липидов, а изопреноидный «хвост» создает внутримембранное давление, препятствующее потере воды.

Убихинон, также известный как коэнзим Q₁₀ (рис. 2), представляет собой 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон с десятичленной изопреноидной цепью. Основная функция убихинона в клетке — перенос электронов в электрон-транспортных цепях. Наибольшее его количество в клетке обнаружено во внутренней мембране митохондрий, где он является одним из участников дыхательной электрон-транспортной цепи. Убихинон содержится также в липопротеинах низкой плотности, плазме крови и во всех клеточных мембранах, в том числе — в плазматической мембране [60], где он участвует в работе коротких электрон-транспортных цепей, обеспечивая перенос электронов от внутриклеточных восстановленных пиридиновых нуклеотидов к внешним окислителям [61].

Убихинон регулирует уровень АФК во всех мембранах клетки [62–64], в том числе — посредством восстановления токоферола [63, 65, 66]; прекращает перекисное окисление липидов по-

средством реакции с его продуктами — пероксидными, алкоксильными и липидными радикалами, а также с супероксидным анион-радикалом [26, 67]. Убихинон плазматической мембраны предотвращает апоптоз, вызванный накоплением церамида в клетке [68]; уменьшает повреждение ДНК, вызванное ультрафиолетовым облучением, в кератиноцитах человека *in vitro* [69], ингибирует апоптоз, вызванный окислительным стрессом [60].

Исследование действия убихинона при ожогах также показало положительный эффект. Авторы работы [39] вводили убихинон в дозе 4 мг/кг внутривенно крысам с ожогом третьей степени (аналог внутривенного введения). Оценка действия убихинона показала, что у таких животных снижалось поражение печени за счет уменьшения активности продукции активных форм кислорода, сохранения целостности и функции митохондрий, уменьшения активности образования мтДНК и последующей активации NLRP3. В исследовании [70], проведенном на мышах, было продемонстрировано, что использование восстановленного убихинона (убигидрохинона) при ожогах 30% кожных покровов может существенно снизить митохондриальную дисфункцию и воспалительные реакции в скелетных мышцах мышей. Было показано, что убигидрохинон предотвращает индуцированные ожоговой травмой морфологические изменения в митохондриях и значительно подавляет окислительный стресс. Данные, полученные на пациентах-добровольцах, свидетельствуют о том, что уровень общего убихинона у пациентов с ожоговой травмой ниже, чем у здоровых людей, и значительно повышается как в плазме, так и в мононуклеарных клетках периферической крови при его перо-

ральном введении больным [71, 72]. Однако, в отличие от экспериментов на животных, при этом не было выявлено какого-либо ощутимого вклада убихинона в улучшение прогноза пациентов с ожоговой травмой. Тем не менее, авторы данных исследований указывают на неравномерность и ограниченность исследуемых выборок пациентов и подчеркивают необходимость дальнейших исследований.

Структурным аналогом убихинона является пластохинон-9 (рис. 2), представляющий собой 2,3-диметил-1,4-бензохинон с девятичленным изопреноидным хвостом. Как и убихинон в дыхательной цепи, пластохинон выполняет роль мобильного липорастворимого переносчика электронов и протонов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи организмов с окисленным типом фотосинтеза (высшие растения, зеленые водоросли и цианобактерии).

Фактически проявления антиоксидантных свойств пластохинона те же, что и убихинона: он прерывает перекисное окисление липидов [73], взаимодействует с продуктами перекисного окисления липидов, восстанавливает супероксидный анион-радикал до пероксида водорода H_2O_2 [74, 75]. Последнее свойство крайне важно, поскольку супероксидный анион-радикал образуется не только снаружи, в водной фазе, количество антиоксидантов в которой велико, но и внутри липидного бислоя мембран [76, 77], количество антиоксидантов в которых существенно ниже, чем в водной фазе. В фотосинтетических мембранах, в отличие от мембран животных клеток, в результате фотодинамической реакции пигментов (прежде всего хлорофиллов) происходит образование синглетного кислорода (1O_2) — одной из самых реакционноспособных и «губительных» для растений АФК. [78]. Пластохинон — эффективный нейтрализатор 1O_2 [79] и пигментов в триплетном состоянии, ответственных за продукцию 1O_2 [80].

На данный момент не существует данных об антиоксидантном действии природного пластохинона-9 на животные клетки. Поэтому перспективность его использования может быть лишь спрогнозирована на основании известных данных о его реакционной способности в отношении АФК в растениях и модельных системах. Тем не менее, считается, что пластохинон обладает более высокой антиоксидантной и низкой прооксидантной активностью, чем убихинон. Одна из возможных причин заключается в структурном отличии хиноновой «головы» пластохинона от убихинона — замене метоксильных групп на метильные и метильной на водород [81, 82].

Природные аналоги пластохинона-9, содержащиеся в некоторых водорослях, также прояв-

ляют антиоксидантные свойства. Так, аналоги пластохинона, выделенные из *Sargassum microcranthum* подавляли перекисное окисление липидов [83, 84]; аналоги из *Roldana barba-johannis* проявляли антиоксидантные и противовоспалительные свойства [85].

Ближайшими синтетическими аналогами убихинона и пластохинона являются соответственно MitoQ и SkQ1 (рис. 2). Эти соединения представляют собой митохондриально-направленные агенты с хиноновой «головой» убихинона и пластохинона, но с отличным от природных соединений «хвостом». В данных соединениях «хвост» представляет собой децильный линкер, к которому прикреплен трифенилфосфониевый катион, обеспечивающий молекулам направленный транспорт в митохондрии. Впервые такая концепция митохондриального таргетинга была предложена в работе [86]. SkQ1 был синтезирован под руководством академика В.П. Скулачева и является самым эффективным из всей линейки митохондриально-направленных хинонов. Примечательно то, что MitoQ и SkQ1 способны восстанавливаться и окисляться в дыхательной цепи митохондрий [87], что обеспечивает не только их способность проявлять высокую антиоксидантную активность за счет образования восстановленных форм — гидрохинонов, но также и их способность заменить убихинон при падении его содержания в клетке в стрессовых условиях. SkQ1 имеет более низкую прооксидантную активность, чем MitoQ, что поддерживает изложенное выше предположение о том, что пластохинон, вероятно, более эффективен как антиоксидант [88] по сравнению с убихиноном, и проявляет свое антиоксидантное действие при более низких концентрациях, чем MitoQ.

В литературе описан опыт применения как природного убихинона, так и его синтетического производного MitoQ при ожоговой болезни [39], а также синтетических производных пластохинона при реперфузионных поражениях головного мозга в экспериментах на животных [89] и гипотермическом хранении печени крыс [90]. Однако информация о применении природного пластохинона и его производных при ожоговых травмах отсутствует. Учитывая то, насколько важно поддерживать структурную и функциональную целостность как митохондрий, так и плазматических мембран при развитии СПОД в ответ на ожоговые поражения, применение как природных хинонов, так и их митохондриально-направленных производных может стать перспективным подходом в комплексной терапии ожоговых травм.

Исследование действия MitoQ при ожогах [39] не учитывало вторичные метаболические изменения липид-транспортной системы крови и свя-

занные с ними изменения эссенциальных полиненасыщенных жирных кислот, носивших выраженный провоспалительный характер. В связи с этим в качестве системы доставки хинонов к клеткам целесообразно использование липосом, построенных из фосфатидилхолина, как основного носителя эссенциальных жирных кислот в организме. Помимо фосфатидилхолина, неотъемлемой частью липосом является холестерол [91], содержание которого, как было указано ранее, имеет обратную корреляционную зависимость с уровнем интерлейкина IL-6 и длительностью пребывания пациентов в стационаре. Кроме того, холестерол может быть использован для продукции кортизола и, таким образом, позитивно влиять на восстановление связи гипоталамо-гипофизарной оси и баланса стрессорных гормонов в целом. Однако в литературе есть указания и на возможные сложности с применением такой композиции. В работе [92], посвященной исследованию эффекта инкапсулированного в липосомы антиоксиданта SkQ1 на изолированные митохондрии, была обнаружена конкуренция в распределении SkQ1 между митохондриальными мембранами и липидными структурами. Это говорит о необходимости проведения исследований с широким спектром концентраций хинонов во избежание получения ложноотрицательного результата, связанного с распределением хинонов между мембранами клеток и липосомами.

Таким образом, представленный обзор описывает важность применения антиоксидантов, в частности хинонов, для предотвращения развития СПОД и других следствий ожоговых травм, а также указывает на необходимость дальнейших исследований, направленных на усиление защиты и регенерации кожных покровов при ожоговой болезни.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственная научная программа, тема № 122041100186-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. G. Jeschke, M. E. van Baar, M. A. Choudhry, et al., *Nat. Rev. Dis. Primers*, **6** (1), 11 (2020). DOI: 10.1038/s41572-020-0145-5
2. P. B. Comish, D. Carlson, R. Kang, and D. Tang, *J. Immunol.*, **205** (5), 1189 (2020). DOI: 10.4049/jimmunol.2000439
3. A. J. Majmundar, W. J. Wong, and M. C. Simon, *Mol. Cell*, **40** (2), 294 (2010). DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.022
4. P. D'Arpa and K. P. Leung, *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, **6** (10), 330 (2017). DOI: 10.1089/wound.2017.0733
5. S. Patel, *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **18** (11), 63 (2018). DOI: 10.1007/s11882-018-0817-3
6. J. M. Platnich and D. A. Muruve, *Arch. Biochem. Biophys.*, **670**, 4 (2019). DOI: 10.1016/j.abb.2019.02.008
7. C. Ott, K. Jacobs, E. Haucke, et al., *Redox Biol.*, **2**, 411 (2014). DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.016
8. D. Pantalone, C. Bergamini, J. Martellucci, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (13), 7020 (2021). DOI: 10.3390/ijms22137020
9. M. P. Rowan, L. C. Cancio, E. A. Elster, et al., *Crit. Care*, **19**, 243 (2015). DOI: 10.1186/s13054-015-0961-2
10. A. Beiraghi-Toosi, R. Askarian, F. Sadrabadi Haghighi, et al., *Emerg. (Tehran)*, **6** (1), e54 (2018).
11. Н. Т. Ватулин, Г. А. Игнатенко, Г. Г. Тарадин и др., *Бюл. сибирской медицины*, **19** (4), 198 (2020).
12. J. A. Bortolin, H. T. Quintana, T. de C. Tomé, et al., *World J. Hepatol.*, **8** (6), 322 (2016). DOI: 10.4254/wjh.v8.i6.322
13. J. Ma, Y. Wang, Q. Wu, et al., *Burns*, **43** (5), 1011 (2017). DOI: 10.1016/j.burns.2017.01.028
14. C.-Y. Yuan, Q.-C. Wang, X.-L. Chen, et al., *Burns*, **45** (3), 641 (2019). DOI: 10.1016/j.burns.2018.09.017
15. J. Wu, M. Zhou, X. Yu, et al., *Minerva Med.*, **110** (6), 587 (2019). DOI: 10.23736/S0026-4806.19.06000-2
16. A. Niculae, I. Peride, M. Tiglis, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (15), 8712 (2022). DOI: 10.3390/ijms23158712
17. A. V. Kozlov and J. Grillari, *Front Med (Lausanne)*, **9**, 806462 (2022). DOI: 10.3389/fmed.2022.806462
18. O. Cetinkale, A. Belce, D. Konukoglu, et al., *Burns*, **23** (2), 114 (1997). DOI: 10.1016/s0305-4179(96)00084-8
19. Y. K. Youn, G. J. Suh, S. E. Jung, et al., *J. Burn Care Rehabil.*, **19** (6), 542 (1998). DOI: 10.1097/00004630-199811000-00015
20. L. Guo, X. Wu, Y. Zhang, et al., *Hepatol. Res.*, **49** (3), 247 (2019). DOI: 10.1111/hepr.13315
21. J. Khanagavi, T. Gupta, W. S. Aronow, et al., *Arch. Med. Sci.*, **10** (2), 251 (2014). DOI: 10.5114/aoms.2014.42577
22. F. Dépret, W. F. Peacock, K. D. Liu, et al., *Ann. Intensive Care*, **9** (1), 32 (2019). DOI: 10.1186/s13613-019-0509-8
23. H. Illner and G. T. Shires, *Circ. Shock*, **9** (3), 259 (1982).
24. I. Alican, E. E. Unlüer, C. Yeğen, and B. C. Yeğen, *Peptides*, **21** (8), 1265 (2000). DOI: 10.1016/s0196-9781(00)00268-0

25. A. Weidinger, A. Müllebnner, J. Paier-Pourani, et al., *Antioxid. Redox Signal.*, **22** (7), 572 (2015). DOI: 10.1089/ars.2014.5996
26. A. Maroz, R. F. Anderson, R. A. J. Smith, and M. P. Murphy, *Free Radic. Biol. Med.*, **46** (1), 105 (2009). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.033
27. H. Nakazawa, K. Ikeda, S. Shinozaki, et al., *Sci. Rep.*, **7** (1), 6618 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-07011-3
28. S.-X. Guo, H.-L. Zhou, C.-L. Huang, et al., *Mar. Drugs*, **13** (4), 2105 (2015). DOI: 10.3390/md13042105
29. L. Li, J. Zhang, Q. Zhang, et al., *Burns Trauma*, **7**, 8 (2019). DOI: 10.1186/s41038-019-0146-3
30. T. Chao, B. I. Gómez, T. C. Heard, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **317** (6), C1229 (2019). DOI: 10.1152/ajpcell.00224.2019
31. J. J. Wen, C. B. Cummins, and R. S. Radhakrishnan, *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (7), E2350 (2020). DOI: 10.3390/ijms21072350
32. J. B. Perry, G. N. Davis, M. E. Allen, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **135**, 160 (2019). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.08.010
33. Q. Zang, D. L. Maass, J. White, and J. W. Horton, *J. Appl. Physiol.*, **102** (1), 103 (2007). DOI: 10.1152/jap-physiol.00359.2006
34. X. Lu, T. Costantini, N. E. Lopez, et al., *J. Cell. Mol. Med.*, **17** (5), 664 (2013). DOI: 10.1111/jcmm.12049
35. R. Xiao, M. Teng, Q. Zhang, et al., *PLoS One*, **7** (6), e39488 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0039488
36. J. Marín-García and M. J. Goldenthal, *J. Card. Fail.*, **8** (5), 347 (2002). DOI: 10.1054/jcaf.2002.127774
37. E. P. K. Yu and M. R. Bennett, *Free Radic. Biol. Med.*, **100**, 223 (2016). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.011
38. R. Yue, X. Xia, J. Jiang, et al., *J. Cell Physiol.*, **230** (9), 2128 (2015). DOI: 10.1002/jcp.24941
39. Y. Wu, C. Hao, X. Liu, et al., *Int. Immunopharmacol.*, **80**, 106189 (2020). DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106189
40. W.-J. Zhang, Z.-M. Fang, and W.-Q. Liu, *Parasit. Vectors*, **12** (1), 29 (2019). DOI: 10.1186/s13071-018-3223-8
41. A. P. West and G. S. Shadel, *Nat. Rev. Immunol.*, **17** (6), 363 (2017). DOI: 10.1038/nri.2017.21
42. G. L. Vega, P. Alaupovic, Z. J. Zhang, et al., *J. Burn Care Rehabil.*, **9** (1), 18 (1988). DOI: 10.1097/00004630-198801000-00006
43. F. Rassoul, V. Richter, C. Kistner, et al., *West Ind. Med. J.*, **58** (5), 417 (2009).
44. B. R. Gordon, T. S. Parker, D. M. Levine, et al., *Crit. Care Med.*, **24** (4), 584 (1996). DOI: 10.1097/00003246-199604000-00006
45. B. R. Gordon, T. S. Parker, D. M. Levine, et al., *Crit. Care Med.*, **29** (8), 1563 (2001). DOI: 10.1097/00003246-200108000-00011
46. H. E. C. Vanni, B. R. Gordon, D. M. Levine, et al., *J. Burn Care Rehabil.*, **24** (3), 133 (2003). DOI: 10.1097/01.BCR.0000066812.96811.28
47. E. J. Coombes, P. G. Shakespeare, and G. F. Batstone, *J. Trauma*, **20** (11), 971 (1980). DOI: 10.1097/00005373-198011000-00012
48. R. L. Harris, G. L. Cottam, J. M. Johnston, and C. R. Baxter, *J. Trauma*, **21** (1), 13 (1981). DOI: 10.1097/00005373-198101000-00002
49. O. Cetinkale and Z. Yazici, *Burns*, **23** (5), 392 (1997). DOI: 10.1016/s0305-4179(97)89764-1
50. J. T. Grbic, J. A. Mannick, D. B. Gough, and M. L. Rodrick, *Ann. Surg.*, **214** (3), 253 (1991). DOI: 10.1097/00000658-199109000-00008
51. K. L. Fritsche, *Adv. Nutr.*, **6** (3), 293S (2015). DOI: 10.3945/an.114.006940
52. A. Nicolaou, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **88** (1), 131 (2013). DOI: 10.1016/j.plefa.2012.03.009
53. S. Bohr, S. J. Patel, D. Sarin, et al., *Wound Repair Regen.*, **21** (1), 35 (2013). DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00853.x
54. G. Talabér, M. Jondal, and S. Okret, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **380** (1–2), 89 (2013). DOI: 10.1016/j.mce.2013.05.007
55. T. L. Palmieri, S. Levine, N. Schonfeld-Warden, et al., *J. Burn Care Res.*, **27** (5), 742 (2006). DOI: 10.1097/01.BCR.0000238098.43888.07
56. E. Raposio, M. P. Grieco, and E. Caleffi, *J. Plast. Surg. Hand Surg.*, **51** (6), 393 (2017). DOI: 10.1080/2000656X.2017.1281821
57. S. Ravi, K. A. Peña, C. T. Chu, and K. Kiselyov, *Cell Calcium*, **60** (5), 356 (2016). DOI: 10.1016/j.ceca.2016.08.002
58. A. A. Naumov, Y. V. Shatalin, T. K. Sukhomlin, and M. M. Potselueva, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **147** (4), 531 (2009). DOI: 10.1007/s10517-009-0543-x
59. E. K. Eriksson, K. Edwards, P. Grad, et al., *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, **1861** (7), 1388 (2019). DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.04.008
60. J. M. Villalba and P. Navas, *Antioxid. Redox Signal.*, **2** (2), 213 (2000). DOI: 10.1089/ars.2000.2.2-213
61. J. M. Villalba, F. Navarro, F. Córdoba, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92** (11), 4887 (1995). DOI: 10.1073/pnas.92.11.4887
62. E. Cadenas, P. Hochstein, and L. Ernster, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **65**, 97 (1992). DOI: 10.1002/9780470123119.ch3
63. R. E. Beyer, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **26** (4), 349 (1994). DOI: 10.1007/BF00762775
64. A. M. James, R. A. J. Smith, and M. P. Murphy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **423** (1), 47 (2004). DOI: 10.1016/j.abb.2003.12.025
65. V. Kagan, E. Serbinova, and L. Packer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169** (3), 851 (1990). DOI: 10.1016/0006-291x(90)91971-t
66. P. J. Quinn, J. P. Fabisiak, and V. E. Kagan, *Biofactors*, **9** (2–4), 149 (1999). DOI: 10.1002/biof.5520090209
67. M. Bentinger, K. Brismar, and G. Dallner, *Mitochondrion*, **7 Suppl**, S41 (2007). DOI: 10.1016/j.mito.2007.02.006
68. M. P. Barroso, C. Gómez-Díaz, J. M. Villalba, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **29** (3), 259 (1997). DOI: 10.1023/a:1022462111175
69. M. Inui, M. Ooe, K. Fujii, et al., *Biofactors*, **32** (1–4), 237 (2008). DOI: 10.1002/biof.5520320128
70. H. Nakazawa, K. Ikeda, S. Shinozaki, et al., *FEBS OpenBio*, **9** (2), 348 (2019). DOI: 10.1002/2211-5463.12580

71. M. W. Donnino, S. J. Mortensen, L. W. Andersen, et al., *Crit. Care*, **19**, 275 (2015). DOI: 10.1186/s13054-015-0989-3
72. N. Kuriyama, T. Nakamura, H. Nakazawa, et al., *Metabolites*, **12** (7), 613 (2022). DOI: 10.3390/metabol12070613
73. U. Maciejewska, L. Polkowska-Kowalczyk, E. Swiezewska, and A. Szkopinska, *Acta Biochim. Polonica*, **49** (3), 775 (2002). DOI: 10.18388/abp.2002_3785
74. M. Mubarakshina, S. Khorobrykh, and B. Ivanov, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **1757** (11), 1496 (2006). DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.09.004
75. M. M. Mubarakshina and B. N. Ivanov, *Physiologia Plantarum*, **140** (2), 103 (2010). DOI: 10.1111/j.1399-3054.2010.01391.x
76. M. Kozuleva, I. Klenina, I. Proskuryakov, et al., *FEBS Lett.*, **585** (7), 1067 (2011). DOI: 10.1016/j.febslet.2011.03.004
77. M. Kozuleva, I. Klenina, I. Mysyn, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **89**, 1014 (2015). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.016
78. C. Triantaphylidès, M. Krischke, F. A. Hoeberichts, et al., *Plant Physiol.*, **148** (2), 960 (2008). DOI: 10.1104/pp.108.125690
79. J. Kruk and A. Trebst, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777** (2), 154 (2008). DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.10.008
80. S. Rajagopal, E. A. Egorova, N. G. Bukhov, and R. Carpentier, *Biochim. Biophys. Acta*, **1606** (1–3), 147 (2003). DOI: 10.1016/s0005-2728(03)00111-7
81. V. P. Skulachev, Y. N. Antonenko, D. A. Cherepanov, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1797** (6–7), 878 (2010). DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.03.015
82. S. Kishi, K. Saito, Y. Kato, and H. Ishikita, *Photosynth. Res.*, **134** (2), 193 (2017). DOI: 10.1007/s11120-017-0433-4
83. M. Iwashima, J. Mori, X. Ting, et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **28** (2), 374 (2005). DOI: 10.1248/bpb.28.374
84. J. Mori, M. Iwashima, H. Wakasugi, et al., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **53** (9), 1159 (2005). DOI: 10.1248/cpb.53.1159
85. A. L. Pérez-Castorena, A. Arciniegas, M. T. Apan, et al., *Planta Med.*, **68** (7), 645 (2002). DOI: 10.1055/s-2002-32890
86. R. J. Burns, R. A. Smith, and M. P. Murphy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **322** (1), 60 (1995). DOI: 10.1006/abbi.1995.1436
87. G. F. Kelso, C. M. Porteous, C. V. Coulter, et al., *J. Biol. Chem.*, **276** (7), 4588 (2001). DOI: 10.1074/jbc.M009093200
88. Y. N. Antonenko, A. V. Avetisyan, L. E. Bakeeva, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **73** (12), 1273 (2008). DOI: 10.1134/s0006297908120018
89. D. N. Silachev, E. Y. Plotnikov, L. D. Zorova, et al., *Molecules*, **20** (8), 14487 (2015). DOI: 10.3390/molecules200814487
90. D. V. Cherkashina, I. A. Sosimchik, O. A. Semenchenko, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **76** (9), 1022 (2011). DOI: 10.1134/S0006297911090069
91. P. Nakhaei, R. Margiana, D. O. Bokov, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 705886 (2021). DOI: 10.3389/fbioe.2021.705886
92. Y. N. Antonenko, I. V. Perevoshchikova, T. I. Rokitskaya, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **44** (4), 453 (2012). DOI: 10.1007/s10863-012-9449-9

Pathogenetic Mechanisms of Burn Disease Associated with Oxidative Membrane Damage and Ways of Their Correction

D.V. Vilyanen*, N.I. Pashkevich**, M.M. Borisova-Mubarakshina*, and S.S. Osochuk**

*Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, prosp. Frunze 27, Vitebsk, 210009 Republic of Belarus

**Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Despite significant progress in the treatment of burn disease, mortality in this pathology can exceed 50% owing to the development of multiple organ dysfunction syndrome when more than 30% of the body surface area is affected. The review describes the most important molecular and biological mechanisms that underlie the development of multiple organ dysfunction syndrome in which free-radicals cause damage to plasma membranes, mitochondria, damaged mitochondria generate other free radicals, mitochondrial DNA is modified and used as a trigger of inflammatory processes in peripheral organs and systems. Secondary changes in the system of lipid transport in the blood and their role in generalization of multiple organ failure and hormonal imbalance are considered. In view of pathogenic metabolic shifts, use of antioxidants (such as quinones) in combination with lipid metabolism modulators is a reasonable strategy to reduce the activity of the inflammatory process and hormonal imbalance in the treatment of burn disease.

Keywords: burn disease, reactive oxygen species, oxidative stress, multiple organ dysfunction syndrome, antioxidants, plastoquinone

СИНАПТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА АУТИЗМА, БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА, БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2023 г. А.Е. Хайруллин*, **, #, М.А. Мухамедьяров*, С.Н. Гришин*,
А.Ю. Теплов*, К.К. Нагиев*, А.У. Зиганшин*

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

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

#E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.09.2022 г.

После доработки 25.09.2022 г.

Принята к публикации 26.09.2022 г.

В последнее время появились данные о том, что важную роль в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний и расстройств аутистического спектра играет нарушение функционирования синапсов как на пре-, так и на постсинаптическом уровне. Особый интерес могут представлять сведения о синаптических нарушениях на ранних, досимптомных стадиях болезни, когда потенциально еще возможно предотвратить массовую дегенерацию нейронов. Возможно, как раз коррекция синаптической трансдукции на данной стадии весьма эффективна в плане терапии ряда подобных заболеваний. Настоящий обзор посвящен роли синаптических структур в патогенезе болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза и расстройств аутистического спектра.

Ключевые слова: синапс, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, расстройства аутистического спектра.

DOI: 10.31857/S0006302923010192, EDN: OBJWAN

В мире постоянно увеличивается число людей, страдающих неврологическими заболеваниями [1]. Для многих из этих заболеваний, в частности, нейродегенеративных, так и не найдено эффективного лечения. Характерно, что при неврологических заболеваниях отмечены патологические изменения в связующем звене — синаптических образованиях.

Известно, что при болезни Альцгеймера синаптическая дисфункция может наблюдаться еще задолго до массовой гибели нейронов и других патологических признаков [2], что дает основание называть болезнь Альцгеймера «синаптической патологией» [3]. При болезни Альцгеймера еще задолго до образования амилоидных бляшек, элиминации синапсов и гибели нейронов уменьшается синтез важных белков эндоцитоза (AP-2, Arp-180, динамина, синаптотаксина) в префронтальной коре [4]. В модели бокового амиотрофического склероза на трансгенных мышах нарушения электрогенеза мотонейронов и дисфункция нервно-мышечных синапсов возникают задолго до клинических проявлений заболевания, уже в постнатальном периоде [5, 6].

При болезни Хантингтона специфические нарушения процессов экзо- и эндоцитоза проявляются на самых ранних стадиях заболевания и, вероятно, необходимы для его развития [7]. При синдроме Дауна важное значение в патогенезе, вероятно, играет сверхэкспрессия эндоцитозных белков 21-й хромосомы синаптозина и интерсектина [8]. В дополнение к этому многие тяжелые последствия такого тяжелого недуга, как эпилепсия, характеризующегося гиперактивностью нейронов, возникают как результат неконтролируемых циклов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул. В настоящее время отсутствуют данные о детальных молекулярных механизмах, обуславливающих развитие синаптической дисфункции при нейродегенеративных заболеваниях.

Что касается расстройств аутистического спектра, биоинформатический анализ сигнальных путей и генных сетей привел к пониманию, что многие из вызывающих эти расстройства мутационные изменения сказываются на функционировании синапсов [9]. Как известно, синапс пластичен, и наиболее стойкие формы синаптической пластичности сопутствуют изменениям в биосинтезе белка. Локальная трансляция — это тонко регулируемый процесс, центральную роль

Сокращение: βАП — β-амилоидный пептид.

в регуляции инициации которого играет сигнальный путь mTOR. Мутационное повреждение хотя бы одного из звеньев этого сигнального пути приводит к нарушениям синаптической пластичности и поведения. С нарушениями регуляции локальной трансляции в дендритах связаны моногенные синдромы Каудена, Ретта, Нунана, Костелло, нейрофиброматоз I типа, туберозный склероз и синдром Мартина—Белл, у части носителей которых также диагностируются расстройства аутистического спектра [9, 10].

Данный обзор посвящен синаптическим механизмам развития патологий при некоторых расстройствах аутистического спектра, а также таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера и боковой амиотрофический склероз.

СИНАПТИЧЕСКИЙ КОМПОНЕНТ ПРИ ПАТОГЕНЕЗЕ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Л. Каннер впервые описал поведенческий синдром, известный как аутизм, в 1943 г. [11]. Последующие исследования показали, что синдром передается по наследству и что предрасположенность к аутизму сопряжена с риском более широкого спектра проявлений, выходящих за рамки традиционных диагностических критериев. Это привело к расширению диагностических концепций, пересмотру диагностических критериев и появлению термина «расстройство аутистического спектра» [12]. В нынешнем тысячелетии отмечен рост числа таких заболеваний более, чем на 1%.

Моногенные синдромы сыграли огромную роль в изучении молекулярных механизмов расстройств аутистического спектра [9]. С помощью модельных животных, несущих мутации, приводящие к разным типам синдромного аутизма, было продемонстрировано, что нарушения в структуре, функциях или формировании синапсов являются основной причиной возникновения фенотипа расстройств аутистического спектра [13].

Нейролигины и нейрексыны являются молекулами клеточной адгезии, необходимыми для функционирования синапсов. Известно, что сбой взаимодействий нейролигинов с нейрексынами может играть роль в патогенезе расстройств аутистического спектра и когнитивных отклонений [13, 14]. Мутации в генах нейрексынов также приводят к фенотипу расстройств аутистического спектра [9, 15]. Три гена нейрексынов, *NRXN1*, *NRXN2* и *NRXN3*, кодируют по две изоформы белков каждый, которые считаются с независимых промоторов, а сложный альтернативный сплайсинг генерирует тысячи вариантов белков

[16]. Нейролигины являются эндогенными лигандами нейрексынов и кодируются четырьмя генами (*NLGN1*, *NLGN2*, *NLGN3* и *NLGN4*), мРНК которых также подвергается альтернативному сплайсингу. Как нейрексыны, так и нейролигины имеют по одному трансмембранному и короткому цитоплазматическому домену, последний содержит PDZ-мотив на карбоксильном конце [17, 18].

В норме нейролигины и нейрексыны формируют транс-синаптический комплекс, организующий постсинаптический и пресинаптический компартменты путем связывания с белками CASK, MAGUK и PSD95 [9, 13]. Эксперименты с модельными животными показали, что отсутствие трех нейролигинов, *Nlgn1*, *Nlgn2* и *Nlgn3*, приводит к перинатальной гибели эмбрионов из-за респираторной недостаточности [19]. Полное отсутствие α -нейрексынов также приводит к гибели эмбрионов из-за проблем с дыханием, но уже пренатально [20]. У мышей, несущих аллель *NLGN3* с мутацией R451C, впервые обнаруженной у одного из пациентов с расстройством аутистического спектра, было зафиксировано поведение, аналогичное аутизму без снижения обучаемости, но с нарушением социального взаимодействия [21]. Делеция ортолога *NLGN4* гена человека у мышей вызывала нарушение социального взаимодействия, что является аналогией расстройств аутистического спектра у человека [22].

Синдром Фелан — МакДермид — это генетическое расстройство, вызывающее широкий спектр симптомов различной степени тяжести: задержку развития или умственную отсталость, дефицит двигательных навыков, задержку речи или ее отсутствие, аутизм. Данный синдром является результатом терминальной или интерстициальной хромосомной делеции 22q13.3 [23, 24]. Ключевой ген, мутация в котором ответственна за формирование синдрома Фелан — МакДермид, — *SHANK3*, — кодирует структурный белок, отвечающий за фиксацию рецепторов глутамата и нейролигин-нейрексыновых комплексов на постсинаптической мембране [9, 25–27]. Белок Shank3 входит в семейство, состоящее из белков Shank1, Shank 2 и Shank 3, являющихся структурными компонентами постсинаптической мембраны, которые также называются обогащенными пролином синапс-связанными белками [9]. Shank-белки содержат несколько доменов белок-белкового взаимодействия, позволяющих им связываться со множеством белков в постсинаптическом пространстве, в том числе с рецепторами глутамата, нейролигин-нейрексыновыми комплексами и компонентами актинового цитоскелета [28]. В результате этих взаимодействий Shank-белки модулируют морфологию дендритных шипиков и синаптическую передачу.

Важная роль белка Shank3 для функционирования синапсов была подтверждена экспериментально [29]. Так, в культуре нейронов гиппокампа нокадаун гена *SHANK3* привел к увеличению длины и уменьшению количества дендритных шипиков. У модельных мышей с мутантным вариантом гена *SHANK3* была снижена AMPA-опосредованная синаптическая передача, нарушена длительная потенция в гиппокампе [30], изменены соотношение белков в постсинаптическом пространстве и морфология дендритов [31, 32]. Для изучения механизмов болезни были созданы линии плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с синдромом Фелан—МакДермид, на которых было показано, что потеря функциональности Shank3 приводит в нейронах к снижению амплитуды и частоты постсинаптического возбуждения и уменьшает количество возбуждающих синапсов. Обработка инсулиноподобным фактором роста 1 восстанавливала нормальную функциональность синапсов. В настоящее время инсулиноподобный фактор роста 1 проходит вторую фазу клинических испытаний для лечения синдрома Фелан—МакДермид и других расстройств аутистического спектра [33].

Синдром Мартина—Белл (синдром ломкой X-хромосомы) диагностируется у 5–8% детей с расстройствами аутистического спектра и обычно характеризуется выраженным аутизмом при сниженном интеллекте [34]. Подавляющее большинство пациентов с синдромом Мартина—Белл — мужчины. Фенотипические проявления синдрома Мартина—Белл у них весьма значительны и включают макроорхидизм, увеличенный размер ушей, асимметричные черты лица, увеличенные руки, часто аномалии соединительной ткани, митрального клапана и аорты. У трети женщин, носителей этой мутации, при отсутствии каких-либо иных фенотипических проявлений снижен интеллект. Фенотип синдрома Мартина—Белл вызывается транскрипционным сайленсингом гена *FMR1*, в 5'-нетранслируемом районе которого содержится нестабильный при передаче в поколениях ЦГГ-повтор [9]. Нормальное количество повторов (отсутствие синдрома) — от 29 до 31. Премутация — от 55 до 200 повторов (когда синдром не развивается). Полная мутация — более 200 повторов (обычно от 230 до 4000), что приводит к метилированию всего промоторного района гена *FMR1*, замолчанию гена, и, следовательно, отсутствию его белкового продукта FMRP. FMRP является РНК-связывающим белком, и его функции включают транспорт большого количества мРНК в дендриты, прямую регуляцию локальной трансляции и стабильности мРНК в синапсе [35]. В экспериментах с модельными мышами, у которых нокаутирован ген, гомологичный *FMR1* (*Fmr1 KO*), показано повышение базального уровня белкового синтеза в гиппокампе.

Попытки скорректировать избыточный биосинтез белка в синапсах мышей *Fmr1 KO* были предприняты с использованием негативных регуляторов метаболитных рецепторов глутамата (mGluR1 и mGluR5). В настоящее время четыре различных препарата, являющихся негативными регуляторами mGluR5-рецепторов, находятся на различных стадиях клинических испытаний для коррекции аберрантного поведения при синдроме Мартина—Белл [36].

Другой перспективной возможностью коррекции синдрома Мартина—Белл фенотипа оказалась активация рецепторов ГАМК, которая смягчала проявление синдрома у мух дрозофил [37] и нокаутных мышей [38]. Баклофен, селективный агонист ГАМКВ-рецепторов, прошел успешные клинические испытания по коррекции синдрома Мартина—Белл [36].

Альтернативно для лечения была предположена коррекция структурных дефектов дендритов [39]. В экспериментах были использованы те же мыши *Fmr1 KO*, а в качестве белковой мишени была выбрана p21-активируемая киназа, которая модулирует динамику актинового цитоскелета. Однократное использование ингибитора РАК FRAX486 оказалось достаточно для полной коррекции фенотипа данного синдрома у взрослых особей таких мышей. Наблюдалась нормализация морфологии дендритных шипиков.

Синдром Ангельмана («синдром счастливой куклы») характеризуется такими признаками, как задержка психического развития, нарушения сна, припадки, хаотические движения (особенно рук), частый смех или улыбки [9]. При синдроме Ангельмана отсутствуют некоторые гены длинного плеча 15-й хромосомы (причем страдает материнская хромосома, тогда как в случае повреждения отцовской хромосомы возникает синдром Прадера—Вилли). В большинстве случаев при синдроме Ангельмана наблюдается делеция 15q11-q13, в районе расположения которой локализуется ген убиквитин-лигазы E3 (*Ube3a*). Именно его считают ответственным за появление данного синдрома [40, 41]. У модельных мышей, нокаутных по гену *Ube3a*, уменьшено количество синапсов, денормализована длительная потенция в гиппокампе и способность к обучению [42]. Очевидно, что проблемы при синдроме Ангельмана возникают в результате избытка белков-мишеней убиквитин-лигазы E3 в постсинаптическом пространстве, одним из которых является ассоциированный с цитоскелетом белок Arc. У мышей, мутантных по *Ube3a*, экспрессия Arc повышена. Функции белка Arc связаны с интернализацией AMPA-подтипа рецепторов глутамата в возбуждающих синапсах [43]. Трансляция Arc регулируется белком FMRP, ответственным за формирование синдрома Мартина—Белл. Предполагается,

что гиперэкспрессия Arc является точкой пересечения в патофизиологии синдрома Ангельмана и синдрома Мартина—Белл [44] и ингибирование mGluR5 может скорректировать фенотип синдрома Ангельмана так же, как и синдром Мартина—Белл [45]. Для коррекции некоторых черт мутантного фенотипа синдрома Ангельмана был использован препарат L-диоксифенилаланин [9]. Он прошел клинические испытания, хотя молекулярные механизмы, обуславливающие его эффективность, еще не вполне понятны. Показано только, что мутация или делеция гена *Ube3a* у мышей нарушает функционирование дофаминергической системы [46].

Мишень рапамицина млекопитающих (mTOR — mammalian or mechanistic target of rapamycin) — серин/треонинкиназа — является ключевым регулятором инициации трансляции [47] и действует как центральный компонент двух мультибелковых комплексов, mTORC1 и mTORC2, которые различаются композицией белков и субстратами [48]. Как известно, сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR — внутриклеточный сигнальный путь, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы AKT 1 и mTOR. Это один из универсальных сигнальных путей, характерных для большинства клеток человека. Он отвечает за уход от апоптоза, рост, пролиферацию клеток, метаболизм [49]. Он вовлечен в регуляцию иммунного ответа [50], клеточного и опухолевого роста [51], а также в формирование памяти и долговременной синаптической пластичности [9]. Большая часть доказательств связи функций mTOR с синаптической пластичностью получена с использованием рапамицина как ингибитора данной киназы. Исследования на генетически модифицированных животных подтвердили вовлеченность этого сигнального пути в регуляцию пластичности межнейронных связей [52]. У позвоночных долговременные изменения характера синаптической передачи описываются как, соответственно, долговременная потенция и депрессия. Наиболее стойкие формы синаптической пластичности сопровождаются изменениями в биосинтезе белка как в теле нейронов, так и локально в дендритах [48]. Мутационное повреждение любого компонента сигнального пути mTOR приводит к нарушениям локальной трансляции, и как следствие, синаптической пластичности и обусловленного ею поведения. С нарушениями регуляции локальной трансляции в дендритах связаны следующие моногенные расстройства аутистического спектра: нейрофиброматоз I типа, синдром Костелло, синдром Нунана, синдром Каудена, туберозный склероз, синдром Мартина—Белл и синдром Ретта [45].

Туберозный склероз (болезнь Бурневилля) — мультисистемное расстройство, характерной чер-

той которого являются доброкачественные опухоли, расположенные во многих органах и тканях, чаще всего в мозге, на коже, глазах, в почках и сердце [53]. Неврологические проявления туберозного склероза у пациентов очень варьируют — от симптомов эпилепсии до выраженной олигофрении. Около половины пациентов с туберозным склерозом соответствуют критериям расстройств аутистического спектра [54]. Были установлены два локуса, связанные с заболеванием, а позднее описаны расположенные в них гены TSC1 и TSC2, кодирующие соответственно белки гамартин и туберин. Оба гена принадлежат к числу генов-супрессоров опухолей, в норме не позволяющих развиваться патологиям, ограничивающих избыточный рост тканей [53]. Гамартин и туберин формируют гетеродимерный комплекс, который ингибирует mTOR. В отсутствие ингибирования со стороны TSC1/2-комплекса mTOR чрезмерно стимулирует клеточный рост и пролиферацию. Мутации как гена *TSC1*, так и *TSC2* в гомозиготном состоянии летальны уже на эмбриональной стадии развития организма. В экспериментах на модельных животных было показано, что расстройства аутистического спектра и снижение интеллекта у больных туберозным склерозом, скорее всего, не связаны с эпилепсией и формированием доброкачественных опухолей [9]. Особенно интересный фенотип был обнаружен у мышей *Tsc2*^{+/-}, которые продемонстрировали нарушения синаптической пластичности и поведения при отсутствии судорог и избыточного разрастания нервной ткани [52]. У данных мышей была усилена поздняя фаза длительной потенциации, как известно, требующая интенсивного белкового синтеза, но именно повышение уровня биосинтеза белка является отражением повышенной активности mTOR. У всех модельных линий мышей, мутантных по *TSC1* или *TSC2*, поведенческие и молекулярные нарушения устранялись после применения mTOR-ингибиторов, таких, как рапамицин [55–57]. Характерно, что даже у взрослых мышей *Tsc2*^{+/-} после лечения рапамицином были отмечены как восстановление длительной потенциации, так и значительное улучшение поведения и обучаемости [52], что предполагает обратимость поведенческих нарушений при аутизме. В настоящее время производное рапамицина эверолимус одобрен USFDA для лечения не-неврологических проявлений туберозного склероза. Проводятся испытания этого препарата для лечения нейрокогнитивных нарушений у детей [36].

Что касается mTOR-ингибиторов, известна липидная фосфатаза PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) — ингибитор сигнального пути mTOR [9]. В настоящее время известна функция PTEN как супрессора опухолевого роста и показана роль инактивации

этого фермента в канцерогенезе. С мутациями в гене *PTEN* связывают синдром Каудена, иначе называемый синдромом множественных гамартом. Также такие мутации часто сопровождаются неврологическими проявлениями — макроцефалией, эпилепсией, снижением интеллекта и аутизмом. Считается, что доля мутации *PTEN* составляет до 5% среди расстройств аутистического спектра, но она может быть и выше, поскольку, как правило, анализируются образцы крови пациентов методом полноэкзомного секвенирования, а при таком варианте анализа не учитываются мутации в некодирующих участках. Характерно, что корреляция между *PTEN*-связанным аутизмом и канцерогенезом отсутствует [51]. Эксперименты на модельных животных подтвердили роль *PTEN* в формировании расстройств аутистического спектра. Делеция гена *PTEN* приводила в нейронах мышей к увеличению размеров тела нейронов, гипертрофии аксонов и дендритов, и, как следствие, размеров синапсов. Социальное взаимодействие таких животных также было нарушено [58]. В экспериментах с избирательно нокаутированным геном *PTEN* в нейронах слухового пути наблюдалось значительное усиление возбуждающего входного синаптического сигнала по сравнению с нейронами с нормальной экспрессией *PTEN* [59]. Дендриты *PTEN*-нокаутированных нейронов были длиннее нормы, плотность расположения шипиков на них была повышена. Как морфологические, так и функциональные нарушения данных нейронов блокировались рапамицином, из этого пришли к выводу, что все фенотипические проявления делеции *PTEN* в нейронах происходят в результате гиперактивации сигнального пути mTOR [59].

Синдром Ретта обычно диагностируется у девочек после полугода нормального развития с частотой 1:10000 — 1:15000 [9]. Первыми проявлениями становятся бесцельные стереотипные движения руками, потеря речи, мимики и отслеживания глазами. Практически все пациенты соответствуют критериям расстройств аутистического типа, с отягощениями в виде нарушения дыхания, судорог, тахикардии, брадикардии и сколиоза. Синдром Ретта связан с мутацией в гене *MECP2*, локализованном на X-хромосоме. Для мальчиков null-мутация *MECP2* летальна, ее носители обычно не доживают до двух лет. Несколько известных случаев болезни у мальчиков сопровождались синдромом Клайнфельтера с полисомией XXY [60]. В настоящее время описано достаточно много различных мутаций *MECP2*, в том числе и синдром Xq28, причиной которого является дупликация гена *MECP2*. Последствиями этих мутаций являются самые разнообразные нейropsychические заболевания: аутизм, эпилепсия, шизофрения, биполярное расстройство, болезнь Паркинсона, тремор и снижение интеллек-

та [45]. MeCP2 — это белок, который локализован в ядре клеток и связывается с метилированным цитозином. Взаимодействуя с промоторными областями некоторых генов, включая BDNF (brain-derived neurotrophic factor), MeCP2 активирует их транскрипцию. Было продемонстрировано также, что MeCP2 конкурирует с гистоном H1 за сайты связывания с ДНК, но молекулярные механизмы, приводящие к формированию фенотипов синдрома Ретта и Xq28, пока не выяснены [61]. Мыши, лишенные функционального MeCP2-белка, воспроизводили фенотип синдрома Ретта [62, 63]. Морфологически мозг таких мышей подходил на нормальный, но с микроцефалией, при этом количество дендритов у нейронов было меньше нормы и наблюдалось их распухание [64]. На молекулярном уровне у модельных MeCP2-мышей было обнаружено чрезмерное ингибирование mTOR-сигнального пути — гипофосфорилирование протеинкиназы B, mTOR-киназы, рибосомного белка S6, p70S6K-киназы и, как следствие, снижение биосинтеза белка [65]. Ген *BDNF* был среди первых изученных мишеней MeCP2. Белок BDNF связывается с тирозинкиназным рецептором B (TrkB) и активирует целый ряд внутриклеточных сигнальных путей, включая mTOR [66]. Считается, что снижение уровня белка и мРНК BDNF вносит основной вклад в патологию синдрома Ретта [67]. Использование рекомбинантного BDNF в его терапии осложнено низкой проницаемостью гематоэнцефалического барьера для этого белка, поэтому исследования сосредоточены на бустерах и миметиках BDNF [9]. В настоящее время на стадии клинических испытаний находятся два бустера BDNF — финголимод и копаксон, оба препарата ранее были одобрены для лечения рассеянного склероза. Финголимод является модулятором сфингозин-1-фосфатных рецепторов, который приводит к увеличению экспрессии BDNF и активации TrkB-зависимых сигнальных путей [68]. Копаксон известен как иммуномодулятор. Один из предполагаемых механизмов его действия — увеличение экспрессии и высвобождения BDNF из аутореактивных Т-клеток [69].

Центральная роль mTOR в интегрировании множества экстраклеточных и внутриклеточных сигналов объясняет сложную картину симптоматики аутизма у человека, которая часто включает аллергии и иммунные нарушения [9, 70, 71]. У модельных мышей была вызвана аллергическая реакция на молочную сыворотку, которая приводила к снижению социального взаимодействия и нарастанию повторяющегося поведения. Активация mTOR была выявлена в кишечнике и в мозге таких мышей и, как и в случае с аутизмом, рапамицин снимал как поведенческие, так и иммунологические проявления аллергии на молочный белок [71]. Таким образом, возможно, mTOR яв-

ляется тем сигнальным путем, который объединяет поведенческие и иммунологические проблемы расстройств аутистического спектра и, следовательно, может оказаться оптимальной мишенью для коррекции их проявлений.

У трехлетнего ребенка, принимавшего витамин D3 в терапевтических дозах, было отмечено ослабление проявлений расстройств аутистического спектра [9]. Такое могло произойти благодаря способности витамина D3 ингибировать mTOR посредством усиления экспрессии активируемого повреждениями ДНК транскрипта 4 (DDIT4 – DNA damage-inducible transcript 4), являющегося сильным супрессором mTOR [73, 74].

СИНАПТИЧЕСКАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Исследования последних десятилетий свидетельствуют о том, что основой когнитивных нарушений и потери памяти при болезни Альцгеймера может быть нарушение межнейрональной синаптической передачи и синаптической пластичности. В соответствующих областях мозга наблюдается выраженное снижение количества синапсов и пресинаптического белка синаптофизина, которое хорошо коррелирует с когнитивными нарушениями [75]. Нарушение памяти и синаптическая дисфункция появляются еще до отложения амилоидных бляшек и гибели нейронов. Это может свидетельствовать о том, что дефицит синаптических функций, а не потеря нейронов лежит в основе начального развития болезни [76]. В подтверждение синаптической теории развития болезни Альцгеймера можно привести следующие доказательства. 1) Селективная потеря памяти (при сохраненных сенсорных и моторных функциях в начале болезни) – свидетельство нарушения функций синапсов – морфологического субстрата памяти. 2) Количество синапсов в гиппокампе пациентов снижено на 18% уже при легком когнитивном нарушении, а при болезни Альцгеймера средней тяжести – может снижаться до 55% [77]. 3) Потеря синапсов начинается раньше, чем потеря нейронов [78]. 4) При болезни Альцгеймера значительно снижается количество многих пре- и постсинаптических белков, а также многих нейротрансмиттеров [79]. 5) Степень когнитивных нарушений лучше всего коррелирует именно со снижением количества синапсов [78, 80]. 6) β -Амилоидный пептид – ключевой фактор патогенеза болезни Альцгеймера – оказывает широкий спектр токсических эффектов на синаптическую передачу *in vivo* и *in vitro*, а также нарушения памяти у животных [81].

Очень интересным и удивительным представляется тот факт, что гениальный нейрогистолог, нобелевский лауреат С. Рамон-и-Кахаль еще в 1892 г. в своей книге «Структура аммониева рога»

по сути предсказал синаптическую природу развития деменции: «Можно представить, что амнезия, нехватка мыслительных ассоциаций, деменция могут возникнуть, когда синапсы между нейронами слабеют в результате патологического процесса в коре, при этом отростки нейронов атрофируются и больше не образуют контакты, а кортикальные мнемонические и ассоциативные области подвергаются частичной дезорганизации. Наша гипотеза также подразумевает лучшее сохранение более старых воспоминаний – воспоминаний о молодости в старости – поскольку эти ассоциативные пути возникли очень давно, повторились много раз и, очевидно, получили большую силу. Кроме того, они были сформированы в период жизни, когда нейрональная пластичность максимальна».

В наших собственных исследованиях мы использовали β -амилоидный пептид (β АП – олигопептид, состоящий из 38–42 аминокислотных остатков, который образуется во внеклеточном пространстве при расщеплении трансмембранного белка-предшественника амилоида). Как известно, избыточная продукция и накопление β АП лежат в основе патогенеза болезни Альцгеймера и ряда других нейродегенеративных заболеваний [81]. В электрофизиологических экспериментах мы оценивали влияние β АП на мембранный потенциал покоя волокон скелетных мышц лягушки [82]. β АП в диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10^{-8} М вызывал медленную, значительную, обратимую деполяризацию мембран мышечных волокон. Воздействие развивалось быстрее при более высоких концентрациях β АП (10^{-6} – 10^{-7} М). Эффект β АП полностью отсутствовал в растворах, не содержащих Na^+ . β АП-опосредованная деполяризация также предотвращалась в присутствии тетродотоксина.

В дальнейших экспериментах мы сравнительно исследовали действие β АП на постсинаптические ответы и сократимость скелетных мышц холоднокровных (озерных лягушек) и теплокровных (мышей) [83]. β АП в концентрации 10^{-6} до 10^{-8} М индуцировал деполяризацию мышечных волокон у тех и других, но нарушал сократимость только у лягушек, но не у мышей, за счет снижения амплитуды потенциалов концевой пластинки и повышения порогового потенциала. Незменная сократительная способность мышей в присутствии β АП обусловлена более высоким фактором безопасности нервно-мышечной передачи у млекопитающих по сравнению с амфибиями.

Тем не менее, была выявлена общность в механизмах нарушений электрогенеза скелетных мышечных волокон при моделировании болезни Альцгеймера, характеризующихся снижением ве-

личины мембранного потенциала покоя и активности Na^+/K^+ -насоса плазмолеммы. Вероятно, нарушение процессов секреции нейромедиатора и рециклирования синаптических везикул при нейродегенеративных заболеваниях может быть связано с нарушением функций пресинаптических белков, таких как синапсин 1, синаптофин и др. [79, 84–86].

Нами также было изучено влияние ингибиторов ацетилхолинэстеразы на моделях болезни Альцгеймера у мышей [87]. У трансгенных мышей, экспрессирующих химерный белок-предшественник амилоида, ингибиторы ацетилхолинэстеразы — новое производное 6-метилурацила C-35 и используемый в клинике донепезил — частично реверсировали сокращение числа синапсов, уменьшали число амилоидных бляшек, восстанавливали способность к обучению. Эти результаты доказывают, что ингибиторы ацетилхолинэстеразы обладают действием, модифицирующим болезнь Альцгеймера.

Все приведенные результаты всесторонних исследований подтверждают создавшееся мнение о болезни Альцгеймера как о «синаптической патологии» и определяют направление поиска возможных средств излечения.

СИНАПТИЧЕСКАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПРИ БОКОВОМ АМИОТРОФИЧЕСКОМ СКЛЕРОЗЕ

Боковой амиотрофический склероз — прогрессирующее, фатальное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением мотонейронов головного и спинного мозга. Клинически заболевание проявляется в виде мышечной слабости, параличей и атрофии скелетных мышц. По мере прогрессирования болезнь захватывает практически все скелетные мышцы, включая диафрагму. В большинстве случаев смерть пациентов наступает от паралича дыхательных мышц через 3–5 лет после постановки диагноза [88]. Распространенность бокового амиотрофического склероза составляет три-пять случаев на сто тысяч человек [89, 90]. В настоящее время отсутствуют эффективные методы лечения бокового амиотрофического склероза, что является одной из важнейших проблем современной медицины.

В последние годы появились сведения о том, что дегенерация спинальных мотонейронов при боковом амиотрофическом склерозе может быть вызвана деструкцией нервно-мышечного синапса [88]. Показано, что предотвращение апоптоза тел мотонейронов слабо влияет на развитие заболевания у *SOD1*-трансгенных мышей [89–91], а селективная экспрессия мутантной *SOD1* в мотонейронах не вызывает выраженной клинической картины [92, 93]. Кроме того, установлено, что

селективная экспрессия мутантной *SOD1* в скелетной мышце вызывает некоторые признаки бокового амиотрофического склероза у мышей [94]. Есть сведения о разрушении нервно-мышечных синапсов у трансгенных *SOD1*-мышей [92–94].

Уже на досимптомной стадии наблюдается снижение количества синапсов, дающих положительную окраску одновременно на пресинаптический белок SV-2 и на холинорецепторы, при этом количество кластеров холинорецепторов не снижается даже на терминальной стадии бокового амиотрофического склероза у мышей [95]. Эти данные свидетельствуют об отсоединении нервных терминалей от концевых пластинок скелетных мышц. Вместе с тем, в настоящее время отсутствуют сведения о функциональном состоянии нервно-мышечного синапса при боковом амиотрофическом склерозе, хотя такие сведения могли бы значительно продвинуть нас в понимании патофизиологии заболевания.

Недавние исследования показали ограниченное или неожиданное участие шванновских клеток в боковом амиотрофическом склерозе. Установлено, что шванновские клетки резистентны к агрегации mSOD1 (известно, что чаще всего развитие заболевания связано с мутацией в гене *SOD1* (24.0% при семейной форме бокового амиотрофического склероза и 4.6% при его спорадической форме)) [96]. Удивительно, что селективное снижение синтеза mSOD1 в шванновских клетках *SOD1G37R*-мышей ускоряет развитие болезни, что сопровождается снижением уровня инсулиноподобного фактора роста в нервах [97]. Терминальные шванновские клетки показывают выраженную активацию и морфологические изменения в нервно-мышечных синапсах mSOD1-животных, вызванные процессами денервации-реиннервации и связанные с повышением экспрессии CD44 (интегральный клеточный гликопротеин, играющий важную роль в межклеточных взаимодействиях) [98]. В действительно перисинаптические шванновские клетки играют необходимую роль в направлении аксонов при реиннервации денервированных концевых пластинок. Коллатеральный и терминальный спраутинг оставшихся двигательных аксонов является важным компенсаторным механизмом при потере функциональных двигательных единиц при нервно-мышечных заболеваниях и после травмы. Коллатеральный спраутинг был описан при развитии бокового амиотрофического склероза [99], при данной патологии он снижен по сравнению с нормальным и не дает продолжительной функциональной компенсации [100, 101].

Учитывая значительное разнообразие генов и факторов окружающей среды, связанных с возникновением и развитием бокового амиотрофи-

ческого склероза, в настоящее время сформировались представления о нем как о заболевании с широким спектром этиологических причин, действие которых запускает клеточно-молекулярных механизмы, приводящие к развитию сходных клинических симптомов, связанных с дегенерацией мотонейронов [102]. Несмотря на большое количество исследований в данной области, до сих пор не удалось разработать единую гипотезу, объединяющую различные патогенетические механизмы, что затрудняет разработку эффективной нейропротекторной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важное значение в патогенезе многих неврологических патологий имеют периферические нарушения нервно-мышечной и сердечно-сосудистых систем, которые зачастую и становятся непосредственными причинами инвалидизации и смерти. К ним можно отнести атрофию и паралич скелетных мышц, инфаркт миокарда и т.д. Необходимо понимать, что патология нервно-мышечной и сердечно-сосудистой систем при нейродегенеративных заболеваниях и расстройствах аутистического спектра не является просто «отражением» дегенеративных изменений в нервной системе, а представляет собой отдельный, практически неизученный аспект патогенеза данных заболеваний, значение которого в практической медицине недооценивается. Периферические дисфункции при нейродегенеративных заболеваниях и расстройствах аутистического спектра могут быть первичными, либо усиливающими дегенеративный процесс в центральной нервной системе, что повышает их значимость в клиническом течении заболевания.

В последнее время для расстройств, связанных с нарушениями синаптической передачи, стали использовать термин «синапсопатия» (synapsopathy) [9]. Успешный поиск лекарств для лечения различных синапсопатий — прекрасная иллюстрация использования методов молекулярной биологии в медицине. В данном обзоре мы попытались обобщить доступные на сегодняшний день экспериментальные факты, связывающие нейродегенеративные заболевания и расстройства аутистического спектра с некоторыми синапсопатиями, и возможности фармакологической коррекции этих патологий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Казанского государственного медицинского университета Минздрава России по договорам № 1/22-3 и № 2/22-5 о предоставлении гранта в рамках Программы развития Университета, а также в рамках программы «Стратегическое ака-

демическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. C. Dalakas, H. Alexopoulos, and P. J. Spaeth, *Nat. Rev. Neurol.*, **16**, 601 (2020).
2. D. J. Selkoe, *Science*, **298**, 789 (2002).
3. H. W. Querfurth and F. M. LaFerla, *N. Engl. J. Med.*, **362**, 329 (2010).
4. E. Masliah, M. Mallory, M. Alford, et al., *Neurology*, **56**, 127 (2001).
5. M. Dadon-Nachum, E. Melamed, and D. Offen, *J. Mol. Neurosci.*, **43**, 470 (2011).
6. J. Durand, J. Amendola, C. Bories, et al., *J. Physiol.*, **99**, 211 (2006).
7. J. Y. Li, M. Plomann, and P. Brundin, *Trends Mol. Med.*, **9**, 414 (2003).
8. C. C. Garner and D. Z. Wetmore, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **970**, 451 (2012).
9. Е. А. Трифонова, Т. М. Хлебодарова и Н. Е. Грунтенко, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **20**, 959 (2016).
10. T. Takumia, K. Tamadaa, F. Hatanakaa, et al., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **110**, 60 (2020).
11. L. Kanner, *Nerv. Child*, **2**, 217 (1943).
12. C. Lord, M. Elsabbagh, G. Baird, and V. Vanderweele, *Lancet*, **392**, 508 (2018).
13. T. C. Südhof, *Nature*, **455**, 903 (2008).
14. S. Jamain, H. Quach, C. Betancur, et al., *Nat. Genet.*, **34**, 27 (2003).
15. C. Zweier, E. K. de Jong, M. Zweier, et al., *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 655 (2009).
16. M. Missler, and T. C. Südhof, *Trends Genet.*, **14**, 20 (1998).
17. Y. Hata, S. Butz, and T. C. Südhof, *J. Neurosci.*, **16**, 2488 (1996).
18. M. Irie, Y. Hata, M. Takeuchi, et al., *Science*, **277**, 1511 (1997).
19. K. Tabuchi, T. Biederer, S. Butz, and T. C. Südhof, *J. Neurosci.*, **22** (11), 42 (2002).
20. M. Missler, W. Zhang, A. Rohlmann, et al., *Nature*, **423**, 939 (2003).
21. K. Tabuchi, J. Blundell, M. R. Etherton, et al., *Science*, **318**, 71 (2007).

22. S. Jamain, K. Radyushkin, K. Hammerschmidt, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1710 (2008).
23. M. C. Phelan, R. C. Rogers, R. A. Saul, et al., *Am. J. Med. Genet.*, **101**, 91 (2001).
24. Н. В. Соловьева и Н. С. Кицул, Аутизм и нарушения развития, **14**, 13 (2016).
25. M. Sheng and E. Kim, *J. Cell Sci.*, **113**, 1851 (2000).
26. C. M. Durand, C. Betancur, T. M. Boeckers, et al., *Nat. Genet.*, **39**, 25 (2007).
27. N. Okamoto, T. Kubota, Y. Nakamura, et al., *Am. J. Med. Genet. Part A*, **143**, 2804 (2007).
28. T. M. Böckers, M. G. Mameza, M. R. Kreutz, et al., *J. Biol. Chem.*, **276**, 40104 (2001).
29. G. Roussignol, F. Ango, S. Romorini, et al., *Neuroscience* **25** (14), 3560 (2005).
30. O. Bozdogi, T. Sakurai, D. Papapetrou, et al., *Mol. Autism*, **1** (1), 15 (2010).
31. J. Peça, C. Feliciano, J. T. Ting, et al., *Nature*, **472** (7344), 437 (2011).
32. M. Kouser, H. E. Speed, C. M. Dewey, et al., *Neuroscience* **33** (47), 18448 (2013).
33. A. Shcheglovitov, O. Shcheglovitova, M. Yazawa, et al., *Nature*, **503** (7475), 267 (2013).
34. J. P. Martin and J. Bell, *J. Neur. Neurosurg. Psych.*, **6**, 154 (1943).
35. C. Bagni, and B. A. Oostra, *Am. J. Med. Genet. Part A*, **161** (11), 2809 (2013).
36. D. Ebrahimi-Fakhari, and M. Sahin, *Curr. Opin. Neurol.* **1** (617), 1 (2015).
37. S. Chang, S. M. Bray, Z. Li, et al., *Nat. Chem. Biol.*, **4** (4), 256 (2008).
38. L. K. K. Pacey, S. P. Heximer, and D. R. Hampson, *Mol. Pharmacol.*, **76** (1), 18 (2009).
39. B. M. Dolan, S. G. Duron, D. A. Campbell, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** (14), 5671 (2013).
40. T. Kishino, M. Lalande, and J. Wagstaff, *Nat. Genet.*, **15** (1), 70 (1997).
41. T. Matsuura, J. S. Sutcliffe, P. Fang, et al., *Nat. Genet.*, **15**, 74 (1997).
42. Y. H. Jiang, D. Armstrong, and U. Albrecht, *Neuron*, **21** (4), 79 (1998).
43. P. L. Greer, R. Hanayama, B. L. Bloodgood, et al., *Cell*, **140** (5), 704 (2010).
44. R. J. Kelleher and M. F. Bear, *Cell*, **135** (3), 401 (2008).
45. H. Y. Zoghbi and M. F. Bear, *Cold Spring Harb. Symp. Perspect. Biol.*, **4** (3), 98 (2012).
46. T. T. Riday, E. C. Dankoski, M. C. Krouse, et al., *J. Clin. Invest.*, **122** (12), 4544 (2012).
47. A. Sato, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **15** (5), 533 (2016).
48. J. O. Lipton and M. Sahin, *Neuron*, **84** (2), 275 (2014).
49. T. S. Lisse and M. Hewison, *Cell Cycle*, **10** (12), 1888 (2011).
50. Y. Liu, D. Zhang, and X. Liu, *Int. Rev. Immunol.*, **34** (1), 50 (2015).
51. J. Zhou and L. F. Parada, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **22** (5), 873 (2012).
52. D. Ehninger, S. Han, C. Shilyansky, et al., *J. Nat. Med.*, **14** (8), 843 (2009).
53. P. Curatolo, R. Bombardieri, and S. Jozwiak, *Lancet*, **372** (9639), 657 (2008).
54. D. J. Allingham-Hawkins, R. Babul-Hirji, D. Chitayat, et al., *Am. J. Med. Genet.*, **83** (4), 322 (1999).
55. L. Meikle, K. Pollizzi, A. Egnor, et al., *J. Neurosci.*, **28** (21), 5422 (2008).
56. D. Ehninger and A. J. Silva *Trends Mol. Med.*, **17** (2), 78 (2011).
57. P. Tsai and M. Sahin, *Curr. Opin. Neurol.*, **24** (2), 106 (2011).
58. C. H. Kwon, B. W. Luikart, C. M. Powell, et al., *Neuron*, **50** (3), 377 (2006).
59. Q. Xiong, H. V. Oviedo, L. C. Trotman, and A. M. Zador, *J. Neurosci.*, **32** (5), 1643 (2012).
60. J. Guy, J. Gan, J. Selfridge, et al., *Science*, **315** (5815), 1143 (2007).
61. R. P. Ghosh, R. A. Horowitz-Scherer, T. Nikitina, et al., *Mol. Cell. Biol.*, **30** (19), 4656 (2010).
62. R. Z. Chen, S. Akbarian, M. Tudor, and R. Jaenisch, *Nat. Genet.*, **27** (3), 327 (2001).
63. J. Guy, B. Hendrich, M. Holmes, et al., *Nat. Genet.*, **27** (3), 322 (2001).
64. P. V. Belichenko, E. E. Wright, N. P. Belichenko, et al., *J. Comp. Neurol.*, **514** (3), 240 (2009).
65. S. Ricciardi, E. M. Boggio, S. Grosso, et al., *Hum. Mol. Genet.*, **20** (6), 1182 (2011).
66. R. A. Segal and M. E. Greenberg, *Annu. Rev. Neurosci.*, **19**, 463 (1996).
67. D. M. Katz, Eds. G. R. Lewin, and B. D. Carter, *Berlin: Springer-Verlag*, **220**, 481 (2014).
68. R. Deogracias, M. Yazdani, M. P. J. Dekkers, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109** (35), 14230 (2012).
69. T. Ziemssen, T. Kumpfel, W. E. F. Klinkert, et al., *Brain*, **125** (11), 2381 (2002).
70. A. Angelidou, K. D. Alysandratos, S. Asadi, et al., *J. Autism Dev. Disord.*, **41** (11), 1579 (2011).
71. J. Wu, C. M. G. De Theije, S. L. Da Silva, et al., *Neuropharmacology*, **97**, 220 (2015).
72. F. Jia, B. Wang, L. Shan, et al., *Pediatrics*, **135** (1), 196 (2015).
73. T. S. Lisse, T. Liu, M. Irmeler, et al., *FASEB J.*, **25** (3), 937 (2011).
74. T. S. Lisse, and M. Hewison, *Cell Cycle*, **10** (12), 1888 (2011).
75. H. W. Querfurth and F. M. LaFerla, *N. Engl. J. Med.*, **362** (4), 329 (2010).
76. D. J. Selkoe, *Science*, **298** (5594), 789 (2002).
77. S. W. Scheff, D. A. Price, F. A. Schmitt, et al., *Neurology*, **68** (18), 1501 (2007).
78. R. D. Terry, E. Masliah, D. P. Salmon, et al., *Ann. Neurol.*, **30** (4), 572 (1991).

79. H. W. Querfurth and F. M. LaFerla, *N. Engl. J. Med.*, **362** (4), 329 (2010).
80. S. T. DeKosky and S. W. Scheff, *Ann. Neurol.*, **27** (5), 457 (1990).
81. M. Wynn, *J. Gen. Intern. Med.*, **37** (10), 2576 (2022).
82. M. A. Mukhamedyarov, S. N. Grishin, E. R. Yusupova, et al., *Cell Physiol. Biochem.*, **23** (1–3), 109 (2009).
83. M. A. Mukhamedyarov, A. Y. Teplov, S. N. Grishin, et al., *Muscle & Nerve*, **43** (6), 872 (2011).
84. М. А. Мухамедьяров и А. Л. Зефилов, *Успехи физиол. наук*, **44** (1), 55 (2013).
85. Y. Wang, Z. Yu, H. Ren, et al., *J. Chem. Neuroanat.*, **63**, 1 (2015).
86. I. Zueva, J. Dias, S. Lushchekina, et al., *Neuropharmacology*, **1** (155), 131 (2019).
87. M. A. Mukhamedyarov, P. N. Grigor'ev, E. A. Ushanova, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **165** (5), 669 (2018).
88. L. Dupuis and J. P. Loeffler, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **9** (3), 341 (2009).
89. M. Dewil, V. F. dela Cruz, L. Van Den Bosch, et al., *Neurobiology of Disease*, **26** (2), 332 (2007).
90. T. W. Gould, R. R. Buss, S. Vinsant, et al., *J. Neurosci.*, **26** (34), 8774 (2006).
91. C. Rouaux, I. Panteleeva, F. Rene, et al., *J. Neurosci.*, **27** (21), 5535 (2007).
92. M. M. Lino, C. Schneider, and P. Caroni, *J. Neurosci.*, **22** (12), 4825 (2002).
93. A. Pramatarova, J. Laganieri, J. Roussel, et al., *J. Neurosci.*, **21** (10), 3369 (2001).
94. G. Dobrowolny, M. Aucello, E. Rizzuto, et al., *Cell Metab.*, **8** (5), 425 (2008).
95. H. Narai, Y. Manabe, M. Nagai, et al., *Neurol. Int.*, **1** (1), 16 (2009).
96. B. J. Turner, S. Ackerley, K. E. Davies, et al., *Hum. Mol. Genet.*, **19** (5), 815 (2010).
97. C. S. Lobsiger, S. Boillee, M. McAlonis-Downes, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (11), 4465 (2009).
98. A. Gorlewicz, J. Wlodarczyk, E. Wilczek, et al., *Neurobiol. Dis.*, **34** (2), 245 (2009).
99. D. Frey, C. Schneider, L. Xu, et al., *J. Neurosci.*, **20** (7), 2534 (2000).
100. R. Mancuso, E. Santos-Nogueira, R. Osta, et al., *Clin. Neurophysiol.*, **122** (8), 1660 (2011).
101. J. M. Shefner, M. Cudkowicz, and R. H. Brown, *Muscle & Nerve*, **34** (5), 603 (2006).
102. М. А. Мухамедьяров, А. М. Петров, П. Н. Григорьев и др., *Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*, **68** (5), 551 (2018).

Synaptic Aspects of the Pathogenesis of Autism, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Alzheimer's Disease

A.E. Khairullin*, **, M.A. Mukhamedyarov*, S.N. Grishin*, A.Yu. Teplov*, K.K. Nagiev*, and A.U. Ziganshin*

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

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

Recently, there has been evidence that alterations in functionality of synapses both at the pre- and postsynaptic level play an important role in the pathogenesis of many neurodegenerative diseases and autism spectrum disorders. Of particular interest may be the data on synaptic defects appearing in the early, asymptomatic stages of the disease, when it might still be possible to prevent mass degeneration of neurons. Probably, modulation of synaptic signal transduction at this stage is very effective through therapy of a number of similar diseases. This review aims to explore the role of synaptic structures in the pathogenesis of Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis and autism spectrum disorders.

Keywords: synapse, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, autism spectrum disorders

АНАЛИЗ МУЛЬТИФРАКТАЛЬНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОНЕНТ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММ ПРИ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ

© 2023 г. О.Е. Дик*,#

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

#E-mail: dickviola@gmail.com

Поступила в редакцию 04.09.2022 г.

После доработки 21.09.2022 г.

Принята к публикации 31.10.2022 г.

С помощью метода поиска максимумов модулей вейвлет-коэффициентов выполнен сравнительный анализ мультифрактальности различных компонент электроэнцефалограмм в норме и при таких психических расстройствах, как шизофрения и депрессия. Показано, что для каждого типа психических расстройств положение спектра сингулярности стабильно для большинства областей мозга, и основные отличия мультифрактальных свойств связаны с альфа-компонентами электроэнцефалограмм. Для группы с депрессией характерна антикоррелированная динамика последовательных значений альфа-компонент, а для группы с шизофренией — сочетание антикоррелированной и коррелированной динамики, что может быть полезно для клинической диагностики нейрональных нарушений.

Ключевые слова: психические расстройства, частотные компоненты ЭЭГ, мультифрактальность.

DOI: 10.31857/S0006302923010209, EDN: OBLKJV

В связи с тем, что биоэлектрическая активность как здорового, так и больного мозга проявляет мультифрактальные свойства, как во время спокойного бодрствования, так и в различных фазах сна, а также при выполнении различных когнитивных задач [1–9] мультифрактальные характеристики паттернов электроэнцефалограммы (ЭЭГ) могут быть включены в комплекс тестов для дифференциальной диагностики и исследования различных когнитивных расстройств.

В настоящее время мультифрактальный анализ является перспективным диагностическим методом исследования биомедицинских сигналов [10–14]. Известно, что паттерны разнообразных физиологических ритмов, например, биоэлектрической активности мозга и сердца, двигательных ритмов, проявляют мультифрактальные свойства [15–18]. Это связывается с парадоксальным сочетанием вызванной шумом кратковременной декорреляции в этих ритмах и долговременной корреляции, связанной с их фрактальной структурой [16, 19]. Наличие мультифрактальных свойств означает, что временные закономерности этих паттернов на малых масштабах не идентичны всему сигналу, но самоподобие сохраняется после усреднения по статистически независимым выборкам [20].

Мультифрактальный спектр динамики мозга чувствителен к влиянию возраста и когнитивных способностей [14]. Мультифрактальность биоэлектрической активности мозга обнаруживается при его патологических состояниях, например, в ЭЭГ больных фокальной симптоматической эпилепсией до, во время и после эпилептических разрядов [8] и в ЭЭГ больных с нервными расстройствами, связанными с тревожной фобией в сочетании с головной болью, тахикардией или нарушением ритма дыхания [9]. При этом при отсутствии эпилептических разрядов динамика ЭЭГ больного фокальной эпилепсией практически неотличима от динамики ЭЭГ здорового мозга [8]. Но уже в период, предшествующий эпилептиформной активности, происходят перестройки динамики ЭЭГ, приводящие к возникновению долговременных корреляций последовательных значений ЭЭГ, что является причиной значительного увеличения амплитуды ЭЭГ во время эпилептического разряда [8]. Таким образом, оценка мультифрактальных свойств позволяет установить структурные перестройки, приводящие к изменению паттернов ЭЭГ при возникновении эпилептиформной активности.

Мультифрактальный анализ также позволяет оценить эффективность лечения больных с нервными нарушениями, связанными с психогенными болевыми синдромами. Так, в работе [9] пока-

Сокращения: ЭЭГ — электроэнцефалограмма.

зано, что вариации мультифрактальных свойств объясняют происходящие при психорелаксации изменения, отражающие сохранение или снятие психогенной боли у больных с тревожно-фобическими расстройствами.

Как правило, мультифрактальный анализ связан с анализом широкополосного сигнала [4–9, 21, 22], исключение составляет, например, работа [3], в которой проанализированы мультифрактальные свойства отфильтрованных компонентов ЭЭГ (дельта-, тета-, альфа- и бета-колебания) здорового мозга, которые также имеют мультифрактальное поведение.

Целью настоящей работы является сравнительный анализ мультифрактальных свойств различных компонент ЭЭГ нормальной и патологической активности головного мозга при таких заболеваниях, как шизофрения и депрессия.

МЕТОДЫ

Были проанализированы безартефактные сегменты ЭЭГ, полученные в состоянии покоя с закрытыми глазами у десяти здоровых испытуемых в возрасте от 18 до 30 лет, десяти больных параноидной формой шизофрении в возрасте от 24 до 35 лет и десяти больных депрессией в возрасте от 21 до 34 лет. Данные были предоставлены лабораторией физиологии зрения Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Обе группы больных (с шизофренией и депрессией) принимали один и тот же антипсихотический препарат арипипразол, оказывающий наименьшее влияние на электрическую активность мозга, в отличие от других антипсихотиков [23].

ЭЭГ были зарегистрированы на 21-канальном электроэнцефалографе фирмы «Мицар_ЭЭГ» (Санкт-Петербург, Россия) с помощью Ag/AgCl-электродов. Активные электроды располагались по стандартной схеме 10–20. Референтные электроды располагались на мочках ушей, а заземляющий электрод — в лобной области.

Сегменты ЭЭГ длительностью 120 с, зарегистрированные в отведениях C3, C4, T5, T6, P3, Pz, P4, O1, O2 с частотой дискретизации 256 Гц, подвергались цифровой фильтрации с использованием полосового фильтра 0.5–50 Гц. Анализируемые сегменты ЭЭГ содержали 30720 отсчетов и были разложены на колебания тета-, альфа- и бета-диапазонов (3–7, 8–12 и 14–25 Гц соответственно) с использованием оптимального фильтра Чебышева с конечной импульсной характеристикой, рассчитанной с помощью алгоритма Паркса–Макклеллана. Частоты среза полосы заграждения составляли $[f_1 - 0.5, f_2 + 0.5]$ Гц по отношению к частотам среза полосы пропускания $[f_1, f_2]$ Гц, порядок фильтра равнялся 1296. Эта фильтрация была осуществлена с помощью про-

цедур *firpmord.m* и *firpm.m* в системе MATLAB. Полученные три диапазона были использованы в мультифрактальном анализе.

Для оценки различий в степени мультифрактальности колебаний в этих диапазонах применяли метод поиска максимумов модулей вейвлет-коэффициентов (WTMM – wavelet transform modulus maxima) [24]. Программное обеспечение было реализовано в системе MATLAB на основе программы *multifractal.c*, описанной в PhysioNet (<https://physionet.org>) и в работе [25].

Алгоритм этого метода состоит из следующей последовательности процедур:

1) для анализируемого сигнала $x(t)$ применяется непрерывное вейвлет-преобразование:

$$W(a, t_0) = \frac{1}{a} \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) \psi^* \left(\frac{t - t_0}{a} \right) dt,$$

где a — параметр масштаба, b — параметр временного сдвига, $\psi((t - b)/a)$ — вейвлетная функция, полученная из базисного вейвлета $\psi(t)$ путем растяжения или сжатия и сдвига по времени, символ ψ^* означает комплексное сопряжение;

2) для каждого значения a находится множество $L(a)$ линий локальных максимумов модулей вейвлет-коэффициентов, т.е. линий, для которых выполняется условие $\frac{\partial |W(a, t_0)|}{\partial t} = 0$;

3) вдоль каждой линии для значений масштабов, меньших заданного значения a , вычисляются частичные функции $Z(q, a)$ как сумма q степеней максимумов модулей вейвлет-коэффициентов:

$$Z(q, a) = \sum_{l \in L(a)} \left(\sup_{a^* \leq a} |W(a^*, t_l(a^*))| \right)^q,$$

где $t_l(a^*)$ определяет положение максимума, соответствующего линии l на этом масштабе;

4) в силу того, что при $a \rightarrow 0$ частичная функция $Z(q, a) \sim a^{\tau(q)}$ [26], показатель $\tau(q)$ вычисляется по формуле

$$\tau(q) \sim \log_{10} Z(q, a) / \log_{10} a;$$

5) в случае линейной зависимости $\tau(q)$ значение экспоненты Гельдера h единственно и сигнал монофрактален, в случае нелинейной зависимости $\tau(q)$ сигнал мультифрактален и распределение экспонент Гельдера (спектр сингулярности) вычисляется по формуле:

$$D(h) = qh(q) - \tau(q).$$

В качестве базисного вейвлета $\psi(t)$ использовался вейвлет Морле:

$$\psi(t) = \pi^{-1/4} e^{i\omega_0 t} e^{-t^2/2}$$

при значении параметра $\omega_0 = 2\pi$, обеспечивающего простое соотношение $f = 1/a$ между масштабом a и частотой f .

Ширина спектра сингулярности оценивалась как $\Delta h = h_{\max} - h_{\min}$, где $h_{\max} = h|_{q=q_{\min}}$ и $h_{\min} = h|_{q=q_{\max}}$ — максимальное и минимальное значения показателя Гельдера, соответствующие минимальной и максимальной флуктуации сигнала. Ширина спектра сингулярности Δh является мерой, определяющей степень мультифрактальности сигнала, поскольку малое значение Δh указывает на тенденцию сигнала к монофрактальности, а большое значение Δh свидетельствует об усилении мультифрактальности.

Основной вклад в спектр сингулярности $D(h)$ при $q > 0$ дают сегменты, проявляющие большие флуктуации, а при $q < 0$ доминируют сегменты с малыми флуктуациями [20]. При этом положение спектра сингулярности $D(h)$ дает информацию о степени коррелированности последовательных значений сигнала, поскольку нахождение спектра в области значений экспонент Гельдера $h < 0.5$ соответствуют антикоррелированной динамике, в то время как значения $h > 0.5$ — коррелированной [20]. Коррелированность последовательных значений сигнала означает, что с большей вероятностью за большим значением сигнала следует большее, и наоборот. В случае, если динамика является одновременно коррелированной и антикоррелированной, спектр сингулярности будет находиться в интервале $0 < h < 1$.

Для сравнения средних значений ширины спектров сингулярности, полученных для разных групп, применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением и попарной проверкой гипотез с помощью теста Тьюки. Если статистика, полученная по F -критерию Фишера, превышала критическое значение $F_{\text{crit}} = F_{2,28} = 3.3$, то нулевая гипотеза о равенстве средних отвергалась. Значения 2 и 28 выбраны исходя из того, что количество групп $k = 3$, количество усредненных значений в каждой группе равно 10, общее количество наблюдений составляет $N = 10 \cdot 3 = 30$, поэтому $k - 1 = 2$, $N - k = 28$. Статистически значимые различия между группами определялись на основании значений $p < 0.017$ в связи с тем, что $n = k(k - 1)/2 = 3$ и $1 - 0.951/n = 0.017$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 показаны мультифрактальные свойства отфильтрованных составляющих в тета-, альфа- и бета-диапазонах для испытуемого из контрольной группы. Мультифрактальность объясняется нелинейностью кривых $\tau(q)$ (рис. 1б) и зависимостью показателей Гельдера $h(q)$ от мо-

мента q (рис. 1а). Представленные усредненные зависимости для отведений над центральными (С3, С4), затылочными (О1 и О2), теменными (Р3, Р4 и Рз) и височными (Т5 и Т6) областями мозга свидетельствуют об устойчивости мультифрактальных свойств различных областей мозга у данного испытуемого. Это подтверждается данными табл. 1, в которой приведены усредненные (по испытуемым в контрольной группе) значения интервалов максимального и минимального значений показателя Гельдера $[h_{\min}, h_{\max}]$ для разных отведений.

Для ЭЭГ-составляющей в тета-диапазоне колебания являются как коррелированными, так и антикоррелированными, так как спектр сингулярности находится в области значений экспонент Гельдера $0.1 < h < 0.8$ (рис. 1в). Для составляющей в бета-диапазоне колебания являются антикоррелированными ($0.15 < h < 0.56$) (рис. 1в). В отличие от этого для альфа компоненты колебания характеризуются только долгосрочными корреляциями и спектр сингулярности находится в области значений экспонент Гельдера $0.55 < h < 1.1$ (рис. 1в). В это смещение вносят вклад как сильные флуктуации ($h > 0$ при $q > 0$), так и слабые флуктуации (при $q < 0$), в то время как для спектров сингулярности $D(h)$ для тета- и бета-компонент доминируют слабые флуктуации, потому что при $q > 0$ значения h близки к нулю (рис. 1а).

На рис. 2 представлены усредненные спектры сингулярности $D(h)$ для пациента с шизофренией (рис. 1а,б) и для пациента с депрессией (рис. 1в,д) для составляющих в тета-, альфа- и бета-диапазонах. Спектры для отведений над центральными (С3, С4) областями мозга (рис. 1б,д) шире для пациентов из обеих групп, чем для отведений над затылочными (О1 и О2), теменными (Р3, Р4 и Рз) и височными (Т5 и Т6) областями мозга (рис. 1а,в), что так же как и в случае испытуемого из контрольной группы свидетельствует об устойчивости мультифрактальных свойств в большинстве областей (кроме центральных) мозга у пациентов с шизофренией и депрессией. Это отражено также в данных табл. 2, в которой представлены усредненные (по пациентам с двумя группами патологий) значения интервалов максимального и минимального значений показателя Гельдера $[h_{\min}, h_{\max}]$ для разных отведений.

Для пациента с шизофренией спектры для тета- и альфа-компонент находятся в области значений экспонент Гельдера $0.1 < h < 1.25$ (рис. 1а,б), что соответствует как коррелированной, так и антикоррелированной динамике последовательных значений компонент ЭЭГ. В отличие от этого, для бета-компоненты характерно смещение спектра сингулярности в основ-

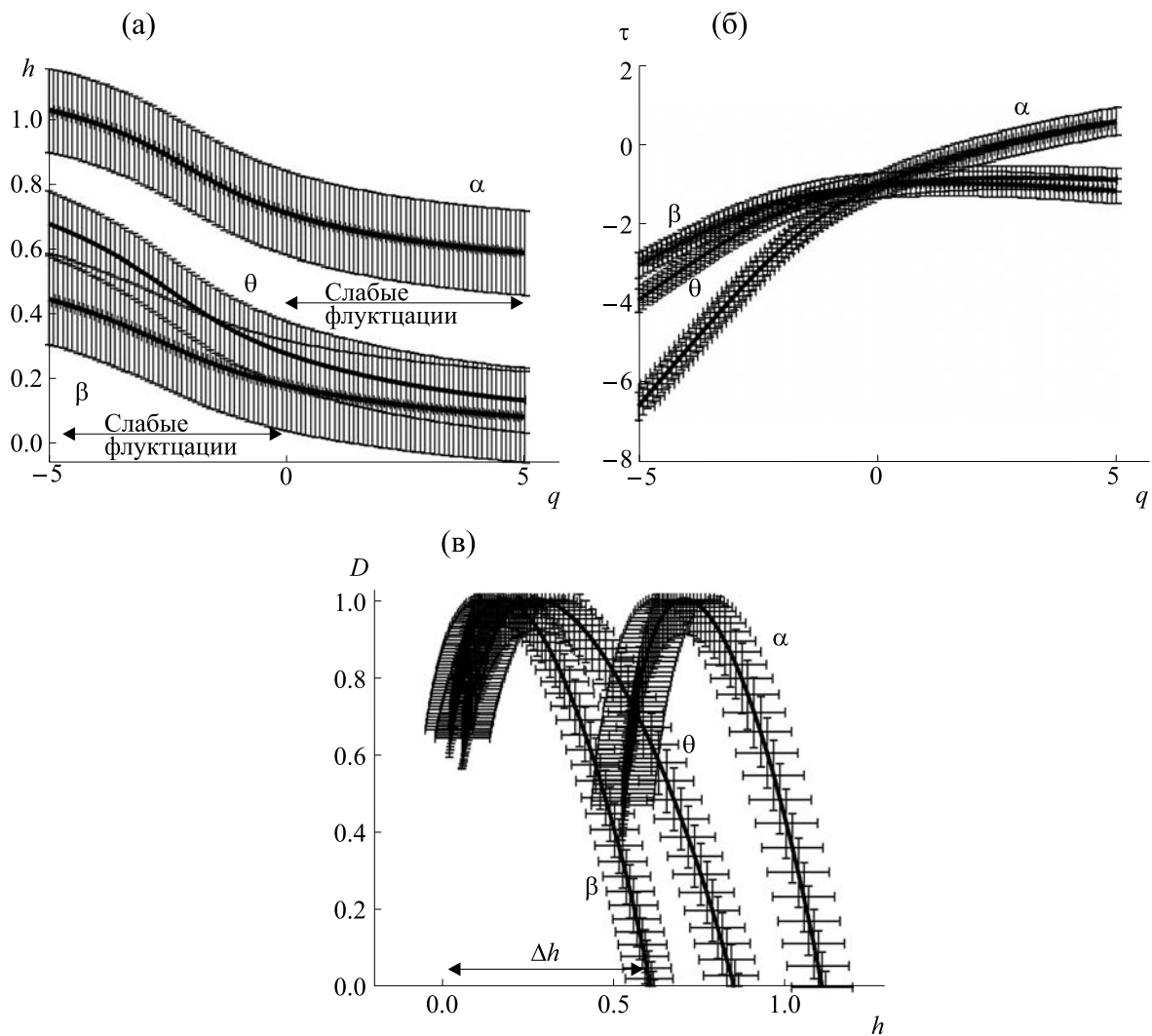


Рис. 1. Усредненные зависимости $h(q)$ показателя Гёльдера от значения q (а), показателей $\tau(q)$ (б) и спектров сингулярности $D(h)$ (в) для испытуемого из контрольной группы для отведений над центральными (С3, С4), затылочными (О1 и О2), теменными (Р3, Р4 и Рz) и височными (Т5 и Т6) областями. Вертикальные и горизонтальные отрезки отражают доверительные интервалы с уровнем доверия 0.95.

Таблица 1. Сравнение усредненных (по испытуемым в контрольной группе) интервалов максимального и минимального значений показателя Гёльдера $[h_{\min}, h_{\max}]$ для разных отведений

Отведения	Тета-компонента $[h_{\min}, h_{\max}]$	Альфа-компонента $[h_{\min}, h_{\max}]$	Бета-компонента $[h_{\min}, h_{\max}]$
С3	0.01–0.88	0.51–0.97	0.02–0.67
С4	0.03–0.89	0.49–0.91	0.01–0.66
Р3	0.05–0.92	0.47–0.93	0.06–0.61
Р4	0.07–0.87	0.56–0.89	0.07–0.70
Т5	0.09–0.83	0.59–0.95	0.02–0.67
Т6	0.05–0.91	0.46–0.92	0.09–0.69
О1	0.03–0.83	0.55–0.89	0.06–0.62
О2	0.05–0.85	0.57–0.95	0.05–0.65

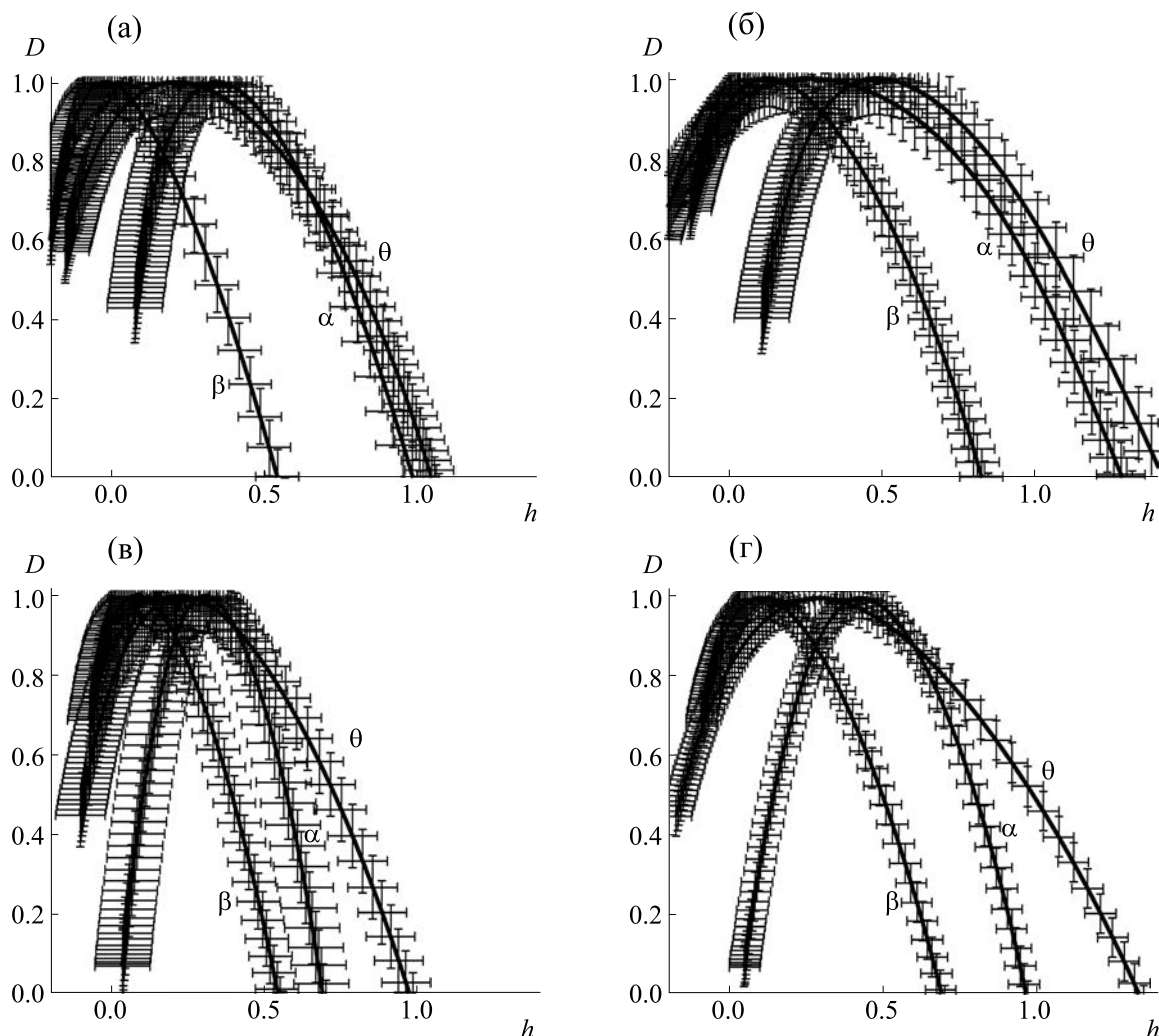


Рис. 2. Усредненные спектры сингулярности $D(h)$ для пациента с шизофренией для отведений над затылочными (O1 и O2), теменными (P3, P4 и Pz) и височными (T5 и T6) областями (а) и над центральными (C3, C4) областями (б); (в) и (д) — аналогичные спектры для пациента с депрессией.

ном в область антикоррелированных значений ($-0.15 < h < 0.55$) для большинства отведений, кроме центральных (рис. 1а, б).

Для пациента с депрессией спектры сингулярности тета-компонент находятся в области значений экспонент Гельдера $-0.15 < h < 1.2$, для большинства отведений для альфа-компоненты степень долговременных корреляций уменьшается и спектр сингулярности оказывается в области значений $-0.08 < h < 0.6$, а для бета-компоненты долговременные корреляции последовательных значений исчезают и спектр сингулярности смещается в область антикоррелированных значений $-0.2 < h < 0.5$ (рис. 1в, д). Таким образом, антикоррелированная динамика характерна для компонент бета-диапазона для пациентов обеих групп также, как и для здорового испытуемого.

Табл. 3 иллюстрирует изменчивость средних значений ширины спектра сингулярности разных компонент ЭЭГ в анализируемых группах. Для группы пациентов с шизофренией характерна более высокая степень мультифрактальности для всех компонент ЭЭГ ($\Delta h = 1.05 \pm 0.07$, $\Delta h = 0.88 \pm 0.08$ и $\Delta h = 0.73 \pm 0.06$ для тета-, альфа- и бета-компонент соответственно) по сравнению с группой пациентов с депрессией ($\Delta h = 0.91 \pm 0.08$, $\Delta h = 0.65 \pm 0.07$ и $\Delta h = 0.61 \pm 0.06$). Для бета-компоненты уменьшение степени мультифрактальности связано с преимущественным смещением спектра сингулярности в область антикоррелированных значений.

Для группы пациентов с депрессией для альфа- и бета-компонент также наблюдается тенденция к смещению спектра сингулярности в область антикоррелированных значений.

Таблица 2. Сравнение усредненных (по испытуемым в группах с шизофренией и депрессией, соответственно,) интервалов максимального и минимального значений показателя Гёльдера $[h_{\min}, h_{\max}]$ для разных отведений

Отведения	Тета-компонента $[h_{\min}, h_{\max}]$	Альфа-компонента $[h_{\min}, h_{\max}]$	Бета-компонента $[h_{\min}, h_{\max}]$
Группа с шизофренией			
C3	0.01–1.40	–0.02–1.26	–0.11–0.83
C4	–0.07–1.45	–0.01–1.31	–0.07–0.89
P3	0.01–1.11	0.09–0.96	–0.17–0.63
P4	0.03–1.04	0.09–0.99	–0.11–0.66
T5	0.05–1.15	0.09–0.92	–0.07–0.61
T6	0.02–1.06	0.09–0.91	–0.07–0.69
O1	0.01–1.16	0.09–0.98	–0.15–0.62
O2	0.03–1.07	0.09–0.90	–0.17–0.68
Группа с депрессией			
C3	–0.14–1.39	0.01–0.97	–0.15–0.67
C4	–0.09–1.31	0.03–1.07	–0.11–0.75
P3	–0.11–0.99	0.05–0.67	–0.05–0.57
P4	–0.17–0.99	0.09–0.63	–0.01–0.52
T5	–0.04–0.99	0.03–0.61	–0.02–0.55
T6	–0.09–0.99	0.02–0.69	0.03–0.59
O1	–0.11–0.99	0.07–0.60	0.01–0.54
O2	–0.15–0.99	0.01–0.67	0.04–0.57

Таблица 3. Сравнение усредненных (по испытуемым и отведениям, кроме центральных C3, C4) интервалов максимального и минимального значений показателя Гёльдера $[h_{\min}, h_{\max}]$ и ширины спектра сингулярности Δh для разных групп

	Тета-компонента	Альфа-компонента	Бета-компонента
Контрольная группа			
$[h_{\min}, h_{\max}]$	[0.05–0.85]	[0.53–0.98]	[0.03–0.61]
Δh	0.79 ± 0.06	0.45 ± 0.05	0.62 ± 0.06
Группа с шизофренией			
$[h_{\min}, h_{\max}]$	[0.01–1.11]	[0.09–0.96]	[–0.17–0.63]
Δh	1.05 ± 0.07	0.88 ± 0.08	0.73 ± 0.06
Группа с депрессией			
$[h_{\min}, h_{\max}]$	[–0.14–0.99]	[0.05–0.67]	[–0.05–0.57]
Δh	0.91 ± 0.08	0.65 ± 0.07	0.61 ± 0.06

Для контрольной группы степень мультифрактальности для тета-компонент ЭЭГ ниже ($\Delta h = 0.79 \pm 0.06$), чем для групп с рассмотренными патологиями, а для бета-компонент степень мультифрактальности незначительно отличается во всех группах.

Основные отличия в мультифрактальных свойствах здорового мозга и мозга с психическими расстройствами содержатся в альфа-компонентах ЭЭГ, которые характеризуются исключительно долговременными корреляциями для контрольной группы ($[h_{\min}, h_{\max}] = [0.53-0.98]$), коррелированной и антикоррелированной динамикой для группы с шизофренией ($[h_{\min}, h_{\max}] = [0.09-0.96]$) и практически антикоррелированной динамикой ($[h_{\min}, h_{\max}] = [0.05-0.67]$) для группы с депрессией.

Однофакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимые различия усредненных ширины спектра сингулярности Δh в трех исследованных группах для альфа- и тета-компонент ЭЭГ. Статистика, полученная по F -критерию Фишера, превышала критическое значение $F_{\text{crit}} = 3.3$. Уровень значимости критерия Фишера (p), т.е. максимальная вероятность ложного отклонения нулевой гипотезы о равных средних, когда она верна, составила порядка $5 \cdot 10^{-10}$, т.е. была близка к нулю. Для бета-компонент статистически значимых различий в ширине спектра сингулярности Δh для всех трех групп выявлено не было (статистика, полученная по F -критерию Фишера, не превышала критическое значение $F_{\text{crit}} = 3.3$).

Таким образом полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют, во-первых, о высокой степени устойчивости мультифрактальности различных компонент ЭЭГ для определенной тестируемой группы, и, во-вторых, говорят о преимущественно антикоррелированной динамике, т.е. значительном уменьшении или даже полном исчезновении долговременных корреляций в альфа-компонентах ЭЭГ для группы с депрессией, а также в бета-компонентах всех анализируемых групп.

Наши данные согласуются с результатами работы [3], в которой показано, что при различных условиях выполнения задачи зрительно-моторного слежения здоровыми испытуемыми (как воображаемого, так и реального зрительно-моторного слежения) мультифрактальные свойства отфильтрованных компонент ЭЭГ очень стабильны для разных мест расположения электродов. При этом внешние события (условия задачи) оказывают слабое влияние на результаты анализа мультифрактальных свойств. Таким образом мультифрактальная динамика является эндогенным свойством такой самоорганизующейся

системы, как мозг, обеспечивающим его целенаправленное поведение [3]. Другими словами, мультифрактальность мозга статистически устойчива, как и стабильна его нейродинамика.

Ранее в работе [27] мы показали стабильность мультифрактальных свойств широкополосных (нефильтрованных) ЭЭГ, демонстрируя отсутствие значимых различий в спектрах сингулярности внутри каждой группы для разных электродных отведений у пациентов с психическими расстройствами и выявили наличие исключительно долговременных корреляций последовательных значений паттернов ЭЭГ для контрольной группы, антикоррелированную динамику для больных депрессией и сочетание коррелированной и антикоррелированной динамики для больных шизофренией. При этом степень антикорреляций возрастала при переходе от лобных и соматомоторных областей к зрительным областям, а выраженность мозговых нарушений коррелировала с увеличением степени мультифрактальности широкополосной ЭЭГ [27]. Сходство результатов предыдущей работы [27] с результатами настоящей работы, касающихся альфа-компонент ЭЭГ, по-видимому, связаны с тем, что эти компоненты преобладают в паттернах всех трех анализируемых групп, а преобладание определенной составляющей в ЭЭГ может влиять на фрактальные характеристики из-за наибольшего вклада этой составляющей [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе с помощью метода максимума модуля вейвлет-преобразования вычислены распределения экспонент Гельдера (спектры сингулярности) для тета-, альфа- и бета-компонент ЭЭГ здоровых людей и двух групп пациентов с параноидной шизофренией и с депрессией. Основные различия в мультифрактальных свойствах активности мозга в норме и при патологии найдены в альфа-компонентах электроэнцефалографических временных рядов, которые характеризуются исключительно долговременными корреляциями для контрольной группы, корреляционной и антикорреляционной динамикой для группы с шизофренией и антикоррелированной динамикой для группы с депрессией.

В связи с этим изменение мультифрактальных свойств между пациентами с нейрональными нарушениями и здоровыми лицами может служить подходом в клинической диагностике некоторых патологий мозга.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность за предоставленные экспериментальные данные

д.м.н. Ю.Е. Шелепину, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Государственной программы Российской Федерации 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030 гг.), подпрограмма «Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и конкурентоспособности общества и государства» (47_110_ДРиОК).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Eke, P. Hermann, L. Kocsis, et al., *Physiol. Meas.*, **23** (1), 1 (2002).
2. P. A. Watters and F. Martin, *Biol. Psychol.*, **66**, 79 (2004).
3. D. Popivanov, V. Stomonyakov, Z. Minchev, et al., *Biol. Cybernetics*, **94**, 149 (2006).
4. M. A. Qianli, N. Xinba, W. Jun, et al., *Chinese Sci. Bulletin*, **51**, 3059 (2006).
5. A. M. Wink, E. Bullmore, A. Barnes, et al., *Human Brain Mapping*, **29**, 791 (2008).
6. M. Nurujjaman, R. Narayanan, S. Iyengar, *Nonlinear Biomed. Physics*, **3**, 6 (2009).
7. O. E. Dick and I. A. Mochovikova, in *Chaos Theory: Modeling, Simulation and Applications*, Ed. by C. H. Skiadas, I. Dimotikalis and C. Skiadas (World Scientific Publ., 2011), pp. 159–166.
8. O. E. Dick and I. A. Svyatogor, *Neurocomputing*, **82**, 207 (2012).
9. O. E. Dick and I. A. Svyatogor, *Neurocomputing*, **165**, 361 (2015).
10. E. A. Ihlen, *Front. Physiol.*, **3**, 141 (2012).
11. B. S. Raghavendra, D. N. Dutt, H. N. Halahalli, et al., *Physiol. Measur.*, **30** (8), 795 (2009).
12. W. Wang, S. Zhang, and X. Ning, *Chinese Biomed. Engineer. Trans.*, **23**, 511 (2004).
13. J. Suckling, A. M. Wink, F. A. Bernard, et al., *J. Neurosci. Methods*, **174**, 292 (2008).
14. P. Mukli, Z. Nagy, F. S. Racz, et al., *Front. Physiol.*, **9**, 1072 (2018).
15. R. Sassi, M. G. Signorini, and S. Cerutti, *Chaos*, **19**, 028507 (2009).
16. N. Scafetta, R. E. Moon, and B. J. West, *Complexity*, **12**, 12 (2007).
17. O. E. Dick, *Neurocomputing*, **243**, 142 (2017).
18. O. E. Дик, *Биофизика*, **66** (3), 1 (2021).
19. P. C. Ivanov, L. A. Amaral, A. L. Goldberger, et al. *Nature*, **399**, 461 (1999).
20. А. Н. Павлов и В. С. Анищенко, *Успехи физ. наук*, **177**, 859 (2007).
21. T. Takahashi, H. Kosaka, T. Murata, et al., *Psych. Res. Neuroimaging*, **171**, 177 (2009).
22. F. S. Racz, K. Farkas, O. Stylianou, et al., *Brain Behav.*, **11**, 181 (2021).
23. T. Takashi Ozaki, A. Toyomaki, N. Hashimoto, et al., *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, **19**, 313 (2021).
24. J. F. Muzy, E. Bacry, and A. Arneodo, *Phys. Rev.*, **47**, 875 (1993).
25. A. L. Goldberger, L. A. N. Amaral, L. Glass, et al., *Circulation*, **101** (23):215 (2009).
26. A. Arneodo, E. Bacry, and J. F. Muzy, *Physica A*, **213**, 232 (1995).
27. O. E. Dick, S. V. Murav'eva, V. S. Lebedev, et al., *Front. Physiol.*, **13**, 1 (2022).

Analysis of Multifractality of Various Components of Electroencephalograms in Mental Disorders

O.E. Dick*

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

The method of finding maxima of the moduli of the wavelet coefficients was used to perform a comparative analysis of the multifractality of various components of electroencephalograms in normal conditions and in mental disorders such as schizophrenia and depression. It is shown that for each type of mental disorders, the position of the singularity spectrum is stable in most areas of the brain, and the main differences between multifractal properties are associated with the alpha components of electroencephalograms. The group of individuals affected with depression is characterized by anticorrelated dynamics of successive values of the alpha components, and the group of individuals with schizophrenia is characterized by a combination of anticorrelated and correlated dynamics, thus, it can be useful for the clinical diagnosis of neuronal disorders.

Keywords: mental disorders, EEG frequency components, multifractality

СОДЕРЖАНИЕ ТОМА 67, 2022 г.

номер 1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

К механизму активации кислорода в химических и биологических системах

Т.В. Сирота, Н.П. Сирота 5

Возможная роль кластеров заряженных аминокислот на поверхности цистеиновых протеаз для сохранения активности при связывании с полимерами

С.М. Панкова, Ф.А. Сакибаев, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов 14

Анализ изменений в структуре ДНК при взаимодействии с координационными соединениями платины методом инфракрасной спектроскопии

Е.Е. Тымченко, А.А. Солдатова, Е.В. Чихиржина, А.М. Поляничко 22

Спектрофотометрический метод оценки размера и концентрации лазерно-аблированных золотых наночастиц

В.А. Скрибичский, Н.В. Позднякова, А.А. Липенгольц, А.А. Попов, Г.В. Тихоновский, Ю.А. Финогенова, А.В. Смирнова, Е.Ю. Григорьева 30

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Методы исследования сверхслабого свечения биологических объектов.

III. Физические методы

Е.В. Наумова, Ю.А. Владимиров, В.В. Тучин, В.А. Намиот, И.В. Володяев 37

Изменение показателя интегрированной информации для активности нейронов гиппокампа в процессе формирования оперантных навыков у крыс

И.А. Нажёткин, О.Е. Сварник 73

Чувствительность опухолевых и нормальных клеток человека к полиакрилатам благородных металлов

Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, Н.В. Блюхтерова, Ю.А. Хоченкова, К.А. Абзаева 82

О природе спектрального сдвига полосы сорбции эритроцитарного оксигемоглобина при добавлении органических молекул в суспензию эритроцитов

Н.Л. Лаврик 88

Радиопротекторное действие препаратов на основе хлорофилла

Л.А. Ромодин, Н.П. Лысенко 96

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Моделирование микроклимата пчелиного улья в конце зимнего периода

С.В. Оськин, Д.А. Овсянников, И.Н. Шишигин 105

Влияние переменного магнитного поля на хемилюминесценцию мононуклеарных клеток периферической крови человека и производство провоспалительных цитокинов

Е.Е. Текуцкая, Л.Р. Гусарук, Г.П. Ильченко 113

Влияние электромагнитного излучения на перекисное окисление липидов и антиоксидантную активность крови крыс

М.Т. Аббасова, А.М. Гаджиев 121

Влияние переменных токов на кристаллогенные свойства сыворотки крови <i>in vitro</i> <i>А.К. Мартусевич, А.Г. Галка, А.Н. Тужилкин, Е.С. Голыгина, А.С. Федотова, В.В. Назаров</i>	128
Определение ропивакаина в слезной жидкости у детей при проводниковой анестезии методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии <i>Л.М. Балашова, В.А. Намиот, И.И. Колесниченко, Л.С. Коробова, Ю.Д. Кузнецова, А.А. Балашов, Д.Р. Черкашин, Н.А. Бакунина, А.Н. Доронин, С.Н. Удальцов</i>	134
Частотный анализ колебаний показателей внешнего дыхания и сердечного ритма в диапазоне очень низких частот <i>В.Г. Гришин, О.В. Гришин, В.С. Никульцев, В.В. Гуляева, М.И. Зинченко, Д.Ю. Урюмцев</i>	140
Неинвазивный подход в гидродинамике спинномозговой жидкости в спинальной полости <i>А.Г. Зверев, Ю.Н. Токарев</i>	150
Пассивный асептический кальциноз фиксированных перикардальных биоматериалов опосредован нарушениями структуры и микроархитектоники их внеклеточного матрикса <i>А.И. Звягина, А.И. Даль, В.В. Минайчев, О.А. Краснова, В.С. Акатов, И.С. Фадеева</i>	160
Влияние гелиевой холодной плазмы на микроциркуляцию в околораневой зоне при экспериментальной термической травме <i>А.К. Мартусевич, Е.С. Голыгина, В.В. Назаров, А.А. Епишкина, К.С. Малышева</i>	168
Моделирование динамики популяций на неоднородном ареале: инвазия и мультистабильность <i>А.В. Будянский, В.Г. Цибулин</i>	174
Снижение скорости старения человека в XX веке и его возможные причины <i>В.И. Донцов, В.Н. Крутько, О.В. Митрохин, Н.А. Ермакова</i>	183
Содержание тома 66, 2021 г.	188
Авторский указатель к 66 тому за 2021 год	199

номер 2

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Кремниевые аналоги L-аминокислот: свойства «кирпичиков» чужой биосферы <i>М.С. Кондратьев, К.А. Щербаков, А.А. Самченко, О.В. Дегтярева, Е.Л. Терпугов, Н.Н. Хечинашвили, В.М. Комаров</i>	213
Анализ структуры элонгационных комплексов в полиакриламидном геле методом фёрстеровского резонансного переноса энергии <i>Н.С. Герасимова, А.Н. Коровина, Д.А. Афонин, К.В. Шайтан, А.В. Феофанов, В.М. Студитский</i>	222
Новая интерпретация коэффициента Хилла <i>И.А. Лавриненко, Г.А. Вашанов, Ю.Д. Нечипуренко</i>	229
Анализ структурной вариабельности геномов льна <i>Linum usitatissimum</i> L. <i>М.А. Дук, А.А. Канапин, А.А. Самсонова, Т.А. Рожмина, М.Г. Самсонова</i>	234
Сборка геномов трех слабовирулентных штаммов <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> <i>А.А. Канапин, А.А. Самсонова, М.П. Банкин, А.А. Логачев, Т.А. Рожмина, М.Г. Самсонова</i>	240

Влияние постоянного магнитного поля на инфекционный титр черноморских альговирусов

О.А. Степанова, П.В. Гайский, С.А. Шоларь

244

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Взаимодействие антимикробного пептида лазиоглоссина III с модельными липидными бислоями

С. Саха, П. Ратрей, А. Мишра

250

Ряд катионной селективности каналов, формируемых пероксиредоксином-6 в бимолекулярных фосфолипидных мембранах

П.А. Григорьев

264

Активность сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови кролика зависит от характеристик вибрационного воздействия

В.В. Воробьева, О.С. Левченкова, П.Д. Шабанов

267

Нарушение регуляции системы цАМФ в обонятельных нейронах в модели шизофрении, индуцируемой введением (+)-МК-801 крысам

Е.В. Бигдай, А.А. Синегубов

274

Глазной имажинальный диск дрозофилы как модель для обработки изображений эпителиальных тканей

К.Н. Козлов, Е.В. Голубкова, Л.А. Мамон, М.Г. Самсонова, С.Ю. Суркова

283

Математическое моделирование эфферентной регуляции мышечного сокращения

Е.А. Скребенков, О.Л. Власова

289

Математический анализ модели эпидемии COVID-19 с использованием данных эпидемиологических параметров болезней, распространенных в Индии

Д. Пал, Д. Гхош, П.К. Сантра, Г.С. Маханатра

301

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Краткий обзор современного состояния исследований биологического действия слабых магнитных полей

И.А. Шаев, В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко

319

О механизме действия микроволн на членистоногих

Б.Л. Ихлов, И.Л. Вольхин, А.Ю. Ощепков

327

Ранние эффекты ионизирующего воздействия протонов высоких энергий на зрительно-моторное поведение обезьян

Л.В. Терещенко, И.Д. Шамсиев, М.А. Кадочникова, Е.А. Красавин, А.В. Латанов

333

Исследование суммарного уровня глутамата и глутамина в зрительной коре человека после короткой активации методом функциональной магнитно-резонансной спектроскопии

А. Яковлев, А. Мажурцев, П. Меньщиков, М. Ублинский, И. Мельников, Д. Курьянов, Т. Ахадов, Н. Семенова

343

Резонансное сканирование и анализ электроэнцефалограммы при определении зрелости корковой ритмики у младших школьников

Л.В. Савчук, С.А. Полевая, С.Б. Парин, А.Т. Бондарь, А.И. Федотчев

354

Оценка взаимодействия между тиреоидными гормонами и тиреотропином при расстройствах функций щитовидной железы на базе популяционного анализа данных с логистической моделью

Т.Р. Ламичхане, С.П. Пант, Б. Ламичхане, С. Паудел, Б.К. Ядав, Х.П. Ламичхане

362

Пулы аминокислот скелетных мышц якутского суслика *Urocitellus undulatus* на разных стадиях гибернации

М.В. Каранова, Н.М. Захарова 371

Уравнение Гинзбурга–Ландау для анализа нелинейной неустойчивости в сердечной ткани

И.В. Елюхина 378

Гибридная модель коллапса промысловой популяции краба *Paralithodes camtschaticus* (Decapoda, Lithodidae) Кадыкского архипелага

А.Ю. Переварюха 386

ДИСКУССИИ

К биофизике эволюции интеллектуальных систем

А.Л. Еремин 409

номер 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Кооперативное связывание кислорода гемоглобином как одна из обобщающих моделей в молекулярной биофизике

И.А. Лавриненко, Г.А. Вашанов, А.С. Бучельников, Ю.Д. Нечипуренко 421

Катионы нитрозония как наиболее эффективные в цитотоксическом отношении и компоненты динитрозильных комплексов железа

А.Ф. Ванин 434

Новая математическая модель, описывающая оксигенацию гемоглобина

И.А. Лавриненко, Г.А. Вашанов, Ю.Д. Нечипуренко 444

Оптимизация вычислений в задаче структурного моделирования уравнениями для биоинформатических приложений

Г.А. Мещеряков, В. А. Зувев, А.А. Иголкина, М.Г. Самсонова 451

Связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами в растворе и на микрочипах

Ю.Д. Нечипуренко, А.С. Бучельников 456

Хитозан как фотопротектор для иммобилизованного на его матрице папаина

М.Г. Холявка, С.М. Панкова, Ю.М. Вышкворкина, А.Н. Лукин, М.С. Кондратьев, В.Г. Артюхов 467

О хиральности лекарственных препаратов и структур биомакромолекул

Е.В. Белова, Е.В. Семенова, В.А. Твердислов 477

Эффекты скрытой симметрии в динамике линейных полимеров и биополимеров

К.В. Шайтан 492

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Электронный парамагнитный резонанс: исследование механизмов регуляции и световых стадий фотосинтеза растений

Э.К. Рууге, А.Н. Тихонов 516

Термолюминесценция и диагностика состояния фотосинтетического аппарата листьев растений

В. А. Караваев, О. А. Калмацкая, Б. В. Трубицин, А. Н. Тихонов 524

Механизмы повреждения бактерий *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* при импульсном фотовозбуждении молекулярных сенсibilизаторов

С.Н. Летута, А.Т. Ишемгулов, А.Н. Никян, Д.А. Раздобреев, Л.В. Галактионова, Д.В. Дорофеев, Д.Е. Цюрко 531

Стохастичность экспрессии белка р53 в клетках первичных и перевиваемых линий человека

Р.А. Ковалёв, Н.Д. Федорова, Р.А. Пантина, Е.В. Семенова, М.В. Филатов, Е.Ю. Варфоломеева 540

Включение наночастиц магнетита, стабилизированных цетилтриметиламмония бромидом, в состав липосом на основе соевого лецитина

Е.В. Шилова, И.А. Колтаков, С.В. Канныкин, В.Г. Артюхов 549

Измерение адсорбции антител класса IgG на электроформованные мембраны из нейлона-6

А.М. Сенковенко, А.М. Мойсенович, А.А. Маслакова, Е.Р. Павлова, Д.В. Багров 555

Параметры управления разделением и концентрированием эритроцитов и лимфоцитов крыс, эритроцитов человека в поле стоячей ультразвуковой волны

Т.Н. Пашовкин, Д.Г. Садикова 562

Сравнительное исследование повреждений днк в лейкоцитах крови мыши и клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 в зависимости от концентрации озона, пероксида водорода и гемцитабина

А.Б. Гапеев, Е.С. Жукова, В.А. Синельникова, Г.Ю. Балакин, М.Ю. Земскова, Г.К. Рысцов, Т.Г. Щербатюк 569

Мионевральная передача в бариевой среде

С.Н. Гришин, А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, М.А. Мухамедьяров 576

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Действие динитрозильных комплексов железа с лигандом на основе *N*-ацетил-L-цистеина при сублингвальном введении этих комплексов в организм крыс

А.А. Тимошин, К.Б. Шумаев, В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, Э.К. Рууге 581

Регрессионный анализ и математическое моделирование флуктуаций показателей микроциркуляции симметричных областей верхних конечностей человека

Л.В. Мезенцева 587

Пуринергические механизмы адаптации диафрагмы мышцы в условиях аллергической перестройки

А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, С.Н. Гришин, А.У. Зиганшин 596

Связь моментов восстановления температуры тела у животных в период зимней спячки с интенсивностью флуктуаций вторичного космического излучения

М.Е. Диатроптов, А.И. Ануфриев, М.В. Рutowская 600

Метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии при анализе офтальмологических препаратов Луцентис и Эйлеа, препятствующих новообразованию сосудов

Л.М. Балашова, Н.А. Бакунина, И.И. Колесниченко, Ю.Д. Кузнецова, С.В. Лесовой, Ж.М. Салмаси, С.Н. Удальцов 610

Фотобиомодуляция фиолетово-синим светом динамики опухолевого роста и прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме опухоленосителей

Е.С. Жукова, Т.Г. Щербатюк, И.А. Чернигина, В.В. Чернов, А.Б. Гапеев 615

номер 4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Лев Александрович Блюменфельд и современная биохимическая физика.
«Решаемые» и «нерешаемые» проблемы

С.Д. Варфоломеев 629

Архитектура конденсированной днк в нуклеоиде бактерии *Escherichia coli*

Ю.Ф. Крупянский, В.В. Коваленко, Н.Г. Лойко, А.А. Генералова, А.В. Моисеенко, Э.В. Терешкин, О.С. Соколова, К.Б. Терешкина, Г.И. Эль-Регистан, А.Н. Попов 638

Исследование *in vitro* агрегационных свойств мышечного X-белка

Л.Г. Бобылёва, А.Г. Габдулхаков, Н.Н. Салмов, И.М. Вихлянцева, А.Г. Бобылёв 652

Биологическая активность растворов веществ в малых и сверхмалых концентрациях

В.И. Лобышев 658

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Натрий-μ2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрата тетрагидрат повышает
эффективность работы дыхательной цепи митохондрий проростков гороха

И.В. Жигачева, Н.И. Крикунова, И.П. Генерозова, П.А. Буцанец, Н.Ю. Герасимов, О.В. Неврова, С.В. Васильев, А.Н. Голощапов 671

Ингибирующее действие водного извлечения из йерба мате (*Ilex paraguariensis*)
на процесс липидной перекисидации липосомальных мембран

Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, А.А. Кочетова, А.Н. Осипов 680

Математическое моделирование акустического поля для воздействия
на репродуктивные клетки рыб в криозащитном растворе при эквilibрации

Е.Н. Пономарева, А.Н. Соловьев, А.А. Матросов, В.А. Чебаненко, Д.А. Нижник, А.А. Егорова, А.А. Красильникова 689

Яйцеклетки серых морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* как тест-объект
и источник гипометаболических веществ

Л.И. Крамарова, Р.Х. Зиганин, В.К. Утешев, Т.В. Крамарова, Э.Н. Гахова 700

Цитотоксичность соединений серебра

Д.Б. Корман, Л.А. Островская, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина 707

Наночастицы серебра — цитотоксическая активность и механизм действия

Д.Б. Корман, Л.А. Островская, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина 715

Модели, описывающие генерацию и проведение нервного импульса

Х.Л. Эрнандес Касерес, С.С. Джимаков, Д.А. Семенов, М.И. Дроботенко, Ю.Д. Нечипуренко 728

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Энтропия и информация в описании биосистем

В.В. Аристов, А.В. Карнаухов, В.Ф. Левченко, Ю.Д. Нечипуренко 741

Возможности применения низкоинтенсивного красного света для модуляции
постаритмических процессов в сердце крыс

О.В. Другова, А.П. Баврина, Н.В. Тиунова, В.В. Борзиков, С.Л. Малиновская 749

Частотно-временной анализ колебаний показателей внешнего дыхания и сердечного ритма человека при физической нагрузке	
<i>В.Г. Гришин, О.В. Гришин, В.С. Никульцев, В.В. Гультяева, М.И. Зинченко, Д.Ю. Урюмцев</i>	755
Численное моделирование работы левого желудочка сердца в системе кровообращения: эффекты изменения частоты сокращений и апикального инфаркта миокарда	
<i>Ф.А. Сёмин, А.Р. Хабибуллина, А.К. Цатурян</i>	763
Изменение антиоксидантных свойств крови при терапии травмы ахиллова сухожилия у крыс мезенхимальными стволовыми клетками	
<i>С.В. Пинчук, И.Б. Василевич, А.Ю. Молчанова, А.А. Басалай, И.Д. Волотовский</i>	776
Пероксиредоксин 6 предотвращает реперфузионное поражение изолированной почки крысы	
<i>А.Е. Гордеева, М.Г. Шарапов, Р.Г. Гончаров, В.И. Новоселов</i>	783
Анализ действия экзогенного никотинамида на биоэнергетические процессы в головном мозге при острой гипоксии	
<i>М.В. Васин, Л.А. Ильин, И.Б. Ушаков</i>	792
Противоопухолевая эффективность сочетанного применения полиакрилата золота (аурумакирил) и облучения в эксперименте	
<i>Л.А. Островская, Д.Б. Корман, А.Б. Шевелев, А.В. Шibaева, А.А. Липенгольц, Н.В. Блюхтерова, М.М. Фомина, В.А. Рыкова, Т.К. Лобжанидзе, Н.В. Позднякова, В.А. Скрибицкий, В.В. Спиридонов, В.А. Кузьмин</i>	798
Микрогемодинамика кожи и механизмы ее регуляции при сахарном диабете 2 типа	
<i>И.В. Тихонова, А.А. Гриневич, А.В. Танканаг, В.Г. Сафронова</i>	805
Метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии в анализе противоопухолевых препаратов	
<i>Л.М. Балашова, Н.А. Бакунина, В.А. Намиот, И.И. Колесниченко, Ю.Д. Кузнецова, А.А. Балашов, Ж.М. Салмаси, С.Н. Удальцов</i>	819
Нетканые сосудистые протезы малого диаметра на основе нановолокон из ароматического полиимида	
<i>А.Е. Чирятьева, Н.А. Завражных, П.В. Попрядухин, Г.Ю. Юкина, А.В. Кривенцов, Е.М. Иванькова, В.Е. Юдин</i>	827

номер 5**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА**

Хиральность как симметричная основа самоорганизации биомакромолекул	
<i>В.А. Твердислов, А.Э. Сидорова, О.Е. Багрова, Е.В. Белова, В.С. Быстров, Н.Т. Левашова, А.О. Луценко, Е.В. Семенова, Д.К. Шпигун</i>	837
16S рРНК <i>E. coli</i> значительно стимулирует трансляцию репортерной мРНК в бесклеточной эукариотической системе	
<i>Н.В. Зырина, С.Ч. Агаларов</i>	859
Структура и аффинность комплексов между ДНК-связывающим доменом белка Swi4 и ДНК	
<i>Д.А. Афонин, О.В. Гераськина, Т.В. Лосева, М.П. Кирпичников, В.М. Студитский, А.В. Феофанов</i>	868

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Динамика процессов в тилакоидных мембранах водорослей *in vivo*, изучаемая в моделях фотосистемы II и тилакоида по измерениям индукции флуоресценции

Н.Е. Беляева, А.А. Булычев, В.З. Пащенко, К.Е. Клементьев, П.А. Ермаченко, И.В. Конюхов, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин 877

Изменение конформации и распределения гемоглобина в эритроците при ингибировании Na^+/K^+ -атфазы

О.В. Слатинская, П.И. Зарипов, Н.А. Браже, И.Ю. Петрушанко, Г.В. Максимов 897

Защитный эффект пероксида водорода при гемолизе эритроцитов наночастицами серебра

В.В. Войнаровский, Г.Г. Мартинович 906

Действие астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга крыс при сердечной недостаточности

Р.Р. Крестинин, Ю.Л. Бабурина, И.В. Одиноква, Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина 917

Оценка окрашивания ткани мозга экстрактом чая улун с особым вниманием к гладкому эндоплазматическому ретикулуму

Е.А. Шишкова, И.В. Краев, В.В. Рогачевский 926

Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов

А.Ф. Ванин, В.И. Телегина, В.Д. Микоян, Н.А. Ткачев, С.В. Васильева 938

Полиакрилаты благородных металлов — цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, резистентных к цисплатине и доксорубину

Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Е.И. Некрасова, Ю.А. Хоченкова, Н.В. Блюхтерова, К.А. Абзаева 947

Селенит натрия как возможный адъювант в терапии Covid-19

Т.М. Гусейнов, Р.Т. Гулиева, С. Н. Джафарова, Н.Х. Джафар 956

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Эффекты хлорида никеля на сократительные параметры миокарда активных сусликов с различным ответом на гипотермию

А.С. Аверин, Н.М. Захарова, Д.А. Игнатьев 962

Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка

А.В. Шиповалов, А.Ф. Ванин, О.В. Пьянков, Е.Г. Багрянская, В.Д. Микоян, Н.А. Ткачев, Н.А. Асанбаева, В.Я. Попкова 969

Роль катиона нитрозония в механизме противоопухолевого эффекта препаратов динитрозильных комплексов железа

А.Ф. Ванин, Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина 982

Влияние последовательности действия нейтронного и протонного излучений на опухолевый ответ солидной карциномы Эрлиха и реакции кожи у мышей в ранние и отдаленные сроки

О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, Т.А. Белякова, Н.С. Стрельникова, А.Е. Шемяков, А.В. Смирнов 991

Влияние Кустодиола на сохранность изолированного сердца крысы при газовой гипотермической консервации под давлением смеси монооксида углерода и кислорода

А.Е. Гурин, Е.Л. Гагаринский, Е.Е. Фесенко (мл.)

1002

Тканеинженерные конструкции в биофизике, неврологии и других областях, отраслях и разделах медицины

В.П. Реутов, Л.А. Давыдова, Е.Г. Сорокина

1009

Эволюционная оптимальность признаков организма. Видовая продолжительность жизни как продукт эволюции

Л.Л. Овсянников

1030

номер 6

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Высвобождение катионов нитрозония из динитрозильных комплексов железа при их распаде под действием анионов супероксида или этилендиаминтетраацетата

А.Ф. Ванин, В.Д. Микоян, Н.А. Ткачев

1045

Специфические и неспецифические взаимодействия липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* с моноклональными антителами, охарактеризованные методом атомно-силовой микроскопии

А.А. Бывалов, В.С. Белозёров, Б.А. Ананченко, И.В. Коньшев

1056

Обзор математических моделей, описывающих механические движения в молекуле ДНК

М.В. Беженар, А.А. Елкина, Х.Л. Эрнандес Касерес, М.Г. Барышев, А.О. Сулима, С.С. Джимаков, В.А. Исаев

1068

Возможные фазовые эффекты в дисперсии глобулярного белка в диапазоне температур нативного состояния

С.П. Рожков, А.С. Горюнов

1079

Исследование методом ЯМР ^1H влияния трет-бутилового спирта на коллаген I

М.Н. Машкин, В.А. Машкина, С.Г. Козлова

1089

Взаимодействие молекул сывороточного альбумина, жирных кислот и графенов наночастиц шунгитового углерода в водной дисперсии по данным спектроскопии комбинационного рассеяния воды в диапазоне больших волновых чисел

С.П. Рожков, А.С. Горюнов, В.А. Колодей, Л.А. Пронькина, Н.Н. Рожкова

1093

Неэквивалентность мономеров в димерной структуре бактериальной фоторегулируемой аденилатциклазы

А.М. Кулакова, М.Г. Хренова, А.В. Немухин

1101

Папаиноподобная протеаза PLpro коронавируса SARS-COV-2 как противовирусная мишень для ингибиторов активного центра и белок-белковых взаимодействий

П.В. Ершов, Е.О. Яблоков, Ю.В. Мезенцев, Г.Н. Чуев, М.В. Федотова, С.Е. Кручинин, А.С. Иванов

1109

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Димеризация свободного и ассоциированного с мембранами фотосистемы II белка PsbO при облучении УФ-светом

М.С. Христин, Т.Н. Смолова, А.А. Хоробрых

1122

Вклад фосфолипидов ядерной мембраны в формирование электрокинетического потенциала

Л.А. Минасбекян, А.В. Неркаряян 1131

Применение базовых изотопных уравнений для описания динамики микробиологических процессов: перераспределение дейтерия

В.А. Вавилин, Л.Я. Локшина 1143

Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на лимфоциты крови человека

А.К. Чигасова, Л.А. Островская, Д.Б. Корман 1158

Активность и каталитические характеристики сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии

Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев 1163

Альтернативные фотосенсибилизаторы для фотохимиотерапии на основе лекарственных препаратов — производных нитрофурана

Г.Ж. Парра, Л.П. Феррейра, Г.П. Борисевич, Ю.Е. Борисевич 1176

Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на опухолевые клетки

А.К. Чигасова, Л.А. Островская, Д.Б. Корман 1185

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Причинно-следственная связь между физиологическими и патологическими процессами в мозге и в желудочно-кишечном тракте: ось «мозг — кишечник»

В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина 1192

Влияние нелинейности упругих свойств роговицы на результаты тонометрии по Шиотцу: оценка на основе двухкомпонентной математической модели

И.Н. Моисеева, А.А. Штейн 1209

Пуринергические механизмы адаптации различных типов двигательных единиц в условиях аллергической перестройки

А.Е. Хайруллин, А.Ю. Теплов, С.Н. Гришин, А.У. Зиганшин 1220

Исследование кинетики транспорта радиофармацевтических соединений на основе фолиевой кислоты, меченных галлием-68

А.С. Лунёв, К.А. Лунёва, Ф.И. Василевич, М.Г. Рахимов, А.А. Ларенков 1224

Гиперкальциевая модель для выявления постсинаптических эффектов АТФ

А.Е. Хайруллин, С.Н. Гришин, А.Ю. Теплов, А.А. Еремеев, Т.В. Балтина, А.У. Зиганшин 1232

Оценка тромбообразования при имплантации в артерию кролика полиуретанового сосудистого протеза, обработанного азотной плазмой

В.С. Чудинов, И.Н. Шардаков, В.В. Литвинов, Г.Г. Фрейнд, С.Ю. Солодников, В.В. Маслова 1236

Разработка медицинских сенсорных систем в пульмонологии на основе измерения электрического импеданса

В.Ю. Мишланов, А.Л. Зуев, Я.В. Мишланов 1243

Высокодозовая ингаляция газообразного оксида азота в лечении COVID-19

Е.В. Печёнкин, А.В. Коврижкин, А.В. Пекшев, А.Б. Вагапов, Н.А. Шарапов, А.Ф. Ванин 1251

К теории явления суперкомпенсации на основе модели нелинейного
переторможенного осциллятора

А.А. Зайцев, С.В. Сазонов 1262

Модель эффекта Брока—Зульцера

С.И. Ляпунов, И.И. Шошина 1269

Формальное математическое описание концепции интеллекта в модельной задаче
о влиянии наблюдений на квантовые процессы

Л.Ю. Щурова, В.А. Намиот 1277

Сравнительный анализ методов оценки скорости старения популяций

В.И. Донцов, В.Н. Крутько, Н.А. Ермакова 1288

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ К 67 ТОМУ ЗА 2022 ГОД

Аббасова М.Т., Гаджиев А.М. Влияние электромагнитного излучения на перекисное окисление липидов и антиоксидантную активность крови крыс 121

Абдуллаев В.Р. см. **Халилов Р.А.**

Абзаева К.А. см. **Островская Л.А.**

Абзаева К.А. см. **Островская Л.А.**

Абрамов А.А. см. **Тимошин А.А.**

Аверин А.С., Захарова Н.М., Игнатьев Д.А. Эффекты хлорида никеля на сократительные параметры миокарда активных сусликов с различным ответом на гипотермию 962

Авторский указатель к 66 тому за 2021 год 199

Агаларов С.Ч. см. **Зырина Н.В.**

Акатов В.С. см. **Звягина А.И.**

Ананченко Б.А. см. **Бывалов А.А.**

Ануфриев А.И. см. **Диатроптов М.Е.**

Аристов В.В., Карнаухов А.В., Левченко В.Ф., Нечипуренко Ю.Д. Энтропия и информация в описании биосистем 741

Артюхов В.Г. см. **Панкова С.М.**

Артюхов В.Г. см. **Холявка М.Г.**

Артюхов В.Г. см. **Шилова Е.В.**

Асанбаева Н.А. см. **Шиповалов А.В.**

Афонин Д.А. см. **Герасимова Н.С.**

Афонин Д.А., Гераськина О.В., Лосева Т.В., Кирпичников М.П., Студитский В.М., Феофанов А.В. Структура и аффинность комплексов между ДНК-связывающим доменом белка Swi4 и ДНК 868

Ахадов Т. см. **Яковлев А.**

Бабенкова И.В. см. **Теселкин Ю.О.**

Бабурина Ю.Л. см. **Крестинин Р.Р.**

Баврина А.П. см. **Другова О.В.**

Багров Д.В. см. **Сенковенко А.М.**

Багрова О.Е. см. **Твердислов В.А.**

Багрянская Е.Г. см. **Шиповалов А.В.**

Бакунина Н.А. см. **Балашова Л.М.**

Бакунина Н.А. см. **Балашова Л.М.**

Бакунина Н.А. см. **Балашова Л.М.**

Балакин Г.Ю. см. **Гапеев А.Б.**

Балашов А.А. см. **Балашова Л.М.**

Балашов А.А. см. **Балашова Л.М.**

Балашова Л.М., Бакунина Н.А., Колесниченко И.И., Кузнецова Ю.Д., Лесовой С.В., Салмаси Ж.М., Удальцов С.Н. Метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии при анализе офтальмологических препаратов Луцентис и Эйлеа, препятствующих новообразованию сосудов 610

Балашова Л.М., Бакунина Н.А., Намиот В.А., Колесниченко И.И., Кузнецова Ю.Д., Балашов А.А., Салмаси Ж.М., Удальцов С.Н. Метод мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии в анализе противоглаукомных препаратов 819

Балашова Л.М., Намиот В.А., Колесниченко И.И., Коробова Л.С., Кузнецова Ю.Д., Балашов А.А., Черкашин Д.Р., Бакунина Н.А., Доронин А.Н., Удальцов С.Н. Удальцов Определение ропивакаина в слезной жидкости у детей при проводниковой анестезии и методом мультисенсорной инверсионной вольтамперометрии 134

Балтина Т.В. см. **Хайруллин А.Е.**

Банкин М.П. см. **Канапин А.А.**

Барышев М.Г. см. **Беженар М.В.**

Басалай А.А. см. **Пинчук С.В.**

Беженар М.В., Елкина А.А., Эрнандес Касерес Х.Л., Барышев М.Г., Сулима А.О., Джима С.С., Исаев В.А. Обзор математических моделей, описывающих механические движения в молекуле ДНК 1068

Белова Е.В. см. **Твердислов В.А.**

Белова Е.В., Семенова Е.В., Твердислов В.А. О хиральности лекарственных препаратов и структур биомакромолекул 477

Белозёров В.С. см. **Бывалов А.А.**

Беляева Н.Е., Булычев А.А., Пашенко В.З., Клементьев К.Е., Ермаченко П.А., Конохов И.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Динамика процессов в тилакоидных мембранах водорослей *in vivo*, изучаемая в моделях фотосистемы II и тилакоида по измерениям индукции флуоресценции 877

Белякова Т.А. см. **Розанова О.М.**

Бигдай Е.В., Синегубов А.А. Нарушение регуляции системы цАМФ в обонятельных нейронах в

модели шизофрении, индуцируемой введением (+)-МК-801 крысам 274

Блюхтерова Н.В. см. **Ванин А.Ф.**

Блюхтерова Н.В. см. **Корман Д.Б.**

Блюхтерова Н.В. см. **Корман Д.Б.**

Блюхтерова Н.В. см. **Островская Л.А.**

Блюхтерова Н.В. см. **Островская Л.А.**

Блюхтерова Н.В. см. **Островская Л.А.**

Бобылёв А.Г. см. **Бобылёва Л.Г.**

Бобылёва Л.Г., Габдулхаков А.Г., Салмов Н.Н., Вихлянцева И.М., Бобылёв А.Г. Исследование *in vitro* агрегационных свойств мышечного α -белка 652

Бондарь А.Т. см. **Савчук Л.В.**

Борзиков В.В. см. **Другова О.В.**

Борисевич Г.П. см. **Парра Г.Ж.**

Борисевич Ю.Е. см. **Парра Г.Ж.**

Браже Н.А. см. **Слатинская О.В.**

Будянский А.В., Цибулин В.Г. Моделирование динамики популяций на неоднородном ареале: инвазия и мультистабильность 174

Бульчев А.А. см. **Беляева Н.Е.**

Буцанец П.А. см. **Жигачева И.В.**

Бучельников А.С. см. **Нечипуренко Ю.Д.**

Бучельников А.С. см. **Лавриненко И.А.**

Бывалов А.А., Белозёров В.С., Ананченко Б.А., Коньшев И.В. Специфические и неспецифические взаимодействия липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* с моноклональными антителами, охарактеризованные методом атомно-силовой микроскопии 1056

Быстров В.С. см. **Твердислов В.А.**

Вавилин В.А., Локшина Л.Я. Применение базовых изотопных уравнений для описания динамики микробиологических процессов: перераспределение дейтерия 1143

Вагапов А.Б. см. **Печёнкин Е.В.**

Ванин А.Ф. Катионы нитрозония как наиболее эффективные в цитотоксическом отношении и компоненты динитрозильных комплексов железа 434

Ванин А.Ф. см. **Печёнкин Е.В.**

Ванин А.Ф. см. **Шиповалов А.В.**

Ванин А.Ф., Микоян В.Д., Ткачев Н.А. Высвобождение катионов нитрозония из динитрозильных комплексов железа при их распаде под действием анионов супероксида или этилендиаминтетраацетата 1045

Ванин А.Ф., Островская Л.А., Корман Д.Б., Блюхтерова Н.В., Рыкова В.А., Фомина М.М. Роль катиона нитрозония в механизме противоопухолевого эффекта препаратов динитрозильных комплексов железа 982

Ванин А.Ф., Телегина В.И., Микоян В.Д., Ткачев Н.А., Васильева С.В. Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов 938

Варфоломеев С.Д. Лев Александрович Блюменфельд и современная биохимическая физика. «Решаемые» и «нерешаемые» проблемы 629

Варфоломеева Е.Ю. см. **Ковалёв Р.А.**

Василевич И.Б. см. **Пинчук С.В.**

Василевич Ф.И. см. **Лунёв А.С.**

Васильев С.В. см. **Жигачева И.В.**

Васильева С.В. см. **Ванин А.Ф.**

Васин М.В., Ильин Л.А., Ушаков И.Б. Анализ действия экзогенного никотинамида на биоэнергетические процессы в головном мозге при острой гипоксии 792

Вашанов Г.А. см. **Лавриненко И.А.**

Вашанов Г.А. см. **Лавриненко И.А.**

Вашанов Г.А. см. **Лавриненко И.А.**

Вихлянцева И.М. см. **Бобылёва Л.Г.**

Владимиров Ю.А. см. **Наумова Е.В.**

Власова О.Л. см. **Скребенков Е.А.**

Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г. Защитный эффект пероксида водорода при гемолизе эритроцитов наночастицами серебра 906

Володяев И.В. см. **Наумова Е.В.**

Волотовский И.Д. см. **Пинчук С.В.**

Вольхин И.Л. см. **Ихлов Б.Л.,**

Воробьева В.В., Левченкова О.С., Шабанов П.Д. Активность сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови кролика зависит от характеристик вибрационного воздействия 267

Вышкворкина Ю.М. см. **Холявка М.Г.**

Габдулхаков А.Г. см. **Бобылёва Л.Г.**

Гагаринский Е.Л. см. **Гурин А.Е.**

Гаджиев А.М. см. **Аббасова М.Т.**

Гайский П.В. см. **Степанова О.А.**

Галактионова Л.В. см. **Летута С.Н.**

Галка А.Г. см. **Мартусевич А.К.**

- Гапеев А.Б. см. Жукова Е.С.
- Гапеев А.Б., Жукова Е.С., Синельникова В.А., Балакин Г.Ю., Земскова М.Ю., Рысцов Г.К., Щербатюк Т.Г. Сравнительное исследование повреждений днк в лейкоцитах крови мыши и клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 в зависимости от концентрации озона, пероксида водорода и гемцитабина 569
- Гахова Э.Н. см. Крамарова Л.И.
- Генералова А.А. см. Крупянский Ю.Ф.
- Генерозова И.П. см. Жигачева И.В.
- Герасимов Н.Ю. см. Жигачева И.В.
- Герасимова Н.С., Коровина А.Н., Афонин Д.А., Шайтан К.В., Феофанов А.В., Студитский В.М. Анализ структуры элонгационных комплексов в полиакриламидном геле методом фёрстеровского резонансного переноса энергии 222
- Гераськина О.В. см. Афонин Д.А.
- Голощапов А.Н. см. Жигачева И.В.
- Голубкова Е.В. см. Козлов К.Н.
- Гольгина Е.С. см. Мартусевич А.К.
- Гольгина Е.С. см. Мартусевич А.К.
- Гончаров Р.Г. см. Гордеева А.Е.
- Гордеева А.Е., Шарапов М.Г., Гончаров Р.Г., Новоселов В.И. Пероксиредоксин 6 предотвращает реперфузионное поражение изолированной почки крысы 783
- Горюнов А.С. см. Рожков С.П.
- Горюнов А.С. см. Рожков С.П.
- Григорьев П.А. Ряд катионной селективности каналов, формируемых пероксиредоксином-6 в бимолекулярных фосфолипидных мембранах 264
- Григорьева Е.Ю. см. Скрибичский В.А.
- Гриневич А.А. см. Тихонова И.В.
- Гришин В.Г., Гришин О.В., Никульцев В.С., Гульяева В.В., Зинченко М.И., Урюмцев Д.Ю. Частотный анализ колебаний показателей внешнего дыхания и сердечного ритма в диапазоне очень низких частот 140
- Гришин В.Г., Гришин О.В., Никульцев В.С., Гульяева В.В., Зинченко М.И., Урюмцев Д.Ю. Частотно-временной анализ колебаний показателей внешнего дыхания и сердечного ритма человека при физической нагрузке 755
- Гришин О.В. см. Гришин В.Г.
- Гришин О.В. см. Гришин В.Г.
- Гришин С.Н. см. Хайруллин А.Е.
- Гришин С.Н. см. Хайруллин А.Е.
- Гришин С.Н., Хайруллин А.Е., Теплов А.Ю., Мухамедьяров М.А. Мионевральная передача в бариевой среде 576
- Гулиева Р.Т. см. Гусейнов Т.М.
- Гульяева В.В. см. Гришин В.Г.
- Гульяева В.В. см. Гришин В.Г.
- Гурин А.Е., Гагаринский Е.Л., Фесенко Е.Е. (мл.) Влияние Кустодиола на сохранность изолированного сердца крысы при газовой гипотермической консервации под давлением смеси монооксида углерода и кислорода 1002
- Гусарук Л.Р. см. Текущая Е.Е.
- Гусейнов Т.М., Гулиева Р.Т., Джафарова С. Н., Джафар Н.Х. Селенит натрия как возможный адъювант в терапии Covid-19 956
- Гхош Д. см. Пал Д.
- Давыдова Л.А. см. Реутов В.П.
- Даль А.И. см. Звягина А.И.
- Дегтярева О.В. см. Кондратьев М.С.
- Джафар Н.Х. см. Гусейнов Т.М.
- Джафарова А.М. см. Халилов Р.А.
- Джафарова С. Н. см. Гусейнов Т.М.
- Джимак С.С. см. Беженар М.В.
- Джимак С.С. см. Эрнандес Касерес Х.Л.
- Диатроптов М.Е., Ануфриев А.И., Рутовская М.В. Связь моментов восстановления температуры тела у животных в период зимней спячки с интенсивностью флуктуаций вторичного космического излучения 600
- Донцов В.И., Крутько В.Н., Ермакова Н.А. Сравнительный анализ методов оценки скорости старения популяций 1288
- Донцов В.И., Крутько В.Н., Митрохин О.В., Ермакова Н.А. Снижение скорости старения человека в XX веке и его возможные причины 183
- Доронин А.Н. см. Балашова Л.М.
- Дорофеев Д.В. см. Летута С.Н.
- Дроботенко М.И. см. Эрнандес Касерес Х.Л.
- Другова О.В., Баврина А.П., Тиунова Н.В., Борзиков В.В. Малиновская, С.Л. Возможности применения низкоинтенсивного красного света для модуляции постаритмических процессов в сердце крыс 749
- Дук М.А., Канапин А.А., Самсонова А.А., Рожмина Т.А., Самсонова М.Г. Анализ структурной

вариабельности геномов льна *Linum usitatissimum* L. 234

Егорова А.А. см. Пономарева Е.Н.

Елкина А.А. см. Беженар М.В.

Елюхина И.В. Уравнение Гинзбурга—Ландау для анализа нелинейной неустойчивости в сердечной ткани 378

Епишкина А.А. см. Мартусевич А.К.

Еремеев А.А. см. Хайруллин А.Е.

Еремин А.Л. К биофизике эволюции интеллектуальных систем 409

Ермакова Н.А. см. Донцов В.И.

Ермакова Н.А. см. Донцов В.И.

Ермаченко П.А. см. Беляева Н.Е.

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 1109

Жигачева И.В., Крикунова Н.И., Генерозова И.П., Буцанец П.А., Герасимов Н.Ю., Неврова О.В., Васильев С.В., Голощапов А.Н. Натрий-μ2-дитиосульфато-тетранитрозилдиферрата тетрагидрат повышает эффективность работы дыхательной цепи митохондрий проростков гороха 671

Жукова Е.С. см. Гапеев А.Б.

Жукова Е.С., Щербатюк Т.Г., Чернигина И.А., Чернов В.В., Гапеев А.Б. Фотобиомодуляция фиолетово-синим светом динамики опухолевого роста и прооксидантно-антиоксидантного баланса в организме опухоленосителей 615

Завражных Н.А. см. Чирятьева А.Е.

Зайцев А.А., Сазонов С.В. К теории явления суперкомпенсации на основе модели нелинейного переторможенного осциллятора 1262

Зарипов П.И. см. Слатинская О.В.

Захарова Н.М. см. Аверин А.С.

Захарова Н.М. см. Каранова М.В.

Зверев А.Г., Токарев Ю.Н. Неинвазивный подход в гидродинамике спинномозговой жидкости в спинальной полости 150

Звягина А.И., Даль А.И., Минайчев В.В., Краснова О.А., Акатов В.С., Фадеева И.С. Пассивный асептический кальциноз фиксированных перикар-

диальных биоматериалов опосредован нарушениями структуры и микроархитектоники их внеклеточного матрикса 160

Земскова М.Ю. см. Гапеев А.Б.

Зиганшин А.У. см. Хайруллин А.Е.

Зиганшин А.У. см. Хайруллин А.Е.

Зиганшин А.У. см. Хайруллин А.Е.

Зиганшин Р.Х. см. Крамарова Л.И.

Зинченко М.И. см. Гришин В.Г.

Зинченко М.И. см. Гришин В.Г.

Зуев А.Л. см. Мишланов В.Ю.

Зуев В. А. см. Мещеряков Г.А.

Зырина Н.В., Агаларов С.Ч. 16S рРНК *E. coli* значительно стимулирует трансляцию репортерной мРНК в бесклеточной эукариотической системе 859

Иванов А.С. см. Ершов П.В.

Иванькова Е.М. см. Чирятьева А.Е.

Игнатъев Д.А. см. Аверин А.С.

Иголкина А.А. см. Мещеряков Г.А.

Ильин Л.А. см. Васин М.В.

Ильченко Г.П. см. Текуцкая Е.Е.

Исаев В.А. см. Беженар М.В.

Ихлов Б.Л., Вольхин И.Л., Ошечков А.Ю. О механизме действия микроволн на членистоногих 327

Ишемгулов А.Т. см. Летута С.Н.

Кадочникова М.А. см. Терещенко Л.В.

Калмацкая О. А. см. Караваев В. А.

Канапин А.А. см. Дук М.А.

Канапин А.А., Самсонова А.А., Банкин М.П., Логачев А.А., Рожмина Т.А., Самсонова М.Г. Сборка геномов трех слабовирулентных штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lini* 240

Канныкин С.В. см. Шилова Е.В.

Караваев В. А., Калмацкая О. А., Трубицин Б.В., Тихонов А. Н. Термолуминесценция и диагностика состояния фотосинтетического аппарата листьев растений 524

Каранова М.В., Захарова Н.М. Пулы аминокислот скелетных мышц якутского суслика *Urocyon undulatus* на разных стадиях гибернации 371

Карнаухов А.В. см. Аристов В.В.

Кирпичников М.П. см. Афонин Д.А.

Клементьев К.Е. см. Беляева Н.Е.

- Ковалёв Р.А., Федорова Н.Д., Пантина Р.А., Семенова Е.В., Филатов М.В., Варфоломеева Е.Ю. Стохастичность экспрессии белка р53 в клетках первичных и перевиваемых линий человека 540
- Коваленко В.В. см. Крупянский Ю.Ф.
- Коврижкин А.В. см. Печёнкин Е.В.
- Козлов К.Н., Голубкова Е.В., Мамон Л.А., Самсонова М.Г., Суркова С.Ю. Глазной имажинальный диск дрозофилы как модель для обработки изображений эпителиальных тканей 283
- Козлова С.Г. см. Машкин М.Н.
- Колесниченко И.И. см. Балашова Л.М.
- Колесниченко И.И. см. Балашова Л.М.
- Колесниченко И.И. см. Балашова Л.М.
- Колодей В.А. см. Рожков С.П.
- Колтаков И.А. см. Шилова Е.В.
- Комаров В.М. см. Кондратьев М.С.
- Кондратьев М.С. см. Холявка М.Г.
- Кондратьев М.С., Щербаков К.А., Самченко А.А., Дегтярева О.В., Терпугов Е.Л., Хечинашвили Н.Н., Комаров В.М. Кремниевые аналоги L-аминокислот: свойства «кирпичиков» чужой биосферы 213
- Коньшев И.В. см. Бывалов А.А.
- Конюхов И.В. см. Беляева Н.Е.
- Корман Д.Б. см. Ванин А.Ф.
- Корман Д.Б. см. Островская Л.А.
- Корман Д.Б. см. Островская Л.А.
- Корман Д.Б. см. Островская Л.А.
- Корман Д.Б. см. Чигасова А.К.
- Корман Д.Б. см. Чигасова А.К.
- Корман Д.Б., Островская Л.А., Блюхтерова Н.В., Рыкова В.А., Фомина М.М. Цитотоксичность соединений серебра 707
- Корман Д.Б., Островская Л.А., Блюхтерова Н.В., Рыкова В.А., Фомина М.М. Наночастицы серебра — цитотоксическая активность и механизм действия 715
- Коробова Л.С. см. Балашова Л.М.
- Коровина А.Н. см. Герасимова Н.С.
- Кочетова А.А. см. Теселкин Ю.О.
- Краев И.В. см. Шишкова Е.А.
- Крамарова Л.И., Зиганшин Р.Х., Утешев В.К., Крамарова Т.В., Гахова Э.Н. Яйцеклетки серых морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* как тест-объект и источник гипометаболических веществ 700
- Крамарова Т.В. см. Крамарова Л.И.
- Красавин Е.А. см. Терещенко Л.В.
- Красильникова А.А. см. Пономарева Е.Н.
- Краснова О.А. см. Звягина А.И.
- Крестинин Р.Р., Бабурина Ю.Л., Одиноква И.В., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В. Действие атаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга крыс при сердечной недостаточности 917
- Крестинина О.В. см. Крестинин Р.Р.
- Кривенцов А.В. см. Чирятьева А.Е.
- Крикунова Н.И. см. Жигачева И.В.
- Крупянский Ю.Ф., Коваленко В.В., Лойко Н.Г., Генералова А.А., Моисеенко А.В., Терешкин Э.В., Соколова О.С., Терешкина К.Б., Эль-Регистан Г.И., Попов А.Н. Архитектура конденсированной ДНК в нуклеоиде бактерии *Escherichia coli* 638
- Крутько В.Н. см. Донцов В.И.
- Крутько В.Н. см. Донцов В.И.
- Кручинин С.Е. см. Ершов П.В.
- Кузнецова Ю.Д. см. Балашова Л.М.
- Кузнецова Ю.Д. см. Балашова Л.М.
- Кузнецова Ю.Д. см. Балашова Л.М.
- Кузьмин В.А. см. Островская Л.А.
- Кулакова А.М., Хренова М.Г., Немухин А.В. Неэквивалентность мономеров в димерной структуре бактериальной фоторегулируемой аденилатциклазы 1101
- Куприянов Д. см. Яковлев А.
- Лаврик Н.Л. О природе спектрального сдвига полосы сорбции эритроцитарного оксигемоглобина при добавлении органических молекул в суспензию эритроцитов 88
- Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Бучельников А.С., Нечипуренко Ю.Д. Кооперативное связывание кислорода гемоглобином как одна из обобщающих моделей в молекулярной биофизике 421
- Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Нечипуренко Ю.Д. Новая интерпретация коэффициента Хилла 229
- Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Нечипуренко Ю.Д. Новая математическая модель, описывающая оксигенацию гемоглобина 444
- Лакомкин В.Л. см. Тимошин А.А.
- Ламичхане Б. см. Ламичхане Т.Р.
- Ламичхане Т.Р., Пант С.П., Ламичхане Б., Паудел С., Ядав Б.К., Ламичхане Х.П. Оценка взаи-

модействия между тиреоидными гормонами и тиреотропином при расстройствах функций щитовидной железы на базе популяционного анализа данных с логистической моделью 362

Ламичхане Х.П. см. Ламичхане Т.Р.

Ларенков А.А. см. Лунёв А.С.

Латанов А.В. см. Терещенко Л.В.

Левашова Н.Т. см. Твердислов В.А.

Левченко В.Ф. см. Аристов В.В.

Левченкова О.С. см. Воробьева В.В.

Лесовой С.В. см. Балашова Л.М.

Летута С.Н., Ишемгулов А.Т., Никиян А.Н., Раздобреев Д.А., Галактионова Л.В., Дорофеев Д.В., Цюрко Д.Е. Механизмы повреждения бактерий *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* при импульсном фотовозбуждении молекулярных сенсibilизаторов 531

Липенгольц А.А. см. Островская Л.А.

Липенгольц А.А. см. Скрибицкий В.А.

Литвинов В.В. см. Чудинов В.С.

Лобжанидзе Т.К. см. Островская Л.А.

Лобышев В.И. Биологическая активность расщепителей веществ в малых и сверхмалых концентрациях 658

Логачев А.А. см. Канапин А.А.

Лойко Н.Г. см. Крупянский Ю.Ф.

Локшина Л.Я. см. Вавилин В.А.

Лосева Т.В. см. Афонин Д.А.

Лукин А.Н. см. Холявка М.Г.

Лунёв А.С., Лунёва К.А., Василевич Ф.И., Рахимов М.Г., Ларенков А.А. Исследование кинетики транспорта радиофармацевтических соединений на основе фолиевой кислоты, меченных галлием-68 1224

Лунёва К.А. см. Лунёв А.С.

Луценко А.О. см. Твердислов В.А.

Лысенко Н.П. см. Ромодин Л.А.

Ляпунов С.И., Шошина И.И. Модель эффекта Брока—Зульцера 1269

Мажурцев А. см. Яковлев А.

Максимов Г.В. см. Слатинская О.В.

Малиновска, С.Л. см. Другова О.В.

Мальшева К.С. см. Мартусевич А.К.

Мамон Л.А. см. Козлов К.Н.

Мартинovich Г.Г. см. Войнаровский В.В.

Мартусевич А.К., Галка А.Г., Тужилкин А.Н., Гольгина Е.С., Федотова А.С., Назаров В.В. Влияние переменных токов на кристаллогенные свойства сыворотки крови *in vitro* 128

Мартусевич А.К., Гольгина Е.С., Назаров В.В., Епишкина А.А., Мальшева К.С. Влияние гелиевой холодной плазмы на микроциркуляцию в околораневой зоне при экспериментальной термической травме 168

Маслакова А.А. см. Сенковенко А.М.

Маслова В.В. см. Чудинов В.С.

Матросов А.А. см. Пономарева Е.Н.

Махапатра Г.С. см. Пал Д.

Машкин М.Н., Машкина В.А., Козлова С.Г. Исследование методом ЯМР ^1H влияния трет-бутилового спирта на коллаген I 1089

Машкина В.А. см. Машкин М.Н.

Мезенцев Ю.В. см. Ершов П.В.

Мезенцева Л.В. Регрессионный анализ и математическое моделирование флуктуаций показателей микроциркуляции симметричных областей верхних конечностей человека 587

Мельников И. см. Яковлев А.

Меньщиков П. см. Яковлев А.

Мещеряков Г.А., Зуев В. А., Иголкина А.А., Самсонова М.Г. Оптимизация вычислений в задаче структурного моделирования уравнениями для биоинформатических приложений 451

Микоян В.Д. см. Ванин А.Ф.

Микоян В.Д. см. Ванин А.Ф.

Микоян В.Д. см. Шиповалов А.В.

Минайчев В.В. см. Звягина А.И.

Минасбеян Л.А., Неркарарян А.В. Вклад фосфолипидов ядерной мембраны в формирование электрокинетического потенциала 1131

Митрохин О.В. см. Донцов В.И.

Мишланов В.Ю., Зуев А.Л., Мишланов Я.В. Разработка медицинских сенсорных систем в пульмонологии на основе измерения электрического импеданса 1243

Мишланов Я.В. см. Мишланов В.Ю.

Мишра А. см. Саха С.

Моисеева И.Н., Штейн А.А. Влияние нелинейности упругих свойств роговицы на результаты тонометрии по Шютцу: оценка на основе двухкомпонентной математической модели 1209

Моисеенко А.В. см. Крупянский Ю.Ф.

Мойсенович А.М. см. Сенковенко А.М.
 Молчанова А.Ю. см. Пинчук С.В.
 Мухамедьяров М.А. см. Гришин С.Н.

Нажётский И.А., Сварник О.Е. Изменение показателя интегрированной информации для активности нейронов гиппокампа в процессе формирования оперантных навыков у крыс 73

Назаров В.В. см. Мартусевич А.К.
 Назаров В.В. см. Мартусевич А.К.
 Намиот В.А. см. Балашова Л.М.
 Намиот В.А. см. Балашова Л.М.
 Намиот В.А. см. Наумова Е.В.
 Намиот В.А. см. Щурова Л.Ю.

Наумова Е.В., Владимиров Ю.А., Тучин В.В., Намиот В.А., Володяев И.В. Методы исследования сверхслабого свечения биологических объектов. III. Физические методы 37

Неврова О.В. см. Жигачева И.В.
 Некрасова Е.И. см. Островская Л.А.
 Некрасова Е.И. см. Островская Л.А.
 Немухин А.В. см. Кулакова А.М.
 Неркарарян А.В. см. Минасбекян Л.А.
 Нечипуренко Ю.Д. см. Аристов В.В.
 Нечипуренко Ю.Д. см. Лавриненко И.А.
 Нечипуренко Ю.Д. см. Лавриненко И.А.
 Нечипуренко Ю.Д. см. Эрнандес Касерес Х.Л.

Нечипуренко Ю.Д., Бучельников А.С. Связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами в растворе и на микрочипах 456

Нижник Д.А. см. Пономарева Е.Н.
 Никиян А.Н. см. Летута С.Н.
 Никульцев В.С. см. Гришин В.Г.
 Никульцев В.С. см. Гришин В.Г.
 Новиков В.В. см. Шаев И.А.
 Новоселов В.И. см. Гордеева А.Е.

Овсянников Д.А. см. Оськин С.В.

Овсянников Л.Л. Эволюционная оптимальность признаков организма. Видовая продолжительность жизни как продукт эволюции 1030

Одиноква И.В. см. Крестинин Р.Р.
 Осипов А.Н. см. Теселкин Ю.О.
 Островская Л.А. см. Ванин А.Ф.
 Островская Л.А. см. Корман Д.Б.
 Островская Л.А. см. Корман Д.Б.

Островская Л.А. см. Чигасова А.К.

Островская Л.А. см. Чигасова А.К.

Островская Л.А., Корман Д.Б., Некрасова Е.И., Блюхтерова Н.В., Хоченкова Ю.А., Абзаева К.А. Чувствительность опухолевых и нормальных клеток человека к полиакрилатам благородных металлов 82

Островская Л.А., Корман Д.Б., Некрасова Е.И., Хоченкова Ю.А., Блюхтерова Н.В., Абзаева К.А. Полиакрилаты благородных металлов – цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, резистентных к цисплатине и доксорубину 947

Островская Л.А., Корман Д.Б., Шевелев А.Б., Шибаева А.В., Липенгольц А.А., Блюхтерова Н.В., Фомина М.М., Рыкова В.А., Лобжанидзе Т.К., Позднякова Н.В., Скрибицкий В.А., Спиридонов В.В., Кузьмин В.А. Противоопухолевая эффективность сочетанного применения полиакрилата золота (аурумакрил) и облучения в эксперименте 798

Оськин С.В., Овсянников Д.А., Шишигин И.Н. Моделирование микроклимата пчелиного улья в конце зимнего периода 105

Ощепков А.Ю. см. Ихлов Б.Л.,

Павлова Е.Р. см. Сенковенко А.М.

Пал Д., Гхош Д., Сантра П.К., Махапатра Г.С. Математический анализ модели эпидемии COVID-19 с использованием данных эпидемиологических параметров болезней, распространенных в Индии 301

Панкова С.М. см. Холявка М.Г.

Панкова С.М., Сакибаев Ф.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Возможная роль кластеров заряженных аминокислот на поверхности цистеиновых протеаз для сохранения активности при связывании с полимерами 14

Пант С.П. см. Ламичхане Т.Р.

Пангина Р.А. см. Ковалёв Р.А.

Парин С.Б. см. Савчук Л.В.

Парра Г.Ж., Феррейра Л.П., Борисевич Г.П., Борисевич Ю.Е. Альтернативные фотосенсибилизаторы для фотохимиотерапии на основе лекарственных препаратов – производных нитрофурана 1176

Паудел С. см. Ламичхане Т.Р.

Пашовкин Т.Н., Садикова Д.Г. Параметры управления разделением и концентрированием

эритроцитов и лимфоцитов крыс, эритроцитов человека в поле стоячей ультразвуковой волны 562

Пашенко В.З. см. **Беляева Н.Е.**

Пекшев А.В. см. **Печёнкин Е.В.**

Переварюха А.Ю. Гибридная модель коллапса промысловой популяции краба *Paralithodes camtschaticus* (Decapoda, Lithodidae) Кадыкского архипелага 386

Петрушанко И.Ю. см. **Слатинская О.В.**

Печёнкин Е.В., Коврижкин А.В., Пекшев А.В., Вагапов А.Б., Шарапов Н.А., Ванин А.Ф. Высокодозовая ингаляция газообразного оксида азота в лечении COVID-19 1251

Пинчук С.В., Василевич И.Б., Молчанова А.Ю., Басалай А.А., Волотовский И.Д. Изменение антиоксидантных свойств крови при терапии травмы ахиллова сухожилия у крыс мезенхимальными стволовыми клетками 776

Позднякова Н.В. см. **Островская Л.А.**

Позднякова Н.В. см. **Скрибицкий В.А.**

Полевая С.А. см. **Савчук Л.В.**

Поляничко А.М. см. **Тымченко Е.Е.**

Пономарева Е.Н., Соловьев А.Н., Матросов А.А., Чебаненко В.А., Нижник Д.А., Егорова А.А., Красильникова А.А. Математическое моделирование акустического поля для воздействия на репродуктивные клетки рыб в криозащитном растворе при эквilibрации 689

Попкова В.Я. см. **Шиповалов А.В.**

Попов А.А. см. **Скрибицкий В.А.**

Попов А.Н. см. **Крупянский Ю.Ф.**

Попрядухин П.В. см. **Чирятьева А.Е.**

Пронькина Л.А. см. **Рожков С.П.**

Пьянков О.В. см. **Шиповалов А.В.**

Раздобреев Д.А. см. **Летута С.Н.**

Ратрей П. см. **Саха С.**

Рахимов М.Г. см. **Лунёв А.С.**

Реутов В.П., Давыдова Л.А., Сорокина Е.Г. Тканеинженерные конструкции в биофизике, неврологии и других областях, отраслях и разделах медицины 1009

Реутов В.П., Сорокина Е.Г. Причинно-следственная связь между физиологическими и патологическими процессами в мозге и в желудочно-кишечном тракте: ось «мозг – кишечник» 1192

Ризниченко Г.Ю. см. **Беляева Н.Е.**

Рогачевский В.В. см. **Шишкова Е.А.**

Рожков С.П., Горюнов А.С. Возможные фазовые эффекты в дисперсии глобулярного белка в диапазоне температур нативного состояния 1079

Рожков С.П., Горюнов А.С., Колодей В.А., Пронькина Л.А., Рожкова Н.Н. Взаимодействие молекул сывороточного альбумина, жирных кислот и графенов наночастиц шунгитового углерода в водной дисперсии по данным спектроскопии комбинационного рассеяния воды в диапазоне больших волновых чисел 1093

Рожкова Н.Н. см. **Рожков С.П.**

Рожмина Т.А. см. **Дук М.А.,**

Рожмина Т.А. см. **Канапин А.А.**

Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Белякова Т.А., Стрельникова Н.С., Шемяков А.Е., Смирнов А.В. Влияние последовательности действия нейтронного и протонного излучений на опухолевый ответ солидной карциномы Эрлиха и реакции кожи у мышей в ранние и отдаленные сроки 991

Ромодин Л.А., Лысенко Н.П. Радиопротекторное действие препаратов на основе хлорофилла 96

Рубин А.Б. см. **Беляева Н.Е.**

Рутовская М.В. см. **Диатроптов М.Е.**

Рууге Э.К. см. **Тимошин А.А.**

Рууге Э.К., Тихонов А.Н. Электронный парамагнитный резонанс: исследование механизмов регуляции световых стадий фотосинтеза растений 516

Рыкова В.А. см. **Ванин А.Ф.**

Рыкова В.А. см. **Корман Д.Б.**

Рыкова В.А. см. **Корман Д.Б.**

Рыкова В.А. см. **Островская Л.А.**

Рысцов Г.К. см. **Гапеев А.Б.**

Савчук Л.В., Полевая С.А., Парин С.Б., Бондарь А.Т., Федотчев А.И. Резонансное сканирование и анализ электроэнцефалограммы при определении зрелости корковой ритмики у младших школьников 354

Садикова Д.Г. см. **Пашовкин Т.Н.**

Сазонов С.В. см. **Зайцев А.А.**

Сакибаев Ф.А. см. **Панкова С.М.**

Салмаси Ж.М. см. **Балашова Л.М.**

Салмаси Ж.М. см. **Балашова Л.М.**

Салмов Н.Н. см. **Бобылёва Л.Г.**

Самсонова А.А. см. **Дук М.А.**

- Самсонова А.А. см. Канапин А.А.
Самсонова М.Г. см. Дук М.А.
Самсонова М.Г. см. Канапин А.А.
Самсонова М.Г. см. Козлов К.Н.
Самсонова М.Г. см. Мещеряков Г.А.,
Самченко А.А. см. Кондратьев М.С.
Сантра П.К. см. Пал Д.
Сафронова В.Г. см. Тихонова И.В.
Саха С., Ратрей П., Мишра А. Взаимодействие
антимикробного пептида лазиоглоссина III с мо-
дельными липидными бислоями 250
Сварник О.Е. см. Нажёсткин И.А.
Семенов Д.А. см. Эрнандес Касерес Х.Л.
Семенова Е.В. см. Белова Е.В.
Семенова Е.В. см. Ковалёв Р.А.
Семенова Е.В. см. Твердислов В.А.
Семенова Н. см. Яковлев А.
Сёмин Ф.А., Хабибуллина А.Р., Цатурян А.К.
Численное моделирование работы левого желудоч-
ка сердца в системе кровообращения: эффекты из-
менения частоты сокращений и апикального ин-
фаркта миокарда 763
Сенковенко А.М., Мойсенович А.М., Маслако-
ва А.А., Павлова Е.Р., Багров Д.В. Измерение ад-
сорбции антител класса IgG на электроформован-
ные мембраны из нейлона-6 555
Сидорова А.Э. см. Твердислов В.А.
Синегубов А.А. см. Бигдай Е.В.
Синельникова В.А. см. Гапеев А.Б.
Сирота Н.П. см. Сирота Т.В.
Сирота Т.В., Сирота Н.П. К механизму актива-
ции кислорода в химических и биологических си-
стемах 5
Скребенков Е.А., Власова О.Л. Математическое
моделирование эфферентной регуляции мышеч-
ного сокращения 289
Скрибицкий В.А. см. Островская Л.А.
Скрибицкий В.А., Позднякова Н.В., Липен-
гольц А.А., Попов А.А., Тихоновский Г.В., Фино-
генова Ю.А., Смирнова А.В., Григорьева Е.Ю.
Спектрофотометрический метод оценки раз-
мера и концентрации лазерно-аблированных
золотых наночастиц 30
Слатинская О.В., Зарипов П.И., Браже Н.А.,
Петрушанко И.Ю., Максимов Г.В. Изменение
конформации и распределения гемоглобина в
эритроците при ингибировании Na^+/K^+ -атфазы
897
Смирнов А.В. см. Розанова О.М.
Смирнова А.В. см. Скрибицкий В.А.
Смирнова Е.Н. см. Розанова О.М.
Смолова Т.Н. см. Христин М.С.
Содержание тома 66, 2021 г. 188
Соколова О.С. см. Крупянский Ю.Ф.
Солдатов А.А. см. Тымченко Е.Е.
Соловьев А.Н. см. Пономарева Е.Н.
Солодников С.Ю. см. Чудинов В.С.
Сорокина Е.Г. см. Реутов В.П.
Сорокина Е.Г. см. Реутов В.П.
Сотникова Л.Д. см. Крестинин Р.Р.
Спиридонов В.В. см. Островская Л.А.
Степанова О.А., Гайский П.В., Шоларь С.А. Вли-
яние постоянного магнитного поля на инфекцион-
ный титр черноморских альгровирусов 244
Стрельникова Н.С. см. Розанова О.М.
Студитский В.М. см. Афонин Д.А.
Студитский В.М. см. Герасимова Н.С.
Сулима А.О. см. Беженар М.В.
Суркова С.Ю. см. Козлов К.Н.
Танканаг А.В. см. Тихонова И.В.
Твердислов В.А. см. Белова Е.В.
Твердислов В.А., Сидорова А.Э., Багрова О.Е.,
Белова Е.В., Быстров В.С., Левашова Н.Т., Луцен-
ко А.О., Семенова Е.В., Шпигун Д.К. Хиральность
как симметричная основа самоорганизации био-
макромолекул 837
Текущая Е.Е., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Вли-
яние переменного магнитного поля на хемилюми-
несценцию мононуклеарных клеток перифериче-
ской крови человека и производство провоспалит-
ельных цитокинов 113
Телегина В.И. см. Ванин А.Ф.
Теплов А.Ю. см. Гришин С.Н.
Теплов А.Ю. см. Хайруллин А.Е.
Теплов А.Ю. см. Хайруллин А.Е.
Теплов А.Ю. см. Хайруллин А.Е.
Терешкин Э.В. см. Крупянский Ю.Ф.
Терешкина К.Б. см. Крупянский Ю.Ф.
Терещенко Л.В., Шамсиев И.Д., Кадочникова М.А.,
Красавин Е.А., Лаганов А.В. Ранние эффекты ионизи-
рующего воздействия протонов высоких энергий на
зрительно-моторное поведение обезьян 333

Терпугов Е.Л. см. Кондратьев М.С.

Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Кочетова А.А., Осипов А.Н. Ингибирующее действие водного извлечения из йерба мате (*Ilex paraguariensis*) на процесс липидной перекисидации липосомальных мембран 680

Тимошин А.А., Шумаев К.Б., Лакомкин В.Л., Абрамов А.А., Рууге Э.К. Действие динитрозильных комплексов железа с лигандом на основе N-ацетил-L-цистеина при сублингвальном введении этих комплексов в организм крыс 581

Тиунова Н.В. см. Другова О.В.

Тихонов А. Н. см. Караваев В. А.

Тихонов А.Н. см. Рууге Э.К.

Тихонова И.В., Гриневич А.А., Танканаг А.В., Сафронова В.Г. Микрогемодинамика кожи и механизмы ее регуляции при сахарном диабете 2 типа 805

Тихоновский Г.В. см. Скрибицкий В.А

Ткачев Н.А. см. Ванин А.Ф.

Ткачев Н.А. см. Ванин А.Ф.

Ткачев Н.А. см. Шиповалов А.В.

Токарев Ю.Н. см. Зверев А.Г.

Трубицин Б. В. см. Караваев В. А.

Тужилкин А.Н. см. Мартусевич А.К.

Тучин В.В. см. Наумова Е.В.

Тымченко Е.Е., Солдатова А.А., Чихиржина Е.В., Поляничко А.М. Анализ изменений в структуре ДНК при взаимодействии с координационными соединениями платины методом инфракрасной спектроскопии 22

Ублинский М. см. Яковлев А.

Удальцов С.Н. см. Балашова Л.М.

Удальцов С.Н. см. Балашова Л.М.

Удальцов С.Н. см. Балашова Л.М.

Урюмцев Д.Ю. см. Гришин В.Г.

Урюмцев Д.Ю. см. Гришин В.Г.

Утешев В.К. см. Крамарова Л.И.

Ушаков И.Б. см. Васин М.В.

Фадеева И.С. см. Звягина А.И.

Федорова Н.Д. см. Ковалёв Р.А.

Федотова А.С. см. Мартусевич А.К.

Федотова М.В. см. Ершов П.В.

Федотчев А.И. см. Савчук Л.В

Феофанов А.В. см. Афонин Д.А.

Феофанов А.В. см. Герасимова Н.С.

Феррейра Л.П. см. Парра Г.Ж.

Фесенко Е.Е. (мл.) см. Гурин А.Е.

Фесенко Е.Е. см. Шаев И.А.

Филатов М.В. см. Ковалёв Р.А.

Финогенова Ю.А. см. Скрибицкий В.А

Фомина М.М. см. Ванин А.Ф.

Фомина М.М. см. Корман Д.Б.

Фомина М.М. см. Корман Д.Б.

Фомина М.М. см. Островская Л.А.

Фрейнд Г.Г. см. Чудинов В.С.

Хабибуллина А.Р. см. Сёмин Ф.А.

Хайруллин А.Е. см. Гришин С.Н.

Хайруллин А.Е., Гришин С.Н., Теплов А.Ю., Еремеев А.А., Балтина Т.В., Зиганшин А.У. Гиперкальциевая модель для выявления постсинаптических эффектов АТФ 1232

Хайруллин А.Е., Теплов А.Ю., Гришин С.Н., Зиганшин А.У. Пуринергические механизмы адаптации диафрагмы мышцы в условиях аллергической перестройки 596

Хайруллин А.Е., Теплов А.Ю., Гришин С.Н., Зиганшин А.У. Пуринергические механизмы адаптации различных типов двигательных единиц в условиях аллергической перестройки 1220

Халилов Р.А., Джафарова А.М., Абдуллаев В.Р. Активность и каталитические характеристики сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии 1163

Хечинашвили Н.Н. см. Кондратьев М.С.

Холявка М.Г. см. Панкова С.М.

Холявка М.Г., Панкова С.М., Вышкворкина Ю.М., Лукин А.Н., Кондратьев М.С., Артюхов В.Г. Хитозан как фотопротектор для иммобилизованного на его матрице папаина 467

Хоробрых А.А. см. Христин М.С.

Хоченкова Ю.А. см. Островская Л.А.

Хоченкова Ю.А. см. Островская Л.А.

Хренова М.Г. см. Кулакова А.М.

Христин М.С., Смолова Т.Н., Хоробрых А.А. Димеризация свободного и ассоциированного с мембранами фотосистемы II белка PsbO при облучении УФ-светом 1122

Цатурян А.К. см. Сёмин Ф.А.

Цибулин В.Г. см. Будянский А.В.

Цюрко Д.Е. см. **Летуга С.Н.**

Чебаненко В.А. см. **Пономарева Е.Н.**

Черкашин Д.Р. см. **Балашова Л.М.**

Чернигина И.А. см. **Жукова Е.С**

Чернов В.В. см. **Жукова Е.С**

Чигасова А.К., Островская Л.А., Корман Д.Б.
Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на лимфоциты крови человека 1158

Чигасова А.К., Островская Л.А., Корман Д.Б.
Механизм цитотоксического действия полиакрилата золота на опухолевые клетки 1185

Чирятьева А.Е., Завражных Н.А., Попрядухин П.В., Юкина Г.Ю., Кривенцов А.В., Ивановка Е.М., Юдин В.Е. Нетканые сосудистые протезы малого диаметра на основе нановолокон из ароматического полиимида 827

Чихиржина Е.В. см. **Тымченко Е.Е.**

Чудинов В.С., Шардаков И.Н., Литвинов В.В., Фрейнд Г.Г., Солодников С.Ю., Маслова В.В.
Оценка тромбообразования при имплантации в артерию кролика полиуретанового сосудистого протеза, обработанного азотной плазмой 1236

Чуев Г.Н. см. **Ершов П.В.**

Шабанов П.Д. см. **Воробьева В.В.,**

Шаев И.А., Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Краткий обзор современного состояния исследований биологического действия слабых магнитных полей 319

Шайтан К.В. см. **Герасимова Н.С.**

Шайтан К.В. Эффекты скрытой симметрии в динамике линейных полимеров и биополимеров 492

Шамсиев И.Д. см. **Терещенко Л.В.**

Шарапов М.Г. см. **Гордеева А.Е.**

Шарапов Н.А. см. **Печёнкин Е.В.**

Шардаков И.Н. см. **Чудинов В.С.**

Шевелев А.Б. см. **Островская Л.А.**

Шемяков А.Е. см. **Розанова О.М.**

Шибалева А.В. см. **Островская Л.А.**

Шилова Е.В., Колтаков И.А., Канькин С.В., Артюхов В.Г. Включение наночастиц магнетита, стабилизированных цетилтриметиламмония бро-

мидом, в состав липосом на основе соевого лецитина 549

Шиповалов А.В., Ванин А.Ф., Пьянков О.В., Багрянская Е.Г., Микоян В.Д., Ткачев Н.А., Асанбаева Н.А., Попкова В.Я. Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка 969

Шишигин И.Н. см. **Оськин С.В.**

Шишкова Е.А., Краев И.В., Рогачевский В.В.
Оценка окрашивания ткани мозга экстрактом чая улун с особым вниманием к гладкому эндоплазматическому ретикулуму 926

Шоларь С.А. см. **Степанова О.А.,**

Шошина И.И. см. **Ляпунов С.И..**

Шпигун Д.К. см. **Твердислов В.А.**

Штейн А.А. см. **Моисеева И.Н.**

Шумаев К.Б. см. **Тимошин А.А.**

Щербаков К.А. см. **Кондратьев М.С.**

Щербатюк Т.Г. см. **Гапеев А.Б.**

Щербатюк Т.Г. см. **Жукова Е.С**

Щурова Л.Ю., Намиот В.А. Формальное математическое описание концепции интеллекта в модельной задаче о влиянии наблюдений на квантовые процессы 1277

Эль-Регистан Г.И. см. **Крупянский Ю.Ф.**

Эрнандес Касерес Х.Л. см. **Беженар М.В.**

Эрнандес Касерес Х.Л., Джимах С.С., Семенов Д.А., Дроботенко М.И., Нечипуренко Ю.Д.
Модели, описывающие генерацию и проведение нервного импульса 728

Юдин В.Е. см. **Чирятьева А.Е.**

Юкина Г.Ю. см. **Чирятьева А.Е.**

Яблоков Е.О. см. **Ершов П.В.**

Яблокова Е.В. см. **Шаев И.А.**

Ядав Б.К. см. **Ламичхане Т.Р.**

Яковлев А., Мажурцев А., Меньшиков П., Ублинский М., Мельников И., Куприянов Д., Ахадов Т., Семенова Н. Исследование суммарного уровня глутамата и глутамин в зрительной коре человека после короткой активации методом функциональной магнитно-резонансной спектроскопии 343