Том 69, Номер 4

ISSN 0006-3029 Июль - Август 2024







_

Том 69, номер 4, 2024

-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Кинетика окисления 3-аминопиридин-2(1Н)-онов пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена	
В.С. Шубина, Ю.В. Шаталин, А.Л. Шацаускас, А.С. Фисюк	695
Природа межмолекулярных взаимодействий, влияющих на олигомеризацию никазы Nt.BspD6I	
В.Н. Антипова, А.К. Юнусова, Р.И. Артюх	701
Влияние катехинов на образование фибрилл коллагена in vitro	
Ю.С. Тараховский, С.Г. Гайдин, Ю.А. Ким	707
Инновационные биофизические подходы к экстракции кверцетина из растительной клетки	
А.Г. Погорелов, Л.Г. Ипатова, А.И. Панаит, А.А. Станкевич, А.К. Юнусова, В.Н. Погорелова	715
Бесконтактная атомно-силовая микроскопия для исследования биомолекул в жидкости	
Т. Мамедов, А. Швирст, М.В. Федотова, Г.Н. Чуев	723

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Влияние TRO19622 (олесоксима) на функциональную активность изолированных митохондрий и выживаемость клеток	
А.И. Ильзоркина, Н.В. Белослудцева, А.А. Семёнова, М.В. Дубинин, К.Н. Белослудцев	737
Эволюция представлений о механизмах гипервозбудимости нейронных сетей и пачечной активности при эпилепсии. Вклад активации калием калий-проводящих каналов в гиперактивацию сетей	
А.С. Галашин, М.В. Конаков, В.В. Дынник	747
Степень специфичности синаптических контактов при нейротрансплантации	
3.Н. Журавлева	758
Ротенон, родамин 123 и краситель янус зеленый индуцируют повреждение ядерной ДНК в клетках асцитных опухолей мышей, ротенон и родамин в Х-облученных клетках спобствуют сохранению целостности генома	
Е.А. Кузнецова, Н.П. Сирота	766
Адаптационная самозащита зрелых клеток от повреждений базируется на эффекте Варбурга, де-дифференцировке клеток и их устойчивости к гибели	
П.М. Шварцбурд	778
Параптоз и другие типы неапоптотической регулируемой гибели клеток	
М.Е. Соловьева, Ю.В. Шаталин, В.С. Акатов	786

Повышение лекарственной устойчивости клеток острого лимфоидного лейкоза в трехмерных высокоплотных клеточных культурах	
Д.Ю. Штатнова, М.И. Кобякова, Я.В. Ломовская, Е.И. Фетисова, К.С. Краснов, Р.С. Фадеев	805
БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ	
Белки гепатопанкреаса краба-стригуна и камчатского краба, обладающие антибактериальной активностью	
В.Г. Молчанов, А.Е. Егоров, Д.А. Осетрина, В.Ю. Новиков, Н.М. Новожилов, А.А. Тимченко, Е.А. Согорин, М.А. Тимченко	810
Тета-осцилляции и компараторная функция гиппокампа	
В.Ф. Кичигина	821
Адренергическая регуляция функции миокарда и сосудов в условиях гипотермии	
М.Х. Галимова, А.С. Аверин	836
Сравнительное исследование кардиопротекторных свойств уридин-5-монофосфата и уридина в модели повреждения миокарда крыс с помощью изопреналина	
Н.В. Белослудцева, Т.А. Урюпина, Д.А. Хуртин, Н.В. Хундерякова, Г.Д. Миронова	846
¹ Н-ЯМР-спектроскопия плазмы крови для детекции изменений в метаболизме при развитии саркомы М-1 у крыс	
А.Е. Егоров, А.С. Быков, Т.И. Пономарева, М.В. Молчанов, Н.М. Панкратова, А.Н. Панкратов, А.Г. Аракелян, С.Н. Корякин, М.А. Тимченко	856
Молекулярные механизмы флэш-эффекта в радиобиологии	
С.И. Глухов, Е.А. Кузнецова	868
Результаты флэш-облучения мышей in vivo протонами высокой энергии	
А.Е. Шемяков, А.Р. Дюкина, С.И. Заичкина, А.В. Агапов, Г.В. Мицын, К.Н. Шипулин	887
Особенности действия протонов с энергией 90—170 Мэв на органы кроветворения при тотальном облучении мышей тонким сканирующим пучком в зависимости от линейной потери энергии частиц	
О.М. Розанова, Т.А. Белякова, Е.Н. Смирнова, С.С. Сорокина, А.Р. Дюкина, А.Е. Шемяков, Н.С. Стрельникова	895
Проникновение полифенолов через кожу, поврежденную уксусной кислотой	
В.С. Шубина, Ю.В. Шаталин	906
Эффект синхронизации сердечного ритма человека с вариациями геомагнитного поля: существуют ли выделенные частоты?	
Т.А. Зенченко, Н.И. Хорсева, А.А. Станкевич	915

дискуссии

Роль биофизики в современных науках о жизни

Г.Р.	Иван	ицкий
------	------	-------

927

_

=

Vol. 69, No. 4, 2024

=

-

Molecular Biophysics

Kinetics of Oxidation of 3-Aminopyridin-2(1H)-ones by Hydrogen Peroxide in the Presence of Horseradish Peroxidase	
V.S. Shubina, Yu.V. Shatalin, A.L. Shatsauskas, and A.S. Fisyuk	695
The Nature of Intermolecular Interactions Affecting Oligomerization of Nt.BspD6I Nickase	
V.N. Antipova, A.K. Yunusova, and R.I. Artyukh	701
Effects of Catechins on the Formation of Collagen Fibrils in vitro	
Yu.S. Tarahovsky, S.G. Gaidin, and Yu.A. Kim	707
Innovative Biophysical Approaches for Quercetin Extraction from Plant Cells	
A.G. Pogorelov, L.G. Ipatova, A.I. Panait, A.A. Stankevich, A.K. Yunusova, and V.N. Pogorelova	715
Noncontact Atomic Force Microscopy for Studying Biomolecules in Liquids	
T. Mamedov, A. Shvirst, M.V. Fedotova, and G.N. Chuev	723

Cell Biophysics

Effect of TRO19622 (Olesoxime) on the Functional Activity of Isolated Mitochondria and Cell Viability	
A.I. Ilzorkina, N.V. Belosludtseva, A.A. Semenova, M.V. Dubinin, and K.N. Belosludtsev	737
Evolution of Ideas about the Mechanisms of Neuronal Network Hyperactivation and Burst Firing in Epilepsy. Contribution of Potassium-Induced Activation of Potassium-Conducting Channels to Network Hyperactivation	
A.S. Galashin, M.V. Konakov, and V.V. Dynnik	747
Degree of Specificity of the Synaptic Contacts during Neurotransplantation	
Z.N. Zhuravleva	758
Rotenone, Rhodamine 123 and Janus Green Induce Damage to Nuclear DNA in Ascites Tumor Cells from Mice, Rotenone and Rhodamine in X-Irradiated Cells Contribute to the Maintenance of Genome Integrity	
E.A. Kuznetsova and N.P. Sirota	766
Adaptive Self-Defense of Mature Cells against Damage Is Based on the Warburg Effect, De-Differentiation of Cells and Resistance to Cell Death	
P.M. Schwartsburd	778
Paraptosis and Other Types of Non-Apoptotic Regulated Cell Death	
M.E. Solovieva, Yu.V. Shatalin, and V.S. Akatov	786
Increased Drug Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells in Three-Dimensional High-Density Cell Cultures	
D.Yu. Shtatnova, M.I. Kobyakova, Y.V. Lomovskaya, E.I. Fetisova, K.S. Krasnov, and R.S. Fadeev	805

Complex Systems Biophysics

T.A. Zenchenko, N.I. Khorseva, and A.A. Stankevich	915
The Effect of Synchronizing the Human Heart Rhythm with Geomagnetic Field Variations: Are There Distinguished Frequencies?	
V.S. Shubina and Yu.V. Shatalin	906
Penetration of Polyphenols through Acetic Acid-Damaged Skin	
O.M. Rozanova, T.A. Belyakova, E.N. Smirnova, S.S. Sorokina, A.R. Dyukina, A.E. Shemyakov, and N.S. Strelnikova	895
Features of the Effects of Exposure to 90–170 MeV Proton Radiation on the Blood-Forming Organs in Mice under Total Irradiation with Proton Pencil Scanning Beam Depending on the Linear Energy Transfer of Particles	
A.E. Shemyakov, A.R. Dyukina, S.I. Zaichkina, A.V. Agapov, G.V. Mitsyn, and K.N. Shipulin	887
Results of FLASH Irradiation of Mice in vivo with High-Energy Protons	
S.I. Glukhov and E.A. Kuznetsova	868
Molecular Mechanisms of FLASH Effect in Radiobiology	
A.Y. Egorov, A.S. Bykov, T.I. Ponomareva, M.V. Molchanov, N.M. Pankratova, A.N. Pankratov, A.G. Arakelyan, S.N. Koryakin, and M.A. Timchenko	856
¹ H-NMR Spectroscopy of Blood Plasma for Detection of Changes in Metabolism during the Development of Sarcoma M-1 in Rats	
N.V. Belosludtseva, T.A. Uryupina, D.A. Khurtin, N.V. Khunderyakova, and G.D. Mironova	846
Study of the Cardioprotective Properties of Uridine-5'-Monophosphate and Uridine in a Rat Model of Myocardial Damage Induced by Isoprenaline	
M.H. Galimova and A.S. Averin	836
Adrenergic Regulation of the Functioning of the Cardiovascular System under Hypothermic Conditions	
V.F. Kitchigina	821
Theta Oscillations and Comparator Function of the Hippocampus	
V.G. Molchanov, A.Y. Yegorov, D.A. Osetrina, V.Yu. Novikov, N.M. Novojilov, A.A. Timchenko, E.A. Sogorin, and M.A. Timchenko	810
Hepatopancreatic Proteins of Snow Crab and Red King Crab with Antibacterial Activity	

Discussion

The Role of Biophysics in Modern Life Sciences *G.R. Ivanitskii*

927

= МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА =

УДК 57.037; 547.823

КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ З-АМИНОПИРИДИН-2(1H)-ОНОВ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

© 2024 г. В.С. Шубина*, #, Ю.В. Шаталин*, А.Л. Шацаускас**, ***, А.С. Фисюк**, ***

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

Омский государственный технический университет, просп. Мира, 11, Омск, 644050, Россия *Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского, просп. Мира, 55а, Омск, 644077, Россия

> [#]E-mail: shubinavictoria@yandex.ru Поступила в редакцию 12.03.2024 г. После доработки 12.03.2024 г. Принята к публикации 03.07.2024 г.

Целью данного исследования являлась оценка кинетических параметров окисления некоторых 3-аминопиридин-2(1H)-онов пероксидом водорода, катализируемого пероксидазой хрена, и сродства пероксидазы хрена к данным соединениям. Было показано, что окисление 3-аминопиридин-2(1H)-онов подчиняется кинетике псевдопервого порядка. Также было обнаружено гиперболическое снижение наблюдаемой константы скорости реакции (k_{obs}) с увеличением исходной концентрации 3-аминопиридин-2(1H)-онов. Зависимость k_{obs} от концентрации фермента носила прямолинейный характер, свидетельствуя в пользу конкурентного ингибирования окисления продуктом реакции. Было обнаружено, что увеличение полярности заместителя в 4-м положении приводит к увеличению скорости окисления пиридинонов. Значения V_{max}/K_m также были выше для соединений, несущих полярные заместители в 4-м положении. Данный кинетический параметр (V_{max}/K_m) отражает субстратную специфичность фермента. Полученные данные проясняют механизми взаимодействия пероксидазы хрена и 3-аминопиридинонов и говорят о том, что 3-аминопиридиноны могут быть использованы для разработки чувствительных методов детекции пероксида водорода и модификации методик иммунно-ферментного анализа.

Ключевые слова: 3-аминопиридин-2(1H)-он, флуоресцентные красители, пероксидаза хрена, кинетика окисления, субстратная специфичность.

DOI: 10.31857/S0006302924040012, EDN: NIOTCS

Пероксидаза хрена (HRP) представляет собой гликопротеин, относящийся к суперсемейству растительных пероксидаз и получивший широкое распространение в медико-биологических исследованиях. Данный фермент катализирует одноэлектронное окисление субстратов в присутствии пероксида водорода. Образование/разрушение в результате реакции окрашенных, флуоресцентных или люминесцентных соединений позволяет использовать данный фермент при иммуноферментном детектировании белков, нуклеиновых кислот и ряда низкомолекулярных соединений [1]. Недавно нами был разработан способ синтеза новых флуорофоров, обладающих высоким квантовым выходом и изменяющих оптические свойства в процессе их окисления (рис. 1) [2]. Было установлено, что отдельные соединения являются субстратами HRP и окисляются в присутствии пероксида водорода. Стехиометрия HRP-катализируемого окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов пероксидом водорода составляет 1:1. Пределы обнаружения пероксида водорода и HRP (LODH₂O₂ и LOD_{HRP}) в системах, содержащих исследуемые флуорофоры, лежат в диапазоне наномолярных концентраций и сопоставимы с соответствующими пределами обнаружения в системах, содержащих красители, используемые в наборах для иммуноферментного анализа (табл. 1) [2].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствует о том, что 3-аминопиридиноны могут быть использованы для разработки чувствительных методов детекции пероксида водорода и модификации методик иммуноферментного анализа. Для выявления структурных особенностей, необходимых для наиболее эффективного взаимодействия фермента с 3-аминопиридин-2(1H)онами, в рамках данной работы были изучены ки-

Сокращение: HRP – пероксидаза хрена.



Рис. 1. Схема синтеза новых 3-аминопиридин-2(1Н)-онов.

нетические параметры HRP-катализируемого окисления пиридинонов пероксидом водорода и проведена оценка сродства HRP к данным соединениям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все растворы были приготовлены на дистиллированной воде, дополнительно очищенной на установке Milli-Q (Millipore, США). HRP (P8375) приобретен в компании Sigma-Aldrich (США). HRP растворяли в 20 мМ фосфатно-солевом буфере, рН 7.4 ($A_{403}/A_{275} = 2.8-3.0$), концентрацию фермента определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{403} = 100 \text{ мM}^{-1} \text{ см}^{-1}$) [3]. Пероксид водорода (30%) приобретен в компании «Реахим» (Россия). Концентрацию пероксида водорода подтверждали спектрофотометрически ($\epsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$]. Синтез 3-аминопиридин-2(1H)-онов осуществляли как описано ранее [2]. Стоковые растворы флуорофоров (100 мМ) готовили в диме-

тилсульфоксиде, их концентрации определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции [2]: $8.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (C1), $6.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (C2), $9.7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (C3), $9.8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (C4), $8.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (C5) и $8.8 \cdot 10^3$ (C6) $\text{M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Свежие растворы красителей, HRP и H₂O₂ готовили перед каждым экспериментом.

HRP-катализируемое окисление 3-аминопиридин-2(1H)-онов пероксидом водорода. Измерения проводили при 37°С на микропланшетном ридере Infinite F200 (Тесап, Австрия) в 96 луночных планшетах (Greiner 655076). Длина волны экстинкции – 360 \pm 25 нм, длина волны эмиссии – 465 \pm 25 нм. Реакционная смесь содержала NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (20 мМ, pH 7.4), HRP (36 нМ (0.25 Eд/мл)), исследуемые соединения (6.3, 12.5, 25.0, 50.0 и 100 мкМ), и пероксид водорода (6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 85.0 и 100.0 мкМ). Измерения проводили до тех пор, пока интенсивность флуоресценции не достигала некоторого постоянного

Флуорофор	<i>LOD</i> _{Н2} О ₂ , нМ	<i>LOD</i> _{HRP} , нМ	
C1	8.97 ± 1.01	2.45 ± 0.45	
C2	11.45 ± 4.61	2.92 ± 0.63	
C4	7.78 ± 3.75	3.40 ± 1.06	
C5	3.17 ± 0.70	1.58 ± 0.44	
C6	6.84 ± 2.79	7.45 ± 2.19	

Таблица 1. Пределы обнаружения пероксида водорода и HRP в системах, содержащих исследуемые флуорофоры [2]

Примечание. В отличие от других соединений стехиометрия HRP-катализируемого окисления C3 пероксидом водорода не соответствовала стехиометрии 1 : 1. Поэтому пределы обнаружения пероксида водорода и HRP в системе, содержащей C3, не определены [2].



Рис. 2. Кинетика окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов в присутствии пероксида водорода и пероксидазы хрена. (а) — Характерные кривые изменения относительной интенсивности флуоресценции соединения 6 во времени в присутствии различных концентраций пероксида водорода. Концентрация соединения 6 составляла 100 мкМ. Концентрация пероксидазы хрена составляла 36 нМ (0.25 Ед/мл). (б) — Зависимость наблюдаемой константы скорости (k_{obs}) от концентрации соединения. Константы скорости псевдопервого порядка определяли по изменению концентрации соединения в присутствии в присутствии различных концентрации соединения. Константы скорости псевдопервого порядка определяли по изменению концентрации соединений во времени в присутствии 50 мкМ пероксида водорода. На врезке — зависимость наблюдаемой константы скорости (k_{obs}) от концентрации соединения. Концентрации фермента. Концентрация соединений составляла 100 мкМ, пероксида водорода — 50 мкМ. (в) — Зависимости Лайнуивера—Берка для исследуемых соединений. Концентрация пероксида водорода составляла 50 мкМ. (г) — Значения V_{max}/K_m для структурно близких 3-аминопиридин-2(1H)-онов. Концентрация пероксида водорода составляла 50 мкМ. Представлено среднее значение ± стандартное отклонение в пяти независимых экспериментах. * — Достоверные различия по сравнению с C1 –C3 и C6, p < 0.05; # — достоверные различия по сравнению с C3 и C6, p < 0.05; # — достоверные различия по сравнению с C3 и C6, p < 0.05.

значения или выходила на базовый уровень. В первом случае H_2O_2 , добавленный к смеси, полностью расходовался в реакции HRP с флуоресцентным соединением. Во втором случае соединение, присутствующее в смеси, практически полностью окислялось системой HRP/ H_2O_2 . Изменения интенсивности флуоресценции соединений были пересчитаны в изменения концентраций соединений. Проведено пять независимых экспериментов.

Определение констант скоростей окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов. Для оценки кон-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

стант скоростей использовали данные по окислению зондов в присутствии 50 мкМ пероксида водорода. Нелинейная аппроксимация изменения концентрации флуорофора от времени проводилась по уравнению экспоненциально затухающей кривой: $C = C_0 e^{-kt} + C_{\text{кон}}$, где C_0 – исходная концентрация флуорофора в растворе в мкМ, k – наблюдаемая константа псевдопервого порядка в мин⁻¹, t – время в минутах, $C_{\text{кон}}$ – остаточная концентрация флуорофора в системе после выхода реакции на стационарный уровень. Расчет параметров аппроксимации осуществляли с использованием программного пакета QtiPlot 0.9.8.9. Далее строили график зависимости наблюдаемой константы скорости от концентрации исследуемых пиридинонов. Так как обнаружено гиперболическое снижение наблюдаемой константы скорости реакции (k_{obs}) с увеличением исходной концентрации 3-аминопиридин-2(1H)-онов, в дальнейшем для прояснения механизма взаимодействия пиридинонов с HRP была проведена оценка зависимости наблюдаемой константы скорости реакции от концентрации HRP.

Влияние концентрации HRP на наблюдаемые константы скорости окисления 3-аминопиридин-2(1Н)-онов. Для оценки использовались данные по окислению зондов в присутствии исследуемых соединений в концентрации 100 мкМ, пероксида водорода в концентрации 50 мкМ и HRP в различных концентрациях (144, 72, 36, 18 и 9 нМ, что соответствует 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 Ед/мл соответственно). Далее строили график зависимости наблюдаемой константы скорости от концентрации HRP. Проведено пять независимых экспериментов.

Определение начальной скорости окисления 3-аминопиридин-2(1Н)-онов. Начальную скорость реакции определяли по углу наклона прямолинейного участка зависимости концентрации флуорофора от времени реакции.

Оценка сродства НRP к 3-аминопиридин-2(1Н)-онам. Для сравнительной оценки сродства фермента к исследуемым флуорофорам использовали значения V_{max}/K_m (константа специфичности (k_{cat}/K_m), умноженная на концентрацию фермента) [5]. Для этого строили зависимость Лайнуивера–Берка и по углу наклона (K_m/V_{max}) определяли соответствующую величину. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение пяти независимых экспериментов, p = 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2а приведены характерные кривые изменения относительной интенсивности флуоресценции соединения С5 во времени в присутствии различных концентраций пероксида водорода. Так как концентрация флуоресцентного соединения уменьшается со временем, уменьшается относительная интенсивность флуоресценции -*I*/*I*₀. Однако по истечении некоторого времени данное соотношение практически перестает изменяться, свидетельствуя о том, что один из компонентов системы полностью расходуется в реакции. Было показано, что окисление данных соединений подчиняется кинетике псевдопервого порядка. Было обнаружено гиперболическое снижение наблюдаемой константы скорости реакции (k_{obs}) с увеличением исходной концентрации 3-аминопиридин-2(1Н)-онов (рис. 2б). Такая ситуация, в частности, может наблюдаться, когда скорость лимитирующей стадией является мономолекулярный процесс или в случае конкурентного ингибирования продуктом реакции [6]. В пользу последнего свидетельствует прямолинейная зависимость наблюдаемой константы скорости реакции от концентрации фермента (врезка на рис. 26) [6, 7]. Для дальнейшего анализа полученных данных строили график зависимости начальной скорости реакции от концентрации флуоресцентного соединения в координатах Лайнуивера-Берка. Было показано для всех соединений, что данная зависимость является линейной при различных (но постоянных) концентрациях пероксида водорода. В качестве примера на рис. 2в приведены графики Лайнуивера-Берка для исследуемых соединений в присутствии 50 мкМ пероксида водорода. Как видно из рисунка, данные соединения можно ранжировать в соответствии с величиной $V_{\rm max}/K_{\rm m}$, которая определяется по тангенсу угла наклона прямой (рави отражает субстратную $K_{\rm m}/V_{\rm max}$) ному специфичность фермента. На рис. 3 также представлены графики Лайнуивера-Берка для исследуемых соединений в присутствии различных концентраций пероксида водорода (6.25, 12.5, 25 и 100 мкМ), а также полученные значения $V_{\rm max}/K_{\rm m}$.

Сравнение кинетики окисления 3-аминопиридин-2(1Н)-онов пероксидом водорода свидетельствуют об увеличении скорости окисления при замене фенильного заместителя в 4-м положении (С1) на диметоксифенильный (С4) или тиофеновый (С5), в этом же ряду увеличивается специфичность фермента к субстрату ($V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$). Введение в структуру 3-аминопиридинона (С1) алкильного заместителя при аминогруппе либо не влияет на кинетику окисления и стехиометрию процесса (С2), либо приводит к снижению скорости окисления и увеличению количества окислителя, требуемого для полного окисления зонда (С3). Введение фурилметильного заместителя при аминогруппе (Сб) также приводит к замедлению процесса окисления. Полученные кинетические данные также свидетельствуют в пользу того, что окисление исследуемых 3-аминопиридин-2(1Н)-онов конкурентно ингибируется продуктом реакции.

Таким образом, увеличение полярности заместителя в 4-м положении приводит к увеличению скорости окисления и субстратной специфичности фермента, тогда как наличие заместителей при аминогруппе в 3-м положении, в целом, приводит к снижению данных параметров (скорости окисления и субстратной специфичности). В целом, полученные данные проясняют механизмы взаимодействия HRP и 3-аминопиридинонов и говорят о том, что 3-аминопиридиноны могут быть



Рис. 3. Сравнение кинетических параметров окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов в присутствии пероксидазы хрена и пероксида водорода в различных концентрациях. Левый столбец: зависимости Лайнуивера–Берка для исследуемых соединений в присутствии различных концентраций пероксида водорода: 6.25 мкМ (а), 12.5 мкМ (в), 25 мкМ (д), 100 мкМ (ж). Правый столбец: значения $V_{\rm max}/K_{\rm m}$, полученные для структурно близких пиридинонов в присутствии различных концентраций пероксида водорода: 6.25 мкМ (е), 100 мкМ (ж). Правый столбец: значения $V_{\rm max}/K_{\rm m}$, полученные для структурно близких пиридинонов в присутствии различных концентраций пероксида водорода: 6.25 мкМ (с), 12.5 мкМ (е), 100 мкМ (з). Представлено среднее значение ± стандартное отклонение в пяти независимых экспериментах. * – Достоверные различия по сравнению с C1–C3 и C6, p < 0.05; § – достоверные различия по сравнению с C2, C3 и C6, p < 0.05; # – достоверные различия по сравнению с C3 и C6, p < 0.05.

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

использованы для разработки чувствительных методов детекции пероксида водорода и модификации методик иммуноферментного анализа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Синтез исследуемых соединений и оценка основных кинетических параметров окисления пиридинонов при постоянной концентрации фермента осуществлялись при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-13-00356). Эксперименты, направленные на изучение субстратной специфичности и прояснение механизмов взаимодействия соединений с ферментом, осуществлялись при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-00224-24-03).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Krainer F. W. and Glieder A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99** (4), 1611–1625 (2015). DOI: 10.1007/s00253-014-6346-7

- Shatsauskas A., Shatalin Yu., Shubina V., Zablodtskii Yu., Chernenko S., Samsonenko A., Kostyuchenko A., and Fisyuk A. Synthesis and application of new 3-amino-2-pyridone based luminescent dyes for ELISA. *Dyes and Pigments*, **187**, 109072 (2021). DOI: 10.1016/j.dyepig.2020.109072
- Paul K.-G. and Stigbrand T. Four isoperoxidases from horse radish root. *Acta Chemica Scandinavica*, 24, 3607–3617 (1970).
 DOI: 10.3891/acta.chem.scand.24-3607
- Nelson D. P. and Kiesow L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem.*, **49** (2), 474–478 (1972). DOI: 10.1016/0003-2697(72)90451-4
- Michaelis L., Menten M. L., Johnson K. A., and Goody R. S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. *Biochemistry*, 50 (39), 8264–8269 (2011). DOI: 10.1021/bi201284u
- Boskovic D. S. and Krishnaswamy S. Exosite binding tethers the macromolecular substrate to the prothrombinase complex and directs cleavage at two spatially distinct sites. *J. Biol. Chem.*, **275** (49), 38561–38570 (2000). DOI: 10.1074/jbc.M006637200
- Wang Z. X. Kinetic study on the dimer-tetramer interconversion of glycogen phosphorylase A. *Eur. J. Biochem.*, **259** (3), 609–617 (1999).
 DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00058.x

Kinetics of Oxidation of 3-Aminopyridin-2(1H)-ones by Hydrogen Peroxide in the Presence of Horseradish Peroxidase

V.S. Shubina*, Yu.V. Shatalin*, A.L. Shatsauskas**, ***, and A.S. Fisyuk**, ***

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

**Omsk State Technical University, prosp. Mira 11, Omsk, 644050 Russia

***F.M. Dostoevsky Omsk State University, prosp. Mira 55a, Omsk, 644077 Russia

The aim of the present work was to estimate the kinetic parameters of oxidation of some 3-aminopyridin-2(1H)-ones by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase and the affinity of horseradish peroxidase towards these compounds. It was shown that the oxidation of 3-aminopyridin-2(1H)-ones follows pseudo-first-order kinetics. It was also found that a hyperbolic decline in the observed rate constant (k_{obs}) occurred with increasing initial concentrations of 3-aminopyridin-2(1H)-ones. The dependence of k_{obs} on enzyme concentration was linear, suggesting competitive inhibition of oxidation by the reaction product. It was found that the increased polarity of the substituent at the 4th position led to the rise in the rate of oxidation of the pyridinones. The V_{max}/K_m values were also greater for compounds bearing polar substituent at the 4th position. This kinetic parameter (V_{max}/K_m) reflects the substrate specificity of enzyme. Data obtained help better understand the mechanisms of interactions between horseradish peroxidase and 3-aminopyridin-2(1H)-ones suggesting that 3-aminopyridinones can be used for the development of a rather sensitive method for detection of hydrogen peroxide and modification of ELISA.

Keywords: 3-aminopyridin-2(1H)-one, fluorescent dye, horseradish peroxidase, oxidation kinetics, substrate specificity

— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА —

УДК 577.3

ПРИРОДА МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, ВЛИЯЮЩИХ НА ОЛИГОМЕРИЗАЦИЮ НИКАЗЫ Nt.BspD6I

© 2024 г. В.Н. Антипова*, А.К. Юнусова*, Р.И. Артюх*, #

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

[#]E-mail: rimmaartyukh@gmail.com Поступила в редакцию 26.02.2024 г. После доработки 08.07.2024 г. Принята к публикации 17.07.2024 г.

Знание природы межмолекулярных взаимодействий и аминокислотных остатков, их обеспечивающих, дает возможность целенаправленно менять устойчивость межмолекулярных комплексов. В данной работе на примере никазы Nt.BspD6I продемонстрировано влияние гидрофобных взаимодействий на способность белка к олигомеризации и необходимость химической и геометрической комплементарности интерфейсных поверхностей при образовании устойчивых гомокомплексов.

Ключевые слова: межмолекулярные взаимодействия, никаза Nt.BspD6I, гидрофобные поверхности, олигомеризация, гомодимеры.

DOI: 10.31857/S0006302924040023, EDN: NINNHO

В основе механизма объединения субъединиц в единую функциональную структуру лежат принципы молекулярного распознавания. Физик Г.Р. Крейн (H.R. Crane) сформулировал два принципа межмолекулярного узнавания еще до открытия атомной структуры первых биомолекул [1]. Согласно этим принципам, биомолекулы взаимодействуют через интерфейсные поверхности, обеспечивающие связь с необходимым субстратом, формируя множество слабых взаимодействий, таких как образование водородной связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия. Образующиеся комплексы могут существовать долгое время, если интерфейсные поверхности имеют геометрическое соответствие и комплементарность химических групп [2, 3]. Если эти принципы нарушаются, то образующийся комплекс будет слабым и сможет существовать непродолжительное время.

Эти же принципы обеспечивают прочность и гомокомплексов. Стереохимическое соответствие является одним из ключевых параметров для белок-белковых взаимодействий [4, 5]. Даже при отсутствии электростатической и гидрофобной комплементарности белки, имеющие геометрическую комплементарность, могут образовывать комплексы [6]. На процесс образования гомокомплексов белка могут оказывать влияние и мутации определенных аминокислотных остатков в молекуле белка. Например, точечная мутация в положении Glu6 в b-цепи гемоглобина A на Val6 в гемоглобине S способствует его агрегации и приводит к серповидно-клеточной анемии [7]. Поэтому исследование влияния определенных остатков на процесс олигомеризации является актуальной задачей.

В данном сообщении представлены сведения о влиянии цистеинов на процесс олигомеризации никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I (никазы). Цистеиновые остатки в белковых молекулах составляют не более 1.9% от общего содержания аминокислотных остатков (а.о.). Однако в результате высокой реакционной способности тиольных групп цистеинов эти остатки часто входят в состав активных центров ферментов.

Объектами исследования в работе, представленной в этой статье, является никаза Nt.BspD6I, которая была найдена в термофильном штамме *Bacillus species* D6 [8], и ее мутантные формы, полученные методом сайт-направленного мутагенеза. Согласно кристаллическим структурам никазы дикого типа [9], Cys-free-никазы [10] и S11C Cys-free-никазы [11], установленным методом рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением (1.8–1.9 Å), в молекуле никазы присутствуют четыре цистеиновых остатка (Cys1,

Сокращение: а.о. – аминокислотные остатки.

Cys160, Cys508 и Cys578), которые не образуют дисульфидные связи и не входят в активный центр никазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методика выделения и очистки никазы дикого типа и ее мутантных форм детально представлена в работах [10—12]. Основные этапы методики представлены ниже.

Образцы никаз нарабатывали в экспрессионном штамме E. coli BL21(DE3)/pRARE-M.SscL1I, содержащем ДНК-метилтрансферазу, которая защищает ДНК от гидролиза никазой. Биомассу выращивали в среде LB, содержащей 40 мкг/мл канамицина и 10 мкг/мл хлорамфеникола в течение 3 ч при 37°С до оптической плотности $A_{\lambda 590} = 0.6$ О.Е. Потом культуру охлаждали до 20°С. Индукцию проводили добавлением ИПТГ до концентрации 1 мМ. Биомассу нарабатывали при 20°С в течение ночи до поздней логарифмической фазы при интенсивной аэрации и осаждали центрифугированием при 18000 g, 30 мин при 4°С (центрифуга CR 22GIII, Ніtachi, Япония). Осадок ресуспендировали при 4°С в буфере (0.02 M К-фосфатный буфер, pH 7.5, 7 мМ β-меркаптоэтанола, 1 мМ ЭДТА), содержащем 1 мМ фенилметилсульфонилфторида. Клетки разрушали ультразвуком до снижения оптической плотности в 10 раз при помощи дезинтегратора УЗД-1 У4.2 (СССР) и центрифугировали (18000 g, 30 мин, 4°С). Полученный лизат очищали в два этапа при помощи колоночной хроматографии низкого давления с использованием прибора Віо-Logic LP System (Bio-Rad, США). Сначала использовали афинную хроматографию на Ni-NTAagarose (QIAGEN, Германия), а потом фракции, содержащие никазу, наносили на колонку с фосфоцеллюлозой Р11 (Whatman, США). Фракции с максимальной концентрацией никазы переводили в буфер для хранения (10 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 150 мМ KCl, 0.1 мМ ЭДТА, 0.1 мМ дитиотреитола, 50% глицерина (v/v)).

Идентификацию олигомерных форм никазы проводили с помощью электрофореза в нативных условиях [13]. Образцы белка смешивали с загрузочным буфером (10 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 15% глицерина, 1% Кумасси бриллиантового синего G-250) и анализировали в 8%-м полиакриламидном геле (75:1), содержащем 200 мМ Трис-HCl (pH 8.8), в течение 40 мин. Катодный буфер содержал 100 мМ гистидина (pH 8.0) и 0.02% Кумасси бриллиантового синего G-250, анодный буфер – 100 мМ Трис-HCl (pH 8.8). Для поиска участков на поверхности молекулы никазы, склонных к агрегации, был использован Aggrescan3D (A3D) (https://bitbucket.org/lcbio/aggrescan3d), автономный мультиплатформенный пакет Python [14]. Это один из хорошо зарекомендовавших себя прогностических инструментов, который позволяет обнаруживать пространственно-соседние аминокислоты, склонные к агрегации [15, 16]. Он может работать как в статическом, так и в динамическом режиме. В качестве входных данных требуется только файл PDB структуры белка.

Aggrescan3D использует экспериментально полученную шкалу внутренней склонности к агрегации для природных аминокислот и проецирует эту шкалу на трехмерную структуру белка. Внутренняя склонность к агрегации каждой конкретной аминокислоты в белке модулируется ее специфическим структурным контекстом. Склонность к агрегации рассчитывается для сферических областей с центром на каждом остатке углерода Сα. Это обеспечивает уникальное структурно скорректированное значение агрегации (показатель A3D, Aggrescan 3D score) для каждой аминокислоты в структуре [16]. По умолчанию для идентификации остатков, участвующих в формировании участков, склонных к агрегации, Aggrescan3D использует радиус сферы 10 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Ранее было показано, что никаза Nt.BspD6I дикого типа (далее wt-никаза) при концентрациях белка ниже 50 мкг/мл существует в форме мономера, а при концентрациях выше 50 мкг/мл образует олигомерные гомокомплексы, преимущественно гомодимеры [17]. Белок-белковые гомокомплексы классифицируют по аффинности на облигатные и не облигатные [18]. Гомокомплексы никазы не являются облигатными, так как при концентрациях ниже 50 мкг/мл молекулы никазы являются стабильными в форме мономера.

Нами показано, что замена всех цистеиновых остатков (11, 160, 508 и 578) на серин в молекуле никазы усиливает ее способность к олигомеризации по сравнению с wt-никазой [10]. Возможной причиной усиления олигомеризации Cys-freeниказы являются конформационные изменения в области N-концевого домена, индуцированные заменой цистеинов. Возвращение Cys11 из Cys-free-никазы наоборот привело к потере способности S11C Cys-free-никазы к олигомеризации [11], что является, вероятно, следствием конформационных изменений в области межмолекулярных контактов, обеспечивающих олигомеризацию молекул никазы.



Рис. 1. Олигомерный состав wt-никазы с концентрацией 3 мкМ при разных концентрациях KCl. Цифры слева: *1* – мономер, *2* – димер, *3* – тример; БСА – бычий сывороточный альбумин. Электрофорез проведен в 8 %-м нативном полиакриламидном геле.

Авторы работы [17] на основании электростатического поля молекулы никазы представили модель гомодимера wt-никазы, в которой взаимодействуют положительно заряженная область одной молекулы никазы с отрицательно заряженной областью другой молекулы. Известно, что олигомеры, образующиеся в результате электростатических взаимодействий между субъединицами, при высоких концентрациях соли нестабильны [19, 20]. В данной работе была исследована устойчивость олигомерных комплексов wt-никазы при разных концентрациях соли (рис. 1). Как видно из рис. 1, гомокоплексы никазы стабильны и при высоких концентрациях КСІ.

На основании этих данных следует, что в олигомеризацию никазы, кроме электростатических взаимодействий, заметный вклад вносят и гидрофобные взаимодействия, что препятствует разрушению олигомеров никазы в присутствии высоких концентраций соли.

Структуры wt-никазы BspD6I (PDB ID: 2EWF), Cys-free BspD6I (PDB ID: 5LIZ) и S11C Cys-free BspD6I (PDB ID: 5LIQ) никаз были проанализированы в статическом режиме на предмет обнаружения областей, склонных к агрегации, с учетом окружающих а.о. в радиусе 10 Å. Выбор этих структур обусловлен тем, что Cys-free-никаза олигомеризуется значительно сильнее wt-никазы, а S11C Cys-free-никаза не олигомеризуется вовсе. Кроме того, повышенная олигомеризация Cys-free-никазы вызывала заметное снижение ее ферментативной активности по сравнению с никазой дикого типа в два раза, а с S11C Cys-free-никазой — в 16 раз [10, 11]. АЗD-анализ кристаллических структур молекул wt- и мутантных форм никазы в одинаковой ориентации выявил область, склонную к агрегации (рис. 2). Как видно из рис. 2, область, склонная к агрегации, изменяет свою геометрию и размер в зависимости от полного отсутствия цистеинов или возвращения одного из цистеинов (Cys11) в молекуле никазы. Никаза дикого типа демонстрирует среднее положение между Cys-free- и S11C Cys-free-никазами по размеру гидрофобного участка и степенью

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

гидрофобности a.o., ее образующих. Остатки, входящие в область, склонную к агрегации, в Cysfree-никазе имеют ярко красный цвет, что отражает их высокую величину гидрофобности. Этот факт согласуется с ранее установленной нами повышенной олигомеризацией Cys-free-никазы по сравнению с дикой никазой.

В S11C Cys-free-никазе гидрофобный участок в позиции « front» заметно меньший по размеру, чем в Cys-free-никазе. При этом в позиции «back» в S11C Cys-free-никазе отсутствует область, склонная к агрегации. Полученные данные отражают низкую вероятность олигомеризации молекул S11C Cys-free-никазы, что и наблюдалось при исследовании функциональной активности никазы, зависящей от степени ее олигомеризации [11].

В табл. 1 представлены величины оценки гидрофобности/гидрофильности а.о. в области, склонной к агрегации, в структурах молекул исследованных никаз.

В молекуле Cys-free-никазы область, склонная к агрегации, включает шесть гидрофобных а.о. (Leu53, Pro54, Gln55, Phe56, Leu57, Gly 58), принадлежащих L1-петле в N-концевом узнающем домене никазы. Как видно из рис. 2, размер этой области в позициях «front» и «back» достаточно большой и включает те же а.о. и с той же степенью гидрофобности. В случае wt-никазы область, склонная к агрегации, также включает шесть гидрофобных а.о., четыре из которых те же, что и в Cys-free-никазе (Leu53, Phe56, Leu57, Gly 58), но с более низкой величиной оценки гидрофобности. Еще два остатка Ala66 и Phe67 в wt-никазе, входящие в область, склонную к агрегации, отсутствуют в Cys-free-никазе. Остаток Phe67 присутствует в S11C Cys-free-никазе, но его величина гидрофобности почти в четыре раза выше, чем в wt-никазе. Следует отметить, что остатки Pro54 и Gln55 в дикой никазе гидрофильные, а замена всех цистеинов на серин индуцирует конформационные изменения в области этих остатков таким образом, что эти остатки становятся гидрофобными.



Рис. 2. Визуализация оценки гидрофобности аминокислотных остатков, наложенной на структуру А-цепей wt-, Cys-free- и S11C Cys-free-никаз. «Front» и «back» – область, склонная к агрегации. Остатки, склонные к агрегации (гидрофобные), окрашены в градиенты красного цвета; растворимые остатки (гидрофильные) окрашены в градиенты синего цвета. Чем ярче цвет, тем больше величина оценки гидрофобности/гидрофильности. Белым цветом окрашены остатки, не влияющие на агрегацию и имеющие оценку гидрофобности, равную нулю или около нуля.

В S11C Cys-free-никазе гидрофобный участок включает только три а.о., причем только два из них (Phe56 и Leu57) те же, что и в Cys-free-никазе, а третий (Phe67) отсутствует в ней, но присутствует в никазе дикого типа. Сопоставление величин гидрофобности а.о., представленное в табл. 1, показало, что замена всех цистеинов на серин приводит к повышению гидрофобности всех остатков, образующих область, склонную к олигомеризации никазы. Возвращение одного цистеина (Cys11) сопровождается уменьшением величины гидрофобности Phe56 в 2 раза по сравнению с величиной гидрофобности этого остатка в Cys-freeниказе. Гидрофобный Gly58 с возвращением Cys11 становится гидрофильным.

Совокупность представленных данных по изучению гидрофобных взаимодействий, а также интерфейсной поверхности взаимодействующих молекул объясняет нестабильность межмолекулярного комплекса S11C Cys-free-никазы. Отсутствие олигомеров в S11C Cys-free-никазе объяснимо снижением числа гидрофобных остатков, способных к агрегации, и величины их гидрофобности (табл. 1).

Аминокислотные остатки	wt Nt.BspD6I	Cys-free Nt.BspD6I	S11C Cys-free Nt.BspD6I
Leu 53	0.0963	0.1656	
Pro 54	-0.0105	0.5517	
Gln 55	-0.2087	0.6222	
Phe 56	0.9030	2.0109	0.8854
Leu 57	1.2213	1.2172	1.2298
Gly 58	0.14	0.1685	-0.0226
Ala 66	0.4858		
Phe 67	0.3318		1.2586

Таблица 1. Aggrescan 3D score аминокислотных остатков, склонных к агрегации в А-цепях молекул wt-, Cys-freeи S11C Cys-free-никаз

выводы

Представленные результаты исследования позволяют сделать следующие выводы.

1. Гидрофобные взаимодействия обеспечивают устойчивость гомокомплексов никазы.

2. Анализ кристаллических структур никазы дикого типа и ее мутантных форм с использованием Aggrescan3D выявил в молекуле никазы гидрофобную область, склонную к агрегации, в L1 петле N-концевого узнающего домена. Замена всех цистеинов на серин в молекуле никазы увеличивает гидрофобную область, тем самым повышая способность к олигомеризации белка.

3. Установлено, что характер олигомеризации никазы определяется изменением геометрии гидрофобной области, склонной к агрегации. Чем больше гидрофобная область и выше величина гидрофобности аминокислотных остатков, ее образующих, тем выше способность белка к олигомеризации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. А.В. Русакову и к.б.н. И.Е. Мысину за техническую помощь.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00224-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Огурцов А. Н. *Введение в биофизику* (НТУ ХПИ, Харьков, 2008).
- Огурцов А. Н. Основы молекулярной биологии: в 2-х ч. Ч. 1. Молекулярная биология клетки (НТУ ХПИ, Харьков, 2010).
- 3. Ogurtsov A. N. *Molecular biophysics and enzymatic catalysis* (NTU KhPI, Kharkiv, 2011).
- Zhang Q., Sanner M., and Olson A. J. Shape complementarity of protein-protein complexes at multiple resolutions. *Prot. Struct. Funct. Bioinform.*, **75**, 453–467 (2009). DOI: 10.1002/prot.22256
- Santos J., Pujols J., Pallarès I. Iglesias V., and Ventura S. Computational prediction of protein aggregation: Advances in proteomics, conformation-specific algorithms and biotechnological applications. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **18**, 1403–1413 (2020). DOI: 10.1016/j.csbj.2020.05.026
- Li Y., Zhang X., and Cao D. The role of shape complementarity in the protein-protein interactions. *Sci. Rep.*, 3, 3–9 (2013). DOI: 10.1038/srep03271
- Schechter A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, **112**, (10), 3927–3938 (2008). DOI: 10.1182/blood-2008-04-078188
- Zheleznaya L. A., Perevyazova T. A., Alzhanova D. V., and Matvienko N. I. Site-specific nickase from bacillus species strain d6. *Biochemistry (Moscow)*, 66, 989–993 (2001). DOI: 10.1023/a:1012369525809

- Kachalova G. S., Rogulin E. A., Yunusova A. K., Artyukh R. I., Perevyazova T. A., Matvienko N. I., Zheleznaya L. A., and Bartunik H. D. Structural analysis of the heterodimeric type IIS restriction endonuclease R.BspD6I acting as a complex between a monomeric site-specific nickase and a catalytic subunit. *J. Mol. Biol.*, **384**, 489–502 (2008). DOI: 10.1016/j.jmb.2008.09.033
- Artyukh R. I., Fatkhullin B. F., Kachalova G. S., Antipova V. N., Perevyazova T. A., and Yunusova A. K. Structural analysis of cysteine-free Nt.BspD6 nicking endonuclease and its functional features. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom*, **1870** (3), 140756 (2022). DOI: 10.1016/j.bbapap.2022.140756
- Artyukh R. I., Fatkhullin B. F., Antipova V. N., Perevyazova T. A., Kachalova G. S., and Yunusova A. K. Effect of reversion back to Cys11 on the structure and function of S11C Cys-free Nt.BspD6I. *Crystallography Reports*, 68 (6), 857–863 (2023). DOI: 10.1134/S1063774523700384
- Rogulin E. A., Perevyazova T. A., Zheleznaya L. A., and Matvienko N. I. Plasmid pRARE as a vector for cloning to construct a superproducer of the site-specific nickase N.BspD6I. *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1123–1127 (2004). DOI: 10.1023/B:BIRY.0000046886.19428.d5
- Hellman L. M. and Fried M. G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat. Protoc.* 2 (8), 1849–1861 (2007). DOI: 10.1038/nprot.2007.249
- Kuriata A., Iglesias V., Kurcinski M., Ventura S., and Kmiecik S. Aggrescan3D standalone package for structure-based prediction of protein aggregation properties.

Bioinformatics, **35** (19), 3834 (2019). DOI: 10.1093/bioinformatics/btz143

- Conchillo-Sole O., de Groot N. S., Aviles F. X., Vendrell J., Daura X., and Ventura S. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of 'hot spots' of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics*, 8 (1), 65 (2007). DOI: 10.1186/1471-2105-8-65
- Zambrano R., Jamroz M., Szczasiuk A., Pujols J., Kmiecik S., and Ventura S. AGGRESCAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures. *Nucl. Acids Res.*, 43 (W1), W306–W313 (2015). DOI: 10.1093/nar/gkv359
- Sekerina S. A., Grishin A. V., Ryazanova A. Yu., Artyukh R. I., Rogulin E. A., Yunusova A. K., Oretskaya T. S., Zheleznaya L. A., and Kubareva E. A. Oligomerization of sitespecific nicking endonucleas BspD6I at high protein concentrations. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **38**, 376–382 (2012).
 DOI: 10.1134/s1068162012040127
- Acuner Ozbabacan S. E., Engin H. B., Gursoy A., and Keskin O. Transient protein-protein interactions. *Protein Eng. Des. Sel.*, 24, 635–648 (2011). DOI: 10.1093/protein/gzr025
- Talley K., Kundrotas P., and Alexov E. Modeling salt dependence of protein-protein association: Linear vs non-linear Poisson-Boltzmann equation. *Commun. Comput. Phys.* 3, 1071–1086 (2008).
- Zhang Z., Witham S., and Alexov E. On the role of electrostatics in protein-protein interactions. *Phys. Biol.*, 8 (3), 035001 (2011). DOI: 10.1088/1478-3975/8/3/035001

The Nature of Intermolecular Interactions Affecting Oligomerization of Nt.BspD6I Nickase

V.N. Antipova*, A.K. Yunusova*, and R.I. Artyukh*

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

Knowledge of the nature of intermolecular interactions and amino acid residues unveiling their origin is necessary to enable alteration of the stability of intermolecular complexes. In this work, using Nt.BspD6I nickase as an example, it was shown that hydrophobic interactions have an influence on the protein's ability to oligomerization and that chemical and geometric complementarity of external surfaces is a necessary condition for the formation of stable homo complexes.

Keywords: intermolecular interactions, Nt.BspD6I nickase, hydrophobic surfaces, oligomerization, homodimers

= МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА=

УДК 577.322.23

ВЛИЯНИЕ КАТЕХИНОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ФИБРИЛЛ КОЛЛАГЕНА *in vitro*

© 2024 г. Ю.С. Тараховский^{*, **}, С.Г. Гайдин^{**, #}, Ю.А. Ким^{**}

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

[#]E-mail: ser-gajdin@yandex.ru Поступила в редакцию 03.05.2024 г. После доработки 07.06.2024 г. Принята к публикации 19.06.2024 г.

Некоторые аспекты терапевтического действия катехинов связаны с их влиянием на отложение фибрилл коллагена в тканях. Предполагается, что этот процесс находится под контролем сигнальной и регуляторной систем клеток, на которые воздействуют катехины, при этом нельзя исключать прямого взаимодействия полифенолов со структурными белками. В настоящей работе мы исследовали непосредственное влияние (+)-катехина и эпигаллокатехин галлата на формирование фибрилл коллагена *in vitro*. Используя турбидиметрию, дифференциальную сканирующую калориметрию и просвечивающую электронную микроскопию мы показали, что (+)-катехин ускоряет образование фибрилл коллагена I типа, при этом образующиеся фибриллы имеют специфическую для этого белка структуру и термическую стабильность, тогда как эпигаллокатехин галлат в концентрации 10 мкМ ингибирует фибриллогенез. Полученные результаты расширяют наши представления о возможных механизмах терапевтического действия катехинов, демонстрируя возможность прямого взаимодействия (+)-катехина и эпигаллокатехин галлата наши представления, и могут быть полезны при разработке новых препаратов, содержащих эти растительные полифенолы или их синтетические аналоги.

Ключевые слова: коллаген, фибриллы, полифенолы, флавоноиды, катехин, эпигаллокатехин галлат.

DOI: 10.31857/S0006302924040038, EDN: NIACQU

Растительные полифенолы, поступающие в организм человека с пищей, оказывают значительный терапевтический эффект благодаря антиоксидантной, антигипертензивной, противовоспалительной, иммуномодулирующей, противомикробной и противовирусной активности, а также обладают противораковым, нейропротекторным и кардиопротекторным действием [1, 2]. Растительные продукты, такие как чай, содержат множество полифенольных соединений, в том числе катехинов, принадлежащих к семейству флавоноидов и обладающих высоким терапевтическим потенциалом [3, 4]. Катехины оказывают антиканцерогенное действие на многие виды опухолей [5]. Они подавляют пролиферацию, рост раковых клеток и метастазирование, улучшают иммунитет, проявляют синергизм с другими противораковыми препаратами [6]. Кроме того, известно, что катехины могут снижать уровень холестерина в крови [7], предотвращать развитие сердечно-сосудистых заболеваний, а также болезней Паркинсона и Альцгеймера [8, 9].

Влияние катехинов на формирование фибрилл коллагена является одним из важных аспектов их воздействия на ткани. Этот эффект может быть обусловлен действием на клеточные сигнальные системы, вовлеченные в регуляцию образования или разрушения фибрилл коллагена в тканях [10]. Тем не менее ранее нами была показана возможность прямого влияния флавоноидов на формирование фибрилл коллагена из мономеров этого белка *in vitro* [11, 12]. Было обнаружено, что в зависимости от количества гидроксильных групп в молекуле, особенно в кольце В, флавоноиды могут ускорять или подавлять процесс фибриллогенеза [11].

Сокращения: ЭГКГ — эпигаллокатехин галлат, t_{lag} — продолжительность лаг-фазы, $D_{\text{мин}}$ и $D_{\text{макс}}$ — минимальный и максимальный уровни оптической плотности, ΔD — разность значений оптической плотности ($\Delta D = D_{\text{макс}} - D_{\text{мин}}$).



Рис. 1. Структурные формулы (+)-катехина (а) и эпигаллокатехин галлата (б).

В представленной работе мы исследовали влияние (+)-катехина (рис. 1) и его производного, эпигаллокатехин галлата (ЭГКГ), на формирование фибрилл коллагена I типа. Выбор указанных соединений обусловлен их присутствием в ежедневном рационе человека [13, 14], а также тем фактом, что ЭГКГ обладает высоким сродством к молекулам коллагена [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракция коллагена и образование фибрилл. Коллаген выделяли из сухожилий хвостов молодых самцов крыс линии Вистар (массой 45 г) в соответствии с описанной ранее методикой [11, 12]. Сухожилия тщательно промывали дистиллированной водой, переносили в 0.2 М уксусную кислоту и инкубировали при 4°С в течение нескольких суток. Затем раствор нейтрализовали гидроксидом аммония до рН 7.0, после чего добавляли 96%-й холодный этиловый спирт при постоянном перемешивании. Все процедуры проводили при температуре 4°С. Через 2 ч раствор центрифугировали 30 мин при 5000 об/мин, осадок снова ресуспендировали в 0.2 М уксусной кислоте и оставляли на 12 ч при 4°С. Полученный раствор центрифугировали при 140000 д для удаления фрагментов клеток, а супернатант, содержащий мономеры коллагена, использовали в дальнейших экспериментах. Для инициации образования фибрилл аликвоту раствора мономеров коллагена переносили в раствор, содержащий 35 мМ Na₂HPO₄ и 145 мМ NaCl. Значение рН полученного после смешивания раствора составляло 7.4. Концентрация белка в рабочих растворах составляла 0.2 мг/мл.

Турбидиметрия. Как описано ранее [11, 12], изменения оптической плотности растворов коллагена, сопровождающие процесс фибриллогенеза, регистрировали с помощью спектрофотометра Specord M-40 (Carl Zeiss Jena, Германия), используя кварцевую спектрофотометрическую кювету объемом 2 мл. Измерения осуществляли на длине волны 313 нм в фосфатно-солевом растворе следующего состава: Na₂HPO₄ – 35 мM, NaCl – 145 мM, pH 7.4. Запись значений оптической плотности осуществляли с шагом 15 с при помощи программного обеспечения спектрофотометра. Построение кривых и расчет параметров осуществляли с помощью программного обеспечения OriginLab Pro (OriginLab Corp., США).

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия. Термограммы плавления образцов коллагена записывали с помощью дифференциального адиабатического сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (ИБП РАН, Пущино, Россия). Все измерения проводили в фосфатно-солевом растворе следующего состава: Na₂HPO₄ – 35 мM, NaCl – 145 мM, pH 7.4 при скорости нагрева 1°C/мин. Термограммы анализировали с помощью программного обеспечения OriginLab Pro.

Электронная микроскопия. Для визуализации структуры фибрилл коллагена I типа, спонтанно формирующихся при комнатной температуре в присутствии катехинов, использовали метод просвечивающей электронной микроскопии. Образцы коллагена в фосфатно-солевом растворе, состав которого указан выше, после суточной инкубации при комнатной температуре наносили на микроскопические сеточки, покрытые формваровой пленкой. Окраску проводили сначала 1%-м раствором уранилацетата, затем 1%-м раствором фосфовольфрамата натрия. Время воздействия каждого реагента составляло 2–3 мин. Образцы визуализировали с помощью электронного микроскопа JEM-100B (JEOL, Япония) при увеличении 30000×.

РЕЗУЛЬТАТЫ

(+)-Катехин и ЭГКГ противоположным образом влияют на процесс фибриллогенеза. Известно [11, 12], что при переносе кислого раствора мономеров коллагена (pH 3.0) в нейтральный буфер (pH 7.4) происходит образование фибрилл, которое может быть зафиксировано по увеличению оптической плотности растворов при длине волны 313 нм. Эти изменения позволяют исследовать динамику процесса фибриллогенеза.

Было обнаружено, что кривая роста оптической плотности имеет форму сигмоиды (рис. 2а, кривые 1—4) и может быть разделена на три фазы: лаг-фазу, фазу роста и фазу насыщения, или плато (рис. 2в). Лаг-фаза сопровождается небольшим увеличением оптической плотности раствора; на этапе роста происходило значительное увеличение оптической плотности раствора; фаза насыщения (плато) — это время, когда достигается максимальная оптическая плотность раствора коллагена и формируются стабильные фибриллярные структуры [15].

Мы измеряли продолжительность лаг-фазы (*t*_{паг}) и амплитуды изменения оптической плотности $\Delta D = D_{\text{макс}} - D_{\text{мин}}$. Сигмоидальная форма кривых сохраняется в присутствии (+)-катехина (рис. 2а, кривые 2-4). При этом увеличение концентрации данного агента сопровождается уменьшением обеих измеряемых величин (ΔD и $t_{\rm паг}$) (рис. 2б,г). В присутствии ЭГКГ изменения оптической плотности были значительно меньшими (рис. 2а, кривые 5-7). При этом оптическая плотность возрастала экспоненциально (рис. 2д) и не могла быть разделена на этапы, как это было сделано в случае сигмоидального роста. Экспоненциальную кривую мы характеризовали значением максимально достижимой оптической плотности (D_{макс}), которое мы рассчитывали путем аппроксимации экспериментальных данных уравнением асимптоты ($y = D_{\text{макс}} - bc^{x}$), где коэффициенты b и c определяют форму кривой (рис. 2д). Было установлено, что с увеличением концентрации ЭГКГ значения ΔD уменьшались (рис. 2е).

(+)-Катехин и ЭГКГ повышают термостабильность формирующихся в их присутствии агрегатов коллагена. Влияние флавоноидов на термостабильность предварительно сформированных фибрилл коллагена I типа изучали методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. Известно [11, 16], что мономеры коллагена,

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

находящиеся в кислой среде (pH 3.0), плавятся при температуре около 40°С. Мы обнаружили, что фибриллы коллагена, спонтанно образующиеся из мономеров при переносе раствора в нейтральную среду (pH 7.4), имели более высокую температуру плавления — около 50°С (рис. 3, термограммы 1 и 2 соответственно). При формировании фибрилл в присутствии (+)-катехина или ЭГКГ температура плавления повышалась примерно до 55°С (рис. 3, термограммы 3 и 4).

ЭГКГ, в отличие от (+)-катехина, способствует формированию агрегатов коллагена с нерегулярной структурой. При использовании метода электронной микроскопии нами было установлено, что контрольные образцы коллагена в нейтральной среде (рис. 4а) содержали многочисленные пучки фибрилл с поперечной полосатостью с периодом порядка 65-67 нм, что соответствует литературным данным [11, 12, 17, 18]. Аналогичная полосатость, но с периодом примерно на 7% больше, присутствовала в фибриллах коллагена, образованных в присутствии (+)-катехина (рис. 4б). Добавление ЭГКГ предотвращало формирование фибрилл — большая часть белка представляла собой аморфную массу (рис. 4в). При этом наблюдаемые редкие фибриллы сохраняли поперечную полосатость с периодом примерно на 5% большим, чем в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что в кислой среде коллаген, полученный из тканей животных, диссоциирует на отдельные белковые молекулы. Когда раствор коллагена переносится в нейтральную или слабощелочную среду, мономерные молекулы образуют пучки поперечно-полосатых фибрилл, которые можно наблюдать с помощью электронного микроскопа [11, 12, 17–19]. Как отмечено выше, кривая, отражающая изменение оптической плотности растворов коллагена в процессе фибриллогенеза, имеет сигмоидальную форму и разделена на лаг-фазу (резкое увеличение оптической плотности раствора), фазу роста, во время которой происходит значительное увеличение оптической плотности раствора, и фазу насыщения (достигается максимальная оптическая плотность раствора), в ходе которой завершается формирование структуры фибрилл. Турбидиметрические исследования показывают (рис. 2), что (+)-катехин ускоряет образование фибрилл, о чем свидетельствует сокращение продолжительности лаг-фазы (рис. 2e). Сокращение $t_{\text{паг}}$ можно определить как ускорение формирования фибрилл коллагена [11]. Лаг-фаза соответствует стадии нуклеации, во время которой, в результате агрегации отдельных молекул, образуются димеры коллагена [15]. Предположительно, уменьшение продолжительности лаг-фазы объясняется тем,



Рис. 2. Влияние катехинов на изменение оптической плотности раствора при формировании фибрилл коллагена. (а, в, д) – Кривые оптической плотности растворов коллагена и их анализ: (а) – кривая 1 – контрольный образец, кривая 2 – образец в присутствии 10 мкМ катехина, кривая 3 – образец в присутствии 50 мкМ катехина, кривая 4 – образец в присутствии 10 мкМ катехина, кривая 5 – образец в присутствии 10 мкМ катехина, кривая 5 – образец в присутствии 1 мкМ ЭГКГ, кривая 6 – образец в присутствии 10 мкМ катехина, кривая 5 – образец в присутствии 1 мкМ ЭГКГ, кривая 6 – образец в присутствии 10 мкМ катехина, кривая 5 – образец в присутствии 1 мкМ ЭГКГ, кривая 6 – образец в присутствии 10 мкМ эГКГ и кривая 7 – образец в присутствии 50 мкМ ЭГКГ; (в) – анализ сигмоидальной кривой оптической плотности, кривая разделена на лаг-фазу (характеризуется временем $t_{\text{лаг}}$ и минимальной оптической плотностью $D_{\text{макс}}$); (д) – анализ экспоненциальной кривой оптической плотности, кривая характеризуется параметром ΔD . (б, г, е) – Результаты анализа кривых изменения ΔD под действием ЭГКГ (е).



Рис. 3. Термограммы плавления коллагена, полученные методом дифференциальной сканирующей калориметрии: термограмма *I* – мономер коллагена, рН 3.0; термограмма *2* – фибриллярный коллаген, рН 7.4, инкубация 1 ч; термограмма *3* – фибриллы коллагена формировались в присутствии 10 мкМ (+)-катехина, инкубация 1 ч; термограмма *4* – фибриллы коллагена формировались в присутствии 10 мкМ ЭГКГ, инкубация 1 ч.

что молекулы (+)-катехина способны влиять преимущественно на начальный этап формирования фибрилл — этап нуклеации.

Молекулы ЭГКГ совершенно иначе влияют на процесс образования фибрилл коллагена, подавляя этот процесс в самом начале (рис. 1г, кривые 5, 6 и 7). В присутствии ЭГКГ кривая роста оптической плотности раствора коллагена не имела сигмоидальной формы. Напротив, этот процесс носил экспоненциальный характер. Это предполагает возможность существования различных вариантов взаимодействия белковых молекул в этих условиях.

Дифференциальная сканирующая калориметрия показывает значительное, примерно на 10-11°С, увеличение термостабильности фибрилл коллагена по сравнению с раствором его мономеров в кислой среде (рис. 3), что коррелирует с данными предыдущих исследований [11, 16]. Дальнейшее повышение термостабильности фибрилл коллагена почти на 5°С наблюдалось в присутствии 10 мкМ (+)-катехина. Примечательно, что агрегаты коллагена с нерегулярной структурой. образующиеся в присутствии 10 мкМ ЭГКГ, имеют аналогичные термические свойства. Это указывает на то, что повышенная термостабильность коллагена в присутствии катехинов связана не только с фибриллярной структурой этого белка. Повышение термостабильности образующихся агрегатов коллагена, в том числе фибрилл, предположительно, можно объяснить образованием при участии катехинов прочных поперечных связей между белковыми молекулами.

Электронная микроскопия показывает, что в присутствии (+)-катехина образуются поперечно-полосатые фибриллы, аналогичные тем, что наблюдаются в контрольных образцах. На микрофотографии (рис. 4а,б) видны фибриллы с периодом около 64—67 нм, характерные для коллагена [20]. Это подтверждает предположение о том, что белковые агрегаты, формирование которых регистрировалось методом турбидиметрии, действительно являются фибриллами.

В отличие от (+)-катехина, ЭГКГ подавляет образование фибрилл в аналогичных или даже



Рис. 4. Просвечивающая электронная микроскопия фибрилл коллагена. (а) – Пучки поперечно-полосатых фибрилл в контрольном препарате коллагена. (б) – Аналогичные фибриллы образовывались в присутствии 10 мкМ (+)-катехина. (в) – В присутствии 10 мкМ ЭГКГ большая часть материала была аморфной (отмечено звездочкой). Однако в этом препарате встречались и одиночные поперечно-полосатые фибриллы (отмечено стрелками).

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

более низких концентрациях. Об этом свидетельствуют не только небольшие значения ΔD , наблюдаемые в турбидиметрическом исследовании, но и данные электронной микроскопии, показывающие, что большая часть белка имеет аморфную структуру, тогда как фибриллярный коллаген встречается очень редко (рис. 4в). Турбидиметрический анализ также показывает, что в присутствии ЭГКГ кривые изменения оптической плотности растворов имеют форму экспонент и, следовательно, не имеют лаг-фазы, в течение которой, как известно, происходит линейная агрегация мономеров коллагена, предшествующая образованию фибрилл [15, 21].

Фибриллярный коллаген обеспечивает механическую прочность тканям человека и животных. Ингибирующее действие ЭГКГ на отложение коллагена может способствовать ремоделированию тканей во время заживления диабетических ран [22], терапии сердечно-сосудистой дисфункции [23], гиперплазии предстательной железы [24] и фиброза печени [25]. Он может значительно предотвратить повреждение легких, воспаление и окислительный стресс [26]. Было показано, что ЭГКГ может служить перспективным агентом при создании лекарственных средств для предотвращения развития гипертрофированных шрамов [27], способный ингибировать рост и вызывать уменьшение размеров келоидной ткани [28]. Терапевтический эффект ЭГКГ может обеспечиваться присутствием в молекуле катехоловой группы. Например, синтетические соединения, такие как полимерные гели, содержащие боковые группы катехолов, могут, подобно ЭГКГ, уменьшать отложение коллагена в тканях и оказывать противовоспалительное действие [29]. В настоящее время получены доказательства того, что обнаруженное действие ЭГКГ может быть опосредовано влиянием на клеточные сигнальные системы, например пути AKT/mTOR [26], ERK1/2 [30], TGF-β/Smad [31] или RunX2/Col IV [32]. Однако в представленной работе мы показали, что при концентрации ЭГКГ, равной 1 мкМ, наблюдается ингибирование образования коллагеновых фибрилл. Известно, что концентрация катехинов в крови человека, выпивающего одну чашку чая, составляет около 0.5 мкМ [33], что близко к уровню ЭГКГ, способного ингибировать образование коллагеновых фибрилл в наших экспериментах. Можно предположить, что ЭГКГ способен в том числе и напрямую, без участия клеточных регуляторных систем, влиять на образование фибрилл in vivo. Поэтому мы призываем к дальнейшему рассмотрению возможности прямого влияния ЭГКГ на отложение коллагена как одного из механизмов терапевтического действия этого препарата.

выводы

Представленная работа посвяшена изучению влияния катехинов чая на формирование фибрилл коллагена из мономеров этого белка. Обнаруженное нами ускорение образования фибрилл в присутствии (+)-катехина и ингибирование этого процесса ЭГКГ в концентрациях, близких к физиологическим, расширяют наши представления о механизмах терапевтического действия этих веществ в случае патологий, ассоциированных с изменением структуры, свойств и содержания фибриллярного коллагена в тканях. Мы полагаем, что в дополнение к главному тренду в исследованиях участия клеточных сигнальных систем во взаимодействии фибрилл коллагена с клетками тканей, следует уделить также внимание изучению прямого влияния различных агентов, включая ЭГКГ и других природных полифенольных соединений, на образование фибрилл коллагена в тканях. Полученные в этих исследованиях данные могут быть использованы для создания новых фармакологических средств для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания ИБК РАН (№ 075-00609-24-01) и ИТЭБ РАН (№ 075-00224-24-01).

конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, сопряженные с выделением коллагена из тканей животных, соответствовали Директиве Европейского парламента ЕС 2010/63/EU.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rathod N. B., Elabed N., Punia S., Ozogul F., Kim S.-K., and Rocha J. M. Recent developments in polyphenol applications on human health: a review with current knowledge. *Plants*, **12** (6), 1217 (2023). DOI: 10.3390/plants12061217
- Buljeta I., Pichler A., Šimunović J., and Kopjar M. Beneficial effects of red wine polyphenols on human health: comprehensive review. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 45 (2), 782–798 (2023). DOI: 10.3390/cimb45020052
- Bakun P., Mlynarczyk D. T., Koczorowski T., Cerbin-Koczorowska M., Piwowarczyk L., Kolasiński E., Stawny M., Kuźmińska J., Jelińska A., and Goslinski T.

Tea-break with epigallocatechin gallate derivatives -Powerful polyphenols of great potential for medicine. Eur. J. Med. Chem., 261, 115820 (2023). DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115820

- 4. Azami S. and Forouzanfar F. Therapeutic potentialities of green tea (Camellia sinensis) in ischemic stroke: biochemical and molecular evidence. Metab. Brain Dis., 39 (2), 347-357 (2024). DOI: 10.1007/s11011-023-01294-4
- 5. Li X. X., Liu C., Dong S. L., Ou C. S., Lu J. L., Ye J. H., Liang Y. R., and Zheng X. Q. Anticarcinogenic potentials of tea catechins. Front Nutr., 9, 1060783 (2022). DOI: 10.3389/fnut.2022.1060783
- 6. Suganuma M., Saha A., and Fujiki H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs. Cancer Sci., 102 (2), 317-323 (2011). DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01805.x
- 7. Kim A., Chiu A., Barone M. K., Avino D., Wang F., Coleman C. I., and Phung O. J. Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis. J. Am. Diet. Assoc., 111 (11), 1720-1729 (2011). DOI: 10.1016/j.jada.2011.08.009
- 8. Lange K. W. Tea in cardiovascular health and disease: a critical appraisal of the evidence. Food Sci. Hum. Wellness, 11 (3), 445-454 (2022).
- 9. Mandel S. A., Amit T., Weinreb O., Reznichenko L., and Youdim M. B. Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. CNS Neurosci. Ther., 14 (4), 352-365 (2008). DOI: 10.1111/j.1755-5949.2008.00060.x
- 10. Prasanth M. I., Sivamaruthi B. S., Chaiyasut C., and Tencomnao T. A review of the role of green tea (camellia sinensis) in antiphotoaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. Nutrients, 11 (2), 474 (2019). DOI: 10.3390/nu11020474
- 11. Kim Y. A., Tarahovsky Y. S., Gaidin S. G., Yagolnik E. A., and Muzafarov E. N. Flavonoids determine the rate of fibrillogenesis and structure of collagen type I fibrils in vitro. Int. J. Biol. Macromol., 104, 631-637 (2017). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.070
- 12. Tarahovsky Y. S., Selezneva I. I., Vasilieva N. A., Egorochkin M. A., and Kim Y. A. (2007). Acceleration of fibril formation and thermal stabilization of collagen fibrils in the presence of taxifolin (dihydroquercetin). Bull. Exp. Biol. Med., 144, 791-794 (2007). DOI: 10.1007/s10517-007-0433-z
- 13. Smith J. W. Molecular pattern in native collagen. Nature, 219, 157-158 (1968). DOI: 10.1038/219157a0
- 14. Açil Y. and Müller P. K. Rapid method for the isolation of the mature collagen cross-links, hydroxylysylpyridinoline and lysylpyridinoline. J. Chromatogr. A, 664, 183-188 (1994). DOI: 10.1016/0021-9673(94)87006-3
- 15. Silver F. H. and Trelstad R. L. Linear aggregation and the turbidimetric lag phase: type I collagen fibrillogenesis in vitro. J. Theor. Biol., 81, 515-526 (1979). DOI: 10.1016/0022-5193(79)90049-3

- 16. Tiktopulo E. I. and Kajava A. V. Denaturation of type I collagen fibrils is an endothermic process accompanied by a noticeable change in the partial heat capacity. Biochemistry, 37 (22), 8147-8152 (1998). DOI: 10.1021/bi980360n
- 17. Williams B. R., Gelman R. A., Poppke D. C., and Piez K. A. Collagen fibril formation. Optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results. J. Biol. Chem., 253, 6578-6585 (1978).
- 18. Bozec L., van der Heijden G., and Horton M. Collagen fibrils: nanoscale ropes. Biophys. J., 92 (1), 70-75 (2007). DOI: 10.1529/biophysj.106.085704
- 19. Darvish D. M. Collagen fibril formation in vitro: From origin to opportunities. Mater. Today Bio., 15, 100322 (2022). DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100322
- 20. Chapman J. A., Tzaphlidou M., Meek K. M., and Kadler K. E. The collagen fibril – a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron* Microsc. Rev., 3 (1), 143-182 (1990). DOI: 10.1016/0892-0354(90)90018-n
- 21. Acil Y., Mobasseri A. E., Warnke P. H., Terhevden H., Wiltfang J., and Springer I. Detection of mature collagen in human dental enamel. Calcif. Tissue Int., 76 (2), 121-126 (2005). DOI: 10.1007/s00223-004-0122-0
- 22. Chen F., Qin J., Wu P., Gao W., and Sun G. Glucoseresponsive antioxidant hydrogel accelerates diabetic wound healing. Adv. Healthc. Mater., 12 (21), e2300074 (2023). DOI: 10.1002/adhm.202300074
- 23. Connolly K., Batacan R., Jackson D., and Fenning A. S. Effects of epicatechin on cardiovascular function in middle-aged diet-induced obese rat models of metabolic syndrome. Br. J. Nutr., 131 (4), 593-605 (2024). DOI: 10.1017/S000711452300209X
- 24. Zhou J., Lei Y., Chen J., and Zhou X. Potential ameliorative effects of epigallocatechin-3-gallate against testosterone-induced benign prostatic hyperplasia and fibrosis in rats. Int. Immunopharmacol., 64, 162-169 (2018). DOI: 10.1016/j.intimp.2018.08.038
- 25. George J., Tsuchishima M., and Tsutsumi M. Epigallocatechin-3-gallate inhibits osteopontin expression and prevents experimentally induced hepatic fibrosis. Biomed. Pharmacother., 151, 113111 (2022). DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113111
- 26. Zhongyin Z., Wei W., Juan X., and Guohua F. Epigallocatechin gallate relieved PM2.5-induced lung fibrosis by inhibiting oxidative damage and epithelial-mesenchymal transition through AKT/mTOR pathway. Oxid. Med. Cell Longev., 2022, 7291774 (2022). DOI: 10.1155/2022/7291774
- 27. Song Y., Wang T., Yang L., Wu J., Chen L., Fan X., Zhang Z., Yang Q., Yu Z., and Song B. EGCG inhibits hypertrophic scar formation in a rabbit ear model. J. Cosmet. Dermatol., 22, 1382-1391 (2023). DOI: 10.1111/jocd.15587
- 28. Sved F., Bagabir R. A., Paus R., and Bayat A. Ex vivo evaluation of antifibrotic compounds in skin scarring: EGCG and silencing of PAI-1 independently inhibit

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024 growth and induce keloid shrinkage. *Lab. Invest.*, **93** (8), 946–960 (2013). DOI: 10.1038/labinvest.2013.82

- Qiao Y., Zhang Q., Wang Q., Lin J., Wang J., Li Y., and Wang L. Synergistic anti-inflammatory coating "Zipped Up" on polypropylene hernia mesh. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **13** (30), 35456–35468 (2021). DOI: 10.1021/acsami.1c09089
- Zang G., Chen Y., Guo G., Wan A., Li B., and Wang Z. Protective effect of CD137 deficiency against postinfarction cardiac fibrosis and adverse cardiac remodeling by ERK1/2 signaling pathways. J. Cardiovasc. Pharmacol., 83 (5), 446–456 (2024). DOI: 10.1097/FJC.000000000001549
- Guo H., Hu Z., Yang X., Yuan Z., Wang M., Chen C., Xie L., Gao Y., Li W., Bai Y., and Lin C. Smad4 regulates TGF-β1-mediated hedgehog activation to pro-

mote epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by suppressing Gli1 activity. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **23**, 1189–1200 (2024). DOI: 10.1016/j.csbj.2024.03.010

- 32. Huang X., Zhang S., Fu W., Wang L., Liu Zh., Tang Y., Gao W., and Tang B. *In situ* imaging of GGT and HOBr-triggered atherosclerotic plaque rupture via activating the RunX2/Col IV signaling pathway. *Anal. Chem.*, **96** (10), 4138–4145 (2024). DOI: 10.1021/acs.analchem.3c05073
- Reddy V. C., Vidya Sagar G. V., Sreeramulu D., Venu L., and Raghunath M. Addition of milk does not alter the antioxidant activity of black tea. *Ann. Nutr. Metab.*, **49** (3), 189–195 (2005). DOI: 10.1159/000087071

Effects of Catechins on the Formation of Collagen Fibrils in vitro

Yu.S. Tarahovsky*, **, S.G. Gaidin**, and Yu.A. Kim**

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

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

Some aspects of therapeutic action of catechins are associated with their effects on the deposition of collagen fibrils in tissues. It is assumed that this process is controlled through signaling and regulatory pathways in cells that catechins affect, however, the direct interactions of polyphenols with structural proteins cannot be excluded. The present work investigates the direct effect of (+)-catechin and epigallocatechin gallate on the formation of collagen fibrils *in vitro*. Turbidimetty, differential scanning calorimetry and transmission electron microscope data showed that (+)-catechin accelerates the formation of type I collagen fibrils, and the resulting fibrils have a protein-specific structure and thermal stability, while epigallocatechin gallate at a concentration of 10 μ M inhibits fibrillogenesis. The results obtained expand our understanding of the potential mechanisms of therapeutic action of catechins demonstrating the possibility of a direct interaction of (+)-catechin and epigallocatechin gallate with collagen monomers and collagen fibrils and these findings may be useful in the development of new drugs containing these plant polyphenols or their synthetic analogues.

Keywords: collagen, fibrils, polyphenols, flavonoids, catechin, epigallocatechin gallate

714

— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА —

УДК 543.645.9

ИННОВАЦИОННЫЕ БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСТРАКЦИИ КВЕРЦЕТИНА ИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

© 2024 г. А.Г. Погорелов^{*, #}, Л.Г. Ипатова^{*}, А.И. Панаит^{*}, А.А. Станкевич^{*}, А.К. Юнусова^{*}, В.Н. Погорелова^{*}

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия [#]E-mail: agpogorelov@rambler.ru Поступила в редакцию 08.02.2024 г. После доработки 15.06.2024 г. Принята к публикации 19.06.2024 г.

Предложен метод экстракции кверцитина из растительной клетки, основанный на сочетанном действии ультразвука и метастабильной фракции водного раствора. Такая обработка вызывает более эффективное выделение цитоплазматической компоненты за счет травления и/или механического разрушения оболочки растительной клетки. Окисленная фракция раствора обладает наиболее выраженными экстрагирующими свойствами, но воздействует на кверцетин, окисляя хромофорную часть молекулы. По критерию сохранности пигмента лучшей экстрагирующей средой является восстановленная фракция воды. Для анализа образцов экстракта использовали аналитические методы: UV-Vis-спектрометрию, гель электрофорез белков, ¹H-ЯМР-спектрометрию и QCMвзвешивание, а также сканирующую электронную микроскопию.

Ключевые слова: кверцетин, электрохимически активированный водный раствор, ультразвуковая экстракция, UV-Vis-спектрометрия, гель электрофорез белков, сканирующая электронная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302924040049, EDN: NHYWDY

Кверцетин и его производные обладают рядом полезных качеств, включая антиоксидантные свойства [1-4]. Физиологическая активность делает эту группу флавоноидов востребованной для целей медицины, производства функциональных пишевых пролуктов и косметических препаратов. что заставляет искать источники натурального кверцетина. Высокое содержание данного вещества находят в слое шелухи лука (ШЛ), который формируют отмершие клетки [5]. Промышленная переработка этого овоща сопровождается накоплением больших объемов отходов в виде ШЛ. Их рациональное использование в качестве вторичного сырья позволит производить продукцию с добавленной стоимостью и к тому же снизить нагрузку на окружающую среду [6].

Натуральные вещества выделяют из отходов переработки растительного сырья посредством экстракции, и кверцетин не является исключением [7, 8]. С этой целью применяют, как правило, органические растворители, а также обработку сырья водной средой, нагретой до высокой температуры, и/или с экстремально измененным значением pH [9]. Такие сложные подходы разработаны в связи с необходимостью разрушить целлюлозную стенку растительной клетки. При этом происходит изменение молекулы экстрагируемого вещества и, следовательно, непрогнозируемое изменение ее свойств, а также привнесение технологических примесей в целевой продукт.

Показано, что фракции электрохимически активированного водного раствора (ЭХАР), проявляя псевдоферментативную активность, расщепляют растительные полисахариды [10]. Это позволяет нам предложить ЭХАР в качестве «зеленой» альтернативы химическим агентам, используемым для экстракции веществ из растительного сырья. Метастабильные фракции ЭХАР (анолит, католит) обладают еще одним полезным свойством: восстанавливаясь со временем до воды, они не содержат загрязняющих ингредиентов, которые зачастую экологически небезопасны и трудно удаляются из экстракта.

В данном исследовании в качестве фактора, усиливающего эффект ЭХАР, использовали воздействие ультразвуком. Такой технологический прием отличается простотой, низкой стоимостью и экологичностью [11–14]. Стимулирующее дей-

Сокращения: ШЛ – шелуха лука, ЭХАР – электрохимически активированный водный раствор, ОВП – окислительно-восстановительный потенциал.

ствие ультразвука на процесс экстракции обусловлено наличием интенсивного перемешивающего потока, уменьшением вязкости экстрагирующей жидкости и возникновением кавитации. Таким образом, цель данного исследования состояла в изучении экстракции кверцетина из растительной клетки в результате сочетанного действия метастабильной фракции ЭХАР и ультразвука, которые относят к «зеленым» физическим воздействиям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка препарата. В эксперименте сравнивали эффективность экстракции кверцетина из ШЛ в воду или фракции ЭХАР. Для эксперимента использовали питьевую воду из городского водопровода со значением кислотности (рН) 7.2 и окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП), равным 360 мВ. Анолит и католит получали посредством коммерческого электролизера СТЕЛ-Универсал (ООО «ИЭСТ», Москва). Значение рН водного раствора регистрировали с помощью прибора HI98120 (Hanna, Германия), а ОВП - ST20R (Ohaus, Китай). Показатели водных фракций следующие: анолит - рН 2.2 и ОВП – 800 мВ, католит – pH 8.2 и ОВП – 800 мВ. Для экстракции готовили фрагменты образца размером 5×5 мм, которые помещали в экстрагирующую водную среду в отношении 1:100 (по весу) с последующей их обработкой в течение 40 мин ультразвуком. Взвесь частиц из полученного экстракта осаждали центрифугированием при 800 g, после чего супернатант пропускали через фильтр с эффективным размером поры 0.2 мкм. Полученный раствор анализировали посредством UV-Vis-спектрометрии, гель-электрофореза белков, ЯМР-спектрометрии и микровзвешивания сухого остатка. Тонкий рельеф поверхности образца изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии.

UV-Vis-спектрометрия. Эффективность экстракции оценивали посредством анализа спектров поглощения водных экстрактов. Кварцевую кювету заполняли 4 мл анализируемого раствора, оптическую плотность которого регистрировали на спектрофотометре UV-2401PC (Shimadzu, Япония). Для спектрометрии в UV-диапазоне экстракт ШЛ желтого цвета разбавляли в 20 раз. В качестве сравнения использовали кварцевую кювету, наполненную водой, анолитом или католитом, для экстрактов, приготовленных на воде или соответствующих фракциях ЭХАР.

Гель-электрофорез белков. В качестве разделяющий основы брали 10%-й акриламидный гель (акриламид: бисакриламид в отношении 37:1) на буферном растворе следующего состава: 0.375 М Трис-HCl (pH 8.8), 0.1% персульфата аммония, 0.1% додецилсульфата натрия, 0.01% ТЕМЕD.

В составе фокусирующего 5%-го акриламидного геля уменьшили концентрацию Трис-HCl до 0.125 М (рН 6.8). Буфер для электродов содержал 0.025 M Трис-HCl (pH 8.3) и 0.19 М глицина. Образцы экстрактов разводили в лизирующем буфере (2% додецилсульфата натрия, 10% глицерина, 5% 2-меркаптоэтанола, 0.004% бромфенолового синего, 0.063 M Трис-HCl, pH 6.8), далее кипятили на водяной бане в течение 5 мин. По мере остывания до комнатной температуры 20 мкл препарата вносили в ячейку пластины акриламидного геля, где при 20 мА проводили электрофорез в течение 2 ч. Разделенные на геле белки прокрашивали красителем Кумасси R-250, а их массу нормировали с помощью молекулярных маркеров (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва).

¹Н-ЯМР-спектрометрия. В исследуемый экстракт ШЛ объемом 570 мкл добавляли 30 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего тетраметилсилан и D_2O . Регистрацию ¹H-ЯМРспектров проводили при температуре 298 К на спектрометре AVANCE III 600 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 598.95 МГц (по протонам). Спектры экстрактов ШЛ регистрировали с помощью стандартных импульсных последовательностей, имеющихся в библиотеке программы zg и zgpr. Для улучшения отношения сигнал/шум накапливали 256 сканов. Калибровку спектров осуществляли по тетраметилсилану (водные растворы), их сравнение проводили в области 7-8 ррт, регистрируя сигналы от ароматических колец, характерных для группы флавоноидов.

Сканирующая электронная микроскопия. Наличие механических повреждений в оболочке растительной клетки изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для этого фрагмент ШЛ трижды отмывали в дистиллированной воде, сушили в струе инертного газа (N_2) и крепили серебряным клеем на поверхность держателя образцов электронного микроскопа. Затем в среде аргоновой плазмы на поверхность препарата напыляли слой платины, используя установку JFC-1600 (JEOL, Япония). Тонкую структуру рельефа изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6390A (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме вторичных электронов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

UV-Vis-спектрометрия экстракта. В данной работе регистрируют спектры поглощения экстрактов, извлеченных посредством обработки образцов ШЛ ультразвуком в воде или фракциях ЭХАР (рис. 1).

Спектры поглощения водных экстрактов для ШЛ желтого цвета (рис. 1а,б) и бесцветного образца (рис. 1в,г) были получены после 40 мин об-



Рис. 1. Спектры поглощения экстрактов шелухи лука, полученных после 40 мин обработки ультразвуком в воде, анолите или католите: (а) – UV-спектры экстрактов шелухи желтого цвета, разбавленных в 20 раз; (б) – спектры в видимой области для тех же, но неразбавленных экстрактов; (в) – UV-спектры неразбавленных экстрактов для неокрашенного образца; (г) – спектры тех же экстрактов в видимой области.

работки ультразвуком. Общему содержанию органических компонент в растворе соответствует интенсивность неспецифического спектра поглощения в UV-диапазоне с пиком на линии в области 220 нМ. Анализ таких спектров, полученных для экстракта окрашенной ШЛ (рис. 1а), указывает на анолит как наиболее эффективный экстрагирующий агент. Отметим, что наличие кверцитина в ШЛ увеличивает в десятки раз оптическую плотность экстракта, если сравнивать с препаратом непигментированного образца (рис. 1в).

Цвет служит визуальным критерием наличия в ШЛ кверцетина — пигмента, содержащего хромофорную группу, которая окрашена в желто-оранжевом диапазоне. По этой причине в спектре поглощения водного раствора кверцетина присутствует характерный пик в области 490 нМ, что позволяет оценить полноту извлечения целевого продукта. Относительно низкий уровень спектра поглощения в видимой области для экстракта на анолите (рис. 16) следует интерпретировать с учетом физико-химических свойств этой фракции водного раствора. Дело в том, что анолит обладает аномально высоким ОВП, что вызывает окисле-

а в желто-оранне в спектре поцетина присутги 490 нМ, что чения целевого гровень спектра

растворе кверцитина.

не длин волн, значение оптический плотности экстракта на длине волны 490 нМ характерного пика можно использовать для сравнения анализируемых препаратов. Это утверждение корректно, по крайней мере, для водной среды, в которой не окисляется хромофорная часть пигмента. Для

ние кверцетина и, как следствие, уменьшение ин-

тенсивности характерного пика поглощения. Как

и для спектра поглощения в UV-диапазоне, опти-

ческая плотность спектров поглощения в види-

мой области для экстракта ШЛ желтого цвета

(рис. 1б) в десятки раз выше, чем такого спектра у

препарата, полученного из непигментированного

образца (рис. 1г). Таким образом, во всем диапа-

зоне длин волн интенсивность спектра поглоше-

ния экстракта формирует преимущественно ком-

понента, которая обусловлена содержанием в

пик пигмента (490 нМ) накладывается фон, кото-

В видимой области спектра поглощения на

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024



Рис. 2. Гель-электрофорез белков, содержащихся в экстракте шелухи лука желтого цвета после 20 и 40 мин обработки ультразвуком в католите, анолите или воде: (а) – неокрашенный гель, (б) – тот же гель, окрашенный Кумасси R-250, (в) – ¹H-ЯМР-спектры тех же экстрактов после 40 мин обработки ультразвуком. М – маркер молекулярной массы, кДа.

ШЛ желтого цвета, например, отношение содержания кверцетина в экстракте на воде и на католите равно значению 0.89.

При рассмотрении UV-спектров поглощения экстрактов (рис. 1б) видна зависимость их формы от экстрагирующей среды, что обусловлено, возможно, модификацией части выделенного вещества. Учитывая то, что носителем хромофорной части природного кверцетина является (глико)пептид, изменение свойства этой молекулы может показать метод гель-электрофореза, детализирующего белковую композицию экстракта.

Гель-электрофорез и ¹**Н-ЯМР-спектрометрия экстракта.** Данные электрофореза белков в экстракте ШЛ желтого цвета в воду и водные фракции ЭХАР представлены на рис. 2.

Для неокрашенного геля (рис. 2а) только на полосе, соответствующей 40 мин экстракции, локализован желтый пигмент с молекулярной массой между 17 и 26 кДа, соответствующий кверцетину. Эффект особенно выражен для образца в католите, но слабо визуализируется для экстракта ШЛ в анолите. Отметим, что для этого экстракта кроме основной полосы визуализируется слабоокрашенное пятно розового цвета (не показано), свидетельствующее о наличии дополнительной группы пигментов. Этот результат согласуется с предположением о модификации кверцетина под действием окисленной фракции ЭХАР и, следовательно, изменении спектральных характеристик экстракта.

На рис. 26 показан тот же гель, но после окрашивания Кумасси R-250, из которого следует совпадение полос пигмента и белка. Это наблюдение подтверждает сопряжение хромофорной части с пептидом в структуре молекулы натурального кверцетина. В структуре окрашенного геля (рис. 2б) отсутствуют дополнительные полосы, возможно, из-за недостаточной чувствительности используемой версии метода. В экстракте, соответствующем 20 мин воздействия, метод гельэлектрофореза не регистрирует наличие цветного рефлекса (рис. 2а), при том что в экстракте присутствует белок (рис. 2б). По-видимому, количества вещества в этом препарате не достаточно для визуализации хромофорной составляющей.

Результаты ЯМР-спектрометрии приведены на рис. 2в. Анализ полученных ¹Н-ЯМР-спектров указывает на то, что при экстракции в случае католита появляются дополнительные сигналы в области ароматических соединений. Однако при интерпретации данных ЯМР-спектрометрии следует принимать во внимание то, что класс соединений, содержащих в структуре молекулы ароматические кольца, не ограничен только кверцетином и его производными, хотя это вещество и вносит основной вклад в состав исследуемых экстрактов.

Сканирующая электронная микроскопия. Эффективность экстракции из растительного сырья обусловлена полнотой разрушения целлюлозной оболочки растительной клетки. Эффект фракций ЭХАР изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии, исследуя сохранность тонкой структуры ШЛ (рис. 3).



Рис. 3. Изображения поверхности шелухи лука желтого цвета после 40 мин экстракции ультразвуком: (а) и (б) – образец выдержан 40 мин в воде без обработки ультразвуком, (в) и (г) – результат обработки ультразвуком в воде; (д) и (е) – результат обработки ультразвуком в анолите; (ж) и (з) – результат обработки ультразвуком в католите. Микрофотографии получены посредством сканирующей электронной микроскопии в режиме вторичных электронов.

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024



Рис. 4. Особенности QCM-микровзвешивания с помощью кварцевого резонатора сухого остатка, содержащегося в 2 мкм капле водного экстракта: (а) – блок-схема QCM-прибора; (б) – изменение со временем резонансной частоты кварцевого кристалла при высыхании капли водного раствора, нанесенной на его поверхность, показаны начало и завершение испарения воды; (в) – калибровочная линия зависимости смещения (Df) резонансной частоты (в Гц) кварцевого кристалла от веса сухого остатка, содержащегося в капле эталонного водного раствора; (г) – вес сухого остатка в капле (2 мкм) экстракта шелухи лука желтого цвета после 40 мин обработки ультразвуком в католите, анолите или воде.

На рис. 4 приведены микрофотографии препаратов ШЛ желтого цвета, полученных после 40 мин обработки ультразвуком в воде, анолите или католите, а для сравнения – изображение поверхности препарата, который выдержан в воде, но без воздействия ультразвуком. При малом увеличении (450×) видны контуры отдельных клеток, формирующих поверхностный сухой слой лука. Анализ изображений, снятых при высоком увеличении, показывает наличие механических дефектов на поверхности клетки после обработки ШЛ в среде водных фракций ЭХАР. Кроме того, видна тонкая клеточная структура, что свидетельствует об удалении целлюлозной оболочки. Таким образом, ультразвуковая обработка в католите и анолите обеспечивает более полное механическое разрушение структуры ШЛ, что является условием эффективной экстракции цитоплазматической компоненты растительной клетки.

QCM-взвешивание сухого остатка экстракта. Данный метод гравиметрии востребован в случае, когда объема анализируемого раствора недостаточно, чтобы выпариванием получить сухое вещество в количестве, необходимом для его аналитического взвешивания. Метод QCM-взвешивания ранее был апробирован для определения веса сухого остатка в объеме 2 мкл [10]. В основе лежит регистрация изменения резонансной частоты кварцевого кристалла после нанесения на его поверхность пленки (осадка) [15, 16]. Особенности определения веса с помощью рассматриваемого гравиметрического подхода поясняет рис. 4.

Концентрация веществ, указанная на диаграмме (рис. 4г), рассчитана для соответствующего водного раствора после 40 мин экстракции. Для того чтобы выполнить пересчет на сухой вес исходного образца, следует учесть разбавление ШЛ в экстрагирующей среде. Отметим, что QCM-взвешивание не обладает избирательностью, т.е. определяется суммарный вес всех нелетучих компонентов, содержащихся в исследуемой жидкости. Другими словами, микровзвешивание дублирует спектрометрию в области неспецифических UV-спектров. Действительно,

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

результаты QCM-измерения (рис. 4г) согласуются с данными спектрометрии (рис. 1а,в) и подтверждают заключение о том, что для ШЛ анолит наиболее эффективен как экстрагирующий агент, хотя в экстракте на католите лучше сохраняется цвет пигмента и, следовательно, молекула кверцетина (рис. 1б).

Завершая обсуждение результатов, можно сделать следующие выводы. Сочетанное действие фракций ЭХАР и ультразвука улучшает выделение веществ из растительной клетки шелухи лука, что подтверждено разными методами после сравнительного изучения полученных экстрактов. Обработка в католите и анолите вызывает более полное удаление и/или разрушение оболочки растительной клетки и, в результате, более эффективную экстракцию цитоплазматической компоненты растительной клетки. Действие окисленной фракции ЭХАР неоднозначно, так как анолит обладает наиболее выраженными экстрагирующими свойствами, но при этом меняет свойства кверцетина, окисляя хромофорную часть молекулы. По критерию сохранности пигмента лучшим экстрагирующим раствором является восстановленная фракция ЭХАР – католит. Это важный фактор, учитывая то, что экстракт шелухи лука востребован как натуральный краситель в промышленных объемах для пишевых технологий при производстве продуктов и полуфабрикатов питания [17, 18].

БЛАГОДАРНОСТИ

Весь комплекс спектральных измерений и морфологические наблюдения выполнены с использованием приборной базы ЦКП «Структурно-функциональные исследования биосистем» при ИТЭБ РАН (Пущино).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-16-00019, https://rscf.ru/project/20-16-00019/).

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.

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Katsampa P., Valsamedou E., Grigorakis S., and Makris D. P. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products*, 77, 23 (2015). DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.09.039
- Milea S. A., Aprodu I., Vasile A. M., Barbu V., Râpeanu G., Bahrim G. E., and Stănciuc N. Widen the functionality of flavonoids from yellow onion skins through extraction and microencapsulation in whey proteins hydrolysates and different polymers. *J. Food Engineer.*, 251, 29 (2019). DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2019.02.003
- Celano R., Docimo T., Piccinelli A. L., Gazzerro P., Tucci M., Di Sanzo R., Carabetta S., Campone L., Russo M., and Rastrelli L. Onion peel: turning a food waste into a resource. *Antioxidants*, **10**, 304 (2021). DOI: 10.3390/antiox10020304
- Kumar M., Barbhai M., Hasan M., Dhumal S., Singh S., Pandiselvam R., Rais N., Natta S., Senapathy M., Sinha N., and Amarowicz R. Onion (*Allium cepa* L.) peel: A review on the extraction of bioactive compounds, its antioxidant potential, and its application as a functional food ingredient. *J. Food Sci.*, 87, 4289 (2022). DOI: 10.1111/1750-3841.16297
- Prodromidis P., Mourtzinos I., Biliaderis C., and Moschakis T. Stability of natural food colorants derived from onion leaf wastes. *Food Chem.*, **386**, 132750 (2022). DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132750
- Chadorshabi S., Hallaj-Nezhadi S., and Ghasempour Z. Red onion skin active ingredients, extraction and biological properties for functional food applications. *Food Chem.*, **386**, 132737 (2022). DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132737
- Yaqub A., Iqbal Z., Toyota T., Chaudhary N., Altaf A., Ahmad S., Majid M., and Liaqat L. Ultrasonic extraction of onion (*Allium cepa*) peel dye, its applications on silk fabric with bio-mordants and its antibacterial activity. *Clin. Med. Bio. Chem.*, 8 (6) (2020), https://www.researchgate.net/publication/348298070
- Celano R., Docimo T., Piccinelli A., Gazzerro P., Tucci M., Di Sanzo R., Carabetta S., Campone L., Russo M., and Rastrelli L. Onion peel: turning a food waste into a resource. *Antioxidants*, **10**, 304 (2021). DOI: 10.3390/antiox10020304
- Manzoor M., Singh J., Gani A., and Noor N. Valorization of natural colors as health-promoting bioactive compounds: phytochemical profile, extraction techniques, and pharmacological perspectives. *Food Chem.*, **362**, 130141 (2021).
 DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130141
- Pogorelov A. G., Gulin A. A., Pogorelova V. N., Panait A. I., Stankevich A. A., and Pogorelova M. A. Impact of a redox balance on polysaccharides in an aqueous solution. *Phys. Wave Phenomena*, **30**, 209 (2022).

DOI: 10.3103/S1541308X22030086

- Chemat F., Rombaut N., Sicaire A., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A., and Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.*, **34**, 540 (2017). DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035
- Benucci I., Lombardelli C., Mazzocchi C., and Esti M. Natural colorants from vegetable food waste: recovery, regulatory aspects, and stability – a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, **21**, 2715 (2022). DOI: 10.1111/1541-4337.12951
- Hu Y., Yan B., Chen Z., Wang L., Tang W., and Huang C. Recent technologies for the extraction and separation of polyphenols in different plants: a review. *J. Renewable Mater.*, **10**, 1472 (2022). DOI: 10.32604/jrm.2022.018811
- Yusoff I. M., Taher Z. M., Rahmat Z., and Chua L. S. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Res. Int.*, **157**, 111268 (2022). DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111268

- Kaur K., Mohammadpour R., Jaramillo I., Ghandehari H., Reilly C., Paine R., and Kelly K. Application of a quartz crystal microbalance to measure the mass concentration of combustion particle suspensions. *J. Aerosol Sci.*, **137**, 105445 (2019). DOI: 10.1016/j.jaerosci.2019.105445-105458
- Couturier G., Vatinel S., Boisgard R., Aimé J., and Chabli A. Quartz crystal microbalance and evaporation of sessile droplets. *J. Appl. Phys.*, **106**, 054906 (2009). DOI: 10.1063/1.3204661.
- Ren F., Nian Y., and Perussello C. Effect of storage, food processing and novel extraction technologies on onions flavonoid content: A review. *Food Res. Int.*, **132**, 108953 (2020). DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108953
- Benito-Román Ó., Blanco B., Sanz M., and Beltrán S. Freeze-dried extract from onion (*Allium cepa* cv. Horcal) skin wastes: Extraction intensification and flavonoids identification. *Food Bioproducts Processing*, **130**, 92 (2021). DOI: 10.1016/j.fbp.2021.09.005

Innovative Biophysical Approaches for Quercetin Extraction from Plant Cells

A.G. Pogorelov*, L.G. Ipatova*, A.I. Panait*, A.A. Stankevich*, A.K. Yunusova*, and V.N. Pogorelova*

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

The method for the extraction of quercetin from plant cells with the use of ultrasound in combination with metastable fraction from aqueous solution is proposed. The procedure enabled more efficient isolation of the cytoplasmic part due to etching and/or mechanical destruction of the cell membrane. The oxidized water fraction has the most pronounced extracting properties, but changes the properties of quercetin by oxidizing the chromophore part of the molecule. According to the criterion of pigment preservation, the best extraction solution is the reduced water fraction. To analyze the extract samples the following analytical methods were used: UV-Vis spectrometry, protein gel electrophoresis, ¹H-NMR spectrometry, and QCM weighing, as well as scanning electron microscopy.

Keywords: quercetin, electrochemically activated aqueous solution, ultrasonic extraction, UV-Vis spectrometry, protein gel electrophoresis, scanning electron microscopy

БЕСКОНТАКТНАЯ АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛ В ЖИДКОСТИ

© 2024 г. Т. Мамедов*, А. Швирст*, М.В. Федотова**, Г.Н. Чуев*, #

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

**Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Академическая ул., 1, Иваново, 153045, Россия

[#]E-mail: genchuev@rambler.ru Поступила в редакцию 18.03.2024 г. После доработки 02.07.2024 г. Принята к публикации 03.07.2024 г.

Бесконтактная атомно-силовая микроскопия, разновидность сканирующей зондовой микроскопии, в последние два десятилетия активно используется для изучения гидратированных биомолекул. В частности, как показывает анализ современной литературы, она является весьма перспективной в исследовании адсорбированных биомакромолекул и биомакромолекулярных комплексов на границе раздела фаз или на поверхности мембран. В настоящем мини-обзоре описываются основы данного метода, его применение для биомолекул, обсуждаются требования к методу и возможности его расширения за счет дополнительной обработки полученных экспериментальных данных с помощью теоретического анализа, молекулярного моделирования или машинного обучения.

Ключевые слова: гидратированные биомолекулы, бесконтактная атомно-силовая микроскопия, молекулярное моделирование, машинное обучение.

DOI: 10.31857/S0006302924040056, EDN: NHSYHJ

Сканирующая зондовая микроскопия является уникальным методом, позволяющим получать изображения поверхности и проводить изучение ее локальных свойств в широких диапазонах параметров состояния. Создание сканирующего зондового микроскопа [1] стало эпохальным событием и было удостоено Нобелевской премии, так как оно позволило получать эксклюзивные данные о структуре поверхности, молекулярных и атомарных особенностей адсорбированных молекул и агрегатов с очень высокой степенью разрешения. В свою очередь, атомно-силовая микроскопия (АСМ) является одним из перспективнаправлений сканирующей ных зондовой микроскопии, которая позволяет определять рельеф изучаемой поверхности с субнанометровым разрешением. Изначально метод был разработан для определения упругих деформаций зонда при силовом контакте с образцом, а возможности ди-

намического режима обсуждались сугубо теоретически [2]. Только спустя некоторое время, с начала двухтысячных, исследования поверхности в динамическом режиме обрели популярность и стали массовыми (см., напр., монографию [3]). Отметим, что для биологических систем динамический режим имеет определенные преимущества, так как позволяет проводить исследования в широком диапазоне параметров состояния при физиологических условиях. Особую роль для исследования биологических систем играют бесконтактный и полуконтактный режимы работы АСМ. При работе в этих режимах не оказывается разрушающего воздействия на образец. В отличие от рентгеноструктурного анализа бесконтактная АСМ (БАСМ) не требует кристаллизации образцов, а в отличие от ЯМР-спектроскопии – не имеет ограничений при исследовании биообъектов массой свыше 50 кДа. Так же, как и некоторые другие методы, используемые для изучения биологических объектов, например, электронная микроскопия, БАСМ не требует нанесения на поверхность проводящего материала, который часто деформирует образец. При этом БАСМ имеет ряд преимуществ перед электронной микроскопией. Например, с его помощью допускается работа как в воздухе, так и в жидко-

Сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия, БАСМ – бесконтактная атомно-силовая микроскопия, ЧМ – частотная модуляция, ЭМП – электронно-механический привод, КСР – кривая «сила-расстояние», теория ДЛФО – теория Дерягина–Ландау–Фервея–Овербека, STA – simple tip approximation, MDFF – молекулярная динамика с дополнительной подгонкой (molecular dynamics flexible fitting).

стях. В последнем случае возможно проводить исследования при физиологических условиях (pH, температура, физиологические концентрации ионов и т.д.). Тем не менее, при использовании БАСМ важно учитывать и ограничения метода. Существует довольно большое число обзоров, посвященных применению метода АСМ для исследования биологических систем (см., например, обзор [4]). Но все они, как правило, посвящены экспериментальным особенностям проведения АСМ экспериментов с биообъектами, описывают детали приготовления образцов, нанесения их на подложку, а также детали проведения спектроскопических измерений или получения изображений биомакромолекул.

В отличие от этих монографий, в данном мини-обзоре будут описаны не только основы метода БАСМ, возможности его применения для биомолекул, но и обсуждены требования и возможности расширения метода за счет дополнительной обработки полученных экспериментальных данных с помощью моделирования. Кратко будет изложено не только то, что можно наблюдать и измерять с помощью БАСМ, а также какие возможности дает комбинация этих экспериментальных данных с моделированием и методами машинного обучения. В части 1 приведено описание экспериментальной установки для проведения БАСМ. Ряд иллюстративных примеров по визуализации белков, ДНК, вирусов представлен в части 2. В части 3 кратко описаны основные теоретические и численные подходы для моделирования данных, полученных с помощью БАСМ, и возможности обработки этих данных с использованием методов машинного обучения.

1. ОПИСАНИЕ МЕТОДА АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Существует довольно большое разнообразие экспериментальных установок для проведения БАСМ. Сюда входят как различные модификации измерения разницы потенциалов между зондом и образцом, так и установки для определения силового взаимодействия. Последние можно разделить на два основных типа — с частотной и амплитудной модуляцией. В работе АСМ выделяют три основных режима работы: контактный, полуконтактный и бесконтактный режимы. На рис. 1 показаны области работы трех режимов.

В контактном режиме определяются механические деформации биообъекта, а в полуконтактном и бесконтактном — изменение частоты или амплитуды колебаний зонда, так как зонд не касается образца. Полуконтактный или бесконтактный режимы работы — это динамический режим работы. Как в контактном, так и в бесконтактном режиме можно водить зонд как в латеральном, так и в вертикальном направлении.



Рис. 1. Схема работы АСМ и характерная кривая «сила–расстояние», на которой показаны области применения режимов: контактный (синие символы), полуконтактный (желтые символы) и бесконтактный (красные символы) режимы.

Мы здесь опишем установку с частотной модуляцией (ЧМ). Детали описания других установок, включая различные комбинации БАСМ с туннельной и сканирующей микроскопией, можно найти в работе [5]. Общий вид ЧМ-БАСМ установки представлен на рис. 2.

Сама установка включает электронно-механический привод (ЭМП), к которому крепится упругая консоль (кантилевер). На конце кантилевера крепится ультратонкий нанозонд с характерными размерами закругления 1-50 нм. Характерный коэффициент жесткости зонда варьируется в пределах 10⁻³-10 Н/м. У самого кантилевера имеется светоотражающая панель, на которую подается сигнал от лазерного диода. Кантилевер подвергается периодическому механическому возмущению с постоянной амплитудой. После того, как сигнал поступает на фотодетектор, он усиливается и далее поступает в систему автоматического управления сигналом, работающую в системе обратной связи, и в электронный блок для сравнения с предыдущим значением сигнала. Система автоматического управления сигналом включает предварительный усилитель, автоматическую регулировку усиления и пропорциональный интегрально-дифференциальный регулятор. После фотодетектора сигнал поступает на предварительный усилитель, который необходим для того, чтобы увеличить уровень сигнала для достаточной обработки. Автоматическая регулировка усиления требуется для поддержки выходного сигнала с постоянной амплитудой с помощью



Рис. 2. Схема установки ЧМ-БАСМ. ПУ – предварительный усилитель, АРС – автоматическая регулировка усиления, ЛД – лазерный диод, ФД – фотодетектор, ФАПЧ – фазовая автоподстройка частоты, ПИД – пропорциональный интегральный дифференциальный регулятор, ЭМП – электронно-механический привод. Адаптировано с разрешения из [Т. Fukuma, Y. Ueda, Sh. Yoshioka, and H. Asakawa, Phys. Rev. Lett. 104, 016101, 2010]. Copyright (2010) American Physical Society.

электронного усилителя с автоматической поддержкой. Пропорциональный интегрально-дифференциальный регулятор представляет собой устройство в управляющем контуре с обратной связью, которое необходимо для того, чтобы формировать управляющий сигнал. Это происходит следующим образом: сигнал поступает на компаратор, где сравнивается с заранее выборным значением. Таким образом, мы получаем сигнал ошибки и подаем его на ЭМП.

Суть работы БАСМ заключается в следующем. При движении ЭМП над образцом меняется сила, действующая на кантилевер со стороны образца, что, в свою очередь, приводит к сдвигу частотного отклика сигнала, который регистрируется фотодетектором. Измеряя этот сдвиг, можно определить изменение силы, действующей на нанозонд. В динамическом режиме работы кантилевер при сканировании образца совершает колебания, близкие к резонансу. Примеры изменения силы и частоты показаны на рис. 3 [6], а именно, результаты измерений в контактном (а, б) и бесконтактных (в, г) режимах. Режим (а, в) – это регистрация латеральной силы, которая позволяет создавать двумерное изображение образца, режим (б, г) – это регистрация кривых «сила-расстояние» (КСР).

Отметим также важную особенность проведения ЧМ-БАСМ в жидкости. На рис. 4 показано сравнение КСР в воде и в воздухе [7].

Причина этих различий — высокая вязкость жидкости, в результате чего можно существенно изменить частоту колебаний нанозонда. С учетом того, что резонансная кривая в жидкости за счет сил вязкости в десятки раз уже, чем в воздухе, характерный масштаб регистрируемых сил можно снизить до пиконьютонов, а характерное разрешение можно увеличить до долей нанометра.

2. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАСМ ДЛЯ БИОМОЛЕКУЛ

Изучение ДНК. Исследованию ДНК, адсорбированной на различных подложках. посвяшено довольно большое число работ (см., например, работы [8-11]). Это достаточно удобный объект для изучения, что обусловлено двумя факторами. Во-первых, это простота нанесения ДНК на подложку, что обусловлено высокой адгезией ДНК к полярным и слабозаряженным подложкам. Вовторых, большая длина ДНК и специфичность ее конформации позволяют легко отличить ДНК в процессе визуализации от любых других адсорбированных примесей или комплексов. В качестве примера приведем работу [8], в которой исследователи визуализировали ДНК и распределение заряда на поверхности ДНК (рис. 5). Заметим, что БАСМ позволяет определить не только тип конформации ДНК (рис. 5), но и детали гидратации ее различных участков. Так, на рис. 5б показано отличие профиля ДНК в В- и Z-конформациях, а на рис. 5д темные участки на ДНК соответствуют повышенной плотности воды в большом желобе ДНК.

Авторами работы [9] было обнаружено, что наиболее высокой плотностью гидратная оболочка ДНК обладает вблизи желобков ДНК. Использование специального протокола экспериментов, позволяющего получать конформации адсорбированной ДНК с аномально высокой длиной персистенции [10], также дает возможность визуализировать не только саму ДНК, но и образование комплексов «ДНК-белок» [10]. Помимо визуализации, БАСМ позволяет оценить отдельные молекулярные характеристики. Например, авторы работы [11] определили среднюю плотность поверхностного заряда ДНК на основе анализа КСР. Используя аналитическое решение уравнения Пуассона-Больцмана и эмпирические оценки заряда зонда, они нашли, что эта плотность составляет порядка 0.11 Кл·м⁻². Авторам работы [8] удалось определить, что распределение заряда на ДНК достаточно неоднородно и зависит как от растворителя, так и от конформации ДНК. Для


Расстояние

Разделение

Рис. 3. Принцип регистрации кривых: (а) – типичная квазистатическая кривая боковой силы, (б) – типичная квазистатическая кривая (СР), (в) – типичная кривая динамической боковой силы, (г) – типичная динамическая кривая (СР). Воспроизведено из работы [6] с разрешения издательства John Wiley & Sons, Inc. (2022).



Рис. 4. Кривые «сила–расстояние» в воздухе (а) и в жидкостях (б). Воспроизведено из работы [7] с разрешения издательства John Wiley & Sons, Inc. (2012).

Z- и B-форм они определили, что эта плотность составляет 0.116 и 0.163 $\text{Kn} \cdot \text{m}^{-2}$ соответственно.

Получение изображения хромосом. Другим интересным объектом приложения БАСМ является визуализация хромосом. Так, авторы работы [12], используя метод полуконтактной АСМ, получили их изображения (рис. 6). Кроме того, они смоделировали аналогичные изображения на основе данных кривых «расстояние—сила» и упрощенных моделей хромосомы как полимерной цепочки, а зонда — как незаряженной сферической частицы. Сравнение полученных результатов показывает удивительное совпадение изображений (рис. 6).



Рис. 5. В-ДНК и Z-ДНК, исследованные с помощью БАСМ: (а) – изображение плазмидной В- и Z-ДНК в 50 мМ растворе NiCl₂; (б) – усредненный профиль поперечного сечения вдоль линии A–B; (в) – увеличенное изображение области, обозначенной белым сплошным прямоугольником; (г) – усредненный профиль поперечного сечения вдоль оси спирали ДНК; (д) – увеличенное изображение области, обозначенной белым прямоугольником; (е) – усредненный профиль поперечного сечения вдоль оси спирали ДНК. Адаптировано из работы [8] с разрешения издательства Springer Nature (2019).

Гидратированные мембранные белки. Метод БАСМ обладает столь высокой степенью разрешения, что позволяет определять не только конформацию гидратированных биомолекул, но и структурные особенности их гидратации. В работе [13] методом атомно-силовой микроскопии были изучены молекулы воды, связанные со структурированными мембранными белками (рис. 7). Авторы проводили изучение молекулярной структуры гидратированных нативных мембранных участков, состоящих из белков протонной помпы. На рис. 7 показаны БАСМ-изображения трансмембранных белков как в поперечном, так и в продольном сечениях.

Можно отчетливо различить как тримеры белков, так и структуру гидратной оболочки белков. Полезно сопоставить эти данные (рис. 7а,б) с молекулярной структурой тримера (рис. 7г). Видно, что БАСМ позволяет визуализировать особенности структуры гидратной оболочки и определить влияние молекулярной организации образца (белкового тримера) на распределение молекул воды.

Другим ярким примером является определение распределения электрического поля, создаваемого белками в трансмембранном канале [14]. Для этого авторы использовали изображения



Рис. 6. (а) — Модель и АСМ-изображения хромосомы, (б) — увеличенное изображение выделенных квадратами областей. Адаптировано с разрешения из [12]. Copyright (2019) American Chemical Society.

тримера нативного порина OmpF с разрешением 0.5 и 0.1 нм по горизонтали и вертикали соответственно (см. рис. 3 из работы [14]). Используя полученные данные о структуре белков и параметризируя заряд атомов на основе силового поля СНАRMM [15], авторы рассчитали электростатический потенциал, создаваемый белками. Численное моделирование показало [14], что измерения воспроизводятся с высокой степенью точности при включении в расчеты АСМ-зонда. Мы



Рис. 7. БАСМ-изображения трансмембранных белков. (а) и (б) – Двумерные изображения цитоплазматической стороны мембраны, включающей трансмембранные белковые тримеры. Последние выделены белыми кружками; (а) – расстояние между зондом и мембраной 0.8 нм, (б) – 1.5 нм. (в) – Двумерное изображение КСР; (г) – молекулярная структура тримера. Адаптировано с разрешения из работы [13]. Copyright (2022) American Chemical Society.



Рис. 8. Внутренний (Q_{in}) и внешний (Q_{out}) заряды аденовируса (а) и капсида МVМ (б), полученные путем БАСМ. Адаптировано из работы [16] с разрешения издательства RCS Pub (2015).

считаем, что этот метод открывает новые возможности для изучения электростатического потенциала поверхностей нативных белков.

Исследование электростатики вируса. Еще одним ярким примером использования БАСМ являются исследования вирусов и их вирусных оболочек. Адсорбированные на подложке вирусы, будучи достаточно большими объектами, легко идентифицируются с помощью БАСМ, и их визуализация не представляет большого труда (рис. 8). Как и для ДНК, для вирусов разработана методика измерения распределения электростатического поля на основе КСР. В работе [16] для изучения зарядов отдельных вирусов в жидкой среде измеряли электростатическую силу между вирусной частицей и зондом атомно-силового микроскопа. Данные силовой спектроскопии адсорбированных головок бактериофага ф29 и зрелых вирионов и аденовируса были использованы

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

для получения изображений плотности заряда каждого вируса. Было установлено, что различия в плотности заряда между вирусными частицами согласуются с теоретическими оценками, полученными на основе рентгеноструктурных данных о структуре вирусов. Следует отметить, что метод АСМ позволяет определить не только полный заряд вируса, но и распределение заряда на поверхности вирусных оболочек. Для этого авторы работы [17] использовали нанозонд, функционализированный либо заряженной (NH3⁺), либо гидрофобной (CH₃) группой. Измеряя взаимодействия между зондом и вирусом и определяя разницу между этими взаимодействиями для указанных двух типов зондов, авторы смогли определить и построить 3D-картину распределения гидрофобных и заряженных участков на поверхности капсида вирусов. Заряд рассчитывали при нейтральном рН, включая только аминокислоты внутри внутренней поверхности вируса. Поскольку эти поверхности не определены однозначно, их соответствующий радиус R_{in} (R_{out}) варыруется, что приводит к разным значениям внутреннего (красного) и внешнего (синего) общего заряда (рис. 8).

Полный заряд определялся как сумма двух этих зарядов. Радиус внутренней и внешней поверхности варьировали от их значений на полуширине полной ширины (FWHM) распределения массовой плотности капсидов: $R_{\rm in} = 34.3$ нм, $R_{\rm out} = 42.4$ нм для аденовируса и $R_{\rm in} = 7.79$ нм, $R_{\rm out} = 12.5$ нм для MVM. Метод оказался настолько точным, что удалось также определить разницу в распределении зарядов в случае замены заполненной оболочки на пустой капсид [17].

3. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ И МОДЕЛИРОВАНИЕ

Аналитические оценки. Как было показано выше, в большинстве случае при исследовании биомолекул методом БАСМ, удается либо визуализировать биомолекулы на подложке, либо получить двумерные или трехмерные КСР. Однако для количественной оценки последних необходимо проводить теоретические расчеты. Наиболее популярным подходом для таких оценок является теория Дерягина-Ландау-Фервея-Овербека (ДЛФО) [18] или ее расширенная версия [19], которая часто используется для оценки стабильности коллоидных систем. В рамках этой теории предполагается, что сила взаимодействия F_{tot} двух коллоидных наночастиц включает три основных вклада:

$$F_{\text{tot}} = F_{\text{edl}} + F_{\text{vdw}} + F_{\text{NDLVO}},\tag{1}$$

где первый член - сила электростатического взаимодействия, второй вклад обусловлен ван-дерваальсовыми взаимодействиями, а последний вклад рассматривается лишь в расширенной версии (ДЛФО) и учитывает все прочие типы взаимодействий. Первый вклад можно рассчитать путем численного решения уравнения Пуассона-Больцмана. Этот вклад определяется через поверхностный потенциал и зависит от ионной силы раствора. Во многих случаях вместо поверхностного потенциала используют электрокинетический потенциал наночастиц (дзетапотенциал) [20], так как последний может быть измерен экспериментально. В случаях, когда заряд распределен равномерно по поверхности, а геометрия взаимодействующих объектов достаточно проста (например, «плоскость-плоскость», «сфера-плоскость» или «сфера-сфера») возможна аналитическая оценка этого вклада. Аналогичные оценки можно получить и для вклада ван-дер-Ваальса *F*_{vdw}. Примеры таких оценок даны в работах [20, 21]. Последний вклад (F_{NDLVO}) может включать различные типы взаимодействий, обусловленные сольватационными, поляризационными и стерическими эффектами. Как правило, оценка этого вклада является эмпирической и аппроксимируется экспоненциальной зависимостью от расстояния [22]. Заметим, что на расстояниях, превышающих 5-10 нм, последними двумя вкладами в выражении (1) можно пренебречь, тогда задача редуцируется к оценке энергии электростатических взаимодействий. В случае, когда плотность поверхностного заряда биомолекулы на порядок и более превышает аналогичную зарядовую плотность нанозонда, оценку плотности поверхностного заряда можно получить путем сравнения выражения (1) с экспериментальными данными КСР [8]. Однако в общем случае для оценки плотности поверхностного заряда биомолекул требуются данные о распределении заряда на поверхности зонда. Для этого проводятся дополнительные эксперименты, которые позволяют оценить этот заряд [23, 24].

Заметим, что, хотя теория ДЛФО и позволяет оценить ряд характеристик биомолекул, многие ее положения (например, о равномерном распределении заряда на поверхности, описании жидкости как бесструктурной полярной среды и т.д.) игнорируют большое число аспектов, связанных с молекулярной структурой, как жидкости, так и взаимодействующих нанообъектов.

Оценки, полученные с помощью приближенных уравнений молекулярных жидкостей. Альтернативой теории ДЛФО являются методы теории жидкостей, основанные на аппарате функций распределения, поскольку они учитывают детальную молекулярную структуру биомолекулы и нанозонда, а также рассматривают жидкость как статистическое распределение частиц (атомов, молекул или ионов). В этом случае сила взаимодействия $F(R\Omega)$ между нанозондом и биомолекулой, определяется как производная от потенциала средней силы $W(R\Omega)$:

$$F(R\Omega) = -\frac{dW(R\Omega)}{dR}.$$
 (2)

В свою очередь, потенциал средней силы $W(R\Omega)$ можно разделить на два вклада: $U(R\Omega)$ – потенциал прямого взаимодействия между зондом и биомолекулой и избыточный химический потенциал $\Delta A(R\Omega)$, определяемый работой, которую надо выполнить, чтобы переместить зонд из бесконечности в положение, которое характеризуется как координатами R, так и относительной ориентацией зонда Ω :

$$W(R\Omega) = U(R\Omega) + \Delta A(R\Omega).$$
(3)

В общем случае для определения $W(R\Omega)$, как и для $\Delta A(R\Omega)$, необходим расчет бинарной функ-



Рис. 9. Двумерное изображение КСР на неоднородной и однородной гидратированных подложках. Слева схематически показаны молекулярные структуры соответствующих подложек. Адаптировано с разрешения из работы [М. Harada and M. Tsukada, Phys. Rev. B., **82**, 035414 (2010)]. Copyright (2010) American Physical Society.

ции распределения на основе теории интегральных уравнений жидкости [25–37], что требует очень больших вычислительных ресурсов из-за наноскопических размеров биокомплекса и зонда. Поэтому для оценки (3) обычно используют два дополнительных приближения. Избыточный химический потенциал $\Delta A(R\Omega)$ считают в приближении бесконечного разбавления и выражают через атомные плотности $\rho_i(\mathbf{r})$, определяя распределение *i*-х атомов молекул растворителя (*s*) вокруг растворенного вещества:

$$\boldsymbol{p}_{i}(\mathbf{r}) = \sum_{s=1}^{N} \delta(\mathbf{r} - \boldsymbol{x}_{si}), \qquad (4)$$

где N — общее число молекул растворителя, x_{si} — их мгновенные положения.

В результате $\Delta A(R\Omega)$ определится как:

$$\Delta A(R\Omega) = -\sum_{iJ} \iint \rho_i(r_1) X_{ij}^{-1}(|r_1 - r_2|) \rho_j(R - r_2, \Omega) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2,$$
(5)

где $X(\mathbf{r})$ — обобщенная восприимчивость чистого раствора. В свою очередь, эти атомные плотности могут быть вычислены путем решения системы нелинейных интегральных уравнений (см. детали в работе [38]) на основе модели взаимодействующих силовых центров (RISM) [39–41]. В качестве примера таких расчетов приведем работу [42]. В этой работе были смоделированы КСР и силовые карты измерений атомно-силовой микроскопии для гипотетических наноструктур в водной среде с использованием метода 3D-RISM (рис. 9).

Исследователями были выявлены различные особенности силы взаимодействия. Например, было показано, что направления сил в жидкости противоположно направлению сил в вакууме. На основании этих особенностей и распределения величины плотности воды по периферии наноструктур, полученного с помощью теории 3D-RISM, была обнаружена тесная корреляция между свободной энергией системы и распределением плотности воды вокруг нанозонда. Отметим,

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

что, хотя метод 3D-RISM позволяет достаточно эффективно оценивать $F(R\Omega)$ в зависимости от состава растворителя, он требует в качестве входных параметров данные о молекулярной структуре как биомолекулы, так и нанозонда. Однако для последнего структура чаще всего неизвестна.

Применение метода молекулярной динамики. Другим примером моделирования кривых «силарасстояние» является использование метода молекулярной динамики. Как уже было указано выше, для расчета сил взаимодействия необходимо явное определение молекулярной структуры и силовых параметров для нанозонда. Однако в самой простой версии (simple tip approximation – STA) в качестве нанозонда можно рассматривать саму молекулу растворителя. В этом случае задача существенно упрощается и сводится к расчету функции распределения молекул растворителя, а сила определяется как [43]:



Рис. 10. Экспериментальные и рассчитанные КСР, определенные по положению Са на границе раздела «флюоритвода». Адаптировано из работы [44] с разрешения издательства RCS Pub (2016).

$$F(R) = -kT \frac{d \ln \frac{\rho_o(R)}{\rho}}{dR},$$
 (6)

где $\rho_0(R)$ — функция распределения атомов кислорода, ρ — средняя плотность воды. В отличие от расчетов по формуле (2) расчеты в приближении STA в десятки раз менее затратны, так как расчеты по формуле (2) требуют термодинамического интегрирования. В работе [44] проведено сравнение сил взаимодействия, полученное как по формуле (2), так и по формуле (6). Расчеты проводили для нанозонда, расположенного на границе раздела неорганического минерала (флюорита) и воды (рис. 10). На рис. 10 показано также сравнение с экспериментальными данными.

Хотя приведенные расчеты показывают хорошую корреляцию, существуют физические причины наблюдаемых расхождений между STA и экспериментом. Это связано с тем, что модель STA не рассматривает реальный зонд и, как следствие, не рассматривает образование гидратной структуры вокруг зонда. Последний может существенно искажать гидратную структуру образца, а интерференция этих гидратных структур усиливается по мере уменьшения расстояния между зондом и образцом.

Моделирование для улучшения качества изображений. Моделирование также активно используется для улучшения качества ACM-изображения. Одним из способов улучшения является молекулярная динамика с дополнительной подгонкой (molecular dynamics flexible fitting – MDFF) [45]. Это расширение метода молекулярной динамики, в котором для определения равновесной структуры в потенциальную энергию взаимодействия, определяемую стандартными силовыми параметрами, добавляется дополнительный потенциал, который учитывает экспериментальные данные. Для этого вводится дополнительный потенциал $V_{\rm AFM}$, который учитывает разницу между

моделированием и экспериментом (детали см. в [46]). В работе [46], где исследовался миозин, меняющий свое химическое состояние, было определено конформационно отличное состояние для каждого АСМ-изображения миозина, связанного с актиновой нитью, в двух конформационных состояниях «вниз-вверх» и «вниз-вниз». Затем для ранее полученного АСМ-изображения миозина. связанного с актиновой нитью, исследователи выполнили MDFF-моделирование. Сравнивая результаты подгонки, они сделали вывод о его конформационном и химическом состояниях по АСМ-изображению. На рис. 11 представлено сравнение изображения и моделирования с гибкой подгонкой, из которого можно сделать вывод, что метод MDFF может давать существенное увеличение разрешения изображений в том случае, если конформационные изменения при наложении на АСМ-изображения относительно невелики или выбор таких изменений заранее предопределен.

Другим широко распространенным методом обработки ACM-изображений является подход на основе сверточных нейронных сетей [47]. Идея последних заключается в комбинации сверточных и субдискретизирующих слоев. Как правило, для обучения используется метод обратного распространения ошибки. Заметим, что этот метод очень часто используется для распознавания изображений. Примеры использования этого метода для улучшения качества ACM-изображений представлены в работе [48]. Однако до сих пор применение метода ограничивается изображениями очень небольших молекул, так как с увеличением числа атомов вариабельность конформаций резко возрастает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном обзоре кратко рассмотрены возможности БАСМ для исследования биологи-



Рис. 11. MDFF-моделирование актин-миозинового комплекса в состоянии «вниз-вверх». (а) – Экспериментальное изображение, используемое в качестве эталона (масштабная линейка – 10 нм, цветовая полоса в нм). (б) – Временная зависимость изменения сходства между эталоном и результатами моделирования для десяти независимых запусков моделирования. Траектория, включающая наибольшее значение, окрашена в красный цвет. (в) – АСМ-изображение с наибольшим сходством. (г) – Молекулярная модель структуры актин-миозинового комплекса, с наибольшим сходством наложенная на эталон. Воспроизведено из работы [46] с разрешения издательства Frontiers Media S.A. (2022).

ческих образцов. Приведенные примеры показывают, что БАСМ является эффективным методом лля исследования адсорбированных биомакромолекул и биомакромолекулярных комплексов на границе раздела фаз или на поверхности мембраны. По существу, у метода нет ограничений по объектам: это могут быть как небольшие биомолекулы (олигопептиды), так и комплексы, включающие миллионы атомов (вирусы и вирусные оболочки). Основное достоинство метода в том, что он является неразрушающим и позволяет исследовать биологические образцы при физиологических условиях (температура, pH, концентрация ионов и т.д.). При этом метод обеспечивает субнанометровое разрешение не только для самих образцов, но и структуры гидратной оболочки биомолекулы. В определенных случаях (например, для сильнозаряженных объектов) с помощью БАСМ можно получить не только изображение образца с субнанометровым разрешением, но и определить его отдельные характе-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

ристики (распределение заряда по поверхности, гидрофильность или гидрофобность той или иной аминогруппы и т.д.). Для дальнейшего развития этого метода требуется интеграция БАСМ с различными методами моделирования и машинного обучения. Однако количество таких работ пока невелико. В первую очередь, проблемой является отсутствие информации о детальной молекулярной структуре зонда. Во-вторых, существуют проблемы с наноскопическими размерами как образцов, так и АСМ зонда, что приводит к тому, что моделирование этих объектов с учетом всех атомных деталей чрезвычайно затратно. Поэтому особую роль в моделировании БАСМ должны играть как приближенные теории (ДЛФО, 3D-RISM), так и методы машинного обучения. Обсужденные выше примеры показывают, что удачная комбинация БАСМ с этими подходами является скорее искусством, чем универсальным способом, тем не менее, перспективность этого направления не вызывает сомнений.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Binnig G. and Rohrer H. Scanning tunneling microscopy. *Helvetica Phys. Acta*, **55**, 726–735 (1982).
- Binnig G., Quate C. F., and Gerber C. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, **56** (9), 930–933 (1986). DOI: 10.1103/PhysRevLett.56.930
- García R., Amplitude modulation atomic force microscopy (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2010). DOI: 10.1002/9783527632183
- Morris V. J., Kirby A. R., and Gunning A. P. *Atomic force microscopy for biologists* (Imperial College Press, 2009).
- Melitz W., Shen J., Kummel A. C., and Lee S. Kelvin probe force microscopy and its application. *Surface Sci. Rep.*, 66 (1), 1–27 (2011). DOI: 10.1016/j.surfrep.2010.10.001
- Chen X., Li B., Liao Z., Li J., Li X., Yin J., and Guo W. Principles and applications of liquid-environment atomic force microscopy. *Adv. Mater. Interfaces*, 9 (35), 2201864 (2022). DOI: 10.1002/admi.202201864
- Baro A. M. and Reifenberger R. G. Atomic force microscopy in liquid (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2012). DOI: 10.1002/9783527649808
- Kominami H., Kobayashi K., and Yamada H. Molecular-scale visualization and surface charge density measurement of Z-DNA in aqueous solution. *Sci. Rep.*, 9, 6851 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-42394-5
- Kuchuk K. and Sivan U. Hydration structure of a single DNA molecule revealed by frequency-modulation atomic force microscopy. *Nano Lett.*, **18** (4), 2733– 2737 (2018). DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b00854
- Heenan P. R. and Perkins T. T. Imaging DNA Equilibrated onto mica in liquid using biochemically relevant deposition conditions. *ACS Nano*, **13** (4), 4220–4229 (2019). DOI: 10.1021/acsnano.8b09234
- Sotres J. and Baró A. M. AFM imaging and analysis of electrostatic double layer forces on single DNA molecules. *Biophys. J.*, **98** (9), 1995–2004 (2010). DOI: 10.1016/j.bpj.2009.12.4330
- Sumikama T., Foster A. S., and Fukuma T. Computed atomic force microscopy images of chromosomes by calculating forces with oscillating probes. *J. Phys. Chem. C.*, **124** (3), 2213–2218 (2020). DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b10263
- Ido S., Kobayashi K., Oyabu N., Hirata Y., Matsushige K., and Yamada H. Structured water molecules on membrane proteins resolved by atomic force

microscopy. *Nano Lett.*, **22** (6), 2391–2397 (2022). DOI: 10.1021/acs.nanolett.2c00029

- Philippsen A., Im W., Engel A., Schirmer T., Roux B., and Müller D. J. Imaging the electrostatic potential of transmembrane channels: atomic probe microscopy of OmpF porin. *Biophys. J.*, 82 (3), 1667–1676 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75517-3
- MacKerell A. D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D. T., Prodhom B., Reiher W. E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J. C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiórkiewicz-Kuczera J., Yin D., and Karplus M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B.*, **102** (18), 3586–3616 (1998). DOI: 10.1021/jp973084f
- Hernando-Pérez M., Cartagena-Rivera A. X., Lošdorfer Božič A., Carrillo P. J., San Martín C., Mateu M. G., Raman A., Podgornik R., and Pablo P. Quantitative nanoscale electrostatics of viruses. *J. Nanoscale*, 7 (41), 17289–17298 (2015). DOI: 10.1039/C5NR04274G
- Heldt C. L., Areo O., Joshi P. U., Mi X., Ivanova Y., and Berrill A. Empty and full AAV capsid charge and hydrophobicity differences measured with single-particle AFM. *Langmuir*, **39** (16), 5641–5648 (2023). DOI: 10.1021/acs.langmuir.2c02643
- 18. Дерягин Б. В., Чураев Н. В., и Муллер В. М. Поверхностные силы (Наука, М., 1985).
- van Oss C. J. The extended DLVO theory. *Interface Sci. Technol.*, **16**, 31–48 (2008). DOI: 10.1016/S1573-4285(08)00203-2
- Sharma P. K. and Hanumantha R. K. Adhesion of paenibacillus polymyxa on chalcopyrite and pyrite: surface thermodynamics and extended DLVO theory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **29** (1), 21–38 (2003). DOI: 10.1016/S0927-7765(02)00180-7
- Liang Y., Hilal N., Langston P., and Starov V. Interaction forces between colloidal particles in liquid: theory and experiment. *J. Adv. Colloid Interface Sci.*, 134–135, 151–166 (2007). DOI: 10.1016/j.cis.2007.04.003
- Klaassen A., Liu F., Mugele F., and Siretanu I. Correlation between electrostatic and hydration forces on silica and gibbsite surfaces: an atomic force microscopy study. *Langmuir*, **38** (3), 914–926 (2022). DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c02077
- Li L., Eppell S., and Zypman F. Method to quantify nanoscale surface charge in liquid with atomic force microscopy. *Langmuir*, 36 (15), 4123–4134 (2020). DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b03602
- Li L., Steinmetz N., Eppell S., and Zypman F. Charge calibration standard for atomic force microscope tips in liquids. *Langmuir*, 36 (45), 13621–13632 (2020). DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c02455
- Blum L. J. Invariant Expansion for two-body correlations: thermodynamic functions, scattering, and the Ornstein–Zernike equation. J. Chem. Phys., 56, 303–310 (1972). DOI: 10.1063/1.1676864

- Ikeguchi M. and Doi J. Direct numerical solution of the Ornstein–Zernike integral equation and spatial distribution of water around hydrophobic molecules. *J. Chem. Phys.*, **103** (12), 5011–5017 (1995). DOI: 10.1063/1.470587
- Ishizuka R. and Yoshida N. Extended molecular Ornstein–Zernike integral equation for fully anisotropic solute molecules: formulation in a rectangular coordinate system. *J. Chem. Phys.*, **139** (8), 084119 (2013). DOI: 10.1063/1.4819211
- Fedotova M. V. and Kruchinin S. E. Ion-binding of glycine zwitterion with inorganic ions in biologically relevant aqueous electrolyte solutions. *Biophys. Chem.*, **190–191**, 25–31 (2014). DOI: 10.1016/j.bpc.2014.04.001
- Dmitrieva O. A. and Fedotova M. V. Characterization of selective binding of biologically relevant inorganic ions with the proline zwitterion by 3D-RISM theory. *New J. Chem.*, **39** (11), 8594–8601 (2015). DOI: 10.1039/C5NJ01559F
- Fedotova M. V. and Dmitrieva O. A. Proline hydration at low temperatures: its role in the protection of cell from freeze-induced stress. *Amino Acids*, 48 (7), 1685– 1694 (2016). DOI: 10.1007/s00726-016-2232-1
- Fedotova M. V., Kruchinin S. E., and Chuev G. N. Hydration structure of osmolyte TMAO: concentration/pressure-induced response. *New J. Chem.*, 41 (3), 1219–1228 (2017). DOI: 10.1039/C6NJ03296F
- Fedotova M. V. and Kruchinin S. E. Hydration and ion-binding of glycine betaine: How they may be involved into protection of proteins under abiotic stresses. *J. Mol. Liq.*, **244**, 489–498 (2017). DOI: 10.1016/j.molliq.2017.08.117
- Fedotova M. V. Compatible osmolytes bioprotectants: Is there a common link between their hydration and their protective action under abiotic stresses? *J. Mol. Liq.*, **292**, 111339 (2019). DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111339
- Fedotova M. V., Kruchinin S. E., and Chuev G. N. Hydration features of the neurotransmitter acetylcholine. *J. Mol. Liq.*, **304**, 112757 (2020). DOI: 10.1016/j.molliq.2020.112757
- 35. Kumawat N., Tucs A., Bera S., Chuev G. N., Valiev M., Fedotova M. V., Kruchinin S. E., Tsuda K., Sljoka A., and Chakraborty A. Site density functional theory and structural bioinformatics analysis of the SARS-CoV spike protein and hACE2 complex. *Molecules*, 27 (3), 799 (2022). DOI: 10.3390/molecules27030799
- Kruchinin S. E., Kislinskaya E. E., Chuev G. N., and Fedotova M. V. Protein 3D hydration: a case of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (23), 14785 (2022). DOI: 10.3390/ijms232314785
- Kruchinin S. E., Chuev G. N., and Fedotova M. V. Molecular insight on hydration of protein tyrosine phosphatase 1B and its complexes with ligands. *J. Mol. Liq.*, **384**, 122281 (2023). DOI: 10.1016/j.molliq.2023.122281

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

- Кручинин С. Е., Федотова М. В., Кислинская Е. Е. и Чуев Г. Н. *In silico* исследование сольватационных эффектов в растворах биомолекул: возможности подхода, основанного на 3D-распределении атомной плотности растворителя. *Биофизика*, 68 (5), 837–849 (2023).
 DOI: 10.31857/S0006302923050010
- Chandler D. and Andersen H. C. Optimized cluster expansions for classical fluids. II. Theory of molecular liquids. *J. Chem. Phys.*, 57 (5), 1930 (1972). DOI: 10.1063/1.1678513
- Hirata F., Rossky P. J., and Pettitt B. M. The interionic potential of mean force in a molecular polar solvent from an extended RISM equation. *J. Chem. Phys.*, **78** (6), 4133–4144 (1983). DOI: 10.1063/1.445090
- Perkyns J. and Pettitt B. M. A site-site theory for finite concentration saline solutions. J. Chem. Phys., 97 (10), 7656-7666 (1992). DOI: 10.1063/1.463485
- 42. Harada M. and Tsukada M. Tip-sample interaction force mediated by water molecules for AFM in water: Three-dimensional reference interaction site model theory. *J. Physical Review B.*, **82** (3), 035414 (2010). DOI: 10.1103/PhysRevB.82.035414
- Watkins M. and Reischl B. A simple approximation for forces exerted on an AFM tip in liquid. J. Chem. Phys., 138 (15), 154703 (2013). DOI: 10.1063/1.4800770
- 44. Miyazawa K., Kobayashi N., Watkins M., Shluger A., Amano K., and Fukuma T. A relationship between three-dimensional surface hydration structures and force distribution measured by atomic force microscopy. *J. Nanoscale*, **8**, 7334–7342 (2016). DOI: 10.1039/C5NR08092D
- Trabuco L. G., Villa E., Mitra K., Frank J., and Schulten K. Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *J. Structure*, **16** (5), 673–683 (2008). DOI: 10.1016/j.str.2008.03.005
- 46. Fuchigami S. and Takada S. Inferring conformational state of myosin motor in an atomic force microscopy image via flexible fitting molecular simulations. J. Frontiers in Molecular Biosciences, 9, 882989 (2022). DOI: 10.3389/fmolb.2022.882989
- LeCun Y., Boser B., Denker J. S., Henderson D., Howard R. E., Hubbard W., and Jackel L. D. Backpropagation applied to handwritten zip code recognition. *J. Neural Computation*, 1 (4), 541–551 (1989). DOI: 10.1162/neco.1989.1.4.541
- Oinonen N., Xu C., Alldritt B., Canova F. F., Urtev F., Cai S., Krejcí O., Kannala J., Liljeroth P., and Foster A. S. Correction to electrostatic discovery atomic force microscopy. *J. ACS Nano*, 16, 89 (2022). DOI: 10.1021/acsnano.2c08130
- 49. Fukuma T., Ueda Y., Yoshioka Sh., and Asakawa H. Atomic-scale distribution of water molecules at the mica-water interface visualized by three-dimensional scanning force microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, **104** (1), 016101 (2010).

DOI: 10.1103/PhysRevLett.104.016101

Noncontact Atomic Force Microscopy for Studying Biomolecules in Liquids T. Mamedov*, A. Shvirst*, M.V. Fedotova**, and G.N. Chuev*

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

**G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry, Russian Academy of Sciences, Akademicheskaya ul. 1, Ivanovo, 153045 Russia

Noncontact atomic force microscopy, a type of scanning probe microscopy, has been actively used in the last two decades to study hydrated biomolecules. Analysis of modern literature shows that noncontact atomic force microscopy is a very promising method for studying adsorbed biomacromolecules and biomacromolecular complexes at the membrane interface or surfaces. This mini-review describes the foundations of this method, its application to biomolecules, discusses the requirements for the method and the possibility of its extension through additional processing of the obtained experimental data using theoretical analysis, molecular modeling or machine learning.

Keywords: hydrated biomolecules, noncontact atomic force microscopy, molecular modeling, machine learning

УДК 577

ВЛИЯНИЕ TRO19622 (ОЛЕСОКСИМА) НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК

© 2024 г. А.И. Ильзоркина^{*, **}, Н.В. Белослудцева^{*, **}, А.А. Семёнова^{*}, М.В. Дубинин^{*}, К.Н. Белослудцев^{*, #}

*Марийский государственный университет, пл. Ленина, 1, Йошкар-Ола, 424000, Россия **Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, ул. Институтская, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия #E-mail: bekonik@gmail.com Поступила в редакцию 15.03.2024 г. После доработки 15.03.2024 г. Принята к публикации 19.06.2024 г.

TRO19622 (олесоксим, холестерин-подобный цитопротектор) – экспериментальный препарат, разработанный для потенциальной терапии ряда неизлечимых дегенеративных заболеваний. Основной молекулярной мишенью данного соединения в клетке служат пориновые белки внешней митохондриальной мембраны, которые выполняют ключевую роль в регуляции обмена метаболитами между митохондриями и остальной частью клетки. Нарушения активности данных каналов может вызывать развитие митохондриальной дисфункции в здоровых клетках. В работе проведена оценка основных показателей функционирования митохондрий и индекса жизнеспособности клеток в культурах после их инкубации с TRO19622. Установлено, что TRO19622 в концентрациях 15-30 мкМ ингибирует скорости фосфорилирующего и разобщенного дыхания изолированных митохондрий (состояния 3 и 3UDNP) при использовании сукцината в качестве субстрата, однако не влияет на ферментативную активность комплексов I-IV дыхательной цепи. Показано, что TRO19622 в исследуемых дозах не влияет на скорость образования H_2O_2 в митохондриях и параметр кальциевой емкости, отражающий резистентность органелл к открытию кальций-зависимой неспецифической поры. Инкубация фибробластов кожи человека и клеток аденокарциномы молочной железы (MCF-7) с 30 мкМ TRO19622 в течение 48 ч не оказывает влияния на продукцию активных форм кислорода и жизнеспособность клеток. Обсуждаются механизмы действия TRO19622 на систему окислительного фосфорилирования и перспективы использования данного митохондриально-направленного терапевтического агента.

Ключевые слова: VDAC, митохондрии, митохондриальное дыхание, окислительное фосфорилирование, АФК, жизнеспособность клеточных культур.

DOI: 10.31857/S0006302924040068, EDN: NHRMXT

Работа клеток в нормальных условиях зависит от скоординированного обмена метаболитами между клетками и внутриклеточными структурами. Митохондрии играют центральную роль в регуляции метаболизма клеток. Они обеспечивают клетки энергией, высвобождаемой в результате окисления субстратов в ходе реакций окислительного фосфорилирования, и участвуют в целом ряде других жизненно важных процессов, таких как кальциевая сигнализация, клеточный цикл, коммуникация между органеллами, клеточная дифференцировка, пролиферация и запрограммированная гибель. Таким образом, митохондрии часто выступают как ключевой центр, определяющий судьбу клетки при физиологических и патологических состояниях [1–3].

Ключевыми белками внешней митохондриальной мембраны, обеспечивающими транспорт большинства водорастворимых метаболитов (включая молекулы АТФ, АДФ и т.д.) и ионов, являются потенциал-зависимые ионные каналы (VDAC), или порины. Это группа порообразующих белков с β-баррельной структурой, кодируемых тремя разными генами у эукариот и имеющих молекулярную массу 30–35 кДа [4]. Все три изоформы VDAC-каналов экспрессируются в разных тканях

Сокращения: VDAC – потенциал-зависимые ионные каналы, MPTP – кальций-зависимая неселективная пора (mitochondrial permeability transition pore), $A\Phi K$ – активные формы кислорода.



Рис. 1. Структура ТКО19622.

и играют важную роль в энергетическом метаболизме клеток. В полностью открытом состоянии VDAC-каналы имеют диаметр 2.5-3.0 нм и пропускают основные метаболиты и анионы, тогда как в закрытом состоянии диаметр поры сокрашается до 1.8 нм и их транспорт резко снижается, но ускоряется транспорт ионов кальция в 4-10 раз. Такие изменения в активности VDAC происходят при модуляции мембранного потенциала на внешней мембране митохондрий (переход от 0 мВ к ± 20–40 мВ) или действии ряда соединенийэффекторов, способных изменять потенциал-зависимые характеристики каналов [5]. Хотя закрытие VDAC может способствовать установлению стабильного состояния и предотвращению изменения объема митохондриального матрикса за счет подавления транспорта одновалентных ионов, чрезмерное накопление ионов Ca²⁺ способно вызвать открытие кальций-зависимой неселективной поры (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) в митохондриях и запустить программируемую клеточную гибель [6].

Исследования продемонстрировали, что VDAC1- и VDAC2-каналы участвуют в регуляции митохондриального апоптоза, вступая во взаимодействие с белками семейства Bcl2, обладающими как про-, так и антиапоптотической активностью. VDAC1 способен образовывать во внешней мембране олигомерные поры, через которые происходит выход проапоптотических белков. Также предполагается, что VDAC1 играет важную роль в активации и стабилизации пор, образованных белками Вах, что приводит к высвобождению проапоптотических факторов и запуску апоптоза. В то же время обнаружено, что взаимодействие с VDAC2 подавляет олигомеризацию белка Bak и апоптоз [7]. Недавно было установлено, что VDAC3 участвует в регуляции образования активных форм кислорода и контроле качества митохондрий. Убедительные доказательства важной роли VDAC в регуляции митохондриальной функции и метаболизма позволяют рассматривать модуляцию активности данных белков как потенциальную стратегию для коррекции нарушений энергетического обмена при различных

патологиях, таких как сахарный диабет, онкологические, нейродегенеративные и другие заболевания [8].

TRO19622 (олесоксим), холестерин-подобное синтетическое соединение - это экспериментальный препарат, который был разработан для потенциальной терапии ряда неизлечимых дегенеративных заболеваний нервно-мышечной системы, включая боковой амиотрофический склероз, спинальную мышечную атрофию и другие (рис. 1) [9]. Исследования показали, что основной цитопротекторный эффект TRO19622 связан с его взаимодействием с VDAC-белками митохондрий. Было установлено, что ингибирование активности VDAC при помоши TRO19622 оказывает нейропротекторное действие за счет подавления избыточного транспорта ионов кальция в митохондрии и предотвращения гибели нейронов. TRO19622 прошел доклинические испытания и продемонстрировал нейропротекторные свойства в моделях дегенеративных заболеваний [10]. Однако клинические испытания 3-й фазы были прекращены, а эффективность этого соединения и безопасность для человека не была подтверждена. Также на данный момент отсутствуют комплексные исследования механизмов действия данного ингибитора на функционирование митохондрий, включая параметры энергетического, ионного и окислительного обмена в этих органеллах.

В связи с этим целью данной работы было изучение влияния TRO19622 на основные показатели функционирования митохондрий и индекс жизнеспособности культивируемых клеток. Мы оценили способность TRO19622 оказывать влияние на биоэнергетические функции изолированных митохондрий, митохондриальный мембранный потенциал, ферментативную активность комплексов митохондриальной дыхательной цепи, скорость образования пероксида водорода в митохондриях и восприимчивость этих органелл к открытию кальций-зависимой неселективной поры, участвующей в выходе ионов кальция и активации апоптоза. Кроме того, мы исследовали действие TRO19622 на продукцию активных

форм кислорода и жизнеспособность клеток линии MCF-7 (аденокарциномы молочной железы) и фибробластов кожи человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и материалы. В работе использовали соединение TRO19622 (Тосгіз bioscience, Ref. 2906, Bio-Techne SAS, Франция). КСІ, НЕРЕЅ, АДФ и остальные реактивы были приобретены у фирмы-производителя Sigma-Aldrich (США), если не указано иначе. В серии контрольных экспериментов вместо TRO19622 добавляли 1 мкл растворителя (диметилсульфоксид). Концентрация диметилсульфоксида в пробах не превышала 0.1%.

Условия культивирования клеток и определение их жизнеспособности. Клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 была получена из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Фибробласты кожи человека, полученные из участка кожи здоровых доноров (n = 3), были получены из биобанка Института регенеративной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, идентификатор коллекции: MSU FB (https://human.depo.msu.ru). Клетки культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (#11885084, Gibco, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (#SH30071.02HI, HyClone, США), 1% раствора противогрибкового антибиотика (Pen/стрептококк/фунгизон) (#SV30079.01, HyClone, США) и 1 мг/мл инсулина (MCF-7).

Для оценки жизнеспособности клетки трижды промывали сбалансированным солевым раствором Хэнкса и инкубировали с 5 мкМ пропидий йодида ($\lambda_{ex} = 493$ нм, $\lambda_{em} = 636$ нм) и 5 мкг/мл красителя Hoechst 33342 ($\lambda_{ex} = 361$ нм, $\lambda_{em} = 497$ нм) при 37°C [11].

Продукцию активных форм кислорода (АФК) в клетках измеряли с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата ($\lambda_{ex} = 490$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм). Клетки в экспериментальных группах инкубировали с 20 мкМ красителя в течение 30 мин при 37°С [11]. Не менее 200–400 клеток из разных полей зрения было проанализировано для каждого образца.

Уровни флуоресценции определяли с помощью системы визуализации клеток Evos Floid (Thermo Fisher Scientific, США), а дальнейший анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Image J2 (Национальный институт здравоохранения, Бетесда, США).

Выделение митохондрий и оценка их функциональной активности. Митохондрии были выделены из ткани печени крыс самцов линии Wistar методом дифференциального центрифугирования, как описано ранее [12]. Буфер для гомогенизации содержал 70 мМ сахарозы, 210 мМ D-маннита, 1 мМ ЭДТА и 10 мМ НЕРЕЅ/КОН (рН 7.4). Последующее центрифугирование проводили в том же буфере, за исключением того, что вместо ЭДТА использовали 100 мкМ ЭГТА. Полученные суспензии содержали 60–70 мг митохондриального белка/мл. Концентрацию белка в суспензии митохондрий определяли по методу Брэдфорда, используя обезжиренный бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Измерение поглощения кислорода изолированными митохондриями проводили полярографическим методом в герметичной термостатируемой ячейке объемом 1 мл с постоянным перемешиванием магнитной мешалкой с помощью респирометра Oxygraph Plus (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания) [13]. Среда инкубации содержала 130 мМ КСІ, 5 мМ NaH₂PO₄ и 10 мМ HEPES/КОН (рН 7.4). В работе использовали 2.5 мм глутамата калия + 2.5 мМ малата калия или 5 мМ сукцината калия (в присутствии 1 мкМ ротенона) в качестве физиологических субстратов окисления для комплексов I и II дыхательной цепи соответственно. Скорость поглощения кислорода регистрировались в последовательных метаболических состояниях митохондрий: а) скорость фосфорилирующего дыхания после добавки 200 мкМ АДФ (состояние 3); б) скорость дыхания после завершения фосфорилирования (состояние 4); в) максимальная скорость дыхания в присутствии разобщителя -50 мкМ 2,4-динитрофенола (состояние 3_{UDNP}). Данные параметры в их комбинации позволяют получить оценку состояния биоэнергетики изолированных митохондрий.

Мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\Psi$) оценивали с помощью флуоресцентного зонда сафранина О (длина волны возбуждения 520 нм; длина волны излучения 580 нм) с использованием спектрофлуориметра Рапогатаа Fluorat-02 («Люмекс», Россия) [14]. Инкубационная среда содержала 210 мМ D-маннита, 70 мМ сахарозы, 10 мкМ ЭГТА и 10 мМ HEPES/KOH (pH 7.4). В качестве субстратов дыхания использовали 2.5 мМ глутамата + 2.5 мМ малата калия или 5 мМ сукцината калия в присутствии 1 мкМ ротенона. Сафранин О добавляли в среду в концентрации 10 мкМ. Концентрация митохондриального бел-ка в кювете составляла 0.5 мг/мл.

Активность комплексов электрон-транспортной цепи (I, II, III, IV) оценивали по скорости специфических окислительно-восстановительных реакций в соответствии с ранее описанными протоколами [15, 16] с помощью планшетного ридера Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ проводили на предварительно



Рис. 2. Влияние 30 мкМ TRO19622 на жизнеспособность опухолевых клеток молочной железы линии MCF-7 (а) и первичной культуры фибробластов кожи человека (HF) (б). Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего (n = 4).

разрушенных путем трехкратного замораживания/оттаивания (-20/+30°С) митохондриях, суспендированных в 10 мМ Трис-HCl-буфере (рН 7.6). Концентрация митохондриального белка в пробах составляла 50 мкг/мл.

Скорость образования пероксида водорода в митохондриях измеряли с помощью флуоресцентного зонда Amplex Red (длины волн возбуждения 560 нм; длина волны излучения 590 нм) на планшетном ридере Tecan Spark 10M (Tecan Group Ltd., Швейцария) при 37° С [14]. Митохондрии в концентрации 0.15 мг/мл инкубировали в среде, содержащей 70 мМ сахарозы, 210 мМ D-маннита, 1 мМ KH₂PO₄, 10 мкМ ЭГТА, 1 Ед./мл пероксидазы хрена, 10 мкМ Amplex Red, 10 мМ HEPES/KOH (рН 7.4). Регистрировали изменение флуоресценции в течение 3 мин. Количество образовавшегося пероксида водорода рассчитывали по калибровочной кривой [14].

Концентрацию ионов кальция в среде определяли с использованием индикатора Арсеназо III при длинах волн 675–685 нм на планшетном ридере Spark 10M (Tecan Group Ltd., Швейцария) [17]. Митохондрии в концентрации 0.5 мг/мл инкубировали в среде, содержащей 70 мМ сахарозы, 210 мМ D-маннита, 5 мМ сукцината калия, 1 мМ КН₂РО₄, 1 мМ ротенона, 10 мМ ЭГТА, 10 мМ HEPES/KOH (рН 7.4). Затем в пробу последовательно добавляли CaCl₂ (10 мкМ) до полного выхода ионов из митохондрий вследствие открытия МРТР-поры. Общее количество Ca²⁺, внесенного в митохондрии до открытия МРТР-поры, рассматривали как показатель кальциевой емкости митохондрий и выражали в нмолях Ca²⁺/мг митохондриального белка.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 8.4 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n = 3-6). Для проверки нормальности распределения данных использовался тест Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения значений применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим множественным сравнением групп по критерию Тьюки. Различия между группами расценивали как статистически значимые при значении p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

TRO19622 не оказывает влияния на продукцию активных форм кислорода и жизнеспособность клеток линии MCF-7 и фибробластов кожи человека. В настоящей работе было исследовано влияние TRO19622 на продукцию активных форм кислорода и жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы линии МСГ-7 и первичной культуры фибробластов кожи человека. Стоит отметить, что, согласно литературным данным, используемая концентрация данного агента составляет 0.1-10 мкМ [10]. Можно видеть, что TRO19622 в концентрациях 0.1-30 мкМ (48 ч инкубации) не влияет на жизнеспособность клеток линии MCF-7 и фибробластов кожи человека (рис. 2). Параллельно с этим, TRO19622 в концентрации 30 мкМ достоверно не влиял на продукцию АФК в раковых клетках линии MCF-7 и в фибробластах кожи человека, хотя наблюдался тренд к увеличению их продукции (рис. 3).

	Скорость митохондриального дыхания,					
TRO19622, мкМ	нмоль O_2 ·мин $^{-1}$ ·мг $^{-1}$ белка			Дыхательный контроль		
	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{DNP}	(V_3/V_4)		
Сукцинат калия + ротенон						
0	70.3 ± 3.6	24.4 ± 1.2	72.6 ± 2.8	2.9 ± 0.2		
15	61.8 ± 3.5*	25 ± 1.2	$65 \pm 1.3^{*}$	$2.5 \pm 0.1*$		
30	$58.2 \pm 3.5^{*}$	25.6 ± 1.0	$62.8 \pm 0.3^{*}$	$2.2 \pm 0.1*$		
Глутамат + малат калия						
0	45.3 ± 1.8	12 ± 2.5	51.5 ± 1.8	3.9 ± 0.1		
15	42.3 ± 0.7	11.3 ± 0.5	51.9 ± 2.7	3.9 ± 0.2		
30	42.6 ± 0.5	11.4 ± 0.8	47.8 ± 2.6	3.8 ± 0.3		
	$ \begin{array}{r} 45.3 \pm 1.8 \\ 42.3 \pm 0.7 \\ 42.6 \pm 0.5 \end{array} $	$ \begin{array}{r} 12 \pm 2.5 \\ 11.3 \pm 0.5 \\ 11.4 \pm 0.8 \\ \end{array} $	51.5 ± 1.8 51.9 ± 2.7 47.8 ± 2.6	$ 3.9 \pm 0.1 \\ 3.9 \pm 0.2 \\ 3.8 \pm 0.3 \\ \hline 1 + 0.2 \\ 3.8 \pm 0.3 \\ \hline 1 + 0.2 \\ \overline{1 + 0.2} \\ $		

Таблица 1. Влияние TRO19622 на параметры дыхания изолированных митохондрий в разных метаболических состояниях

Примечание. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n = 5); * – p < 0.05 – различия достоверны относительно контрольных значений (0 мкМ TRO19622).

TRO19622 вызывает ингибирование окислительного фосфорилирования в изолированных митохондриях. В работе была проведена оценка влияния TRO19622 на биоэнергетические параметры изолированных митохондрий. В табл. 1 представлены данные о влиянии TRO19622 на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий печени крыс в присутствии субстратов комплексов I и II дыхательной цепи (2.5 мМ глутамата + 2.5 мМ малата калия или 5 мМ сукцината калия соответственно). Можно видеть, что TRO19622 дозозависимо снижает скорости АДФ-стимулированного (состояние 3) и разобщенного (состояние 3U_{DNP}) дыхания митохондрий при окислении сукцината в качестве физиологического субстрата. Параллельно



Рис. 3. Оценка влияния TRO19622 (30 мкМ) на уровень образования АФК в первичной культуре фибробластов кожи человека (HF) и опухолевых клеток молочной железы линии MCF-7. Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка средней (n = 5).

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

наблюдалось снижение коэффициента дыхательного контроля, отражающего степень сопряжения митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования. Так, TRO19622 (30 мкМ) снижал этот параметр на 24% при окислении сукцината. При этом TRO19622 в исследуемых концентрациях не влиял на скорость митохондриального дыхания в состоянии покоя (состояние 4), а также на скорость митохондриального дыхания при окислении субстратов комплекса I.

На рис. 4 приведены данные о влиянии TRO19622 на митохондриальный мембранный



Рис. 4. Типичные кинетические кривые интенсивности флуоресценции сафранина О, которые отражают изменение мембранного потенциала изолированных митохондрий в присутствии субстратов комплекса I (2.5 мМ глутамата калия + 2.5 мМ малата) (пунктирная линия) или субстратов комплекса II (5 мМ сукцината калия в присутствии 1 мкМ ротенона) (сплошная линия). Добавки: 15 мкМ TRO19622, 50 мкМ ДНФ. Показаны типичные кривые (n = 5).

ИЛЬЗОРКИНА и др.

TRO19622, мкМ	Ферментативная активность, % от контроля				
	Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV	
0	100 ± 3.5	100 ± 4.2	100 ± 3.4	100 ± 3.3	
15	95.4 ± 3.3	101.5 ± 7	96.0 ± 1.5	89.7 ± 3	
30	96.7 ± 3.3	110.9 ± 6.4	102.4 ± 2.8	96.0 ± 6.3	

Таблица 2. Влияние TRO19622 на ферментативную активность изолированных комплексов дыхательной цепи

Примечание. В отсутствие TRO19622 (контроль, 0 мкМ) ферментативная активность комплексов I–IV составляла 25 \pm 1, 614 \pm 10, 743 \pm 14, 340 \pm 30, 1016 \pm 25 нмоль мин⁻¹ мг⁻¹ белка соответственно. Значения активности в отсутствие TRO19622 были приняты за 100%. Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего (*n* = 3–5).

потенциал, оцененный с помощью флуоресцентного зонда сафранина О. Две последовательные добавки 15 мкМ TRO19622 не приводили к изменению мембранного потенциала митохондрий, окисляющих глутамат/малат или сукцинат калия в качестве субстратов дыхания.

Далее мы оценили действие TRO19622 на ферментативную активность комплексов I, II, III и IV дыхательной цепи в изолированных митохондриях. Как показано в табл. 2, TRO19622 не оказывал влияние на активность митохондриальных комплексов I–IV в исследуемых концентрациях.

ТRO19622 не приводит к гиперпродукции H_2O_2 и снижению резистентности митохондрий к открытию кальций-зависимой неселективной поры. Известно, что модуляция активности VDAC может способствовать усилению продукции активных форм кислорода и открытию кальций-зависимой неселективной МРТ-поры [5]. В связи с этим в следующей части работы мы оценили влияние TRO19622 на продукцию H₂O₂ и параметр кальциевой емкости изолированных митохондрий.

Как показано на рис. 5, инкубация митохондрий с TRO19622 в концентрациях 15-30 мкМ не приводила к повышению скорости образования H_2O_2 , вне зависимости от используемого субстрата дыхания.

На рис. 6 показано, что 30 мкМ TRO19622 не вызывал снижения параметра кальциевой емкости митохондрий. Результаты свидетельствуют о том, что TRO19622 в используемой концентрации не влияет на резистентность митохондрий к открытию MPT-поры.



Рис. 5. Влияние TRO19622 на генерацию митохондриями печени крыс H_2O_2 , окисляющего сукцинат (5 мМ) в присутствии ротенона (а) и 2.5 мМ глутамата калия + 2.5 мМ малата калия (б). Инкубационная среда содержала 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мKM ЭГТА и 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Результаты представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего (n = 5).



[TRO19622], мкМ

Рис. 6. Оценка действия TRO19622 на параметр кальциевой емкости митохондрий печени крыс. Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего (n = 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время регуляция активности VDAC является одним из важнейших механизмов метаболического перепрограммирования клеток, а также рассматривается в качестве перспективного терапевтического подхода при многих заболеваниях [2, 3]. Показано, что ингибирование олигомеризации VDAC1 во внешней мембране митохондрий предотвращает инициацию апоптоза [2]. С другой стороны, эффекторные молекулы, закрывающие VDAC, могут, наоборот, вызывать избыточное накопление ионов Ca²⁺ в митохондриальном матриксе, открывать МРТ-пору и вызывать гибель клетки. Баланс этих разнонаправленных процессов зависит от концентрации регуляторных молекул и определяет их использование при различных патологических состояниях [18].

Обнаружено, что TRO19622 (олесоксим) обладает цитопротекторным действием за счет подавления избыточного транспорта ионов кальция в митохондрии и предотвращения гибели клеток в моделях бокового амиотрофического склероза, болезни Альцгеймера, сахарного диабета и других [10]. Исследования показали, что терапевтический эффект TRO19622 может быть опосредован его взаимодействием с VDAC каналами внешней митохондрий. Однако мембраны недавние клинические испытания выявили негативные побочные эффекты этого препарата. Мы предположили, что TRO19622, вероятно, способствует развитию дисфункции митохондрий в клетках, особенно при его избыточном накоплении. В данной работе мы исследовали, может ли TRO19622 негативно влиять на функциональную активность

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

изолированных митохондрий и митохондриальных ферментов, а также жизнеспособность клеточных культур.

Наши данные показывают, что TRO19622 оказывает дозозависимое торможение скорости потребления кислорода изолированными митохондриями в фосфорилирующем состоянии V₃ при окислении субстрата комплекса II (сукцинатдегидрогеназы) сукцината. Наряду с этим. ТRO19622 подавляет скорость ДНФ-стимулированного (разобщенного) дыхания и параметр дыхательного контроля, что указывает на снижение максимальной окислительной мощности митохондрий и эффективности окислительного фосфорилирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что TRO19622 способен сам по себе подавлять процесс синтеза АТФ в митохондриях при окислении сукцината, но не субстратов комплекса I (NADH:убихинон-оксидоредуктазы) глутамата и малата. Обнаруженная нами субстрат-специфическая регуляция митохондриального дыхания с помощью TRO19622 может быть связана с разной эффективностью транспорта протонов и электронов от субстратов FAD- и NADH-зависимых дегидрогеназ. Известно, что окисление сукцината митохондриями может генерировать более высокую протон-движущую силу для синтеза АТФ в дыхательной цепи, чем окисление NADH-зависимых субстратов (глутамата и малата) [19]. Кроме того, ингибиторы VDAC каналов существенно подавляют транспорт анионных метаболитов, таких как АТФ и АДФ в митохондриальный матрикс [10, 18]. Это может способствовать подавлению процесса окислительного фосфорилирования с участием сукцинатдегидрогеназы, локализованной на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны.

С другой стороны, анализ активности комплексов дыхательной цепи в присутствии TRO19622 показал, что данное соединение не оказывает непосредственного влияния на каталитические свойства комплексов I-IV электронтранспортной цепи. Кроме того, TRO19622 не вызывает изменения мембранного потенциала внутренней митохондриальной мембраны. Отсутствие деполяризующего эффекта TRO19622 при использовании субстратов комплексов I и II электрон-транспортной цепи позволило нам предположить, что мишенями данного соединения могут являться как VDAC-каналы, транспортирующие фосфонуклеотиды, так и, возможно, FoF1-АТФ-синтетаза или ферменты цикла Кребса в матриксе митохондрий.

Ранее было показано, что накопление TRO19622 в митохондриях может ингибировать клеточную гибель посредством его взаимодействия с белками, участвующими в индукции МРТ-поры. Считалось, что это свойство лежит в основе нейро- и кардиопротекторных свойств TRO19622. Вместе с тем, мы не обнаружили увеличение параметра кальциевой емкости митохондрий печени в присутствии TRO19622. Кроме того, в работе не обнаружено усиление генерации пероксида водорода при инкубации митохондрий с данным соединением. Эти наблюдения находятся в соответствии с литературными данными о том, что TRO19622, в отличие от циклоспорина А, практически не влиял на параметры образования МРТ-поры в митохондриях [2].

Наши данные также свидетельствуют о том, что TRO19622 в исследуемых концентрациях не влияет на индекс жизнеспособности и продукцию активных форм кислорода в клетках линии MCF-7 и первичной культуры фибробластов кожи человека. Стоит отметить, что в работе мы использовали достаточно высокие концентрации данного агента (30 мкМ) со временем инкубации 48 ч. Все это позволяет говорить об отсутствии негативного токсического действия TRO19622 на клеточные культуры в исследуемых условиях. Подобные наблюдения TRO19622 были отмечены также и для других клеточных культур при сходных экспериментальных условиях [2, 5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы продемонстрировали, что митохондриально-направленное соединение TRO19622 в концентрациях до 30 мкМ (при действующих концентрациях около 10 мкМ) может оказывать ингибирующее действие на биоэнергетические параметры митохондрий, окисляющих сукцинат. Недавние данные указывают на то, что сукцинат накапливается в клетках при целом ряде патологических состояний, включая рак, воспаление, эпилепсию, ишемию и другие, что может вызывать его неконтролируемое окисление и метаболическое перепрограммирование [19-21]. Согласно литературным данным, TRO19622 является относительно новым терапевтическим агентом (в том числе взаимодействующим с VDAC), однако его клинические испытания для лечения нервно-мышечных заболеваний потерпели неудачу [22, 23]. Полученные нами данные углубляют представления о механизме действия данного соединения на функциональное состояние митохондрий и клеток и могут быть использованы для дальнейшей разработки перспективных соединений, способных целенаправленно

модулировать работу биоэнергетического аппарата клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 20-15-00120-П).

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

- Kim J., Gupta R., Blanco L. P., Yang S., Shteinfer-Kuzmine A., Wang K., Zhu J., Yoon H. E., Wang X., Kerkhofs M., Kang H., Brown A. L., Park S.-J., Xu X., Rilland E. Z., Kim M. K., Cohen J. I., Kaplan M. J., Shoshan-Barmatz V., and Chung J. H. VDAC oligomers form mitochondrial pores to release mtDNA fragments and promote lupus-like disease. *Science*, 366 (6472), 1531 (2019). DOI: 10.1126/science.aav4011
- Shoshan-Barmatz V., Maldonado E. N., and Krelin Y. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *Cell Stress*, 29, 1 (1), 11–36 (2017). DOI: 10.15698/cst2017.11.104
- Shoshan-Barmatz V. and Golan M. Mitochondrial VDAC1: function in cell life and death and a target for cancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, **19** (5), 714 (2012). DOI: 10.2174/092986712798992110
- Belosludtseva N. V., Dubinin M. V., and Belosludtsev K. N. Pore-forming vdac proteins of the outer mitochondrial membrane: regulation and pathophysiological role. *Biochemistry (Moscow)*, **89** (6), 1061 (2024). DOI: 10.1134/S0006297924060075
- Varughese J. T., Buchanan S. K., and Pitt A. S. The role of voltage-dependent anion channel in mitochondrial dysfunction and human disease. *Cells*, **10** (7), 1737 (2021). DOI: 10.3390/cells10071737
- Ott M., Robertson J. D., Gogvadze V., Zhivotovsky B., and Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (3), 1259–1263 (2002). DOI: 10.1073/pnas.241655498
- Tsujimoto Y. and Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *J. Biochimie*, 84 (2–3), 187–193, (2002). DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01370-6
- Yang M., Camara A. K. S., Aldakkak M., et al. Identity and function of a cardiac mitochondrial small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel splice variant.

Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics, **1858** (6), 442 (2017). DOI: 10.1016/j.bbabio.2017.03.005

- Tricaud N., Gautier B., Berthelot J., Gonzalez S., and Hameren G. V. Traumatic and diabetic schwann cell demyelination is triggered by a transient mitochondrial calcium release through voltage dependent anion channel 1. *Biomedicines*, **10** (6), 1447 (2022). DOI: 10.3390/biomedicines10061447
- Bordet T., Berna P., Abitbol J.-L., and Rebecca M. P. Olesoxime (TRO19622): a novel mitochondrial-targeted neuroprotective compound. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3 (2), 345–368 (2010). DOI: 10.3390/ph3020345
- Serov D., Tikhonova I., Safronova V., and Astashev M. Calcium activity in response to nAChR ligands in murine bone marrow granulocytes with different Gr-1 expression. J. Cell Biol. Int., 45 (7), 1533–1545 (2021). DOI: 10.1002/cbin.11593
- Dubinin M. V., Nedopekina D. A., Ilzorkina A. I., Semenova A. A., Sharapov V. A., Davletshin E. V., Mikina N. V., Belsky Y. P., Spivak A. Yu., Akatov V. S., Belosludtseva N. V., Jiankang L., and Belosludtsev K. N. Conjugation of triterpenic acids of ursane and oleanane types with mitochondria-targeting cation F16 synergistically enhanced their cytotoxicity against tumor cells. *Membranes*, **13** (6), 563 (2023). DOI: 10.3390/membranes13060563
- Belosludtsev K. N., Belosludtseva N. V., Kosareva E. A., Talanov E. Y., Gudkov S. V., and Dubinin M. V. Itaconic acid impairs the mitochondrial function by the inhibition of complexes II and IV and induction of the permeability transition pore opening in rat liver mitochondria. *Biochimie*, **176**, 150–157 (2020). DOI: 10.1016/j.biochi.2020.07.011
- Belosludtseva N. V., Starinets V. S., Semenova A. A., Igoshkina A. D., Dubinin M. V., and Belosludtsev K. N. S-15176 Difumarate salt can impair mitochondrial function through inhibition of the respiratory complex III and permeabilization of the inner mitochondrial membrane. *Biology (Basel)*, **11** (3), 380 (2022). DOI: 10.3390/biology11030380
- Dubinin M. V., Semenova A. A., Nedopekina D. A., Davletshin E. V., Spivak A. Y., and Belosludtsev K. N. Mitochondrial dysfunction induced by F16-betulin conjugate and its role in cell death initiation. *Membranes*, **11** (5), 352 (2021). DOI: 10.3390/membranes11050352
- Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L., Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature Protoc.*, 7 (6), 1235–1246 (2012). DOI: 10.1038/nprot.2012.058
- 17. Belosludtsev K. N., Dubinin M. V., Talanov E. Yu., Starinets V. S., Tenkov K. S., Zakharova N. M., and Belosludtseva N. V. Transport of Ca²⁺ and Ca²⁺-dependent permeability transition in the liver and heart mitochondria of rats with different tolerance to acute

hypoxia. *Biomolecules*, **10** (1), 114 (2020). DOI: 10.3390/biom10010114

- Verma A., Shteinfer-Kuzmine A., Kamenetsky N., Pittala S., Paul A., Crystal E. N., Ouro A., Chalifa-Caspi V., Pandey S. K., Monsonego A., Vardi N., Knafo S., and Shoshan-Barmatz V. Targeting the overexpressed mitochondrial protein VDAC1 in a mouse model of Alzheimer's disease protects against mitochondrial dysfunction and mitigates brain pathology. *Transl. Neurodegener.*, **11** (1), 58 (2022). DOI: 10.1186/s40035-022-00329-7
- Mookerjee S. A., Gerencser A. A., Watson M. A., and Brand M. D. Controlled power: how biology manages succinate-driven energy release. *Biochem. Soc. Trans.*, 49 (6), 2929–2939 (2021). DOI: 10.1042/BST20211032
- Martin J. L., Costa A. S. H., Gruszczyk A. V., Beach T. E., Allen F. M., Prag H. A., Hinchy E. C., Mahbubani K., Hamed M., Tronci L., Nikitopoulou E., James A. M., Krieg T., Robinson A. J., Huang M. M., Caldwell S. T., Logan A., Pala L., Hartley R. C., Frezza Ch., Saeb-Parsy K., and Murphy M. P. Succinate accumulation drives ischaemia-reperfusion injury during organ transplantation. *Nature Metab.*, 1, 966–974 (2019). DOI: 10.1038/s42255-019-0115-y
- Chouchani E. T., Pell V. R., Gaude E., Aksentijević D., Sundier S. Y., Robb E. L., Logan A., Nadtochiy S. M., Ord E. N. J., Smith A. C., Eyassu F., Shirley R., Hu Ch.-H., Dare A. J., James A. M., Rogatti S., Hartley R. C., Eaton S., Costa A. S. H., Brookes P. S., Davidson S. M., Duchen M. R., Saeb-Parsy K., Shattock M. J., Robinson A. J., Work L. M., Frezza Ch., Krieg T., and Murphy M. P. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, **515** (7527), 431– 435 (2014). DOI: 10.1038/nature13909
- Bordet T., Buisson B., Michaud M., Drouot C., Galéa P., Delaage P., Akentieva N. P., Evers A. S., Covey D. F., Ostuni M. A., Lacapère J. J., Massaad C., Schumacher M., Steidl E. M., Maux D., Delaage M., Henderson C. E., and Pruss R. M. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one,oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **322** (2), 709– 720 (2007). DOI: 10.1124/jpet.107.123000
- Muntoni F., Bertini E., Comi G., Kirschner J., Lusakowska A., Mercuri E., Scoto M., Ludo van der Pol W., Vuillerot C., Burdeska A., El-Khairi M., Fontoura P., Ives J., Gorni K., Reid C., and Fuerst-Recktenwald S. Long-term follow-up of patients with type 2 and non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy (SMA) treated with olesoxime in the OLEOS trial. *Neuromusc. Disorders*, **30** (12), 959–969 (2020). DOI: 10.1016/j.nmd.2020.10.008

Effect of TRO19622 (Olesoxime) on the Functional Activity of Isolated Mitochondria and Cell Viability

A.I. Ilzorkina*, **, N.V. Belosludtseva*, **, A.A. Semenova*, M.V. Dubinin*, and K.N. Belosludtsev*

*Mari State University, pl. Lenina 1, Yoshkar-Ola, 424000 Russia

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

TRO19622 (olesoxime), a cholesterol-like cytoprotector, is an experimental drug developed as a potential treatment for a range of incurable degenerative diseases. Recent studies have shown that the main molecular targets of this compound in the cell are porins of the outer mitochondrial membrane, which play a crucial role in regulating the exchange of metabolites between mitochondria and the rest of the cell. Disruption of this channel activity may lead to mitochondrial dysfunction in healthy cells. In this study, key indicators of mitochondrial function and the viability of cells in cultures after incubation with TRO19622 were assessed. It was found that TRO19622 at 15–30 μ M concentrations inhibits the coupled and uncoupled respiration rates in isolated mitochondria (state 3 rate and 3UDNP) with succinate as substrate, but does not affect the enzymatic activity of respiratory chain complexes I–IV. It was shown that TRO19622 at the studied doses has no effect on the rate of H₂O₂ formation in mitochondria and the calcium retention capacity index, which reflects the resistance of the organelles to the calcium-dependent nonspecific pore opening. Incubation of human skin fibroblasts and mammary adenocarcinoma cells (MCF-7) with 30 μ M TRO19622 for 48 h has no impact on ROS production and cell viability. How TRO19622 works in the oxidative phosphorylation system and therapeutic prospects for using this mitochondrial-targeted agent are discussed.

Keywords: VDAC, mitochondria, mitochondrial respiration, oxidative phosphorylation, ROS, cell viability

—— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ —

УДК 616.8-092, 612.06, 612.82

ЭВОЛЮЦИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О МЕХАНИЗМАХ ГИПЕРВОЗБУДИМОСТИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ И ПАЧЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ЭПИЛЕПСИИ. ВКЛАД АКТИВАЦИИ КАЛИЕМ КАЛИЙ-ПРОВОДЯЩИХ КАНАЛОВ В ГИПЕРАКТИВАЦИЮ СЕТЕЙ

© 2024 г. А.С. Галашин*, М.В. Конаков*, В.В. Дынник*, #

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, ул. Институтская, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия [#]E-mail: dynnik@rambler.ru Поступица в редакцию 20.03.2024 г.

Поступила в редакцию 20.03.2024 г. После доработки 20.03.2024 г. Принята к публикации 19.06.2024 г.

Обсуждаются существующие представления о молекулярных механизмах патологической гипервозбудимости и синхронизации нейронных сетей при эпилептогенезе, включая калиевую, ГАМК-, мембранную (клеточную) и синаптическую (сетевую) модели. В фокусе таких моделей – нарушение баланса между возбуждением и торможением с вовлечением многочисленных положительных и отрицательных обратных связей в нейронных сетях. В работе рассматриваются современные представления о: 1) надежности динамических систем с большим числом отрицательных обратных связей и 2) вырожденности, т.е. способности разнородных элементов (каналов, токов) замещать друг друга, как основе устойчивого функционирования гипервозбудимых сетей при каналопатиях и гиперэкспрессии различных каналов. В работе предлагается возможный механизм спонтанного возникновения судорожной активности и накопления калия в межклеточном пространстве, основанный на активации калием и кальцием группы катионных каналов (HCN, K_{ir}2.x, hERG, Na_v1.x и BK_{Ca}), обеспечивающий надежность и высокую чувствительность эпилептиформной активности к внешним и внутренним факторам за счет вырожденности и формирования группы петель положительных обратных связей.

Ключевые слова: эпилепсия, надежность и вырожденность в нейронных сетях, гипервозбудимость и пачечная активность, K^+ - и Ca²⁺-активируемые калий-проводящие каналы.

DOI: 10.31857/S0006302924040073, EDN: NHOURI

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ГИПЕРВОЗБУДИМОСТЬ И СИНХРОНИЗАЦИЯ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Гипервозбудимость и синхронизация нейронных сетей являются важными признаками ряда заболеваний, таких как эпилепсия, болезнь Альцгеймера, травматические повреждения мозга, мигрень, инсульт и др. [1–5]. Клиническим проявлением патологической гипервозбудимости являются судороги. При генетически определенной или приобретенной эпилепсии, носителями которой являются более 70 млн человек, рецидивирующие приступы судорог не только ухудшают качество жизни, но и являются маркерами и драйверами необратимых дегенеративных процессов в мозге. Молекулярные механизмы спонтанного возникновения, поддержания и завершения судорожной активности (иктогенеза) изучены недостаточно.

Сокращения: BF – пачечные режимы, SLE – эпилептиформная активность, PFL – положительная обратная связь, NFL – отрицательная обратная связь, Na_v – потенциал-зависимые натриевые каналы, Ca_v – потенциал-зависимые кальциевые каналы, ГАМК – гамма-аминомасляная кислота, AMПA – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота, K_v – потенциал-зависимые калиевые каналы, KCC2 – калий-хлорный переносчик 2 типа, NFAT – ядерный фактор активации Т-лимфоцитов, NFxB – ядерный фактор «каппа-би», BNDF – нейротрофический фактор головного мозга, HCN – нуклеотид-зависимые каналы, активируемые гиперполяризацией, HMДA – N-метил-D-аспартат, K_{ir} – калиевые каналы входящего выпрямления, hERG – калиевые каналы «human ether-a-go-go related gene», PI3K – липидкиназа фосфатидилинозитол-3-киназа, PKG – протеинкиназа G, RyR – рианодиновый рецептор, AKT – киназа AKT, NOS – синтаза оксида азота, sGC – циклическая АДФ-рибоза, BK – кальций-кальций-калы большой проводимости, NCX_{rev} – натрий-кальциевый обменник в инвертированном режиме, CaMKII – калиевые каналы I, AC9 – аденилатциклаза 9, сAMP – циклический аденозинмонофосфат, PKA – протеинкиназа A.



Рис. 1. (а) — Пример пачечной активности нейрона гиппокампа в срезе мозга мыши, возникшей при увеличении $[K^+]_0$ до 8.5 мМ. (б, в, г) — Примерные (качественные) вольт-амперные характеристики каналов HCN, hERG и K_{ir}^2 .х соответственно, характеризующие влияние $[K^+]_0$ на входящие и выходящие токи. Положительный ток означает выход K^+ из клетки, отрицательный — вход K^+ в клетку. Канал HCN помимо Na⁺ проводит также K^+ . (д) — Схема взаимодействия рассматриваемых в статье токов, участвующих в эпилептиформной активности, учитывающая положительные обратные связи, которые показаны пунктирными стрелками. Подробное объяснение в тексте.

На клеточном уровне гипервозбудимость характеризуется ионным дисбалансом, связанным с накоплением калия $([K^+]_0)$ в межклеточном пространстве, а также натрия, кальция и хлора $([Na^+]_i, [Ca^{2+}]_i, [Cl^-]_i)$ в цитоплазме клеток мозга [6–9]. Повторяющиеся приступы могут приводить к переформатированию нейронных сетей вследствие гибели нейронов и стволовых клеток, нарушениям нейрогенеза, активации реактивной микроглии, развитию воспаления, изменениям экспрессии и ковалентной модификации различных ионных каналов и транспортеров [4].

Ключевым элементом патологической гипервозбудимости является переход от тонических режимов к генерации устойчивых пачечных режимов (burst firing – BF), для которых характерна генерация высокочастотных потенциалов действия на фоне плато деполяризации с амплитудой деполяризации до 30 мВ (рис. 1а) и высокоамплитудными изменениями $[Ca^{2+}]_i$ в подавляющем числе нейронов сети [1, 6, 10, 11].

Следует отметить, что в норме (например, в кортексе, стриатуме, таламусе) ВF-режимы играют важную роль в декодировании сигналов, передаче сенсорной информации, синаптической пластичности и других процессах [1, 12]. Однако, по-видимому, параметры таких режимов (например, амплитуда деполяризации во время плато, частота, количество потенциалов действия в пачке) являются «щадящими», что позволяет избежать существенного нарушения ионного гомеостаза, которое наблюдается при эпилептиформной активности (seizure-like events – SLE). В настоящее время этот вопрос остается открытым.

2024

ЛЕЧЕНИЕ ЭПИЛЕПСИИ

Лечение эпилепсии является симптоматическим, направлено в основном на подавление судорожной активности и эффективно лишь на ранних стадиях заболевания. До 30% пациентов резистентны к такому лечению [13-15]. В фокусе лечения - подавление возбуждения (положительных обратных связей – PFL) и усиление торможения (отрицательных обратных связей – NFL) в гипервозбудимых нейронных сетях. Основными мишенями зарегистрированных препаратов являются потенциал-зависимые натриевые (Na_v) и кальциевые (Ca_v) каналы, агонисты тормозных ГАМК_А-рецепторов (ГАМК – гамма-аминомасляная кислота), антагонисты возбуждающих АМПА-рецепторов (АМПА – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота) и модуляторы синаптической передачи. Некоторые неспецифические препараты, такие как вальпроевая кислота, являются сильными гепатотоксинами.

К настоящему времени выявлены сотни генов, которые могут быть вовлечены в патогенез эпилепсии, индукцию патологической гипервозбудимости и «переформатирования» нейронных сетей, включая более 20 генов калий-проводящих каналов [16-20], изменение экспрессии или регуляции которых также может играть важную роль в формировании гипервозбудимости и ВF-режимов. Однако в числе противосудорожных препаратов нет препаратов, действие которых направлено на модуляцию активности калий-проводящих каналов. Ретигабин, агонист канала К_у7.х (опосредующего М-ток), допущенный к применению в США и Европе в 2011-2012 гг., снят с производства ввиду побочных эффектов и низкого спроса [21]. Поэтому выявление вклада таких каналов в индукцию эпилептиформной активности имеет важное фундаментальное значение и высокую медицинскую значимость. В тренде исследований последних лет находится поиск эффективных модуляторов (активаторов и ингибиторов) нейронального калий-хлорного переносчика 2 типа (КСС2) для лечения разных типов эпилептогенеза [22, 23].

НАРУШЕНИЕ ИОННОГО ГОМЕОСТАЗА И МОДЕЛИ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ГИПЕРВОЗБУДИМОСТИ

Дисбаланс ионов при эпилептиформной активности. В экспериментах на животных и на срезах мозга *in vitro* показано [6–9], что на клеточном уровне переход от покоя к гипервозбуждению нейронных сетей приводит к существенному изменению трансмембранного градиента основных ионов, включая Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , H^+ и HCO_3^- .

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

Этот ионный дисбаланс, в частности, характеризуется увеличением концентрации K⁺ ([K⁺]_o) в межклеточном пространстве с 3–4 мМ до 12 мМ (в 3–4 раза), сопряженным с ростом внутриклеточной концентрации Na⁺ – с 10 мМ до 30– 40 мМ (в 3–4 раза), Cl⁻ – с 5–6 мМ до 25 мМ (в 5– 6 раз), Ca²⁺ – с 50–70 мкМ до 700 мкМ (в 10 раз) [6, 9].

Устойчивый рост средней внутриклеточной концентрации Ca²⁺ во время SLE может быть триггером, запускающим иммунные и воспалительные каскады с участием ядерного фактора активации Т-лимфоцитов (NFAT), ядерного фактора «каппа-би» (NF κ B), нейротрофического фактора головного мозга (BNDF) и других факторов, приводящих к последующему переформатированию нейронных сетей. Изменение [K⁺]_o, [Na⁺]_i и [Cl⁻]_i может быть как следствием, так и причиной гипервозбудимости нейронных сетей (см. ниже).

Механизмы гипервозбудимости (модели и гипотезы). За последние 50 лет предложено несколько основных моделей, объясняющих механизмы иктогенеза и ВF-режимов, включая калиевую, ГАМК-, мембранную (клеточную) и синаптическую (сетевую) модели.

1. В калиевой модели [24–26] рост [K⁺]_о рассматривается как причина патологической гипервозбудимости нейронных сетей, приводящая к образованию положительной обратной связи в сети.

Гипотеза о роли K⁺ в индукции гипервозбуждения сети (potassium accumulation hypothesis) была предложена в 1970 году [25], когда было установлено, что К⁺ накапливается в межклеточном пространстве в период судорожной активности в области гипервозбуждения нейронов. Эта гипотеза постулировала возникновение в нейронной сети PFL, основанной на том, что увеличение $[K^+]_0$ вызывает уменьшение равновесного калиевого потенциала (E_r) в соответствии с законом и уравнением Нернста, сдвигая потенциалы реверсии различных калиевых токов вправо, что вызывает деполяризацию нейронов. Повышение возбудимости и увеличение частоты импульсной активности нейронов в свою очередь еще больше увеличивает [K⁺]_о и приводит к гипервозбуждению сети [24-26].

Эксперименты на животных и опыты *in vitro* свидетельствуют в пользу такого механизма. Показано, что патологическое гипервозбуждение можно индуцировать: введением KCl в желудочки мозга животных [27]; перфузией срезов гиппокампа раствором, содержащим 8 мМ KCl [7–9, 24, 28, 29]; аппликацией 6–8 мМ KCl или NH₄Cl в нейроглиальные культуры [11, 30, 31]. Помимо влияния на потенциалы реверсии различных калиевых токов, увеличение $[K^+]_0$ деполяризует потенциал реверсии и увеличивает проводимость нуклеотид-зависимых каналов, активируемых гиперполяризацией (HCN-каналов), опосредующих входящий Na⁺/K⁺-ток (*I*_h-ток) [32], способствуя активации сети. Однако механизмы, обеспечивающие увеличение $[K^+]_0$, изучены недостаточно.

Некоторые авторы связывают рост $[K^+]_o$ с нарушением K^+ -буферной функции астроцитов [33], тогда как другие объясняют рост $[K^+]_o$ активацией переносчика КСС2 пирамидных нейронов избытком $[Cl^-]_i$, входящего через ГАМК_А-зависимые каналы при активации быстрых тормозных ГАМК-интернейронов [7, 22, 23, 26, 34, 35]. Возможное участие калий-проводящих каналов с входящим и выходящим выпрямлением (inward/outward rectifiers) в регуляции гомеостаза $[K^+]_o$ не рассматривается.

2. В ГАМК-модели нарушение баланса между возбуждением и торможением, т.е. баланса положительных и отрицательных обратных связей (PFL/NFL) в нейронной сети, связывают: 1) со снижением тормозной активности ГАМК-интернейронов вследствие их гибели в процессе эпилептогенеза [36, 37]; 2) с инверсией соответствующих хлорных токов при низкой активности калий-хлорного переносчика КСС2 глутаматэргических пирамидных и других нейронов, возможной при некоторых типах эпилепсии [22, 38]; 3) с первичной парадоксальной активацией быстрых ГАМК-интернейронов, вызывающей накопление внутриклеточного Cl⁻, последующий рост [K⁺]₀ (с участием переносчика КСС2) и гиперактивацию сети с участием [K⁺]₀-зависимой PFL [35, 39]. Механизм (3) представляет собой расширение калиевой модели. Однако остается открытым вопрос о триггерах, вызывающих активацию ГАМК-интернейронов в условиях in vivo.

Блокада ГАМК_А-рецепторов и К_v-каналов или активация АМПА-рецепторов в экспериментах *in vivo*, на срезах мозга или культурах путем применения эксайтотоксичных веществ типа бикукулина, 4-аминопиридина, пилокарпина или каиновой кислоты, которые приводят к развитию SLE [11, 29, 30, 40], подтверждает возможность реализации ГАМК-модели, учитывающей нарушение баланса PFL/NFL в нейронных сетях. Следует отметить, что введение, например, бикукулина (блокатора тормозных ГАМК_А-рецепторов) или каиновой кислоты (агониста возбуждающих АМПА-рецепторов) приводит к генерации двух различных типов паттернов электрической активности в гиппокампе, что может свидетельствовать о вовлечении в процессы эпилептогенеза различных конфигураций нейронных сетей [41].

3. В мембранной (клеточной) модели [24, 26, 38, 42-45] доминирование возбуждения (PFL) обусловлено появлением групп пейсмейкерных глутаматэргических нейронов, способных в патологических условиях спонтанно генерировать BF-режимы (intrinsic BF cells). Такие пирамидные и гранулярные клетки обнаружены как в моделях эпилептогенеза у животных [24, 44-47], так и у пациентов с эпилепсией [48]. Число таких клеток в поле СА1 и зубчатой извилине гиппокампа в процессе эпилептогенеза у животных увеличивалось от 5-10% до 50% [47]. Однако конфигурации катионных каналов (токов), обеспечивающие устойчивое функционирование пейсмейкерных клеток при «переформатировании» нейронных сетей, пока не установлены.

4. В синаптической (сетевой) модели генерация ВF-режимов является системным эффектом, связанным с суммированием входных сигналов на синапсах дендритов, имеющих необходимую (но какую?) конфигурацию ионотропных глутаматэргических (АМПА-, каинатных и НМДА-) и ГАМК-эргических (ГАМК_А-) рецепторов, каналы которых проводят Na⁺, Ca²⁺ и Cl⁻ соответственно [8, 26, 42, 43]. Такое суммирование может происходить, например, на дендритах пирамидных клеток полей CA1–CA3 и гранулярных клетках зубчатой извилины гиппокампа, клеток мозжечка и таламуса.

Таким образом, представленные выше данные свидетельствуют о том, что различные модели (механизмы) не исключают, а, наоборот, могут дополнять друг друга, обеспечивая вариабельность механизмов эпилептогенеза.

Математические модели и вырожденность динамических систем. Гипотезу о роли калия в индукции SLE подтверждают также результаты анализа математических моделей. К настоящему времени предложены десятки математических моделей различной сложности, описывающих как один нейрон, так и сеть, включающую группы пирамидных клеток и интернейронов, в которых [K⁺]₀ используется как медленная переменная или параметр, изменение которого обеспечивает бифуркации всех известных режимов (бистабильность, тонические, ВГ-режимы и др.) [7, 26, 49-55]. В моделях может учитываться диффузия калия из внеклеточной среды в межклеточное пространство [56] и/или его активный транспорт в астроциты [55]. Однако в таких математических моделях различные ионные токи описываются феноменологически (в приближении Ходжкина-

Хаксли), что не всегда позволяет определить вклад конкретных ионных каналов. Неудивительно, что модели разного уровня сложности, включающие несколько системных PFL, описывают сходный набор динамических свойств.

Характерный пример неоднозначности решения приведен в работе [57], в которой проведено сравнение BF-режимов в моделях одинаковой размерности, учитывающих 8 проводимостей (g_L , g_{Kd} , g_{KCa} , g_A , g_{Na} , g_{CaT} , g_{CaS} , g_H). На рис. 2 этой работы показано, что одинаковые BF-режимы наблюдаются в этих моделях при вариации величин g_{max} на порядок, т.е. при разных конфигурациях входящих и выходящих токов в системе.

Следуя определению, введенному Дж. Эдельманом в 2001 г. [58], такое свойство биологических динамических систем называют вырожденностью (degeneracy). Вырожденность – способность разнородных элементов выполнять в определенных условиях одну и ту же функцию, замещая друг друга. Применительно к катионным каналам вырожденность - это функциональное перекрытие соответствующих токов, имеющих сходство вольт-амперных и временных характеристик, которое может играть важную роль как в нормальных условиях, так и при эпилептогенезе [57, 59, 60]. Поэтому, оставаясь в рамках конкретной модели, невозможно категорично утверждать, что выбранная конфигурация токов (или проводимостей) соответствует данным in vivo и in vitro.

В важных многолетних исследованиях механизмов SLE, которые проводились группами М. Баженова [54] и М. Де Куртиса [34] и сочетали экспериментальные исследования и анализ математических моделей, показано, что первичная активация импульсной активности тормозных интернейронов приводит к росту $[K^+]_0$ с последующей активацией импульсной активности возбуждающих пирамидных клеток и гиперактивацией сети с участием [K⁺]₀-зависимой PFL. Однако рост [K⁺]_о и формирование системной PFL группа Баженова связывает с функционированием переносчика КСС2, а группа Де Куртиса – с выходящим калиевым током. Принимая логику вырожденности биологических систем, можно допустить реализацию обоих механизмов при эпилептогенезе различной этиологии.

НАДЕЖНОСТЬ И ВЫРОЖДЕННОСТЬ КАК ОСНОВА УСТОЙЧИВОГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГИПЕРВОЗБУДИМЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Надежность, вырожденность и отрицательные обратные связи. Нейронные сети представляют собой открытые динамические системы с боль-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

шим числом положительных и отрицательных обратных связей [61-63], играющих важную роль в генерации разнообразных ритмических процессов в мозге в норме и при различных патологиях [64]. Такие динамические системы являются надежными. Применительно к физическим динамическим системам понятие надежности было ввелено Г. Боле в 1945 г. [65]. Належность (robustness) означает способность динамической системы выполнять заданную функцию в условиях меняющихся внутренних и внешних параметров. Понятие грубости, введенное А.А. Андроновым и Л.С. Понтрягиным в 1937 г. [66], соответствует надежности поведения динамической системы в ε-окрестности изменения параметров системы. В физических (технических) системах надежность обеспечивается дублированием элементов (блоков) системы и наличием петель NFL. Стабилизация отношения «вход-выход» при изменении параметров системы лучше обеспечивается в многоконтурных системах управления с семействами вложенных петель NFL, охватывающих ненадежные элементы [67].

В биологических системах вместо дублирования используется вырожденность, которая вместе с многочисленными NFL обеспечивает надежность – устойчивость функционирования системы [68-71]. Например, в стабилизации рН крови участвуют три системы с перекрывающимися функциями (вырожденность) и собственными петлями NFL, в совокупности обеспечиваюшие належность системы. Сходным образом устроена система стабилизации уровня глюкозы в крови натощак. Ковалентная модификация и эпигенетический контроль приводят к значительным изменениям активности белков метаболических и сигнальных систем и различных ионных каналов (т.е. параметров систем), адаптируя клетки разных типов к меняющимся условиям среды. Надежность в условиях таких вариаций параметров и обеспечивается вырожденностью и многочисленными контурами петель NFL.

Вырожденность в мозге может реализоваться на: 1) клеточном уровне (морфологическая изменчивость и вариабельность проводимостей каналов), 2) уровне нейронных сетей (вариабельность синаптических контактов и пластичность) и 3) системном уровне (нейрогуморальные связи), обеспечивая, таким образом, при эпилептогенезе разнообразие вариантов гипервозбудимости нейронных сетей и надежность функционирования системы [72, 73]. Морфологическая изменчивость и вариабельность проводимостей каналов, наблюдающиеся при переходе от одной клетки к другой, благодаря свойству вырожденности обеспечивают сходство ответов таких клеток, т.е. устойчивость функционирования нейронных сетей в норме и при патологии [73].

О роли петель положительной обратной связи. Хорошо известно, что многочисленные эндогенные ритмические процессы в организме поддерживаются благодаря функционированию петель положительной обратной связи (PFL) [74-77]. Кроме того, как показывает анализ математических моделей, сочетание перекрывающихся петель NFL и PFL также может способствовать усилению устойчивости и надежности системы [75-78]. И, что не менее важно, PFL могут повысить чувствительность динамических систем к сигналам внутри петли [74, 75]. Таким образом, сочетание устойчивости функционирования и высокой чувствительности может достигаться в системе с семейством вложенных петель PFL. Представленный ниже пример демонстрирует такое свойство сигнальной системы адипоцитов с участием липидкиназы (PI3K), протеинкиназы G (PKG), рианодинового рецептора (RyR) и Ca^{2+} . В экспериментах на культурах адипоцитов с использованием ингибиторного анализа, ПЦР-анализа и иммунохимии показано, что сигнальная цепочка $PI3K \rightarrow AKT \rightarrow NOS \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow ARC \rightarrow$ $\rightarrow cADPr \rightarrow RyR \rightarrow Ca^{2+} \rightarrow AKT$ представляет собой устойчивый и чувствительный многопетлевой генератор, способный генерировать ритмические процессы при действии группы пептидных гормонов, ацетилхолина и норадреналина [79]. Однако чувствительность системы к гормонам возрастает на порядок при их комбинированном действии, что сторонним наблюдателем может рассматриваться как синергия, а не усиление сигнала внутри петли. Разрыв одной или двух петель PFL (введение ингибиторов киназ) слабо влияет на функцию такой системы. Очевидно, что сходные эффекты могут реализоваться и в других органах и тканях.

Представляется вероятным, что такой принцип организации управления — с многоконтурным сочетанием NFL/PFL — имеет место в нейронных сетях при эпилептогенезе. При переходе от нормы к патологическому процессу происходит переформатирование динамической системы — изменяется структура ее управления с участием многочисленных прямых и обратных связей.

Забытые и игнорируемые петли положительной обратной связи. Активация калием калий-проводящих каналов с входящим и выходящим выпрямлением (HCN, $K_{ir}2.x$, hERG). Примерные вольт-амперные характеристики каналов HCN ($I_{\rm h}$ -ток), $K_{\rm ir}2.x$ ($I_{\rm K1}$ -ток) и hERG ($K_{\rm v}$ 11.x, $I_{\rm Kr}$ -ток) показаны на рис. 16–г. Видно, что эти каналы проводят катионы в обоих направлениях и активируются внеклеточным калием (K^+_{o}) [80–85]. Активация калием выхода калия из клетки соответствует возникновению трех PFL (PFL1: $K^+_{o} \rightarrow$ HCN \rightarrow K^+_{o} ;

PFL2: $K_{o}^{+} \rightarrow K_{ir}2.x \rightarrow K_{o}^{+}$; PFL3: $K_{o}^{+} \rightarrow hERG \rightarrow K_{o}^{+}$). Таким образом, можно предположить, что калий-активируемый выход калия из клетки может быть источником и причиной накопления K_{o}^{+} в период индукции SLE. Сходная форма вольт-амперных характеристик свидетельствует о том, что входящие, а также выходящие токи для этих каналов могут замещать друг друга (при увеличении экспрессии одного канала и уменьшении экспрессии другого — вырожденность). Сходство большинства электрических характеристик каналов HCN и K_{ir}2.x показано в работе [60]. Существующие данные об изменении экспрессии этих каналов при эпилептогенезе различной этиологии противоречивы [16−19].

Кальций-активируемый ВК-канал (ВК_{Са}, I_{BK}). Активация кальцием потенциал-зависимого кальций-активируемого калиевого канала большой проводимости (ВК-канала) также приводит к выходу K⁺ из нейронов, что может способствовать росту [K⁺]_o и может рассматриваться как новая PFL в сети: Ca²⁺_i \rightarrow BK \rightarrow K⁺_o \rightarrow Na⁺_i \rightarrow NCX_{rev} \rightarrow Ca²⁺_i. Данные об изменении экспрессии BK-каналов при эпилептогенезе также противоречивы, хотя преимущественно имеет место увеличение экспрессии этих каналов [16–19].

Na, *1.х канал и его петли PFL*. К концу XX века стало ясно, что в инициацию судорожной активности и распространяющейся депрессии может быть вовлечен медленно инактивирующийся или неинактивирующийся (постоянный, персистирующий – persistent) деполяризующий входящий натриевый ток I_{NaP}. Последующие исследования показали, что при эпилепсии разной этиологии экспрессия каналов Na_v1.1-1.3 уменьшается. Однако падение амплитуды быстрого тока оказывается сопряженным с увеличением постоянного тока I_{NaP} [86]. В 2000 г. Дж. Сомьен и М. Мюллер показали, что оба тока – быстрый и постоянный – активируются К⁺₀. Авторы предположили, что активация I_{NaP} посредством К⁺ представляет еще одну PFL в нейронных сетях [28]. Однако эта очевидная обратная связь, включающая ось К⁺ , → $\rightarrow I_{NaP} \rightarrow Na_{i}^{+} \rightarrow K_{0}^{+}$, до сих пор не оценена должным образом. Такой ток учитывается практически во всех математических моделях, но его активация посредством К⁺₀ не рассматривается. В 2017 г. на мышах-мутантах с эпилепсией было обнаружено, что активация кальцием кальмодулин-зависимой киназы CaMKII приводит к фосфорилированию каналов Nav1.х и к активации тока I_{NaP}[87]. Учитывая, что в начале SLE имеет место многократный рост $[Na^+]_i$ и $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах, можно полагать, что еще одна PFL с участием оси $Ca^{2+}_{i} \rightarrow CaMKII \rightarrow I_{NaP} \rightarrow Na^{+} \rightarrow$ $\rightarrow NCX_{rev} \rightarrow Ca^{2+}$, может быть вовлечена в поддержание BF-режимов и гиперактивности нейронных сетей. Обе PFL показаны на рис. 1л. Петля с участием CaMKII, основанная на ковалентной модификации каналов Nav1.x, является медленной, поскольку реализуется на минутном интервале времени. Аденилатциклаза 9 (АС9) также активируется кальцием [88], что может приводить к последующей активации протеинкиназы А $(Ca^{2+}_{i} \rightarrow AC9 \rightarrow cAMP \rightarrow PKA)$. Мишенями СаМКІІ и РКА являются различные каналы и транспортеры в нейронах. Поэтому можно допустить формирование ещё нескольких медленных петель PFL, вовлеченных в переформатирование нейронных сетей при эпилептогенезе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, суммируя существующие данные о роли K^+_{o} в индукции SLE и возможных механизмах, вызывающих увеличение его концентрации, мы предлагаем потенциальный механизм, основанный на известной регуляции калием и кальцием группы катионных каналов (HCN, $K_{ir}2.x$, hERG, BK_{Ca} , $Na_v1.x$), позволяющий:

1. Обеспечить надежность и высокую чувствительность SLE к внешним и внутренним факторам за счет вырожденности (способности различных токов замещать друг друга) и наличия в системе группы петель положительной обратной связи (избыточность), основанных преимущественно на активации ряда катионных каналов внеклеточным калием.

2. Объяснить рост [K⁺]_о в межклеточном пространстве при SLE, запускающий гиперактивацию нейронной сети, активацией калием выброса калия группой катионных каналов с потенциал-зависимостью либо прямым и обратным выпрямлением.

В настоящее время вопрос об участии различных NFL в стабилизации работы нейронных сетей остается открытым. Представляется вероятным, что при эпилептогенезе в нейронных сетях может иметь место принцип организации управления с многоконтурным сочетанием NFL/PFL. При переходе от нормы к патологическому процессу происходит переформатирование динамической системы — изменяется структура ее управления с участием многочисленных прямых и обратных связей. Поэтому в фокусе исследований механизмов патологических процессов должны быть не только доступные методы «омикс», но и теоретический и экспериментальный анализ меняющейся структуры управления в системе с участием многочисленных NFL/PFL.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00224-24-01 (FFRS-2024-0013).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы настоящей работы заявляют, что не имеют конфликта интересов касательно материалов, представленных в работе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shao J., Liu Y., Gao D., Tu J., and Yang F. Neural burst firing and its roles in mental and neurological disorders. *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 741292 (2021). DOI: 10.3389/fncel.2021.741292
- Targa D. A. H., Matosin N., and Ooi L. Neuronal hyperexcitability in Alzheimer's disease: what are the drivers behind this aberrant phenotype? *Transl. Psychiatry*, **12**, 257 (2022). DOI: 10.1038/s41398-022-02024-7
- Telias M. and Segal M. Editorial: Pathological hyperactivity and hyperexcitability in the central nervous system. *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 955542 (2022). DOI: 10.3389/fnmol.2022.955542
- Stöber T. M., Batulin D., Triesch J., Narayanan R., and Jedlicka P. Degeneracy in epilepsy: multiple routes to hyperexcitable brain circuits and their repair. *Commun. Biol.*, 6, 479 (2023).
 DOI: 10.1038/s42003-023-04823-0
- 5. Chauhan P., Philip S. E., Chauhan G., and Mehra S. The anatomical basis of seizures. In *Epilepsy*, Ed. by S. J. Czuczwar (Exon Publications, Brisbane (AU), 2022), pp. 15–23.
- Antonio L. L., Anderson M. L., Angamo E. A., Gabriel S., Klaft Z.-J., Liotta A., Salar S., Sandow N., and Heinemann U. *In vitro* seizure like events and changes in ionic concentration. *J. Neurosci. Methods*, 260, 33–44 (2016). DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.08.014
- de Curtis M., Uva L., Gnatkovsky V., and Librizzi L. Potassium dynamics and seizures: why is potassium ictogenic? *Epilepsy Res.*, 143, 50–59 (2018). DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2018.04.005

- Rasmussen R., O'Donnell J., Ding F., and Nedergaard M. Interstitial ions: a key regulator of statedependent neural activity? *Prog. Neurobiol.*, **193**, 101802 (2020). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2020.101802
- Raimondo J. V., Burman R. J., Katz A. A., and Akerman C. J. Ion dynamics during seizures. *Front. Cell. Neurosci.*, 9, 419 (2015). DOI: 10.3389/fncel.2015.00419
- Liotta A., Caliskan G., ul Haq R., Hollnagel J. O., Rösler A., Heinemann U., and Behrens C. J. Partial disinhibition is required for transition of stimulus-induced sharp wave-ripple complexes into recurrent epileptiform discharges in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.*, **105**, 172–187 (2011). DOI: 10.1152/jn.00186.2010
- Teplov I. Y., Zinchenko V. P., Kosenkov A. M., Gaidin S. G., Nenov M. N., and Sergeev A. I. Involvement of NMDA and GABA(A) receptors in modulation of spontaneous activity in hippocampal culture: Interrelations between burst firing and intracellular calcium signal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 553, 99– 106 (2021). DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.149
- Krahe R. and Gabbiani F. Burst firing in sensory systems. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 13–23 (2004). DOI: 10.1038/nrn1296
- Sills G. J. and Rogawski M. A. Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology*, 168, 107966 (2020).
 DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.107966
- 14. Manford M. Recent advances in epilepsy. J. Neurol., 264, 1811–1824 (2017). DOI: 10.1007/s00415-017-8394-2
- Chen Z., Brodie M. J., Liew D., and Kwan P. Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs: a 30-year longitudinal cohort study. *JAMA Neurol.*, **75**, 279–286 (2018). DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.3949
- Köhling R. and Wolfart J. Potassium channels in epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 6, a022871 (2016). DOI: 10.1101/cshperspect.a022871
- Villa C. and Combi R. Potassium channels and human epileptic phenotypes: an updated overview. *Front. Cell. Neurosci.*, **10**, 81 (2016). DOI: 10.3389/fncel.2016.00081
- van Loo K. M. J. and Becker A. J. Transcriptional regulation of channelopathies in genetic and acquired epilepsies. *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 587 (2019). DOI: 10.3389/fncel.2019.00587
- Nikitin E. S. and Vinogradova L. V. Potassium channels as prominent targets and tools for the treatment of epilepsy. *Expert Opin. Ther. Targets*, 25, 223–235 (2021). DOI: 10.1080/14728222.2021.1908263
- 20. Khan R., Chaturvedi P., Sahu P., Ludhiadch A., Singh P., Singh G., and Munshi A. Role of potassium ion channels in epilepsy: focus on current therapeutic

strategies. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **23**, 67–87 (2024). DOI: 10.2174/1871527322666221227112621

- Brickel N., Hewett K., Rayner K., McDonald S., De'Ath J., Daniluk J., Joshi K., Boll M. C., Tiamkao S., Vorobyeva O., and Cooper J. Safety of retigabine in adults with partial-onset seizures after longterm exposure: focus on unexpected ophthalmological and dermatological events. *Epilepsy Behav.*, **102**, 106580 (2020). DOI: 10.1016/j.yebeh.2019.106580
- Di Cristo G., Awad P. N., Hamidi S., and Avoli M. KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders. *Prog. Neurobiol.*, **162**, 1–16 (2018). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.11.002
- McMoneagle E., Zhou J., Zhang S., Huang W., Josiah S. S., Ding K., Wang Y., and Zhang J. Neuronal K+-Cl- cotransporter KCC2 as a promising drug target for epilepsy treatment. *Acta Pharmacol. Sin.*, 45, 1–22 (2024). DOI: 10.1038/s41401-023-01149-9
- Traynelis S. F. and Dingledine R. Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J. Neurophysiol.*, 59, 259–276 (1988). DOI: 10.1152/jn.1988.59.1.259
- Fertziger A. P. and Ranck J. B. Potassium accumulation in interstitial space during epileptiform seizures. *Exp. Neurol.*, 26, 571–585 (1970).
 DOI: 10.1016/0014-4886(70)90150-0
- Fröhlich F., Bazhenov M., Iragui-Madoz V., and Sejnowski T. J. Potassium dynamics in the epileptic cortex: new insights on an old topic. *Neuroscientist*, 14, 422–433 (2008). DOI: 10.1177/1073858408317955
- Zuckermann E. C. and Glaser G. H. Hippocampal epileptic activity induced by localized ventricular perfusion with high-potassium cerebrospinal fluid. *Exp. Neurol.*, 20, 87–110 (1968). DOI: 10.1016/0014-4886(68)90126-x
- Somjen G. G. and Müller M. Potassium-induced enhancement of persistent inward current in hippocampal neurons in isolation and in tissue slices. *Brain Res.*, 885, 102–110 (2000).
 DOI: 10.1016/s0006-8993(00)02948-6
- Wang L., Dufour S., Valiante T. A., and Carlen P. L. Extracellular potassium and seizures: excitation, inhibition and the role of *I*h. *Int. J. Neural. Syst.*, 26, 1650044 (2016). DOI: 10.1142/S0129065716500441
- Dynnik V. V., Kononov A. V., Sergeev A. I., Teplov I. Y., Tankanag A. V., and Zinchenko V. P. To break or to brake neuronal network accelerated by ammonium ions? *PLoS One*, **10**, e0134145 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0134145
- Зинченко В. П., Туровский Е. А., Туровская М. В., Бережнов А. В., Сергеев А. И. и Дынник В. В. NAD вызывает диссоциацию нейронных сетей на субпопуляции нейронов, подавляя синхронную гиперактивность сетей, индуцированную ионами аммония. Биологические мембраны, 33, 150–158 (2016). DOI: 10.7868/S0233475516020134

- Spain W. J., Schwindt P. C., and Crill W. E. Anomalous rectification in neurons from cat sensorimotor cortex *in vitro. J. Neurophysiol.*, 57, 1555–1576 (1987). DOI: 10.1152/jn.1987.57.5.1555
- David Y., Cacheaux L. P., Ivens S., Lapilover E., Heinemann U., Kaufer D., and Friedman A. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? *J. Neurosci.*, 29, 10588–10599 (2009).
 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2323-09.2009
- Gentiletti D., de Curtis M., Gnatkovsky V., and Suffczynski P. Focal seizures are organized by feedback between neural activity and ion concentration changes. *Elife*, **11**, e68541 (2022). DOI: 10.7554/eLife.68541
- Scalmani P., Paterra R., Mantegazza M., Avoli M., and de Curtis M. Involvement of GABAergic interneuron subtypes in 4-aminopyridine-induced seizure-like events in mouse entorhinal cortex in vitro. *J. Neurosci.*, 43, 1987–2001 (2023). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1190-22.2023
- Dudek F. E. Loss of GABAergic interneurons in seizure-induced epileptogenesis-two decades later and in a more complex world. *Epilepsy Curr.*, 20, 70S–72S (2020). DOI: 10.1177/1535759720960464
- Bradford H. F. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.*, **47**, 477–511 (1995). DOI: 10.1016/0301-0082(95)00030-5
- Dossi E. and Huberfeld G. GABAergic circuits drive focal seizures. *Neurobiol. Dis.*, 180, 106102 (2023). DOI: 10.1016/j.nbd.2023.106102
- Yekhlef L., Breschi G. L., Lagostena L., Russo G., and Taverna S. Selective activation of parvalbumin- or somatostatin-expressing interneurons triggers epileptic seizurelike activity in mouse medial entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.*, **113**, 1616–1630 (2015). DOI: 10.1152/jn.00841.2014
- Rutecki P. A., Lebeda F. J., and Johnston D. 4-Aminopyridine produces epileptiform activity in hippocampus and enhances synaptic excitation and inhibition. *J. Neurophysiol.*, 57, 1911–1924 (1987). DOI: 10.1152/jn.1987.57.6.1911
- Bragin A., Azizyan A., Almajano J., and Engel J. The cause of the imbalance in the neuronal network leading to seizure activity can be predicted by the electrographic pattern of the seizure onset. *J. Neurosci.*, 29, 3660–3671 (2009). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5309-08.2009
- Hablitz J. J. and Johnston D. Endogenous nature of spontaneous bursting in hippocampal pyramidal neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 1, 325–334 (1981). DOI: 10.1007/BF00716267
- Johnston D. and Brown T. Mechanisms of neuronal burst generation. In *Electrophysiology of Epilepsy* (Academic Press, Inc., London, 1984), pp. 278–301.
- 44. Pan E. and Stringer J. L. Role of potassium and calcium in the generation of cellular bursts in the dentate gyrus.

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

J. Neurophysiol. **77**, 2293–2299 (1997). DOI: 10.1152/jn.1997.77.5.2293

- Jensen M. S. and Yaari Y. Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *J. Neurophysiol.*, 77, 1224–1233 (1997). DOI: 10.1152/jn.1997.77.3.1224
- Lee-Liu D. and Gonzalez-Billault C. Neuron-intrinsic origin of hyperexcitability during early pathogenesis of Alzheimer's disease: An editorial highlight for "Hippocampal hyperactivity in a rat model of Alzheimer's disease" on https://doi.org/10.1111/jnc.15323. J. Neurochem., 158, 586–588 (2021). DOI: 10.1111/jnc.15248
- Sanabria E. R., Su H., and Yaari Y. Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J. Physiol.*, **532**, 205–216 (2001). DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.0205g.x
- Hofer K. T., Kandrács Á., Tóth K., Hajnal B., Bokodi V., Tóth E. Z., Erőss L., Entz L., Bagó A. G., Fabó D., Ulbert I., and Wittner L. Bursting of excitatory cells is linked to interictal epileptic discharge generation in humans. *Sci. Rep.*, **12**, 6280 (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-10319-4
- Whisler J. W. and Johnston D. Epileptogenesis: a model for the involvement of slow membrane events and extracellular potassium. *J. Theor. Biol.*, **75**, 271–278 (1978). DOI: 10.1016/0022-5193(78)90334-x
- de Curtis M., Librizzi L., and Uva L. *In vitro* isolated guinea pig brain. In *Models of Seizures and Epilepsy* 103–109 (Academic Press Inc., 2006).
- Jirsa V. K., Stacey W. C., Quilichini P. P., Ivanov A. I., and Bernard C. On the nature of seizure dynamics. *Brain*, 137, 2210–2230 (2014). DOI: 10.1093/brain/awu133
- Rasmussen R., Jensen M. H., and Heltberg M. L. Chaotic dynamics mediate brain state transitions, driven by changes in extracellular ion concentrations. *Cell Syst.*, 5, 591–603 (2017). DOI: 10.1016/j.cels.2017.11.011
- Depannemaecker D., Ivanov A., Lillo D., Spek L., Bernard C., and Jirsa V. A unified physiological framework of transitions between seizures, sustained ictal activity and depolarization block at the single neuron level. *J. Comput. Neurosci.*, **50**, 33–49 (2022). DOI: 10.1007/s10827-022-00811-1
- González O. C., Shiri Z., Krishnan G. P., Myers T. L., Williams S., Avoli M., and Bazhenov M. Role of KCC2-dependent potassium efflux in 4-aminopyridine-induced epileptiform synchronization. *Neurobiol. Dis.*, **109**, 137–147 (2018). DOI: 10.1016/j.nbd.2017.10.011
- 55. Øyehaug L. Slow ion concentration oscillations and multiple states in neuron-glia interaction-insights gained from reduced mathematical models. *Front. Netw. Physiol.*, **3**, 1189118 (2023). DOI: 10.3389/fnetp.2023.1189118

- 56. El Houssaini K., Bernard C., and Jirsa V. K. The epileptor model: a systematic mathematical analysis linked to the dynamics of seizures, refractory status epilepticus, and depolarization block. *eNeuro*, 7 (2), ENEURO.0485-18.2019 (2020). DOI: 10.1523/ENEURO.0485-18.2019
- Goaillard J.-M. and Marder E. Ion channel degeneracy, variability, and covariation in neuron and circuit resilience. *Annu. Rev. Neurosci.*, 44, 335–357 (2021). DOI: 10.1146/annurev-neuro-092920-121538
- Edelman G. M. and Gally J. A. Degeneracy and complexity in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13763–13768 (2001).
 DOI: 10.1073/pnas.231499798
- Onasch S. and Gjorgjieva J. Circuit stability to perturbations reveals hidden variability in the balance of intrinsic and synaptic conductances. *J. Neurosci.*, 40, 3186–3202 (2020).
 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0985-19.2020

60. Mishra P. and Narayanan R. Ion-channel degeneracy: Multiple ion channels heterogeneously regulate intrinsic physiology of rat hippocampal granule cells. *Physiol. Rep.*, **9**, e14963 (2021). DOI: 10.14814/phy2.14963

- Pouille F., Marin-Burgin A., Adesnik H., Atallah B. V., and Scanziani M. Input normalization by global feedforward inhibition expands cortical dynamic range. *Nat. Neurosci.*, **12**, 1577–1585 (2009). DOI: 10.1038/nn.2441
- Isaacson J. S. and Scanziani M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*, 72, 231–243 (2011). DOI: 10.1016/j.neuron.2011.09.027
- Kee T., Sanda P., Gupta N., Stopfer M., and Bazhenov M. Feed-forward versus feedback inhibition in a basic olfactory circuit. *PLoS Comput. Biol.*, 11, e1004531 (2015). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004531
- 64. Buzsáki G. and Watson B. O. Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues Clin. Neurosci.*, 14, 345–367 (2012). DOI: 10.31887/DCNS.2012.14.4/gbuzsaki
- Bode H. W. Network Analysis and Feedback Amplifier Design (D. Van Nostrand Company, New York, NY, 1945).
- Andronov A. A. and Pontriagin L. S. Structurally stable systems. *Doklady AN SSSR*, 14, 247–250 (1937).
- 67. Truxal J. Automatic Feedback Control System Synthesis (McGraw-Hill Comp. Inc., New York, 1955).
- Kitano H. Computational systems biology. *Nature*, 420, 206–210 (2002). DOI: 10.1038/nature01254
- 69. Whitacre J. M. Biological robustness: paradigms, mechanisms, and systems principles. *Front. Genet.*, **3**, 67 (2012). DOI: 10.3389/fgene.2012.00067
- Stelling J., Sauer U., Szallasi Z., Doyle F. J., and Doyle J. Robustness of cellular functions. *Cell*, **118**, 675–685 (2004). DOI: 10.1016/j.cell.2004.09.008
- Kitano H. Towards a theory of biological robustness. *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 137 (2007). DOI: 10.1038/msb4100179

- Stöber T. M., Batulin D., Triesch J., Narayanan R., and Jedlicka P. Degeneracy in epilepsy: multiple routes to hyperexcitable brain circuits and their repair. *Commun. Biol.*, 6, 479 (2023).
 DOI: 10.1038/s42003-023-04823-0
- Zang Y. and Marder E. Neuronal morphology enhances es robustness to perturbations of channel densities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2219049120 (2023). DOI: 10.1073/pnas.2219049120
- Freeman M. Feedback control of intercellular signalling in development. *Nature*, 408, 313–319 (2000). DOI: 10.1038/35042500
- Decroly O. and Goldbeter A. Birhythmicity, chaos, and other patterns of temporal self-organization in a multiply regulated biochemical system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 79, 6917–6921 (1982).
 DOI: 10.1073/pnas.79.22.6917
- Cinquin O. and Demongeot J. Roles of positive and negative feedback in biological systems. *C. R. Biol.*, **325**, 1085–1095 (2002).
 DOI: 10.1016/s1631-0691(02)01533-0
- Mitrophanov A. Y. and Groisman E. A. Positive feedback in cellular control systems. *Bioessays*, **30**, 542–555 (2008). DOI: 10.1002/bies.20769
- Nguyen L. K., Muñoz-García J., Maccario H., Ciechanover A., Kolch W., and Kholodenko B. N. Switches, excitable responses and oscillations in the Ring1B/Bmi1 ubiquitination system. *PLoS Comput. Biol.*, 7, e1002317 (2011). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002317
- 79. Turovsky E. A., Turovskaya M. V., and Dynnik V. V. Deregulation of Ca²⁺-signaling systems in white adipocytes, manifested as the loss of rhythmic activity, underlies the development of multiple hormonal resistance at obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 5109 (2021). DOI: 10.3390/ijms22105109
- Yamashita T., Horio Y., Yamada M., Takahashi N., Kondo C., and Kurachi Y. Competition between Mg²⁺ and spermine for a cloned IRK2 channel expressed in a human cell line. *J. Physiol.*, **493** (Pt 1), 143–156 (1996). DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021370
- Ishihara K. and Ehara T. A repolarization-induced transient increase in the outward current of the inward rectifier K+ channel in guinea-pig cardiac myocytes. *J. Physiol.*, **510** (Pt 3), 755–771 (1998). DOI: 10.1111/j.1469-7793.1998.755bj.x
- Dhamoon A. S., Pandit S. V., Sarmast F., Parisian K. R., Guha P., Li Y., Bagwe S., Taffet S. M., and Anumonwo J. M. B. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current. *Circ. Res.*, **94**, 1332–1339 (2004). DOI: 10.1161/01.RES.0000128408.66946.67
- McCormick D. A. and Pape H. C. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol.*, **431**, 291–318 (1990).
 DOI: 10.1113/jphysiol.1990.sp018331
- 84. Azene E. M., Xue T., and Li R. A. Molecular basis of the effect of potassium on heterologously expressed

pacemaker (HCN) channels. *J. Physiol.*, **547**, 349–356 (2003). DOI: 10.1113/jphysiol.2003.039768

- Nuss H. B., Marbán E., and Johns D. C. Overexpression of a human potassium channel suppresses cardiac hyperexcitability in rabbit ventricular myocytes. *J. Clin. Invest.*, **103**, 889–896 (1999). DOI: 10.1172/JCI5073
- Wengert E. R. and Patel M. K. The role of the persistent sodium current in epilepsy. *Epilepsy Curr.*, 21, 40–47 (2021). DOI: 10.1177/1535759720973978
- Thompson C. H., Hawkins N. A., Kearney J. A., and George A. L. CaMKII modulates sodium current in neurons from epileptic Scn2a mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1696–1701 (2017). DOI: 10.1073/pnas.1615774114
- Akram R., Anwar H., Javed M. S., Rasul A., Imran A., Malik S. A., Raza C., Khan I. U., Sajid F., Iman T., Sun T., Han H. S., and Hussain G. Axonal regeneration: underlying molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biomedicines*, **10**, 3186 (2022). DOI: 10.3390/biomedicines10123186

Evolution of Ideas about the Mechanisms of Neuronal Network Hyperactivation and Burst Firing in Epilepsy. Contribution of Potassium-Induced Activation of Potassium-Conducting Channels to Network Hyperactivation

A.S. Galashin*, M.V. Konakov*, and V.V. Dynnik*

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

This review discusses the current understanding of the molecular mechanisms of pathological hyperexcitation and synchronization of neuronal networks in epileptogenesis, including potassium, GABA, membrane (cellular), and synaptic (network) models. The focus of these models is the disturbance of the balance between excitation and inhibition involving multiple positive and negative feedback loops (PFL/NFL) in neuronal networks. This paper considers current ideas about (1) the robustness of dynamical systems with many NFLs, and (2) degeneracy, i.e., the ability of heterogeneous elements (channels, currents) to replace each other, as the basis for the stable functioning of hyperexcited networks in channelopathies and ion channel hyperexpression. In this work, a potential mechanism of spontaneous seizure onset and potassium accumulation in the intercellular space is proposed; it is based on potassium- and calcium-induced activation of a group of cation channels (HCN, $K_{ir}2.x$, hERG, $Na_v1.x$, and BK_{Ca}) and ensures the robustness and high sensitivity of epileptiform activity to external and internal factors due to degeneracy and PFLs formation.

Keywords: epilepsy, robustness and degeneracy in neuronal networks, hyperactivation and burst firing, K^+ *- and* Ca^{2+} *-activated potassium-conducting channels*

УДК 611.81+616.853

СТЕПЕНЬ СПЕЦИФИЧНОСТИ СИНАПТИЧЕСКИХ КОНТАКТОВ ПРИ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦИИ

© 2024 г. З.Н. Журавлева*, #

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

> [#]E-mail: zina_zhur@mail.ru Поступила в редакцию 18.03.2024 г. После доработки 18.03.2024 г. Принята к публикации 19.06.2024 г.

Трансплантация незрелой нервной ткани является перспективным биотехнологическим подходом для восстановления поврежденного мозга. Успех трансплантационной терапии зависит от реализации генетической программы дифференцировки донорских нейрональных предшественников и точности нервных связей как в самих нейротрансплантатах, так и в мозге реципиента. В работе изучена степень специфичности синаптических контактов при трансплантации гиппокамповой формации в неокортекс крыс. С помощью метода электронной микроскопии показано, что в самих трансплантатах дифференцировались преимущественно специфические формы синапсов, которые топографически правильно располагались на сома-дендритной поверхности нейронов. Прорастающие в мозг реципиента аксоны трансплантированных нейронов образовывали синаптические контакты с несвойственными им в норме нейронами. При формировании неспецифических аксональных связей они модифицировали состав и распределение нейромедиаторных пузырьков в пресинаптических дендритах.

Ключевые слова: гетеротопические нейротрансплантаты, гиппокамповая формация, неокортекс, ультраструктура, синаптические контакты, специфичность.

DOI: 10.31857/S0006302924040089, EDN: NHJDKX

Известно, что центральная нервная система взрослых млекопитающих имеет очень ограниченные возможности для регенерации при нейродегенеративных заболеваниях и травмах. Это обусловлено тем, что зрелый мозг содержит преимущественно постмитотические нейроны, не способные к дальнейшему делению. Кроме того, глиальные клетки продуцируют разнообразные молекулы, ингибирующие рост аксональных отростков нейронов. Трансплантация незрелой нервной ткани или нейральных прогениторных клеток является перспективным биотехнологическим подходом для замещения погибших клеток и восстановления нарушенных функций мозга. Следует отметить, что трансплантированные нейроны дифференцируются и функционируют в необычном для себя гуморальном и тканевом микроокружении зрелого мозга. Нейробиологическая основа трансплантационной терапии заключается в способности как эмбриональных, так и зрелых клеточных элементов нервной системы к высокой морфофункциональной пластичности и возможности изменяться под воздействием новых факторов окружающей среды. Процесс нейропластичности имеет множественные формы и включает в себя структурные, функциональные и молекулярные механизмы [1, 2]. Важным компонентом нейропластичности является пластичность синаптических связей. Благодаря синаптической пластичности трансплантированные клетки функционально интегрируются в нервную систему реципиента. В связи с этим очень актуальным является вопрос о степени специфичности формируемых в условиях трансплантации синаптических взаимодействий, так как оптимальная работа мозга зависит от точности нейрональных связей.

Многие исследователи считают, что при трансплантации, также как в онтогенетическом синаптогенезе, существует высокая степень специфичности нервных связей и что только гомотопическая донорская ткань может обеспечить достаточное выживание трансплантированных клеток и оптимальную интеграцию с мозгом [3–5]. В то же время в других работах показано, что в нейротрансплантатах формируются не только типичные для данной области мозга синаптические связи, но и атипичные функциональные контакты [6]. Мы ранее с помощью флуоресцентного трейсера продемонстрировали возможность иннервации нейронов в интраокулярных трансплантатах гиппокампа периферическими нервами, врастающими вдоль кровеносных сосудов из радужной оболочки глаза. При этом электронномикроскопические исследования показали, как периферические волокна, выходя из периваскулярных пространств, лишались шванновских оболочек и образовывали абсолютно неспецифические синаптические контакты с дендритами и дендритными шипиками гиппокампа [7].

Целью настоящей работы была оценка степени специфичности или неспецифичности формирующихся синаптических контактов при гетеротопической трансплантации гиппокамповой формации в соматосенсорную область неокортекса. Эти отделы мозга в норме не контактируют ни анатомически, ни функционально. Специальной задачей было определение уровня воспроизведения структурной организации функциональных контактов и их отклонений от нормы в условиях трансплантации. Для ЭТОГО очень подходящим субмикроскопическим объектом являются гигантские синапсы гиппокамповой формации. Они обладают уникальными ультраструктурными характеристиками и их можно идентифицировать среди других типов синапсов без дополнительной нейрохимической обработки. Используя электронную микроскопию, исследование позволяет выявить субклеточные механизмы, обеспечивающие взаимную адаптацию преи постсинаптических компартментов в неспецифических синаптических контактах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проведены на крысах породы Вистар, содержащихся в условиях институтского вивария. Для трансплантации использовали эмбриональные закладки гиппокампальной области мозга от 18-19-суточных плодов крыс. Самке-донору под общим нембуталовым наркозом (30-40 мг/кг веса, внутрибрюшинно) делали кесарево сечение, извлекали плод, под стереомикроскопом выделяли необходимый материал и хранили в охлажденной среде Игла. В качестве реципиентов служили крысы-самцы той же породы, которые при трансплантации в мозг также были глубоко наркотизированы нембуталом. Животных (n = 5) закрепляли в стереотаксическом аппарате, с помощью бормашины в черепе делали отверстие диаметром 2-3 мм над первичной соматосенсорной корой и с помощью вакуумного насоса отсасывали небольшой объем ткани мозга. В полученную ямку помещали кусочек (примерно 1 мм³) донорской эмбриональной ткани и закры-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

вали кровеостанавливащей губкой. Через 4 месяца после операции животных-реципиентов снова подвергали анестезии и готовили для последующего свето- и электронно-микроскопического исследования нейротрансплантатов. Изучение цитоархитектоники нейротрансплантатов выполняли на окрашенных крезилвиолетом гистологических срезах (метод Ниссля). Для электронной микроскопии животных с интрамозговыми нейротрансплантатами подвергали транскардиальной перфузии сначала физиологическим раствором (10 мин), а затем 2.5%-м раствором глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере (30 мин). После декапитации препарировали мозг, выделяли трансплантаты с прилежащими к ним областями неокортекса, дополнительно дофиксировали погружением в тот же фиксатор (2-3 ч) и обрабатывали 1.0%-м раствором четырехокиси осмия. Дальнейшую обработку материала, обезвоживание в серии спиртов и абсолютном ацетоне, а также заливку в эпоксидную смолу Эпон 812 проводили по стандартной методике. Ориентацию блоков и выбор участков для детального изучения осуществляли на полутонких срезах, окрашенных смесью метиленовой сини и буры. Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме фирмы LKB (Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитоархитектоника и синаптическая организация нейротрансплантатов гиппокамповой формации. При предварительном визуальном и гистологическом анализе неокортикальные трансгиппокамповой плантаты формации были обнаружены у всех оперированных животных. Трансплантаты обычно заполняли всю операционную ямку и немного возвышались над поверхностью мозга реципиента (рис. 1а). На гистологических срезах хорошо распознавались области, занятые трансплантированной тканью и неокортексом реципиента, а также граница между ними. В интерфазе обнаруживались области полного слияния тканей и участки, где трансплантаты и мозг были разделены глиальным рубцом. Внутри трансплантатов четко идентифицировались нейроны и глиальные клетки. Цитоархитектоническая организация различалась в разных трансплантатах: в некоторых образцах нейроны были распределены хаотично, в других – наблюдались большие участки, занятые характерными для гиппокамповой формации *in situ* клеточными слоями пирамидных и гранулярных нейронов (рис. 1б).

Ультраструктура нейронов и синаптических окончаний в трансплантатах визуально соответствовала аналогичным электронно-микроскопи-



Рис. 1. Гетеротопический трансплантат гипокамповой формации в соматосенсорной области неокортекса крысы (4 мес. после операции): (а) – общий вид нейротрансплантата (Т); (б) – гистологический срез (окраска по Нисслю) через трансплантат (Т) и соседний неокортекс мозга реципиента (Н). Область трансплантата обозначена пунктирной линией. Масштаб 1.0 мм.

ческим изображениям в зрелом мозге. Большинство из них имели классические формы и размеры от 0.5-0.8 мкм до 1.0 мкм в диаметре. Важно. что распределение функционально разных синапсов по сома-дендритной поверхности нейронов имело достаточно высокую степень специфичности. Как и в гиппокамповой формации in situ, тормозные синаптические контакты, имеющие симметричные активные зоны, локализовались на поверхности перикарионов нейронов или стволов дендритов, а возбуждающие синапсы, характеризующиеся асимметричными активными зонами, располагались на дендритных шипиках (рис. 2). По-видимому, это обусловлено тем, что донорские нейрональные предшественники на 18–19 сутки эмбрионального развития, помещенные в среду зрелого мозга реципиента, реализуют свою генетически детерминированную программу дифференцировки в определенные типы синапсов. Известно, что пре- и постсинаптические белковые комплексы существуют в нейронах задолго до формирования истинных синаптических контактов. От молекулярного состава этих белковых комплексов зависит возбуждающий или тормозной характер зарождающихся синапсов [8, 9]. В то же время в данной экспериментальной ситуации предположение о высокой специфичности синаптических контактов внутри трансплантированной нервной ткани может быть в полной мере справедливо только для тормозных аксональных систем трансплантатов. Несмотря



Рис. 2. Ультраструктура нейротрансплантата гипокамповой формации. Я – ядро гранулярного нейрона; стрелки указывают на синаптические контакты. Масштаб 1.0 мкм.

на воспроизведение структурных особенностей аксо-шипиковых синаптических контактов, их функциональная специфичность не так однозначна. Не исключено, что многие аксо-шипиковые возбуждающие синапсы в трансплантатах формируются с несвойственными им в норме нейронами, т.к. в гиппокампе in situ на дендритных шипиках заканчиваются внешние эфферентные аксональные системы [10, 11]. Возможно, что в процессе дальнейшего развития нейротрансплантатов часть таких неспецифических синаптических контактов устраняется или замещается при подрастании более функционально адекватных аксонов. Действительно, ранее мы показали, что трансплантированная ткань в течение длительного времени после операции продолжает реорганизацию нейрональных сетей и сохраняет нестабильное морфофункциональное состояние [12].

Среди синапсов классической формы и размеров (0.5-1.0 мкм) в нейротрансплантатах гиппокамповой формации выделялись гигантские синаптические окончания, образованные аксонами гранулярных нейронов зубчатой фасции. Эти уникальные синаптические комплексы идентифицировали благодаря известным данным литературы об их больших аксональных терминалях и сложной ультраструктурной организации синаптического аппарата [13, 14]. В мозге in situ аксоны гранулярных нейронов (так называемые мшистые волокна) собираются в пучки, следуют к проксимальным отделам апикальных дендритов пирамидных нейронов поля САЗ и последовательно образуют с ними функциональные синаптические комплексы, формируя отдельный слой (str. lucidum) гиппокампа.



Рис. 3. Гигантская синаптическая терминаль сложной конфигурации в нейротрансплантате; стрелки указывают на синаптические активные зоны с голов-ками дендритных шипиков. Масштаб 0.5 мкм.

Внутри нейротрансплантатов аксональные терминали мшистых волокон, как и в гиппокампе *in situ*, достигали 3–5 мкм в поперечнике. Гигантские бутоны содержали характерный для них в норме набор синаптических везикул. В основном они были заполнены малыми светлыми пузырьками (30-40 нм в диаметре), которые образовывали выраженные скопления около активных зон. Большие (80-120 нм) электронно-плотные везикулы наблюдались значительно реже и, как правило, располагались экстрасинаптически. Из литературы известно, что основным трансмиттером гигантских синапсов является глутамат, содержащийся в малых везикулах, а в больших электронно-плотных пузырьках хранятся нейропептидные ко-трансмиттеры, которые модулируют синаптическую передачу [15]. Гигантские синапсы в нейротрансплантатах воспроизводили характерный для них в норме интратерминальный способ формирования множественных синаптических активных зон с дендритными шипиками. Однако многие из контактирующих дендшипиков были ритных только частично инвагинированы в пресинаптическую терминаль (рис. 3). Аксо-шипиковые активные зоны имели асимметричный вид из-за выраженных постсинаптических уплотнений и по общепринятой классификации соответствовали химическим возбуждающим контактам.

Как и в гиппокамповой формации *in situ*, терминальные бутоны мшистых волокон помимо синаптических активных зон дифференцировали другой тип мембранных специализаций — симметричные адгезивные соединения с поверхностью стволов дендритов. От активных зон их отличало то, что со стороны пресинапса около них всегда отсутствовали синаптические везикулы. Таким образом, субмикроскопический анализ гигантских синаптических окончаний аксонов гранулярных нейронов в неокортикальных трансплантатах гиппокамповой формации показал, что они в высокой степени воспроизводили свои детерминантные ультраструктурные признаки. Однако следует отметить, что в трансплантированной донорской ткани изначально присутствовала естественная (адекватная) постсинаптическая мишень мшистых волокон (пирамидные нейроны гиппокампа), и для них сохранялась возможность формировать синаптические контакты на специфических постсинаптических мишенях. Поэтому изучение способности мшистых волокон иннервировать несвойственные им в норме нейрональные элементы выполняли при микроскопии соседнего с нейротрансплантатами неокортекса.

Ультраструктурный анализ возможности неспецифических синаптических взаимодействий между гранулярными нейронами гиппокамповой формации и несвойственными им в норме постсинаптическими мишенями в неокортексе. Границу между нейротрансплантатами и мозгом реципиента идентифицировали светомикроскопически на полутонких срезах и на разных уровнях подвергали ультраструктурному исследованию с целью обнаружения прорастающих через нее отростков нервных и глиальных клеток. В участках интерфазы, где наблюдалось полное слияние нейропилей трансплантата и неокортекса, определить принадлежность отростков нервных клеток к той или другой области не представлялось возможным. Однако в областях с четко выраженным глиальным окружением трансплантированной ткани встречались поперечные и продольные пучки аксонов и дендритов, которые следовали между трансплантатами и соседним неокортексом. В таких пучках всегда наблюдались отростки фиброзных астроцитов и группы плотно сгруппированных тонких (0.08–0.10 мкм в диаметре) немиелинизированных аксонов, морфологически аналогичных мшистым волокнам гиппокамповой формации (рис. 4). Присутствие астроцитарных отростков в составе прорастающих аксонов и дендритов предполагает, что они участвовали в ориентации нервных волокон и в афферентноэфферентных взаимодействиях нейротрансплантатов с мозгом реципиента. Известно, что в процессе естественного развития головного мозга млекопитающих глиальные клетки и их отростки служат направляющим субстратом для организации функциональных связей [16].

Исследование соседнего с нейротрансплантатами соматосенсорного неокортекса реципиента было проведено с целью поиска гигантских синаптических терминалей, контактирующих с неспецифическими нейрональными мишенями. Наблюдаемые в неокортексе синаптические окончания, отвечающие по размерам и другим морфологическим признакам гигантским синапсам гиппокамповой формации, часто были сгруппированы вокруг некоторых перикарионов и крупных денд-


Рис. 4. Пучок нервных волокон, проникающий через границу между нейротрансплантатом и мозгом реципиента: а — астроцитарные отростки, г — глиальные клетки на границе между трансплантатом и мозгом, д — дендриты, м — мшистые волокна. Масштаб 1.0 мкм.

ритных стволов. Казалось, ЧТО отдельные гигантские профили являются последовательными расширениями одного и того же мшистого волокна (рис. 5). По везикулярному составу аберрантные терминали не отличались от таковых в самих нейротрансплантатах и содержали тот же набор синаптических и пептидергических везикул. Однако при детальном рассмотрении было отмечено, что в контактах с неспецифическими нейрональными мишенями около активных зон часто концентрировались не только малые синаптические везикулы, но и большие пузырьки с электронно-плотной сердцевиной. Это перераспределение пептид-содержащих везикул из экстрасинаптических локусов к активным зонам в неспецифических синаптических контактах свидетельствует об участии нейропептидных механизмов в адаптации пре- и постсинаптических партнеров друг к другу.

При формировании активных зон гигантские терминали, так же как внутри самих нейротрансплантатов, использовали дендритные шипики. Однако в этом случае дендриты и их выросты принадлежали пирамидным нейронам неокортекса. Большинство дендритных шипиков морфологически не отличалось от классических грибовидных форм. Они были заполнены волокнисто-зернистым содержимым и некоторые из них содержали шипиковый аппарат. В то же время у части шипиков были разветвленные головки, а поперечные срезы через них имели сложные конфигурации. Такая форма шипиков не типична для пирамидных нейронов неокортекса, но характерна для постсинаптических дендритов в зоне окончаний мшистых волокон в гиппокампе in situ. В некоторых дендритных выростах присут-



Рис. 5. Группа гигантских терминалей мшистых волокон (гт), образующих неспецифические синаптические контакты с дендритными шипиками (указаны стрелками) и адгезивные соединения типа *puncta adherentia* (звездочки) с поверхностью дендрита; м преснаптические митохондрии. Масштаб 0.5 мкм.

ствовали рибосомы, полисомы и цистерны эндоплазматического ретикулума. Из данных литературы известно, что появление в шипиках органелл, ответственных за биосинтез белка, свидетельствует об их пластической нейрохимической реорганизации [17]. По-видимому, подрастающие из нейротрансплантатов мшистые волокна запускают синтетические процессы и индуцируют образование более подходящих для себя постсинаптических микроструктур.

Аберрантные терминальные гигантские бутоны в неокортексе, несмотря на образование синаптических контактов с несвойственными им нейрональными мишенями, воспроизводили характерные для этого типа синапсов адгезивные соединения puncta adherentia с мембраной стволов дендритов. От активных зон их отличало то, что со стороны пресинапса около них всегда отсутствовали синаптические везикулы, но концентрировались митохондрии. Такая форма симметричных аддгезивных комплексов является уникальной для гигантских синапсов гиппокампа и имеет специальное название puncta adherentia [13]. Если для пресинаптических компартментов гигантских синапсов в неокортексе, принадлежащих донорским гранулярным клеткам, такие скопления адгезивных молекул являлись типичными, то формирование симметричных скоплений со стороны неокортикальных дендритов было индуцировано подрастающими из трансплантатов аксонами. Часто концентрация адгезионных комплексов puncta adherentia наблюдалась в местах отрастания дендритных выростов, что предполагает их участие в генезе дополнительных дендритных шипиков и эктопических аксо-шипиковых активных зон.

Ранее предполагали, что адгезивные контакты в гигантских синапсах гиппокамповой формации выполняют исключительно механическую функцию и служат для прикрепления большой терминали к постсинаптическому дендриту [13]. В настояшее время определен сложный нейрохимический состав puncta adherentia, свидетельствующий об их вовлеченности в координацию структурных и функциональных процессов в синапсах. В них найдена синаптическая адгезионная молекула S-SCAM, обычно входящая в состав незрелых синаптических контактов министых волокон и участвующая в рекрутировании из цитоплазмы глутаматных рецепторов [18, 19]. В организацию puncta adherentia входят также кадгерин-катениновая и нектин-афадиновая адгезивные системы, которые также играют ключевые роли в развитии и пластической реорганизации нервной системы [20, 21]. При формировании неспецифических функциональных связей при гетеротопической нейротрансплантации симметричные адгезионные контакты могут обеспечивать трансмембранную координацию и участвовать во взаимной структурно-химической интеграции чужеродных синаптических партнеров. При этом доминирующая роль в инициировании данных процессов принадлежит пресинаптическим компонентам аксонов донорских гранулярных клеток, что согласуется с положениями других авторов [22, 23]. Итак, сравнительное исследование гигантских синапсов мшистых волокон, проникающих из трансплантатов гиппокамповой формации в мозг реципиента, показало сохранение их детерминантной структурной организации при контактах с несвойственными им нейрональными мишенями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного ультраструктурного анализа синаптической организации в гетеротопических нейротрансплантатах гиппокамповой формации, развивающихся в течение 4 месяцев в соматосенсорной области неокортекса крыс. показали, что трансплантированные нейроны образуют как специфические, так и неспецифические синаптические связи. Однако степень структурно-функциональной специфичности синаптических контактов, сформированных в самой трансплантированной ткани и в соседнем неокортексе, существенно различалась. Процесс синаптогенеза в трансплантатах носил преимущественно специфический характер, что, по-видимому, объясняется высоким уровнем коммитированности донорских эмбриональных клеток. Это было выра-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

жено в дифференцировке характерных для гиппокамповой формации типов синаптических активных зон и топографически правильном расположении тормозных, возбуждающих и гигантских синапсов на сома-дендритной поверхности нейронов.

В мозге реципиента вопрос о степени специфичности аксональных связей, проецирующихся из трансплантатов гиппокамповой формации, был изучен на системе мшистых волокон гранулярных нейронов и их гигантских синаптических окончаниях. Показано, что они проникают через интерфазу «трансплантат-мозг» и формируют синаптические контакты с несвойственными им в норме нейронами неокортекса. При этом синаптические терминали сохраняют свои детерминантные структурные характеристики, но модифицируют нейротрансмиттерный паттерн, перераспределяя нейропептидные гранулы активным зонам. В постсинаптических дендритах неокортекса они индуцируют образование дополнительных дендритных шипиков и специфических для гигантских синапсов адгезивных контактов типа puncta adherentia.

Таким образом, нейрональные предшественники в условиях гетеротопической нейротрансплантации при отсутствии адекватных постсинаптических нейронов-мишеней способны адаптировать свой синаптический аппарат и формировать неспецифические функциональные связи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена на оборудовании ЦКП ПНЦБИ РАН (№ 670266).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН № 075-00224-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципами Базельской декларации и рекомендациями биоэтического комитета Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, протокол № 20/2023 от 08 февраля 2023г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

764

- Citri A. and Malenka R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, **33** (1), 18–41 (2008). DOI: 10.1038/sj.npp.1301559
- Gulyeva N. V. Molecular mechanisms of neuroplasticity: an expanding universe. *Biochemistry (Moscow)*, 82 (3), 237–242 (2017).
 DOI: 10.1134/S0006297917030014
- Zaman V. and Shetty A. K. Fetal hippocampal CA3 cell grafts enriched with fibroblast growth factor-2 exhibit enhanced neuronal integration into the lesioned aging rat hippocampus in a kainate model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, **13** (5), 618–632 (2003). DOI: 10.1002/hipo.10091
- Cardoso T., Adler A. F., Mattsson B., Hoban D. B., Nolbrant S., Wahlestedt J. N., Kirkeby A., Grealish S., Bjorklund A., and Parmar M. Target-specific forebrain projections and appropriate synaptic inputs of hESCderived dopamine neurons grafted to the midbrain of parkinsonian rats. *J. Comp. Neurol.*, **526**, 2133–2146 (2018). DOI: 10.1002/cne.24500
- Droguerre M., Brot S., Vitrac C., Benoit-Marand M., Belnoue L., Patrigeon M., Lainé A., Béré E., Jaber M., and Gaillard A. Better outcomes with intranigral versus intrastriatal cell transplantation: relevance for Parkinson's disease. *Cells*, **11**, 1191-1224 (2022). DOI: 10.3390/cells11071191
- Magavi S. S. P. and Lois C. Transplanted neurons form both normal and ectopic projections in the adult brain. *Dev. Neurobiol.*, 68 (14), 1527–1537 (2008). DOI: 10.1002/dneu.20677
- Zhuravleva Z. N., Mugantseva E. A. and Zhuravlev G. I. Microscopic study of nervous system plasticity: Interactions of sympathetic nerves with neurons of intraocular hippocampal transplants. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 164 (5), 680–684 (2018). DOI: 10.1007/S10517-018-4058-1
- Gerrow K., Romorini S., Nabi S. M., Colicos M. A., Sala C., and El-Husseini A. A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron*, **49** (4), 547–562 (2006). DOI: 10.1016/j.neuron.2006.01.015
- Colón-Ramos D. A. Synapse formation in developing neural circuits. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **87**, 53–79 (2009). DOI: 10.1016/S0070-2153(09)01202-2
- 10. Косицын Н. С. Микроструктура дендритов и аксодендритических связей ЦНС (Наука, М., 1976).
- Vinogradova O. S. Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus*, **11** (5), 578–598 (2001). DOI: 10.1002/hipo.1073
- Zhuravleva Z. N. Ultrastructural signs of regenerativedegenerative processes in long-term dentate fascia grafts. J. Neural Transpl. Plast., 5 (3), 183–197 (1994). DOI: 10.1155/NP.1994.183

- Hamlyn L. H. The fine structure of the mossy fibre endings in the hippocampus of the rabbit. J. Anat. (Lond.), 96 (1), 112–120 (1962). PMID: 13904141
- Rollenhagen A., Sätzler K., Rodríguez E. P., Jonas P., Frotscher M., and Lübke J. H. R. Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses. J. Neurosci., 27 (39), 10434–10444 (2007). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1946-07.2007
- Henze D. A., Urban N. N., and Barrionuevo G. The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review. *Neurosci.*, **98** (3), 407–427 (2000). DOI: 10.1016/s0306-4522(00)00146-9
- Colón-Ramos D. A. and Shen K. Cellular conductors: Glial cells as guideposts during neural circuit development. *PLoS. Biol.*, 6 (4), e112 (2008). DOI: 10.1371/journal.pbio.0060112
- Sun C., Nold A., Fusco C. M., Rangaraju V., Tchumatchenko T., Heilemann M., and Schuman E. M. The prevalence and specificity of local protein synthesis during neuronal synaptic plasticity. *Sci. Adv.*, 7 (38):eabj0790 (2021). DOI: doi: 10.1126/sciadv.abj0790
- Yamada A., Irie K., Deguchi-Tawarada M., Ohtsuka T., and Takai Y. Nectin-dependent localization of synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) at the puncta adherentia junctions formed between the mossy fiber terminals and the dendrites of pyramidal cells in the CA3 area of the mouse hippocampus. *Genes Cells*, 8 (12), 985–994 (2003). DOI: 10.1046/j.1356-9597.2003.00690.x
- Hoy J. L., Constable J. R., Vicini S., Fu Z., and Washbourne P. SynCAM1 recruits NMDA receptors via Protein 4.1B. *Mol. Cell. Neurosci.*, 42 (4), 466–483 (2009). DOI: 10.1016/j.mcn.2009.09.010
- Mizoguchi A., Nakanishi H., Kimura K., Matsubara K., Ozaki-Kuroda K., Katata T., Honda T., Kiyohara Y., Heo K., Higashi M., Tsutsumi T., Sonoda S., Ide C., and Takai Y. Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. *J. Cell. Biol.*, **156** (3), 555–565 (2002). DOI: 10.1083/jcb.200103113
- Iida J., Hirabayashi S., SatoY., and Hata Y. Synaptic scaffolding molecule is involved in the synaptic clustering of neuroligin. *Mol. Cell. Neurosci.*, 27 (4), 497–508 (2004). DOI: 10.1016/j.mcn.2004.08.006
- Falkner S., Grade S., Dimou L., Conzelmann K. K., Bonhoeffer T., Götz M., and Hübener M. Transplanted embryonic neurons integrate into adult neocortical circuits. *Nature*, **539**, 248–253 (2016). DOI: 10.1038/nature20113
- Shetty A. K., Zaman V. and Turner D. A. Pattern of long-distance projections from fetal hippocampal field CA3 and CA1 cell grafts in lesioned CA3 of adult hippocampus follows intrinsic character of respective donor cells. *Neurosci.*, **99** (2), 243–255 (2000). DOI: 10.1016/S0306-4522(00)00178-0

Degree of Specificity of the Synaptic Contacts during Neurotransplantation

Z.N. Zhuravleva*

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

Transplantation of immature neural tissue is a promising biotechnological approach for restoring damaged brain circuitry. The success of transplantation therapy depends on implementation of the genetic program of differentiation of donor neural progenitors and the accuracy of neural connections both in the grafts themselves and in the recipient's brain. The aim of this work was to study the degree of specificity of synaptic connections during transplantation of the hippocampal formation into the neocortex of rats. Electron microscopy was used in this study, and after analysis of the obtained images it was found that specific forms of synapses, which were topographically correctly located on the neuronal soma-dendritic surface, were predominantly differentiated in the grafts. The axons of the grafted neurons growing into the recipient's brain formed synaptic connections, they modified the composition and distribution of neurotransmitter vesicles in presynaptic terminals, and also induced structural and chemical reorganization in postsynaptic dendrites.

Keywords: heterotopic neurotransplants, hippocampal formation, neocortex, ultrastructure, synaptic contacts, specificity

— БИОФИЗИКА КЛЕТКИ —

УДК 577.3

РОТЕНОН, РОДАМИН 123 И ЯНУС ЗЕЛЕНЫЙ ИНДУЦИРУЮТ ПОВРЕЖДЕНИЕ ЯДЕРНОЙ ДНК В КЛЕТКАХ АСЦИТНЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ, РОТЕНОН И РОДАМИН В X-ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТКАХ СПОБСТВУЮТ СОХРАНЕНИЮ ЦЕЛОСТНОСТИ ГЕНОМА

© 2024 г. Е.А. Кузнецова*, #, Н.П. Сирота*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия [#]E-mail: kuzglu@rambler.ru Поступила в редакцию 10.06.2024 г. После доработки 10.06.2024 г. Принята к публикации 19.06.2024 г.

Митохондриальные ингибиторы ротенон, родамин 123 и краситель янус зеленый В изучаются в настоящее время с целью разработки фармакологических средств, вызывающих митохондриальную дисфункцию и апоптоз. Поскольку нарушение работы митохондрий связано с продукцией активных форм кислорода, то представляется актуальным сопоставить индуцированные этими веществами повреждения ДНК клеток асцитной карциномы Эрлиха и мышиного лимфолейкоза Р388 с таковыми после воздействия известного индуктора активных форм кислорода – ионизирующего (рентгеновского) излучения. Уровень ДНК-повреждений оценивали щелочным вариантом метода ДНК-комет. Индуцированный ротеноном уровень повреждений ДНК был сравним с таковым при 4 Гр в обоих типах клеток. Пострадиационная инкубация уменьшала уровень ДНК-повреждений, что свидетельствовало о репарации ДНК. Обработка клеток асцитной карциномы Эрлиха родамином 123 с последующей отмывкой от него не вызывала этого увеличения, однако облучение в дозе 4 Гр в присутствии родамина 123 индуцировало увеличение уровня повреждений ДНК, которое существенно уменьшалось после часовой инкубации. Можно полагать, что предварительная обработка клеток ротеноном или родамином 123, нарушая работу митохондрий, способствовала сохранению целостности ядерной ДНК в облученных клетках. Воздействие януса зеленого В вызывало увеличение повреждений ДНК и гибель клеток. Исходя из шелочной версии метода ДНК-комет. можно считать индуцированные этими соединениями повреждения одно-, двунитевыми разрывами и щелочелабильными (апуриновыми/апиримидиновыми) сайтами в ДНК.

Ключевые слова: асцитная карцинома Эрлиха, мышиный лимфолейкоз Р388, ротенон, родамин 123, янус зеленый В, метод ДНК-комет.

DOI: 10.31857/S0006302924040094, EDN: NGXPOM

Для оценки работы митохондрий традиционно применяются ингибиторы, такие как ротенон, родамины (в частности, родамин 123) и янус зеленый В. Ротенон является одним из нейротоксинов окружающей среды, известен как пестицид, инсектицид и рыбий яд [1, 2]. Ротенон сложный изофлавоноид (органическое гетеропентациклическое соединение), встречающийся в корнях и стеблях ряда растений, является специфическим ингибитором тканевого дыхания:

воздействует на комплекс I, подавляет электронтранспортную цепь митохондрий. В результате образуются генотоксические/цитотоксические активные формы кислорода (АФК). В экспериментах при подкожном введении крысам ротенона было показано, что в продукции АФК в ткани головного мозга задействован и комплекс II дыхательной цепи митохондрий [3]. В экспериментах на клеточном и субклеточном уровне показано, что ротенон индуцирует продукцию АФК как в изолированных митохондриях из клеток HL-60, так и в культивируемых клетках, что в конечном итоге приводит к дисфункции митохондрий и апоптозу. Это подтверждается фрагментацией ДНК, высвобождением цитохрома с и активно-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, RH-123 – родамин 123, JGB – янус зеленый В (Janus Green B), АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха, PBS – фосфатно-солевой буфер.

стью каспазы 3 [4]. В экспериментах in vitro с использованием ооцитов свиньи было показано, что обработка ротеноном снижала соотношение активных митохондрий к общему количеству митохондрий, снижала продукцию АТФ и повышала продукцию АФК; полагают, что митохондриальная дисфункция, вызванная ротеноном, увеличивала и митофагию [5]. Помимо нарушений работы митохондрий, ротенон вызывает аномалии других субклеточных органоидов, нарушения в работе клеточных мембран, изменение профиля метилирования ДНК, способствует индукции ферроптоза, некроптоза [6-8]. Анализ флуоресцентных изображений выявил чувствительность органелл к ротенону в следующем порядке: микротубулярный цитоскелет, митохондриальная сеть, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и лизосомальная сеть [9]. Индуцированная ротеноном цитотоксичность используется для создания животных моделей – аналогов заболеваний человека [10-13]. Его воздействие на живые организмы рассматривают как общую экспериментальную модель для исследования основных механизмов, велуших к болезни Паркинсона, и для оценки новых потенциальных методов лечения этого заболевания. [14-17]. Кроме того, ротенон пытаются использовать в качестве фармакологического средства из-за его способности ингибировать комплекс I в митохондриях опухолевых клеток [18, 19], а также он применяется для изучения старения клеток человека [20].

Родамин 123 (RH-123) представляет собой катионный флуоресцентный краситель, который используется для специфической маркировки дышащих митохондрий и мониторинга их функции. Краситель распределяется по внутренней мембране митохондрий в соответствии с отрицательным мембранным потенциалом. Потеря потенциала приводит к потере красителя и, следовательно, к потере интенсивности флуоресценции [21, 22]. Если в ранних работах RH-123 использовали в качестве специфического зонда для определения местонахождения и изменений в распределении митохондрий в клетке [23], то в более поздних его пытались использовать для обогащения гемопоэтических стволовых клеток животных, выявления длительно репопулирующих гемопоэтических стволовых клеток человека в популяции Lin-CD34+CD38- [24-26], для исследования процессов мембранного транспорта [27], для изучения биораспределения RH-123, меченого по углероду (¹¹С), в тканях грызунов при его внутривенном введении [28]. Кроме того, в настоящее время RH-123 и его производные исследуются в качестве терапевтических средств, нацеленных на митохондрии, а также для изучения лекарственной устойчивости, поскольку было обнаружено, что RH-123 связывается с несколькими сайтами белка множественной лекар-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

ственной устойчивости – MRP1 [29-32]. При этом RH-123 предлагают использовать не только в качестве собственно лекарственного средства, но и для адресной доставки в митохондрии лекарств, содержащихся в липосомах с поверхностью, модифицированной RH-123-коньюгированным полимером [33]. В экспериментах in vitro на различных типах клеток было обнаружено, что RH-123 не токсичен при его кратковременном применении. Однако при непрерывном воздействии был обнаружен цитотоксический эффект RH-123 в отношении клеток карциномы по сравнению с нормальными эпителиальными клетками [34]. В результате исследований большого количества природных агентов, которые способны воздействовать на митохондрии и проявлять противоопухолевую активность, появился термин «митоканы» (mitocans). Митоканами называют категорию лекарств, которые точно нацелены на митохондрии раковых клеток. Вызывая нарушение работы митохондрий, эти вещества способны вызывать клеточный стресс в раковых клетках и, в конечном итоге, митотохондриально-опосредованный апоптоз. В зависимости от способа действия митоканов их делят на восемь классов. По этой классификации RH-123 относят к 6-му классу – липофильные катионы, нацеленные на внутреннюю мембрану (Lipophilic Cations Targeting the Inner Membrane) [35].

Янус зеленый В (JGB – Janus Green B) – органическое водорастворимое соединение, наджизненный (supravital) липофильный катионный краситель, относящийся к диазотированным сафранинам, поглощается и восстанавливается метаболически активными митохондриями. Цитологическое исследование показало, что JGB может восстанавливаться как в митохондриальной. так и в немитохондриальной частях клетки [36]. Он используется для оценки чистоты, целостности и метаболической активности митохондрий, клеточной жизнеспособности [37-40], для анализа ДНК [41], для выявления разнообразия митохондрий, новых типов клеток и новых структур в тканях и сосудах [42-45], в качестве антимитохондриального фактора для поиска лекарственных средств, способных воздействовать на внутриклеточных паразитов [46, 47], для идентификации микроорганизмов [48].

Несмотря на то, что цитотоксичность этих соединений для клеток млекопитающих известна давно [11, 35, 49–51], все же они представляют собой важный класс субклеточных зондов и позволяют исследовать клеточные процессы в реальном времени с минимальным влиянием на них. Кроме того, в последнее время они исследуются как в качестве возможных терапевтических средств, так и базиса для создания на их основе фармакологических препаратов, применяемых для лечения онкологических заболеваний [18, 19,

30, 32]. Следствием их избирательного влияния на митохондрии являются развитие митохондриальной дисфункции и продукция АФК. Митохондрии являются самым богатым источником АФК, так как они потребляют примерно 80% молекулярного кислорода во время окислительного фосфорилирования [52, 53]. Воздействие АФК приводит к повреждению митохондриальной ДНК, поскольку непосредственная близость к местам продукции АФК делает митохондриальную ДНК особенно восприимчивой к повреждениям. Митохондрии в клетке обычно располагаются вблизи органоидов, потребляющих большое количество АТФ, – элементов цитоскелета и ядра. Митохондриальная дисфункция может в значительной степени способствовать нарушению окислительно-восстановительных реакций в клетке и повреждению ядерной ДНК. В настоящей работе представлялось актуальным выявить индуцированные ротеноном, RH-123 и JGB повреждения ДНК клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и мышиного лимфолейкоза Р388 и сопоставить их с таковыми после воздействия известного индуктора активных форм кислорода – ионизирующего излучения. В качестве положительного контроля (источник АФК) использовали воздействие рентгеновского излучения на эти клетки. Известно, что при облучении фотонами (гамма- или рентгеновское излучение) основное повреждающее действие на ДНК и другие биологические молекулы оказывают АФК, образующиеся при радиолизе воды. Кроме того, ионизирующее излучение также вызывает развитие митохондриальной дисфункции и производство АФК митохондриями на протяжении пострадиационного периода [52, 54]. Однако АФК образуются и в ходе нормальных клеточных метаболических процессов (в основном это $O^{2^{\bullet}-}$ и H_2O_2), что приводит к обширной депуринизации и в меньшей степени депиримидинизации в ДНК интактных клеток [52]. Индуцированные физико-химическими факторами повреждения ДНК представлены более разнообразным и высоким уровнем повреждений ДНК: одно- и двунитевыми разрывами, модификацией оснований или их утратой и сшивками. Исходя из этого, в настоящей работе для определения уровня повреждений ДНК использовали шелочную версию метода ДНК-комет (comet assay). Этот метод позволяет выявлять одно- и двунитевые разрывы и реализованные в разрывы при высоком рН щелочелабильные (апуриновые/апиримидиновые) сайты в ДНК [55].

Цель работы: выявить индуцированные RH-123, ротеноном и JGB уровни повреждений ядерной ДНК клеток асцитной карциномы Эрлиха и мышиного лимфолейкоза P388 и сопоставить их с таковыми при воздействии рентгеновского излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и клетки. Использовали инбредных мышей-самцов линии DBA 2 (окраска шерсти – ослабленный коричневый) массой примерно 19– 20 г, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пущино, Московская область), и белых аутбредных мышей-самцов линии SHK массой примерно 24–30 г, содержащихся в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН.

Клетки лимфолейкоза Р388 (клетки Р388), полученные из Лаборатории окислительного стресса ИТЭБ РАН, выращивали в брюшной полости мышей-самцов DBA 2, прививали внутрибрюшинно 2·10⁶ клеток на мышь. Через 7 суток после прививки мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации, клетки извлекали из брюшной полости, трижды промывали средой RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., США) и подсчитывали в камере Горяева.

Клетки асцитной карциномы Эрлиха (клетки АКЭ), полученные из лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН, поддерживали путем еженедельной внутрибрюшинной перевивки (10⁷ клеток в 0.5 мл физиологического раствора) мышам-самцам SHK. Через 7 суток после прививки мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации, клетки извлекали из брюшной полости, трижды промывали раствором Хенкса и подсчитывали в камере Горяева.

Облучение. Суспензии клеток АКЭ или Р388 были облучены на рентгеновской установке РУТ-250-15-1 в ЦКП «Источники излучений» ИБК РАН (Пущино, Московская область) 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. Дозиметрию проводили по методу Фрике в присутствии бензойной кислоты и с помощью дозиметра VA-J-18 (RFT, Германия).

Эксперименты с ротеноном. К клеткам Р388 или АКЭ перед облучением добавляли 0.04% ротенона (Sigma Chem. Co., США), разведенного в этаноле (конечная концентрация этанола – 0.1%). Клетки Р388 облучали в дозах 2, 4 и 8 Гр на льду, без добавления сыворотки, чтобы избежать ее радиозащитного эффекта. После облучения перед инкубацией добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки Р388 с 0.04% ротенона, не подвергавшиеся облучению, инкубировали во льду до момента приготовления слайдов. Клетки АКЭ облучали в дозе 4 Гр при комнатной температуре, также без добавления сыворотки. После облучения перед инкубацией добавляли 10% сыворотки. Клетки АКЭ с 0.04% ротенона, не подвергавшиеся облучению, инкубировали при комнатной температуре до момента приготовления слайдов. После облучения все клетки инкубировали в присутствии ротенона при 37°С при постоянном перемешивании.

Эксперименты с родамином 123. К клеткам АКЭ перед облучением добавляли 0.025% RH-123 (Sigma Chem. Co., США), разведенного в этаноле (конечная концентрация этанола – 0.02%), инкубировали 15 мин при 37°С, затем трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и облучали при комнатной температуре в дозе 4 Гр. После облучения часть проб инкубировали в PBS, pH 7.2, при 37°С, без добавления сыворотки.

Эксперименты с красителем JGB. К клеткам АКЭ добавляли 0.005% JGB (Sigma Chem. Co., США), растворенного в PBS, инкубировали разное время при 37°C в PBS.

Оценка количества клеток с поврежденной мембраной/мертвых. Количество мертвых клеток оценивали с использованием трипанового синего, как указано в работе [56], или пропидиум иодида.

Метод ДНК-комет. Вначале предметные стекла погружали в раствор 1%-й нормальной агарозы и высушивали. На эти стекла наносили слой той же 1%-й агарозы со стандартной температурой плавления и инкубировали в холодильнике до ее затвердевания (5-7 мин). Для приготовления агарозных слайдов клетки разводили до концентрации 1.10⁶ кл/мл. Суспензию клеток смешивали с равным объемом 1%-й легкоплавкой агарозы (Sigma Chem. Co., США), приготовленной на буфере PBS (136.7 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 8.1 мМ Na₂HPO₄, 1.5 мМ КН₂РО₄, рН 7.2). Агарозу расплавляли при 70°С и инкубировали при 37°С (конечная температура получаемой смеси агарозы с клетками 20-22°С). Смесь (15 мкл) наносили на приготовленный агарозный слой. После охлаждения и застывания содержащей клетки агарозы на ее поверхность наносили новый слой 0.5%-й легкоплавкой агарозы. Слайды помещали в лизирующий раствор (2.5 моль/л NaC1, 0.1 моль/л ЭДТА, 0.01 моль/л Трис-HCl, pH 10.0, 1% Тритона X-100) при 4°С на 20-24 ч. Затем их инкубировали в течение 20 мин в щелочном растворе «А» (0.3 моль/л NaOH. 0.001 моль/л ЭДТА. pH > 13). далее переносили в электрофоретическую камеру SE-1/S-1N (ООО «Компания Хеликон», Москва, Россия) и подвергали электрофорезу в свежей порции раствора «А» в течение 20 мин при 4°С, объем буфера 250 мл, напряжение 27 В, сила тока 260-270 мА (напряженность электрического поля 2 В/см). После электрофореза слайды трижды промывали дистиллированной водой и окрашивали в течение 1 ч в PBS, содержащем 2.0 мкг/мл этидиум бромида. Слайды анализировали под

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

флуоресцентным микроскопом ЛЮМАМ И-3 («ЛОМО», Санкт-Петербург, Россия). Захват изображений проводили цифровым фотоаппаратом CoolPix 995 (Nikon, Япония) с последующей передачей изображений в компьютер. Обработку изображений выполняли с помощью специализированного программного обеспечения с реализованными алгоритмами расчета стандартных параметров комет [57]. Для оценки уровня повреиспользовали жлений ЛНК параметр «процентная доля ДНК в хвосте кометы» (per cent of DNA in a comet tail – %TDNA). Для каждой экспериментальной точки анализировали по 3 слайда, фотографируя не менее чем по 50 клеток на слайд, согласно работе [58].

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p \le 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Воздействие ротенона на клетки Р388 вызывает повреждение ядерной ДНК; ротенон не препятствует репарации ДНК в пострадиационном периоде. В предварительном исследовании определили зависимость «доза-эффект» при воздействии рентгеновского излучения на клетки Р388. На рис. 1а показан уровень повреждений ДНК (%TDNA) клеток Р388, измеренный сразу после облучения клеточной суспензии в дозах 2–8 Гр.

Видно, что с ростом дозы увеличивался %TDNA, который при 8 Гр достоверно отличался от контроля (p < 0.05). На рис. 16 показано изменение количества поврежденных/мертвых клеток сразу после облучения (окрашивание выявляет клетки с поврежденной мембраной). Наблюдалась лишь тенденция увеличения количества поврежденных клеток с ростом дозы, достоверных отличий от контроля не обнаружено. Исходя из дозовых зависимостей, в дальнейших экспериментах клетки облучали в дозе 4 Гр. Окрашивание интактных клеток трипановым синим или пропидиум иодидом показало, что для клеток Р388 предпочтительна среда RPMI 1640, тогда как клетки АКЭ более стабильны и в течение эксперимента могут храниться в растворе Хенкса или в PBS.

На рис. 2а показан %TDNA клеток P388, облученных в дозе 4 Гр и инкубированных после облучения в течение 0.5-1.5 ч в среде RPMI 1640 с сывороткой. Облучение проводили на льду. Видно, что воздействие рентгеновского излучения вызывало существенное увеличение уровня %TDNA, который через 0.5 ч после облучения уменьшался. %TDNA в пробе «4 Гр» достоверно отличался от такового в пробе «без облучения_1.5 ч» (p = 0.02). Поскольку %TDNA в пробе «4 Гр_0.5 ч» достоверно не отличался от такового в пробе



Рис. 1. Уровень повреждений ДНК (%TDNA) и количество поврежденных клеток мышиного лимфолейкоза P388: (а) – уровень повреждений ДНК клеток P388, измеренный сразу после облучения клеточной суспензии в дозах 2–8 Гр (* – $p \le 0.05$); (б) – количество клеток с поврежденной мембраной, окрашенных пропидиумиодидом, определенное сразу после облучения; достоверных отличий от контроля не обнаружено. Приведены средние значения \pm \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$).

«4 Гр_1.5 ч», то в дальнейших экспериментах клетки после облучения инкубировали в течение 0.5 ч. На рис. 26 показано изменение %TDNA клеток Р388, облученных в дозе 4 Гр в присутствии 0.04% ротенона (проба «ROT»). Видно, что при добавлении ротенона к необлученным клеткам %TDNA увеличивался почти до уровня, наблюдающегося при 4 Гр. Отличия между пробами «4 Гр» и «ROT» статистически недосто-

верны. При добавлении к клеткам ротенона и последующем их облучении %TDNA также увеличивался. Пробы «4 Гр» и «ROT + 4 Гр» достоверно отличались от контроля (p = 0.02 и p = 0.04 соответственно). После облучения клеточные суспензии были инкубированы в среде RPMI 1640 с сывороткой в присутствии ротенона. %TDNA в пробе «ROT + 4 Гр_0.5 ч» существенно умень-



Рис. 2. Уровень повреждений ДНК (%TDNA) клеток мышиного лимфолейкоза P388, облученных и/или обработанных ротеноном (ROT). (а) – Уровень повреждений ДНК клеток P388, облученных в дозе 4 Гр и инкубированных после облучения 0.5-1.5 ч в среде RPMI 1640 с сывороткой; проба «4 Гр» достоверно отличается от «0 Гр_1.5 ч» (* – p < 0.05); (б) – уровень повреждений ДНК клеток P388, облученных в дозе 4 Гр в отсутствие и в присутствии 0.04% ротенона. Клеточные суспензии инкубированы в среде RPMI 1640 с сывороткой в присутствии ротенона; пробы «4 Гр», «ROT» и «ROT + 4 Гр» достоверно отличались от контроля (* – $p \le 0.05$). Приведены средние значения ± стандартное отклонение ($M \pm SD$).



Доза, Гр; время инкубации, ч

Рис. 3. Уровень повреждений ДНК (%TDNA) клеток АКЭ, облученных в отсутствие и в присутствии 0.04% ротенона (ROT). Ротенон был добавлен непосредственно перед облучением. Клеточные суспензии после облучения были инкубированы в растворе Хенкса с сывороткой в присутствии ротенона; все пробы, за исключением пробы «0 Гр_0.5 ч», достоверно отличались от контроля (* $-p \le 0.05$). Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$).

шался по сравнению с «ROT + 4 Гр» и был сравним с контрольным.

При оценке количества мертвых клеток, где оценивали клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной, обнаружено, что их количество было сопоставимо с контрольным уровнем во всех вариантах экспериментов с ротеноном. Общее количество клеток в пробах также не изменялось.

Воздействие ротенона на клетки асцитной карциномы Эрлиха вызывает повреждение ядерной ДНК. На рис. 3 показан %TDNA клеток АКЭ, облученных в дозе 4 Гр в присутствии 0.04% ротенона. Облучение проводили при комнатной температуре. После облучения клетки были инкубированы в растворе Хенкса с сывороткой.

Видно, что воздействие рентгеновского излучения на клетки АКЭ вызывало существенное увеличение %TDNA. %TDNA в пробе «4 Гр» достоверно отличался от такового в пробе «0 Гр» (p = 0.003). В процессе пострадиационной инкубации %TDNA снижался. Уже через 0.5 ч после облучения наблюдалось уменьшение %TDNA примерно до уровня пробы «0 Гр_0.5 ч». Добавление ротенона приводило к увеличению %TDNA как в необлученных, так и в облученных клетках; %TDNA во всех этих пробах достоверно отличались от контроля. Отличия %TDNA между пробами «4 Гр» и «ROT», а также между «ROT» и «ROT + 4 Гр» статистически недостоверны. Получасовая инкубация не выявила разницы между пробами «ROT 0.5 ч» и «ROT + 4 Гр 0.5 ч»,

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

%TDNA в этих пробах был сопоставим с таковым в пробе «ROT + 4 Гр».

Воздействие родамина 123 на клетки асцитной карциномы Эрлиха вызывает повреждение ядерной ДНК; родамин 123 способствует репарации ДНК в пострадиационном периоде. В следующей серии экспериментов после 15 мин инкубации клеток АКЭ с 0.025% RH-123 их трижды промывали PBS. Поскольку в этих экспериментах облучение проводили при комнатной температуре, клетки с RH-123, не подвергавшиеся облучению, также находились при 20°С до момента приготовления слайдов. На рис. 4 показан %TDNA клеток АКЭ, обработанных и не обработанных RH-123 и облученных в дозе 4 Гр.

Видно, что кратковременная обработка клеток RH-123 с последующей отмывкой от него не сказывалась на величине % TDNA, она была сопоставима с таковой в контроле («0 Гр»). В пробе «4 Гр» наблюдалось существенное увеличение %TDNA, достоверно отличающееся от контроля (p = 0.017). В пробах «4 Гр 0.5 ч» и «RH-123 + 4 Гр 0.5 ч» также наблюдался повышенный и достоверно отличающийся от контроля %TDNA (p = 0.02 и p = 0.01 соответственно). В случае предварительной обработки RH-123 и последующем облучении %TDNA оставался высоким, достоверные отличия между пробами «4 Гр» и «RH-123 + 4 Гр» не обнаружены. Получасовая пострадиационная инкубация существенно не снижала %TDNA как в присутствии RH-123, так и в его отсутствие. По завершении часовой инкубации %TDNA снижался, в пробе «RH-123 + 4 Гр» он достоверно отличался от такового в пробе «RH-123 + 4 Гр 1 ч» (p = 0.04) и был сопоставим с контрольным.

Обработка красителем JGB клеток асцитной карциномы Эрлиха вызывает повреждения ядерной **ДНК.** На рис. 5а показан % TDNA клеток АКЭ, инкубированных с 0.005% JGB. Как видно из этого рисунка, с увеличением времени инкубации увеличивался и % TDNA; все пробы достоверно отличались от контроля (p < 0.05). На рис. 56 показан %TDNA клеток АКЭ, облученных в дозе 4 Гр или обработанных JGB. После инкубации с JGB (15 мин, 37°С) клетки были трижды отмыты PBS и инкубированы в течение 1 ч. Видно, что обработка JGB вызывает увеличение % TDNA, сопоставимое с 4 Гр. Пробы «4 Гр» и «JGB 1 ч» достоверно отличались от контроля (p < 0.05). При оценке количества мертвых клеток (клеток с поврежденной мембраной) обнаружили, что через 15 мин инкубации с JGB обнаруживалось примерно 45-46% погибших клеток, а через 60 мин примерно 60%.



Рис. 4. Уровень повреждений ДНК (%TDNA) клеток АКЭ, обработанных или не обработанных RH-123 и облученных в дозе 4 Гр. Уровень повреждений ДНК в пробах «4 Гр», «4 Гр_0.5 ч» и «RH-123 + 4 Гр_0.5 ч» достоверно отличался от контроля (* -p = 0.017, 0.02 и 0.01 соответственно). По завершении часовой инкубации уровень повреждений ДНК в пробе «RH-123 + 4 Гр_1 ч» (# -p = 0.04) и был сопоставим с контрольным уровнем. Приведены средние значения ± стандартное отклонение ($M \pm SD$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Повреждения ДНК являются биологическим индикатором таких процессов, как окислительный стресс, репарация ДНК и клеточная гибель. Как видно из рис. 2 и 3, в результате обработки ротеноном клеток РЗ88 и АКЭ в них регистрировался повышенный уровень повреждений ДНК, что согласуется с литературными данными. Так, на модели астроцитоподобных клеток было показано, что воздействие ротенона приводило к снижению выживаемости, увеличению уровня свободных радикалов и повреждению ДНК [59]. Очевидно, что увеличение %TDNA в клетках Р388 и АКЭ в результате обработки ротеноном обусловлено воздействием АФК. Наблюдаемый %TDNA был сравним с таковым при 4 Гр (рис. 1–3). Основное генотоксическое действие рентгеновского излучения также опосредовано атаками АФК [52]. Если клетки облучали при 0°С, то, в основном, регистрировались индуцированные облучением повреждения ДНК. Если же клетки облучали при комнатной температуре или



Рис. 5. Уровень повреждений ДНК (% TDNA) клеток асцитной карциномы Эрлиха, обработанных 0.005% JGB (а) или облученных в дозе 4 Гр (б). Клетки в пробе «JGB_1 ч» перед часовой инкубацией были отмыты фосфатно-солевым буфером. Пробы «4 Гр» и «JGB_1 ч» достоверно отличались от контроля (* p < 0.05). Приведены средние значения ± ± стандартное отклонение ($M \pm SD$).

инкубировали при 37°С после облучения, то в этом случае регистрировались как возникшие в результате облучения или обработки ротеноном повреждения ДНК, так и разрывы, вызванные работой репарационных нуклеаз в эти временные интервалы, что может характеризоваться более высоким %TDNA. Следует отметить, что в облученных клетках АКЭ величина % TDNA при 4 Гр выше, чем в клетках Р388. Возможно, это связано как с клеточными различиями, так и с тем, что облучение клеток АКЭ проводили при комнатной температуре, а клеток Р388 - на льду. И в клетках Р388, облученных на льду, и в клетках АКЭ, облученных при комнатной температуре, по окончании получасового пострадиационного периода наблюдалось уменьшение %TDNA, что может свидетельствовать о репарации индуцированных повреждений ДНК. В обработанных ротеноном и/или облученных клетках Р388 и АКЭ регистрировали высокий %TDNA, сравнимый с таковым при 4 Гр, что свидетельствует о том, что последующее за обработкой ротеноном облучение не вызывает заметного увеличения %TDNA. По-видимому, предрадиационная обработка ротеноном препятствует продукции АФК митохондриями в облученной клетке; либо выбранные сроки наблюдений и ограничения метода не позволяют выявить существенный вклад облучения в уровень повреждений ДНК. В процессе пострадиационной инкубации клеток Р388 наблюдалась эффективная репарация ДНК, тогда как в клетках АКЭ – лишь тенденция к восстановлению ДНК. Так, получасовая инкубация клеток АКЭ не выявила разницы между пробами «ROT 0.5 ч» и «ROT + 4 Гр 0.5 ч», %TDNA в этих пробах был сопоставим с таковым в пробе «ROT + 4 Гр» (рис. 3). По-видимому, различие в репарации ДНК в обработанных ротеноном и инкубированных после облучения клетках Р388 и АКЭ может быть объяснено спецификой этих клеточных линий. Клетки Р388 представлены двумя типами клеток, в то время как среди клеток АКЭ различают до 6-7 типов клеток с разным количеством хромосом [60, 61]. Можно полагать, что кратковременное воздействие ротенона вызывало изменение работы митохондрий, которое снижало эффекты воздействия рентгеновского излучения на митохондрии. Возможно также, что либо сам ротенон, окисляясь, либо ротенон-индуцированные кислородные радикалы, взаимодействуя с продуктами радиолиза воды, уменьшали уровень радиационно-индуцированных АФК. Эти данные, взятые вместе, могут свидетельствовать о том, что ротенон, нарушая работу митохондрий, способствует сохранению целостности ДНК в облученных клетках.

Известно, что ротенон обладает высокой гидрофобностью и легко проникает через клеточную мембрану без помощи специфических транс-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

портных механизмов [1]. RH-123 по молекулярной массе близок к ротенону и, являясь катионным красителем, тоже легко проникает в клетку. Было показано, что RH-123 проникает в клетки в дозозависимой манере и удерживается в клетках (даже после нескольких промывок), также было обнаружено его пролонгированное удерживание в митохондриях ряда трансформированных опухолевых клеточных линий и опухолей [30, 49, 62, 63]. Исходя из приведенных литературных данных, демонстрирующих удерживание этого красителя в разных клетках, в следующих экспериментах клетки АКЭ после обработки RH-123 трижды промывали PBS. Обнаружено, что обработка клеток RH-123 с последующей отмывкой не вызывала увеличения %TDNA как сразу, так и через 30 мин инкубации в PBS. Облучение клеток в дозе 4 Гр вызывало увеличение %TDNA (рис. 4). В этих экспериментах %TDNA облученных клеток АКЭ был выше, чем таковой на рис. 3, что можно объяснить разной средой, в которой облучали эти клетки: на рис. 4 клетки отмывали PBS и облучали в этом же буфере без каких-либо органических добавок, являющихся радиопротектором, как, например, глюкоза в растворе Хенкса. Репарация ДНК также была менее эффективна, заметное снижение %TDNA наблюдалось лишь через 1 ч пострадиационной инкубации. Обработка клеток RH-123 перед облучением не сказывалась на величине %TDNA, однако обнаруживались различия %TDNA в пострадиационном периоде. Исходя из того, что RH-123 пролонгированно удерживается в митохондриях, очевидно, что оставшееся после промывок некоторое количество RH-123 в клетках влияло на уровень повреждений ДНК в пострадиационном периоде: %TDNA в пробе «RH-123 + 4 Гр 0.5 ч» оказался выше, чем в пробе «4 Гр 0.5 ч», хотя достоверные различия между соответствующими величинами %TDNA не были обнаружены. Возможно, что увеличение %TDNA обусловлено не только удержанием красителя в клетках, но и его возможной модификацией, подобно тому, как это было выявлено на обработанных RH-123 клетках глиомы: было обнаружено, что в результате модификаций молекулы родамина возникают флуоресцентные производные с меньшей молекулярной массой; авторы полагают, что длительное удержание красителя и его производных может быть причиной подавления функций митохондрий и, в конечном итоге, гибели клеток [63]. Через 1 ч %TDNA в пробе «RH-123 + 4 Гр 1 ч» был существенно ниже, чем в пробе «4 Гр_1 ч», и был сравним с контрольным, что свидетельствует об эффективной репарации ДНК в клетках, предварительно обработанных RH-123 (рис. 4). Ротенон в клетках P388 также не препятствовал репарации ДНК: %TDNA в пробе «ROT + 4 Гр_0.5 ч» существенно уменьшался по сравнению с «ROT + 4 Гр» и был сравним с контрольным (рис. 2). Можно полагать, что предварительная обработка клеток RH-123, как и в случае обработки клеток ротеноном, нарушая работу митохондрий, способствует сохранению целостности ядерной ДНК в облученных клетках.

JGB также оказывает генотоксическое действие на клетки АКЭ: уже через 15 мин инкубации регистрируется существенное увеличение %TDNA. Уменьшение %TDNA через 1 ч на кривой (рис. 5а), по-видимому, обусловлено потерями фрагментов ДНК и находится за пределами чувствительности метода. В случае, когда обработанные JGB клетки были трижды отмыты PBS и инкубированы в течение 1 ч. наблюдалось увеличение % TDNA. сопоставимое с таковым при 4 Гр. При оценке количества мертвых клеток обнаружили, что уже через 15 мин инкубации с JGB регистрируется большая доля погибших клеток, что свидетельствует о высокой цитотоксичности JGB. Очевидно, что цитотоксичность JGB обусловлена тем, что он взаимодействует со многими клеточными компонентами, существенно нарушая работу различных процессов в клетке. Так, было показано, что JGB может восстанавливаться как в митохондриальной, так и в немитохондриальной частях клетки, он адсорбируется на многих белках и клеточных фракциях, включая коллаген, сывороточный альбумин, митохондрии и ультрамикросомы [36, 64]; кроме того, было показано, что in vitro JGB взаимодействует с двуцепочечной ДНК, а также с двуцепочечной поли(А) со значительным нарушением ее вторичной структуры [41, 65]. Таким образом, JGB более генотоксичен/цитотоксичен, чем ротенон И RH-123.

Исходя из представленных результатов, видно, что предварительная обработка клеток ротеноном или RH-123, нарушая работу митохондрий, способствовала сохранению целостности ядерной ДНК в облученных клетках. Воздействие JGB вызывало существенное увеличение %TDNA, сопоставимое с таковым при облучении в дозе 4 Гр, и гибель клеток. Можно полагать, что вызванные этими митохондриальными ингибиторами повреждения ДНК являются разрывами и щелочелабильными (апуриновыми/апиримидиновыми) сайтами в ДНК, поскольку использовался щелочной вариант метода ДНК-комет, позволяющий, как известно [66], регистрировать всю сумму этих повреждений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Лаборатории окислительного стресса и Лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН за предоставление образцов мышиных опухолевых клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН (№ 075-00224-24-00 и № 075-00224-24-01).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными проводили в соответствии с рекомендациями Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Richardson J. R., Fitsanakis V., Westerink R. H. S., and Kanthasamy A. G. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol.*, **138** (3), 343–362 (2019).
 DOI: 10.1007/s00401-019-02033-9. PMID: 31197504; PMCID: PMC6826260
- Sun Z., Xue L., Li Y., Cui G., Sun R., Hu M., and Zhong G. Rotenone-induced necrosis in insect cells via the cytoplasmic membrane damage and mitochondrial dysfunction. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **173**, 104801 (2021). DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104801. PMID: 33771250
- Panov A., Dikalov S., Shalbuyeva N., Taylor G., Sherer T., and Greenamyre J. T. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J. Biol. Chem.*, 280 (51), 42026–42035 (2005). DOI: 10.1074/jbc.M508628200. PMID: 16243845
- Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J. A., and Robinson J. P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.*, **278** (10), 8516–8525 (2003). DOI: 10.1074/jbc.M210432200
- Heo G., Sun M. H., Jiang W. J., Li X. H., Lee S. H., Guo J., Zhou D., and Cui X. S. Rotenone causes mitochondrial dysfunction and prevents maturation in porcine oocytes. *PLoS One*, **17** (11), e0277477 (2022). DOI: 10.1371/journal.pone.0277477
- Huang Y., Liu X., Feng Y., Nie X., Liu Q., Du X., Wu Y., Liu T., and Zhu X. Rotenone, an environmental toxin, causes abnormal methylation of the mouse brain organoid's genome and ferroptosis. *Int. J. Med. Sci.*, **19** (7), 1184–1197 (2022). DOI: 10.7150/ijms.74569. PMID: 35919817; PMCID: PMC9339416
- Chen H., Wen Y., Yu Z., Du X., Pan W., and Liu T. Codonopsis pilosula polysaccharide alleviates rotenoneinduced murine brain organoids death through downregulation of gene body DNA methylation modification in the ZIC4/PGM5/CAMTA1 axis. *Biochem. Biophys. Rep.*, 37, 101593 (2023).
 DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101593. PMID: 38074999; PMCID: PMC10698575
- Roy T., Chatterjee A., and Swarnakar S. Rotenone induced neurodegeneration is mediated via cytoskeleton degradation and necroptosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.*, **1870** (3), 119417 (2023).
 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2022.119417. PMID: 36581087
- Pokusa M., Hajdúchová D., Menichová V., Evinová A., Hatoková Z., and Kráľová-Trančíková A. Vulnerability of subcellular structures to pathogenesis induced by ro-

tenone in SH-SY5Y cells. *Physiol. Res.*, **70** (1), 89–99 (2021). DOI: 10.33549/physiolres.934477

- Saravanan K. S., Sindhu K. M., and MohanaKumar K. P. Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. *J. Pineal. Res.*, 42 (3), 247–253 (2007). DOI: 10.1111/j.1600-079X.2006.00412.x
- Li X. X., He G. R, Mu X., Xu B., Tian S., Yu X., Meng F. R., Xuan Z. H., and Du G. H. Protective effects of baicalein against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells and isolated rat brain mitochondria. *Eur. J. Pharmacol.*, 674 (2–3), 227–233 (2012). DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.09.181. PMID: 21996316
- Chernivec E., Cooper J., and Naylor K. Exploring the effect of rotenone–a known inducer of Parkinson's disease–on mitochondrial dynamics in *Dictyostelium discoideum. Cells*, 7 (11), 201 (2018). DOI: 10.3390/cells7110201
- Kujawska M., Jourdes M., Kurpik M., Szulc M., Szaefer H., Chmielarz P., Kreiner G., Krajka-Kuźniak V., Mikołajczak P. Ł., Teissedre P. L., and Jodynis-Liebert J. Neuroprotective effects of pomegranate juice against Parkinson's disease and presence of ellagitannins-derived metabolite-urolithin A. *Brain. Int. J. Mol. Sci.*, **21** (1), 202 (2020). DOI: 10.3390/ijms21010202
- Radad K., Al-Shraim M., Al-Emam A., Wang F., Kranner B., Rausch W. D., and Moldzio R. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease. *Folia Neuropathol.*, 57 (4), 317–326 (2019). DOI: 10.5114/fn.2019.89857. PMID: 32337944
- Innos J., and Hickey M. A. Using rotenone to model Parkinson's disease in mice: a review of the role of pharmacokinetics. *Chem. Res. Toxicol.*, **34** (5), 1223–1239 (2021). DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00522. PMID: 33961406
- Guo Z., Ruan Z., Zhang D., Liu X., Hou L., and Wang Q. Rotenone impairs learning and memory in mice through microglia-mediated blood brain barrier disruption and neuronal apoptosis. *Chemosphere*, **291** (Pt 2), 132982 (2022). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.132982. PMID: 34822863
- Zhang J., Sun B., Yang J., Chen Z., Li Z., Zhang N., Li H., and Shen L. Comparison of the effect of rotenone and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on inducing chronic Parkinson's disease in mouse models. *Mol. Med. Rep.*, 25 (3), 91 (2022).
 DOI: 10.3892/mmr.2022.12607. PMID: 35039876; PMCID: PMC8809117
- Heinz S., Freyberger A., Lawrenz B., Schladt L., Schmuck G., and Ellinger-Ziegelbauer H. Inhibitor rotenone in the context of pharmacological and safety evaluation. *Sci. Rep.*, 7, 45465 (2017). DOI: 10.1038/srep45465
- Wu M., Chen W., Zhang S., Huang S., Zhang A., Zhang Y., and Jia Z. Rotenone protects against β-cell apoptosis and attenuates type 1 diabetes mellitus. *Apoptosis*, **24** (11–12), 879–891 (2019). DOI: 10.1007/s10495-019-01566-4. PMID: 31485878
- Callender L. A., Carroll E. C., Bober E. A., Akbar A. N., Solito E., and Henson S. M. Mitochondrial mass governs the extent of human T cell senescence. *Aging Cell.*, **19** (2), e13067 (2020). DOI: 10.1111/acel.13067. PMID: 31788930; PMCID: PMC6996952

- 21. Baracca A., Sgarbi G., Solaini G., and Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1606 (1–3), 137–146 (2003).
 DOI: 10.1016/s0005-2728(03)00110-5.
 PMID: 14507434
- Chazotte B. Labeling mitochondria with rhodamine 123. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 7, 892–894 (2011). DOI: 10.1101/pdb.prot5640. PMID: 21724815
- Johnson L. V., Walsh M. L., and Chen L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (2), 990–994 (1980).
- Bertoncello I., and Williams B. Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and rhodamine 123 staining. *Methods Mol. Biol.*, 263, 181–200 (2004). DOI: 10.1385/1-59259-773-4:181. PMID: 14976367
- Lo K. C., Brugh V. M., III, Parker M., and Lamb D. J. Isolation and Enrichment of Murine Spermatogonial Stem Cells Using Rhodamine 123 Mitochondrial Dye. *Biology of Reproduction*, **72** (3), 767–771 (2005). DOI: 10.1095/biolreprod.104.033464
- McKenzie J. L., Takenaka K., Gan O. I., Doedens M., and Dick J. E. Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood*, **109** (2), 543– 545 (2007). DOI: 10.1182/blood-2006-06-030270. PMID: 16990597
- Forster S., Thumser A. E., Hood S. R., and Plant N. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in *in vitro* drug transport assays. *PLoS One*, 7 (3), e33253 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.003325
- Bao X., Lu S., Liow J. S., Morse C. L., Anderson K. B., Zoghbi S. S., Innis R. B., and Pike V. W. [¹¹C]Rhodamine-123: synthesis and biodistribution in rodents. *Nucl. Med. Biol.*, **39** (8), 1128–1136 (2012). DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.06.013. PMID: 22898316; PMCID: PMC3478417
- Daoud R., Kast C., Gros P., and Georges E. Rhodamine 123 binds to multiple sites in the multidrug resistance protein (MRP1). *Biochemistry*, **39** (50), 15344–15352 (2000). DOI: 10.1021/bi0020574. PMID: 11112520
- Jones L. W., Narayan K. S., Shapiro C. E., and Sweatman T. W. Rhodamine-123: therapy for hormone refractory prostate cancer, a phase I clinical trial. *J. Chemother.*, **17** (4), 435–440 (2005). DOI: 10.1179/joc.2005.17.4.435. PMID: 16167524
- Lacerda S. H., Abraham B., Stringfellow T. C., and Indig G. L. Photophysical, photochemical, and tumorselectivity properties of bromine derivatives of rhodamine-123. *Photochem. Photobiol.*, **81** (6), 1430– 1438 (2005). DOI: 10.1562/2005-08-05-RA-639. PMID: 16149863
- Bhattarai N., Chen M., Pérez R. L., Ravula S., Strongin R. M., McDonough K., and Warner I. M. Comparison of chemotherapeutic activities of rhodamine-based GUMBOS and nanoGUMBOS. *Molecules*, 25 (14), 3272 (2020).
 DOI: 10.3390/molecules25143272. PMID: 32709149; PMCID: PMC7397155
- 33. Biswas S., Dodwadkar N. S., Sawant R. R., Koshkaryev A., and Torchilin V. P. Surface modification of liposomes with rhodamine-123-conjugated

polymer results in enhanced mitochondrial targeting. *J. Drug Target*, **19** (7), 552–561 (2011). DOI: 10.3109/1061186X.2010.536983. PMID: 21348804; PMCID: PMC3492939

- Lampidis T. J., Bernal S. D., Summerhayes I. C., and Chen L. B. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Res.*, 43 (2), 716–720 (1983). PMID: 6848187
- Mani S., Swargiary G., and Singh K K. Natural agents targeting mitochondria in cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (19), 6992 (2020). DOI: 10.3390/ijms21196992. PMID: 32977472; PMCID: PMC7582837
- Lazarow A. and Cooperstein S. J. Studies on the enzymatic basis for the janus green b staining reaction. *J. Histochem. Cytochem.*, 1, 234 (1953). DOI: 10.1177/1.4.234
- Smith V. A., and Johnson T. K. Identification and evaluation of a thinning agent compatible with MegaCell DCS, an animal product-free corneal storage medium. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 250 (12), 1777–1786 (2012). DOI: 10.1007/s00417-012-2126-1. PMID: 23011001; PMCID: PMC3501186
- Ahmad F., Alamoudi W., Haque S., Salahuddin M., and Alsamman K. Simple, reliable, and time-efficient colorimetric method for the assessment of mitochondrial function and toxicity. *Bosn. J. Basic. Med. Sci.*, 18 (4), 367–374 (2018). DOI: 10.17305/bjbms.2018.3323. PMID: 29984676; PMCID: PMC6252094
- Alamoudi W. A., Ahmad F., Acharya S., Haque S., Alsamman K., Herzallah H. K., and Al-Otaibi S. T. A simplified colorimetric method for rapid detection of cell viability and toxicity in adherent cell culture systems. *J. BUON*, 23 (5), 1505–1513 (2018). PMID: 30570879
- Daw S., and Law S. Quercetin induces autophagy in myelodysplastic bone marrow including hematopoietic stem/progenitor compartment. *Environ. Toxicol.*, 36 (2), 149–167 (2021). DOI: 10.1002/tox.23020. PMID: 32902906
- Huang C. Z., Li Y. F., Huang X. H., and Li M. Interactions of Janus Green B with double stranded DNA and the determination of DNA based on the measurement of enhanced resonance light scattering. *Analyst.*, **125** (7), 1267–1272 (2000). DOI: 10.1039/b0016620. PMID: 10984922
- Lee B. C., Yoo J. S., Baik K. Y., Kim K. W., and Soh K. S. Novel threadlike structures (Bonghan ducts) inside lymphatic vessels of rabbits visualized with a Janus Green B staining method. *Anat. Rec. B. New. Anat.*, 286 (1), 1–7 (2005). DOI: 10.1002/ar.b.20076. PMID: 16177995
- Yang J., Ma L., Zhang Y., Fang F., and Li L. Flow cytometric identification of two different rhodamine-123-stained mitochondrial populations in maize leaves. *Protoplasma*, 231 (3–4), 249–252 (2007). DOI: 10.1007/s00709-007-0259-6. PMID: 17922268
- 44. Zheng Y., Li H., Manole C. G., Sun A., Ge J., and Wang X. Telocytes in trachea and lungs. *J. Cell. Mol. Med.*, 15 (10), 2262–2268 (2011). DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01404.x. PMID: 21810171; PMCID: PMC4394233
- 45. Lee B. C. Evidence for novel tubular-bundle structures entangled in the fascia of the inner abdominal wall of a

rat. *Micron*, **123**, 102681 (2019). DOI: 10.1016/j.micron.2019.102681. PMID: 31121482.

- 46. Gozar M. M., O'Sullivan W. J., and Bagnara A. S. Mitochondrial function in *Babesia bovis. Int. J. Parasitol.*, 22 (2), 165–171 (1992).
 DOI: 10.1016/0020-7519(92)90097-5.
 PMID: 1587679
- Vennerstrom J. L., Makler M. T., Angerhofer C. K., and Williams J. A. Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39** (12), 2671–2677 (1995).
 DOI: 10.1128/AAC.39.12.2671. PMID: 8593000; PMCID: PMC163010
- 48. Menon T. and Ponnuvel K. M. Disc diffusion test in the identification of Candida species. *Mycoses*, 43 (5), 165–168 (2000).
 DOI: 10.1046/j.1439-0507.2000.00566.x.
 PMID: 10948812
- Summerhayes I. C., Lampidis T. J., Bernal S. D., Nadakavukaren J. J., Nadakavukaren K. K., Shepherd E. L., and Chen L. B. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** (17), 5292– 5296 (1982). DOI: 10.1073/pnas.79.17.5292. PMID: 6752944; PMCID: PMC346882
- Gupta R. S., and Dudani A. K. Species-specific differences in the toxicity of rhodamine 123 towards cultured mammalian cells. *J. Cell Physiol.*, **130** (3), 321–327 (1987). DOI: 10.1002/jcp.1041300303. PMID: 3558490
- Ghazi-Khansari M., Mohammadi-Bardbori A., and Hosseini M. J. Using Janus green B to study paraquat toxicity in rat liver mitochondria: role of ACE inhibitors (thiol and nonthiol ACEi). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1090**, 98–107 (2006). DOI: 10.1196/annals.1378.010. PMID: 17384251
- Azzam E. I., Jay-Gerin J. P., and Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.*, **327** (1–2), 48–60 (2012). DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.012. PMID:22182453
- Kumari S., Badana A. K., G M. M., G S., and Malla R. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomark. Insights*, **13**, 1177271918755391 (2018). DOI: 10.1177/1177271918755391. PMID: 29449774; PMCID: PMC5808965
- Kobashigawa S., Suzuki K., and Yamashita S. Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblastlike cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414** (4), 795–800 (2011).
- Collins A. R., Oscoz A. A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. C., and Stetina R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23 (3), 143–151 (2008). DOI: 10.1093/mutage/gem051. PMID: 18283046
- 56. Кондратьева И. А., Воробьева Н. В., Буракова О. В., Фрезе К. В., Егорова С. К., Мойсенович М. М., Киркин А. Ф., Пинегин Б. В., Симонова А. В., Киташов А. В., и Рокк Ф. Практикум по иммунологии, под ред. И. А. Кондратьевой и В. Д. Самуилова (Изд-во МГУ, М., 2001).

- 57. Chemeris N. K., Gapeyev A. B., Sirota N. P., Gudkova O. Y., Kornienko N. V., Tankanag A. V., Konovalov I. V., Buzoverya M. E., Suvorov V. G., and Logunov V. A. DNA damage in frog erythrocytes after in vitro exposure to a high peak-power pulsed electromagnetic field. *Mutat. Res.*, 558 (1–2), 27–34 (2004).
- Lovell D. P., and Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, 23 (3), 171–182 (2008).
- Swarnkar S., Singh S., Goswami P., Mathur R., Patro I. K., and Nath C. Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochem. Res.*, 37 (10), 2178–2189 (2012). DOI: 10.1007/s11064-012-0841-y. PMID: 22846965
- Трещалина Е. М. Коллекция опухолевых штаммов животных для экспериментальной химиотерапии злокачественных опухолей (Практическая медицина, М., 2022).
- Лысенко Ю. А., Косых И. А., Шабанов Д. И., Вирютина В. В., Артюхов В. Г. Жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха на различных стадиях роста опухоли в условиях фотодинамического воздействия. Вестн. ВГУ, сер.: Химия. Биология. Фармация, 2, 120–125 (2013).

- Darzynkiewicz F., Traganos L., Staiano-Coico J., and Kapuscinski M. R. Melamed interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.*, 42, 799–806 (1982). PMID: 7059978
- 63. Zorova L. D., Demchenko E. A., Korshunova G. A., Tashlitsky V. N., Zorov S. D., Andrianova N. V., Popkov V. A., Babenko V. A., Pevzner I. B., Silachev D. N., Plotnikov E. Y., and Zorov D. B. Is the Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) Correctly assessed? Intracellular and intramitochondrial modifications of the $\Delta\Psi$ probe, rhodamine 123. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (1), 482 (2022). DOI: 10.3390/ijms23010482. PMID: 35008907; PMCID: PMC8745654
- 64. Urata M. Janus Green B causing functional disturbances in mitochondria in Mg²⁺-containing medium. *Cell structure and function*, **2**, 29–39 (1977).
- Khan A. Y., Saha B., and Kumar G. S. Interaction of phenazinium dyes with double-stranded poly(A): spectroscopy and isothermal titration calorimetry studies. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 131, 615– 624 (2014). DOI: 10.1016/j.saa.2014.04.087. PMID: 24861262
- Olive P., and Banáth J. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.*, 1, 23–29 (2006). DOI: 10.1038/nprot.2006.5

Rotenone, Rhodamine 123 and Janus Green Induce Damage to Nuclear DNA in Ascites Tumor Cells from Mice, Rotenone and Rhodamine in X-Irradiated Cells Contribute to the Maintenance of Genome Integrity

E.A. Kuznetsova*, and N.P. Sirota*

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

Rotenone, Rhodamine 123, and Janus green B, inhibitors of mitochondria function, are currently investigated to create pharmacological agents that induce mitochondrial dysfunction and apoptosis. Since impaired mitochondrial function is associated with overproduction of reactive oxygen species, it seems relevant to compare DNA damage induced by the said inhibitors in Ehrlich ascites carcinoma cells and murine lymphocytic leukemia P388 and DNA damage induced by the direct effect of ionizing radiation (X-rays) that induces an increase of reactive oxygen species. The alkaline comet assay was used for measuring the level of DNA damage. The level of Rotenone-induced DNA damage was comparable to that one induced by very low-dose radiation (4 Gy) for both cell types. Post-irradiation incubation of cells led to a reduction in the level of DNA damage, indicating that damage to DNA is repaired. Treatment of Ehrlich ascites carcinoma cells with Rhodamine 123 and subsequent washing them for removal of excess dye did not cause an increase in the level of DNA damage, however, exposure to very low dose radiation (4 Gy) in the presence of Rhodamine 123 induced an increase in the level of DNA damage, which was significantly reduced after 1-hour incubation. It can be assumed that pre-treatment of cells with Rotenone or Rhodamine 123 that disrupt mitochondrial function contributed to the maintenance of the integrity of nuclear DNA in irradiated cells. Exposure to Janus green B caused an increase in the level of DNA damage and cell death. The alkaline comet assay revealed that damage induced by these compounds can be considered single- and double-strand breaks and alkali-labile (apurinic/apyrimidinic) sites in DNA.

Keywords: Ehrlich ascites carcinoma, murine lymphocytic leukemia P388, Rotenone, Rhodamine 123, Janus green B, comet assay

УДК 576.32/.36

АДАПТАЦИОННАЯ САМОЗАЩИТА ЗРЕЛЫХ КЛЕТОК ОТ ПОВРЕЖДЕНИЙ БАЗИРУЕТСЯ НА ЭФФЕКТЕ ВАРБУРГА, ДЕ-ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК И ИХ УСТОЙЧИВОСТИ К ГИБЕЛИ

© 2024 г. П.М. Шварцбурд*, #

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия #E-mail: P.Schwartsburd@rambler.ru

> Поступила в редакцию 12.03.2024 г. После доработки 16.07.2024 г. Принята к публикации 17.07.2024 г.

Анализируется гипотеза о сохранившейся способности разных специализированных клеток млекопитающих защитить себя от летальных повреждений, используя защитный, атавистический механизм клеточной де-дифференцировки. Развитие такой защиты сопровождается переходом дифференцированных клеток от митохондриального, кислород-зависимого типа метаболизма на восстановительный, кислород-независимый метаболизм (называемый эффектом Варбурга). Этот переход позволяет повысить порог клеточной устойчивости к гибели от гипоксии, а также может индуцировать появление фетальных маркеров, характерных для клеточной де-дифференцировки. На примере развития двух патологий (сердечной недостаточности и диабета 2 типа), в данной работе представлены данные, подтверждающие существование такого механизма и пути его возможной коррекции.

Ключевые слова: эффект Варбурга, де-дифференцировка, самозащита клеток.

DOI: 10.31857/S0006302924040105, EDN: NGMOIR

Посвящается памяти профессора Марии Николаевны Кондрашовой, создавшей метод тестирования эффекта Варбурга в одиночных клетках.

В течение всей жизни организму и его клеткам приходится приспосабливаться к непрерывно меняющимся условиям среды. С этой точки зрения вся жизнь - постоянная адаптация, приспособление, а все изменения в организме – приспособительные. Однако при этом организм поддерживает постоянство внутренней среды (гомеостаз) и сохраняет выживаемость и функциональную активность многих его специализированных клеток. Как же адаптируются разные клетки к действию многочисленных, постоянно меняющихся факторов? Как сохраняют необходимое для жизни относительное постоянство внутренней среды? В процессе эволюции развивались различные пути и способы адаптации. Один из путей адаптации – это отсутствие реакции клеток (например, к некоторым видам микробов). Однако к большинству повреждающих факторов клетки могут приспосабливаться при помощи защитных реакций на эти раздражители. Такой ответ организма может быть активным, ликвидирующим действие раздражителя. Другой защитный ответ — это мобилизация эндогенных стволовых клеток с целью репарации клеточных повреждений; или временная приостановка функционирования специализированных клеток (де-дифференцировка), путем перевода их на энергосберегающий режим работы, обычно характерный для незрелых эмбриональных клеток. Такие клетки способны выживать при недостатке кислорода и питания, т.е. в неблагоприятных условиях внешней среды. Предполагается, что такой механизм активируется, если локальные стволовые клетки повреждены и не могут участвовать в восстановлении повреждений [1]. Как осуществляется метаболическая саморегуляция де-дифференцированных клеток и к каким последствиям для организма она может привести?

ЭФФЕКТ ВАРБУРГА, ДЕ-ДИФФЕРЕНЦИРОВКА – ЗАЩИТНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОК НА ПОВРЕЖДЕНИЯ

Автоматическое регулирование постоянства внутренней среды и энергоснабжения зрелых органов осуществляется, главным образом, с помощью митохондрий. Именно митохондрии являются центром метаболической интеграции, контролирующим тесную взаимосвязь межли vровнем энергоснабжения клеток, необходимым для выполнения специфических функций зрелых клеток, и их устойчивостью к гибели от гипоксии. Однако такую способность приобретают лишь дифференцированных митохондрии клеток взрослого организма. К таким долгоживущим клеткам прежде всего относятся кардиомиоциты, нейроны и бета-клетки полжелулочной железы. Важно отметить, что в период своего эмбрионального развитии эти же клетки, будучи незрелыми, поддерживают свой энергетический гомеостаз за счет гликолиза и обладают относительной устойчивостью к гипоксии. Гликолиз также активирован и в агрессивных, низкодифференцированных раковых клетках, которые способны выживать даже в условиях аноксии и при этом сохраняют устойчивость к повреждающему действии химиотерапии, радиации и ультрафиолетового света [2]. Парадоксально, но в этих незрелых клетках гликолиз также активирован и в присутствии кислорода, что сопровождается превращением глюкозы в лактат и его секрецией во внеклеточную среду. Поэтому такой тип гликолиза был назван «oxygen-independent glycolysis» («aerobic glycolysis» или «pseudohypoxia»). Этот эффект был впервые открыт более 100 лет тому назад О. Варбургом при изучении агрессивных раковых клеток и поэтому он ранее рассматривался как основной «маркер рака» и широко известен как «эффект Варбурга» [3]. Уже позднее было установлено, что эффект Варбурга не характерен для высокодифференцированных и доброкачественных опухолей [4] и поэтому, может рассматриваться лишь как маркер агрессивности и устойчивости раковых клеток. Более того, эффект Варбурга был обнаружен и в различных нормальных, узкоспециализированных клетках, сопровождающих развитие таких патологий как сердечная недостаточность [5], диабет [6], синдром Дауна [7], атеросклероз [8] и ряд других заболеваний. Тот факт, что эффект Варбурга индуцируется в исходно высокоспециализированных клетках при развитии самых разных патологий, позволяет предположить, что переход дифференцированных клеток с окислительным типом энергоснабжения на кислорол-независяший метаболизм. отражает обший самозашитный ответ клеток на повреждения. В результате такого временного перехода клетки с эффектом Варбурга хотя и утрачивают временно свою специфическую функци-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

ональную активность, но приобретают способность выживать в неблагоприятных условиях. Такая повышенная выживаемость клеток достигается благодаря метаболическим изменениям. запускаемых эффектом Варбурга, в частности созданием вокруг клеток защитной среды с высоким уровнем лактата, который поддерживает повышенную клеточную устойчивость к апоптозу [9]. Эффект Варбурга также индуцирует антиоксидантную защиту клеток, стимулируя синтез глутатиона [10] и поддерживая повышенный уровень восстановленного NAD(P)H [2]. Такой тип метаболизма создает благоприятные условия для синтеза липидов и их аккумуляции в форме липидных гранул, поддерживающих пролиферацию и репарацию клеток [11]. Иными словами, от негативного действия разных повреждений, дифференцированные клетки могут защитить себя торможением функциональной активности и повышением устойчивости к окислительному стрессу и гипоксии.

ЭФФЕКТ ВАРБУРГА, КЛЕТОЧНАЯ ДЕ-ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И СЕРДЕЧНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ

Взрослое сердце долго считали полностью дифференцированным органом, рост и восстановление которого полностью зависит от генетики и метаболического состояния, исходно заложенных до рождения кардио-миоцитов. Однако работы последнего десятилетия показали, что в ответ на повреждения даже зрелые кардиомиоциты могут активировать эффект Варбурга не только для своего выживания и пролиферации, но и, возможно, для репарации сердечной ткани [12]. При этом важно отметить, что незрелые кардиомиоциты эмбриона постоянно используют эффект Варбурга для своего выживания и пролиферации. После рождения плода и его дальнейшего развития зрелые кардиомиоциты переходят на митохондриальный тип метаболизма и утрачивают способность к пролиферации, регенерации, а также устойчивость к гипоксии. Однако в ответ на кратковременную ишемию зрелые кардиомиоциты могут отвечать де-дифференцировкой, в них реактивируется эффект Варбурга, наблюдается экспрессия фетальных маркеров, повышается порог устойчивости к повреждающему действию острой гипоксии [13], в частности, благодаря активации анти-апоптозного пути [14]. В данной ситуации эффект Варбурга ведет себя как «двуликий Янус»: с одной стороны, повышает порог устойчивости де-дифференцированных кардиомиоцитов, к повреждающему действию ишемии [15]; а с другой стороны — снижает сократительную активность сердечной мышцы, что повышает риск развития хронической сердечной недостаточности. Возможен ли полный или ча-

стичный возврат де-дифференцированных кардиомиоцитов в исходное функционально активное состояние, по аналогии с тем, как это происходит у животных, сохранивших способность к регенерации? Известно, что в организмах, способных к регенерации, кардиомиоциты переходят из своего дифференцированного состояния в менее зрелое состояние (т.е. де-дифференцируются), что позволяет происходить пролиферации и регенерации. Важно отметить, что стимуляция ле-лифференцировки карлиомиоцитов у взрослого человека способствует функциональному и морфологическому улучшению работы сердечной мышцы после инфаркта миокарда [13], что подчеркивает важность механизма де-дифференцировки как адаптационной, защитной реакции в восстановлении работы сердца.

ЭФФЕКТ ВАРБУРГА, КЛЕТОЧНАЯ ДЕ-ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ДИАБЕТ

Сахарный диабет - это хроническое эндокринное заболевание, характеризующееся повышением содержания глюкозы в крови и нарушением работы поджелудочной железы и ее гормонов, в частности, инсулина. Установлено, что инсулин синтезируется зрелыми β-клетками поджелудочной железы, где он упаковывается в гранулы и секретируется в кровь, что стимулирует утилизацию глюкозы мышечными и жировыми клетками и в итоге приводит к снижению уровня глюкозы в крови. В процессе эмбриогенеза зрелые β-клетки поджелудочной железы происходят из эмбриональных стволовых клеток в результате сложного клеточного процесса, называемого дифференцировкой. Интересно, что клеточная дифференцировка не является однонаправленным процессом. Все больше данных свидетельствует о том, что при определенных стрессовых состояниях (таких как гипергликемия, воспаление, ацидоз) зрелые β-клетки могут в различной степени терять свой дифференцированный фенотип и клеточную идентичность и регрессировать в менее дифференцированное, фетально-подобное состояние [16]. Это состояние называется дедифференцировкой, его рассматривают как важный фактор, способствующий потере функциональной массы β-клеток при сахарном диабете. Де-дифференцировка β-клеток сопровождается: 1) подавлением активности генов, контролирующих ключевые факторы созревания, секреции инсулина и метаболизма глюкозы; 2) усилением активности генов незрелых клеток-предшественников, способствуя их выживанию в неблагоприятных условиях [17]. Такие де-дифференцированные В-клетки обладают сниженной секрецией инсулина, достаточной для повышения уровня глюкозы в крови [18]. Такая гипергликемическая ситуация, если ее не контролировать, снижает в

зрелых β-клетках уровень окисленного никотинамиддинуклеотида (NAD) и приводит к перепроизводству его восстановленной формы (NADH), тем самым создавая окислительно-восстановительный дисбаланс NADH/NAD [19], повышающий клеточную выживаемость, но содействующий переходу на кислород-независимый тип метаболизма, т.е. эффект Варбурга [20]. Важно отметить, что такой NADH/NAD-дисбаланс может также вызвать метаболический стресс, часто наблюдаемый уже в период. предшествующий развитию диабета [21]. Иными словами, псевдогипоксия смещает метаболизм в дифференцированных β-клетках с митохондриального окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз, характерный для эмбриональных и де-дифференцированных β-клеток [20]. В зависимости от потребности организма именно митохондрии в нормальных зрелых β-клетках вырабатывают энергию, необходимую для поддержания синтеза и секреции инсулина [18]. Попадая в неблагоприятные условия среды, зрелые β-клетки вынуждены приостановить работу митохондрий и перейти на кислород-независяший тип метаболизма, характерный для незрелых β-клеток. С одной стороны, такой переход помогает незрелым β-клеткам выжить и сохранить потенциальную способность к созреванию (без значительной потери популяции β-клеток в поджелудочной железе). С другой стороны, этот результат достигается ценой снижения секреции инсулина в кровь, что повышает риск развития хронической инсулиновой недостаточности, гипергликемии, если своевременно не произойдет повторное «созревание» дедифференцированных β-клеток.

Остается открытым вопрос, возможен ли возврат де-дифференцированных β-клеток в исходное дифференцированное состояние? На разных экспериментальных моделях диабета была выявлена четкая корреляция между прогрессией диабета и увеличением активности альдегиддегидрогеназы (aldehyde dehydrogenase 1 isoform A3 -ALHD1A3). Установлено, что ALHD1A3 – маркер де-дифференцированных β-клеток [21]. Генетическое и фармакологическое ингибирование ALHD1A3 фермента у мышей с диабетом сопровождалось увеличением секреции инсулина и снижением уровня глюкозы в крови, что можно рассматривать как частичное восстановление дифференцировки и функциональной активности в некоторых β-клетках при диабете [20]. Другой способ положительного воздействия на диабет – это ограничение калорий [23]. При таком воздействии у мышей с диабетом 2 типа экспрессия ALHD1A3 подавлялась, а уровень маркеров дифференцировки β-клеток, наоборот, повышался [24]. Такая диета представляется физиологически целесообразной, так как диабет 2 типа часто развивается на фоне избыточного питания, а больные с такой формой диабета имеют лишний вес. Помимо ALHD1A3, был выявлен и другой маркер де-дифференцировки — гастрин, известный также как эмбриональный маркер поджелудочной железы. При исследовании больных с диабетом 2 типа было обнаружено, что β-клетки человека экспрессируют гастрин. При нормализации уровня глюкозы, в частности, с помощью нейропептидов, этот маркер незрелых клеток уже не обнаруживался, что позволило авторам предположить обратимое перепрограммирование де-дифференцированных клеток в более зрелые β-клетки [25].

ДЕ-ДИФФЕРЕНЦИРОВКА – АТАВИСТИЧЕСКИЙ ЗАЩИТНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОК НА НЕГАТИВНОЕ ВЛИЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ?

Эмбриологам хорошо известен процесс бластогенеза – возникновение нового организма из комплекса соматических клеток. Этот процесс распространен, в частности, среди низкоорганизованных беспозвоночных организмов, которые могут пребывать как в активных, так и в покоящихся стадиях своего развития. Покоящиеся бластогенные структуры возникают из различных тканей, общая черта которых - низкая степень дифференцированности составляющих их клеток. Как и агрессивные раковые опухоли, покоящиеся бластогенные структуры имеют более простое строение по сравнению с большинством других тканей организма. в котором они возникают [26]. К основным проявлениям де-дифференцировки в раковых опухолях следует отнести подавление аэробного обмена, переход на древний кислород-независящий путь окисления углеродов (эффект Варбурга), амебоидное движение раковых клеток и обретение ими способности переносить аноксию [2]. Клетки покоящихся стадий беспозвоночных обладают такими же свойствами, они также устойчивы к обезвоживанию и переохлаждению. Важно отметить, что именно дедифференцировка обеспечивает жизнеспособность покоящихся стадий первичноводных беспозвоночных и асцидий в неблагоприятных условиях, а при переходе из активного в покоящееся состояние де-дифференцированные клетки как бы «омолаживаются», в то время как малоустойчивые к вредным факторам среды высокодифференцированные клетки распадаются, а их продукты распада индуцируют де-дифференцировку [26]. В попытке повысить свою выживаемость в неблагоприятных условиях среды, современные позвоночные организмы также сохранили способность к переходу своих высокоспециализированных клеток в де-дифференцированное, эмбрионально-подобное состояние. Остается открытым вопрос: какие сигнальные молекулы,

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

образующиеся при гибели высокочувствительных клеток, способны вызывать де-дифференцировку? Среди претендентов на эту роль особое внимание заслуживают простагландины (известные сигнальные липидные молекулы), которые могут образовываться при утилизации макрофагами погибающих апоптозных клеток [27]. Важно отметить, что простагландины Е2 также способны вызывать де-дифференцировку, в частности в малых мышечных клетках [28]. При этом простагландины Е2 обладают способностью «запускать» репарацию и регенерацию в разных высокоспециализированных органах, в частности, таких как сердце, кожа, почки и другие органы [29].

О ДВОЙСТВЕННОЙ РОЛИ ДЕ-ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ЕЕ ПОСЛЕДСТВИЯХ

Многоклеточные организмы используют разные адаптационные механизмы защиты от летальных повреждений, в частности, амфибии могут полностью регенерировать утраченный орган, используя механизм обратимого перехода «дедифференцировки – ре-дифференцировки» клеток, тогда как многие животные и человек не обладают такой способностью. Хотя адаптация к повреждающим факторам осуществляется на разных уровнях систем организма, однако именно специализированные клетки млекопитающих частично сохранили потенциал отвечать клеточной де-дифференцировкой в ответ на повреждения, а также индушировать эффект Варбурга, повышающий выживаемость таких клеток (рис. 1). Каков физиологический смысл такого ответа и каковы его последствия? Анализ вышеприведенных литературных данных подтверждает правомерность гипотезы о сохранении у специализированных клеток млекопитающих (таких, как кардиомиоциты и β-клетки поджелудочной железы) способности сохранить атавистический механизм дедифференцировки, наблюдаемый у беспозвоночных организмов. Этот защитный механизм позволяет де-дифференцированным клеткам временно выжить в условиях хронической гипоксии и гипергликемии. Более того, при благоприятных условиях де-дифференцированные β-клетки смогли сами восстановить свои утраченные функции, например, восстановить секрецию инсулина в β-клетках [30]. Иными словами, де-дифференцированные β-клетки сохранили потенциальную способность к ре-дифференцировке и репарации повреждений, полученных при гипергликемии, т.е. к восстановлению специализированных функций, присущих зрелым β-клеткам. Остается открытым вопрос: способны ли дедифференцированные кардиомиоциты к восстановлению своих утраченных функций? Известно, что сердце взрослых млекопитающих утратило



Рис. 1. В ответ на неблагоприятные условия микроокружения зрелые/дифференцированные клетки могут переходить в де-дифференцированное состояние, основные свойства которого присущи незрелым, эмбрионально-подобным клеткам.

способность к регенерации, тогда как сердце неонатальной мыши может регенерировать, но только в течение первой нелели жизни. Был илентифицирован белок неонатального внеклеточного матрикса агрин (agrin), который отвечает за такую неонатальную регенерацию [31]. Тимозин-β4 и протимозин-а также могут содействовать неонатальной регенерации, наблюдаемой в ответ на ишемические повреждения сердца взрослой мыши [32]. При этом тимозин-β4 и протимозин-α относятся к тем белкам, которые максимально секретируются тимусом именно в неонатальный период развития. Эти наблюдения позволяют предположить, что для восстановления части утраченных тканеспецифических функций де-лифференцированные клетки использую другую программу

репарации, отличную от программы неонатальной регенерации, для активизации которой требуются особые метаболические условия и эмбриональные факторы, отсутствующие в зрелых тканях, что в итоге и блокирует процесс их восстановления. Основные различия между этими двумя программами суммированы в табл. 1, созданной на основе данных, представленных в работе [33]. Обрашает на себя особое внимание тот факт, что, помимо отсутствия эмбриональных факторов в поврежденных зрелых тканях, в них также индуцируется воспалительный ответ, ответственный за накопление коллагена и образование рубца. Принято считать, что существуют лве основные сталии воспаления: 1) цитотоксическая стадия воспаления, которая необходима

N⁰	Особенности восстановления раневых повреждений в эмбриональных тканях	Особенности восстановления раневых повреждений в зрелых тканях
1	Эмбриональные раны быстро закрываются благодаря сокращению и сборке актина	У взрослых животных, раны быстро закрываются благодаря свертыванию крови
2	Количество клеток воспаления минимально	Количество клеток воспаления увеличено
3	Низкий уровень хемотаксических сигналов, не обеспечивает мобилизации фибробластов и формирование коллагенового рубца	Высокий уровень хемотаксических сигналов, обеспечивает эффективную мобилизацию фибробластов и накопление коллагена
4	Отсутствие гранулярной ткани и отложений коллагена в форме рубца	Формирование гранулярной ткани — результат пролиферации фибробластов, синтеза коллагена и внеклеточного матрикса
5	Основные ростовые факторы (↓TFβ1/2, ↑TGFβ3, ↑IGF-1, ↑PDGF, ↑гиалуроновая кислота [33])	Основные ростовые факторы (↑ТFβ1/2, ↓TGFβ3, ↓IGF-1, ↑PDGF, ↓гиалуроновая кислота [33])

Таблица 1. Эмбриональные и зрелые ткани для восстановления раневых повреждений используют две разные программы, обладающие рядом специфических особенностей

чтобы ликвидировать инфекцию и очистить раневое повреждения; 2) стадия воспалительной репарации, которая важна, чтобы восстановить поврежденную ткань и завершить воспалительный ответ. Однако в случае развития хронического воспалительного ответа нарушается взаимоконтроль между этими стадиями [34], что приводит к накоплению факторов воспаления, которые сами могут функционировать как индукторы повреждения, способные как активировать эндогенные стволовые клетки [35], так и вызывать де-дифференцировку клеток. Как результат, повышается риск развития новообразований именно в этих локальных зонах [1]. Сходное состояние «незаживающий раны» может также вызывать конфликт между этими двумя программами, развивающимися в здоровых тканях, окружающих опухоль, и самой опухолью [33]. Хирурги знают, что «здоровую» ткань, окружающую опухоль, необходимо удалить, иначе не будет заживления операционного шва из-за хронического воспаления. Таким образом, состояние де-дифференцировки может вызывать как положительные последствия, содействуя репарации поврежденных тканей, так и негативные последствия, если отсутствуют факторы и метаболические условия, без которых программа репарации не может быть выполнена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время накопилась немало данных о том, что традиционный взгляд на клеточную дифференцировку как на однонаправленный и необратимый путь не всегда верен, так как многие дифференцированные клетки обладают пластичностью и сохранили атавистическую способность к де-дифференцировке, как часть самозащитной реакции органа на повреждение. При этом де-дифференцированные клетки приобретают устойчивость к повреждениям благодаря переходу из окислительного на восстановительный тип метаболизма (эффект Варбурга), что позволяет им выжить в неблагоприятных условиях. Приобретенные де-дифференцированными клетками свойства характерны также и для эмбриональных клеток (рис. 1), которые могут эффективно дифференцироваться в эмбриональных условиях, участвуя в неонатальной регенерации в отсутствие воспалительного ответа. Такой тип регенерации не наблюдается в высокодифференцированных тканях взрослых организмов, которые используют другую стратегию восстановления повреждений, где воспаление играет важную роль (табл. 1) и де-дифференцированные клетки вынуждены находиться в зоне локального воспаления. Какова судьба этих клеток, могут ли они редифференцироваться, находясь в условиях воспаления зрелых тканей, или, напротив, этот процесс заблокирован, так как воспаление индуцирует де-дифференцировку? Какие эндогенные факторы контролируют эти процессы? Пока нет ответов на эти вопросы. Несмотря на большие пробелы в наших знаниях, мы имеем ряд фактов, из которых начинает складываться общая картина путей самозащиты дифференцированных органов и клеток от повреждений *in vivo*. Поэтому изучение роли этого защитного механизма должно дать в будущем новые возможности для лучшего понимания и лечения разных заболеваний.

конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guo Y., Wu W., Yang X., and Fu X. Dedifferentiation and *in vivo* reprogramming of committed cells in wound repair (Review). *Mol. Med. Reports*, **26** (6), 369 (2020). DOI: 10.3892/mmr.2022.12886
- Schwartsburd P. M. and Aslanidi K. B. Hypoxic cancer cells protect themselves against damage: Search for a single-cell indicator of this protective response. *Novel Approach in Cancer Study*, 7 (4), 000668 (2023). DOI: 1031031/NACS.2023.07.000668
- 3. Warburg O., Wind F., and Negelein E. The metabolism of tumours in the body. *J. Gen. Physiol.*, **8** (6), 519-530 (1927).
- Riester M., Xu Q., Moreira A., Zheng J., Michor F., and Downey R. The Warburg effect: persistence of stem-cell metabolism in cancers as a failure of differentiation. *Ann. Oncol.*, **29** (1), 264–270 (2018). DOI: 10.1093/annonc/mdx645
- Serio S., Pagiatakis C., Musolina E., Felicetta A. Carullo P., Frances J. L., Papa L., Rozzi G., Salvarani N., Miragoli M., Gornati R., Bernardini G., Condorelli G., and Papah R. Cardiac aging is promoted by pseudohypoxia increasing p300-induces glycolysis. *Circ. Res.*, **133** (8), 686–703 (2023). DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.123.322676
- Williamson J. R., Chang K., Frangos M., Hasan K. S., Ido Y., Kawamura T., Nyengaard J. R., van den Enden M., Kilo C., and Tilton R. G. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42 (6), 801–813 (1993). DOI: 10.2337/diab.42.6.801
- Pecze L., Randi E. B., and Szabo C. Meta-analysis of metabolites involved in bioenergetic pathways reveals a pseudo-hypoxic state in Down syndrome. *Mol. Med.*, 26 (1), 102 (2020). DOI: 10.1186/s10020-020-00225-8

- Salminen A., Kauppinen K., and Kaarniranta K. Hypoxia/ischemia active processing of amypoid precursor protein: impact of vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, **140** (4), 536–549 (2017). DOI: 10.1111/jnc.13932
- 9. Go S., Kramer T. T., Verhoeven A. J., Oude Elferink R. P. J., and Chang J.-Ch. The extracellular lactate-to-pyruvate ratio modulates the sensitivity to oxidative stress-induced apoptosis via the cytosolic NADH/NAD⁺ redox state. *Apoptosis*, **26** (1–2), 38–51 (2021). DOI: 10.1007/s10495-020-01648-8
- Gwangwa A., Joubert A. M., and Visagise M. H. Crosstalk between Warburg effect, redox regulation and autophagia. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 23, 20 (2018). DOI: 10/1186/s11658-018-0088-y
- Schwartsburd P. M. Lipid droplets: Could they be involved in cancer growth and cancer-microenvironment communication? *Cancer Commun. (London)*, **42** (2), 83–87 (2022). DOI: 10.1002/cac2.12257
- Chen Z., Liu M., Li L., and Chen L. Involvement of the Warburg effect in non-tumour diseases processes. J. Cell Physiol., 233 (4), 2839–2849 (2018). DOI: 10.1002/jcp.25998
- Beisaw A. and Wu C.-C. Cardiomyocyte maturation and its reversal during cardiac regeneration. *Dev. Dynamic.*, 253 (1), 8–27 (2024). DOI: 10.1002/dvdy.557
- Li X., Wu F., Gunther S., Looso M., Kuenne C., Zhang T., Wiesnet M., Klatt S., Zukunft S., Fleming I., Poschet G., Wietelmann A., Atzberger A., Potente M., Yuan X., and Braun T. Inhibition of fatty acid oxidation enables heart regeneration in adult mice. *Nature*, 622 (7983), 619–627 (2023). DOI: 10.1038/s41586-023-06585-5
- Polling J., Gajawaba P., Lorchner H., Polyakova V., Szibor M., Bottger T., Warnecke H., Kubin T., and Braun T. The Janus face of OSM-mediated cardiomyocyte dedifferentiation during cardiac repair and diseases. *Cell Cycle*, **11** (3), 439–445 (2012). DOI: 10.4161/cc.11.3.19024
- Accili D., Talchai S. C., Kim-Muller J. Y., Cinti F., Ishida E., Ordelheide A. M., Kuo T., Fan J., and Son J. When β-cells fail: lesion from dedifferentiation. *Diabetes Obes. Metab.*, **18** (Suppl. 1), 117–122 (2016). DOL: 10.1111/dom.12723
- Bensellam M., Jonas J.-C., and Laybutt R. D. Mechanism of β-cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future directions. *Endocrinology*, 236 (2), R109–R143 (2018). DOI: 10.1530/JOE-17-0516
- Weksler-Zanngen S. Is type 2 diabetes a primary mitochondrial disorder? *Cells*, **11** (10), 1617 (2022). DOI: 10.3390/cells11101617
- Wu J., Jin Z., Zheng H., and Yan L.-J. Sources and implication of NADH/NAD redox imbalance in diabetes and its complications. *Diabetes, Metabolic Syndromes & Obesity: Targets and Therapy*, 9, 145–153 (2016). DOI: 10.2147/DMSO.S106087J

- Song J., Yang X., and Yan L.-J. Role of pseudohypoxia in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Hypoxia*, 7, 33– 40 (2019). DOI: 10.2147/HP.S202775
- Yan L-J. Pathogenesis of chronic hyper-glycemia: From reductive stress to oxidative stress. *J. Diabetes Res.*, 2014, 1379199 (2014). DOI: 10.1155/2014/137919
- 22. Kim-Muller J. Y., Fan J., Kim Y. J., Lee S. A., Ishida E., Blaner W. S., and Accili D. Aldehyde dehydrogenase 1a3 defines a subset of failing pancreatic beta cells in diabetic mice. *Nature Commun.*, 7, 12631 (2016). DOI: 10.1038/ncomms12631
- Cheng C. W., Villani V., Buono R., Wei M., Kumar S., Omer H., Cohen P., Sneddon J. B., Perin L., and Longo V. D. Fasting-mimicking diet promotes Ngn-driven β-cell regeneration reverse diabetes. *Cell*, **168** (5), 775– 788.e12 (2017). DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.040
- Ishida E., Kim-Muller J. Y., and Accili D. Pair feeding, but not insulin, phlorizin, or rosiglitazone treatment, curtails markers of β-cell dedifferentiation in db/db mice. *Diabetes*, **66** (8), 2092–2101 (2017). DOI: 10.2337/db16-1213
- Rodnoi P. Neuropeptide Y expression marks partially differentiated β-cells in mice and human. *JCI insight*, 2 (12), e94005 (2017). DOI: 101172/jci.insight.94005
- Макрушин А. В. и Худолей В. В. Опухоль как атавистическая адаптивная реакция на условия окружающей среды. *Журн. общ. биологии*, **52** (5), 717–720 (1991).
- Byun Y., Youn Y.-S., Lee Y.-J., Choi Y.-H., Woo S.-Y., and Kang J. L. Interaction of apoptotic cells with macrophages upregulates COX-2/PGE₂ and HGF expression via a positive feedback loop. *Mediators Inflamm.*, 2014, 463524, (2014). DOI: 10.1155/2014/463524
- 28. Clement N., Glorian M., Raymondjean M., Andréani M., and Limon I. PGE_2 amplifies the effects of IL-1 β on vascular smooth muscle cell de-differentiation: A consequence of the versatility of PGE_2 receptors 3 due to the emerging expression of adenylyl cyclase 8. *J. Cell Physiol.*, **208** (3), 495–505 (2006). DOI: 10.1002/jcp.20673
- Cheng H., Huang H., Guo Z., Chang Y., and Li Z. Role of prostaglandin E2 in tissue repair and regeneration. *Theranostics*, **11** (18), 8836–8854 (2021). DOI: 10.7150/thno.63396
- Son J. and Accili D. Reversing pancreatic β-cell dedifferentiation in the treatment of type 2 diabetes. *Experim. Mol. Med.*, 55 (8), 1652–1658 (2023). DOI: 10.1038/s12276-023-01043-8
- Bassat E., Mutlak Y. E., Genzelimakh S., Shadrin I. Y., Umansky K. B., Yifa O., Kain D., Rajchman D., Leach J., Bassat D. R., Udi Y., Sarig R., Sadi I., Martin J. F., Bursac N., Cohen S., and Tzahor E. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature*, 547 (7662), 179–184 (2017). DOI: 10.1038/nature22978
- 32. Gladka M., Jahansen A. K., Kampen S. J., Peters M.C., Molenaar B., Versteeg D., Kooijman L.,

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

Zentilin L., Giacca M., and van Rooij E. Thymosin β and pro-thymosin α promote cardiac regeneration post ischemic injury in mice. *Cardiovasc. Res.*, **119** (3), 802–812 (2023). DOI: 10.1093/cvr/cvac155

- Schwartsburd P. M. Un-healing wound in tissues adjacent to cancer as a result of competitive interactions between the embryonic and mature tissue repair programs. *Med. Hypothesis*, **73** (6), 1041–1044 (2009). DOI: 10.1016/j.mehy.2009.03.054
- Schwartsburd P. M. Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: Pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer Metastasis Rev.*, 22 (1), 95–102 (2003). DOI: 10.1023/a:1022220219975
- Шварцбурд П. М. Стволовые клетки и предраковое воспалительное микроокружение в развитии эпителиальных новообразований при старении. *Успехи геронтологии*, **21** (3), 356–366 (2008).

Adaptive Self-Defense of Mature Cells against Damage Is Based on the Warburg Effect, De-Differentiation of Cells and Resistance to Cell Death

P.M. Schwartsburd*

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

This review analyzes the hypothesis of the preserved ability of various specialized mammalian cells to protect themselves from lethal injury by enacting a protective atavistic mechanism of cell dedifferentiation. The development of such protection is accompanied by a transition of differentiated cells from the mitochondrial oxygen-dependent type of metabolism to regenerative oxygen-independent metabolism (called the Warburg effect). This transition allows cells to increase the resistance to cell death from hypoxia, and can also induce the emergence of fetal markers characteristic of cell dedifferentiation. This paper, exemplified by the development of two pathologies (heart failure and type 2 diabetes), presents the findings that confirm the existence of such a mechanism and ways of its possible correction.

Keywords: Warburg effect, dedifferentiation, cell self-defense

УДК 576.38

ПАРАПТОЗ И ДРУГИЕ ТИПЫ НЕАПОПТОТИЧЕСКОЙ РЕГУЛИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК

© 2024 г. М.Е. Соловьева*, #, Ю.В. Шаталин*, В.С. Акатов*

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

*[#]E-mail: m_solovieva@iteb.ru*Поступила в редакцию 13.03.2024 г.
После доработки 16.07.2024 г.
Принята к публикации 17.07.2024 г.

Обзор посвящен современным представлениям о параптозе, как одном из типов регулируемой клеточной гибели, в сравнении с другими типами клеточной гибели. Параптоз — это форма клеточной гибели, вызываемая стрессом эндоплазматического ретикулума, сопровождающимся накоплением в нем поврежденных или неправильно свернутых белков, обширной неаутофагической вакуолизацией цистерн эндоплазматического ретикулума и, в ряде случаев, митохондрий, с последующими повреждениями митохондрий, цитоскелета и гибелью клеток. Знание о молекулярных механизмах параптоза представляет интерес для лечения онкологических заболеваний, резистентных к апоптоз-индуцирующим агентам.

Ключевые слова: клеточная гибель, апоптоз, некроз, параптоз.

DOI: 10.31857/S0006302924040117, EDN: NGKZQR

Бурное развитие молекулярной биологии в XX веке привело к тому, что в конце его последней лекалы остро встал вопрос классификации форм или типов клеточной гибели, к которым относили некроз, коагуляционный некроз, аутолиз, физиологическую гибель клеток, запрограммированную гибель клеток, хроматолиз (первое название апоптоза, появившееся в 1914 г.), кариорексис, кариолизис и три механизма самоубийства клеток - при помощи лизосом, свободных радикалов и путем апоптоза [1]. Наличие такого списка, в котором один и тот же процесс имел несколько наименований, уже являлось показателем необходимости систематизации в этой области. По морфологическим критериям процесс клеточной гибели делился на апоптоз, как форму программируемой или регулируемой клеточной гибели, характеризующейся сморщиванием цитоплазмы, кариорексисом, фрагментацией хро-

матина, и некроз, как форму нерегулируемой клеточной гибели, для которой, напротив, было характерно цитоплазматическое набухание и отсутствие фрагментации хроматина. Накопленные факты часто не соответствовали этой упрощенной схеме и вызывали путаницу при диагностике, например, в патологоанатомических исследованиях. Многие авторы отмечали, что вторичный некроз является завершением любой формы клеточной гибели [1]. Для того чтобы систематизировать накопленные знания в этой области, Общество токсикологической патологии (STP, https://www.toxpath.org/) создало Комитет по номенклатуре клеточной гибели (Nomenclature Committee on Cell Death - NCCD) [2]. За прошедшее время было получено много новых данных о клеточной гибели, путях ее реализации и значении в биологии и медицине. Среди новых типов клеточной гибели отлельное место занимает параптоз, связанный с развитием стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и вакуолизацией цитоплазмы неаутофагической природы, происходяший без активации каспаз. без фрагментации хроматина, отличающийся от других известных типов гибели клеток. Параптоз вызывается целым рядом фармакологических агентов, физических факторов и природных субстанций, наблюдается при фотодинамической терапии и ряде заболеваний. Параптоз активирует Т-клеточный

Сокращения: NCCD – Комитет по номенклатуре клеточной гибели, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, PCD – программируемая гибель клеток, RCD – регулируемая гибель клеток, MPT – переход проницаемости митохондриальной мембраны, DAMP – молекулярный фрагмент (паттерн), ассоциированный с повреждениями, UPR – unfolded protein response (ответ на неверно собранные белки), LDCD – лизосомо-зависимая гибель клеток, AФК – активные формы кислорода, ERAD – endoplasmicreticulum-associated protein degradation (деградация белков, зависимая от эндоплазматического ретикулума).

иммунитет и может реализоваться в случаях развития лекарственной устойчивости к апоптозиндуцирующим агентам [3–14]. Данный обзор посвящен обсуждению параптоза как одного из путей регулируемой клеточной гибели.

ЭВОЛЮЦИЯ КЛАССИФИКАЦИИ ФОРМ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Первоначальные рекомендации NCCD относились к гистологическим образцам и были призваны устранить путаницу в употреблении терминов «апоптоз» и «некроз» в токсикологических исследованиях. В рекомендациях Комитета по номенклатуре клеточной гибели от 1999 г. некроз признавался генерализованной формой, которой заканчивается любой тип гибели клеток. При этом отмечалось, что тип некроза может быть онкотическим или апоптотическим, а также смешанным [2].

В 2005 году NCCD выпустил очередные рекомендации, касающиеся определения сути и механизмов клеточной гибели. Было дано четкое определение погибшей клетки: «клетку следует считать погибшей, если соблюдается любой из следующих молекулярных или морфологических критериев: 1) клетка утратила целостность плазматической мембраны, определяемой витальными красителями; 2) клетка, включая ее ядро, подверглась полной фрагментации на отдельные тела (которые часто называют «апоптотическими телами»); и/или 3) погибшая клетка (или ее фрагменты) были поглощены соседней клеткой in vivo». Таким образом, «мертвые клетки» отличаются от «умирающих клеток», находящихся в процессе клеточной гибели, которая может происходить различными путями [15]. Были охарактеризованы известные на тот момент способы клеточной гибели, включая апоптоз, который не всегда требует активации каспаз и сопровождается фрагментацией ДНК и клетки, аутофагию, некроз и онкоз, при этом NCCD рекомендовал ограничить использование термина «онкоз», поскольку его проявления частично совпадают с некрозом. Были также охарактеризованы митотическая катастрофа, аноикис, эксайтотоксичность и валлерианская дегенерация, характерные для нервной системы, и корнификация (специфическая, отличная от апоптоза, форма программированной гибели клеток, происходящая в эпидермисе) с уточнением, что для описательных форм гибели еще предстоит уточнить молекулярные механизмы. В рекомендациях 2005 г. NCCD в качестве общей политики вместо формализации номенклатуры призвал поощрять использование функциональных терминов, например, вместо термина «аутофагия» - «везикулярное перераспределение LC3» или «наличие двухмембранных микровезикул». Отмечалось, что апоптоз не эквивалентен

программируемой клеточной гибели (PCD) в целом, поэтому термины «программируемая клеточная гибель» и «случайная гибель клеток» неточны и должны быть заменены на «гибель клеток в процессе развития», «гибель клеток, вызванная этопозидом», «гибель клеток, вызванная осмотическим шоком», «гибель, вызванная повторным замораживанием и оттаиванием», что, конечно, трудно признать удачным.

В 2009 г. NCCD сделал ряд критических замечаний по поводу разделения многообразия форм клеточной гибели на апоптоз, аутофагию и некроз, а также наименования этих форм клеточной гибели как type I, type II и type III cell death [16]. Рекомендации NCCD расширили список атипичных форм клеточной гибели включением параптоза, пироптоза, энтоза и пиронекроза. При определении типа гибели NCCD рекомендовал использовать биохимические и молекулярно-генетические критерии взамен морфологических. NCCD вновь призвал избегать использования обобшенных наименований («процент апоптоза» и т.д.), предлагая вместо этого использовать более точные описательные выражения («процент клеток с конденсированными ядрами», «процент клеток с фрагментацией ДНК»), а выводы относительно характера клеточной гибели подкреплять как минимум двумя методами. Комитет отметил, что номенклатура гибели клеток будет считаться полезной только в том случае, если она предсказывает возможности фармакологического/генетического модулирования (индуцирования или ингибирования) гибели клеток и/или если она предсказывает последствия гибели клеток *in vivo* в отношении воспаления и распознавания клетками иммунной системы.

В рекомендациях 2012 г. была сделана попытка расширить набор поддающихся оценке количественных биохимических критериев в классификации клеточной гибели. Например, некроптоз был охарактеризован как RIP1- и/или RIP3-регулируемый некроз. Список форм клеточной гибели, которые предстоит охарактеризовать более подробно, был расширен за счет НЕТоза, партанатоза, однако пиронекроз и параптоз были исключены [17]. Для физиологических случаев клеточной гибели, которые происходят в контексте эмбрионального/постэмбрионального развития и тканевого гомеостаза, было предложено использовать термин «программируемая гибель» (PCD). Термин «регулируемая гибель» (RCD), независимо от того, запрограммирована ли она или вызвана экзогенными воздействиями, используется при наличии специального молекулярного механизма ее реализации, который может быть ингибирован с помощью фармакологических и/или генетических манипуляций. Клеточную гибель под действием значительного внешнего стресса (при многократном заморажи-

вании-оттаивании, высоких концентрациях прооксидантов и т.д.), при котором не успевает инициироваться молекулярная программа гибели, было рекомендовано обозначать как «случайную» клеточную гибель (accidental cell death). Обычно она имеет морфологические признаки некроза и не может быть ингибирована фармакологически и/или генетически.

В 2015 г. NCCD выпустил рекомендации, призванные помочь различать существенные и дополнительные аспекты гибели клеток. Было отмечено, что фармакологические или генетические вмешательства способны изменить ход генетически программированных типов гибели в ходе физиологических процессов (PCD). Ингибирование RCD зачастую лишь меняет кинетику процесса и его биохимические и морфологические проявления и переключают один тип гибели на другой. Таким образом, эффективная защита может быть достигнута лишь на ранних этапах инициации гибели, когда адаптивные системы клетки еще функционируют [18]. Это может вызвать дополнительные трудности при установлении типа клеточной гибели. Большое внимание NCCD уделил адаптивному ответу на стресс и точке невозврата, предположив, что падение АТФ и редокс-дисбаланс составляют общую для всех RCD характеристику клеточной гибели. Поскольку при энтозе было показано, что поглощенная клетка остается жизнеспособной и может выйти наружу и продолжать существовать, в определение погибшей клетки было внесено уточнение. NCCD рекомендовал считать погибшими только клетки, которые либо демонстрируют потерю избирательной проницаемости плазматической мембраны, либо подверглись полной фрагментации.

В 2018 году NCCD выпустил очередные рекомендации, где была дана характеристика таких форм клеточной гибели, как апоптоз, запускаемый внутри клетки (митохондриальный путь инициации, intrinsic), рецептор-опосредованный (extrinsic) апоптоз, некроз, вызванный открытием митохондриальной поры (MPT-induced necrosis), некроптоз, ферроптоз, пироптоз, партанатоз, энтотическая гибель клеток, НЕТотическая гибель клеток, лизосомо-зависимая гибель клеток, аутофагия-зависимая гибель клеток, иммуногенная гибель клеток, а также были охарактеризованы не являющиеся гибелью клеточное старение и митотическая катастрофа [19].

В 2023 г. NCCD уделил большое внимание апоптозу и его месту в гомеостазе организма в условиях болезней, а также роли каспаз в регуляции этих процессов. Было отмечено, что МРТвызванный некроз, некроптоз, ферроптоз, пироптоз, партанатоз, энтотическая гибель клеток, НЕТотическая гибель клеток, лизосомо-зависи-

мая гибель клеток и аутофагия-зависимая гибель клеток включают точно установленные на молекулярном уровне события и, следовательно, ими можно манипулировать с помощью фармакологических или генетических вмешательств. Сигнальные пути идентифицированных в последние алкалиптоза [20], купроптоза [21] и голы ПАНоптоза (включающего одновременную активацию пироптоза, апоптоза и некроптоза), их значение для здоровья и болезней находятся в стадии изучения [22]. Отметим, что ряд авторов отрицает деление клеточной гибели на множество подтипов (которых насчитывается, по их словам, более 30). Они считают, что с точки зрения органов и тканей имеется только два вида физиологического процесса гибели – апоптоз и клеточное старение, и два патологических процесса – некроз и стресс-индуцированная гибель, а все прочие представляют собой подварианты различных сочетаний в определенных физиологических или патологических условиях [23]. Однако это влечет за собой необходимость подразделения на подтипы клеточной гибели, и поэтому большинство исследователей предпочитает пользоваться номенклатурой NCCD.

На настояший момент имеются несколько различных способов классификации форм клеточной гибели: по морфологическим признакам, по биохимическим критериям (участие протеаз), по функциональным аспектам (случайная или программируемая, физиологическая или патологическая) и по иммуногенности (иммуногенная или нет) [16]. Так, например, неапоптотическую клеточную гибель делят на каспаза-зависимую (например, корнификация и пироптоз) и независимую от каспаз [14]. Самая широко применяемая классификация — это разделение на программируемую, регулируемую и случайную гибель вследствие воздействия стимулов, превосходящих возможности защитных систем клетки. При этом регулируемая гибель, в том числе и программируемая гибель, представляющая собой частный случай RCD в физиологических условиях, осуществляется определенными молекулярными посредниками через сигнальные каскады с уникальными биохимическими, функциональными и иммунологическими последствиями [18, 22, 24]. Иногда некоторые авторы выделяют непрограммируемую клеточную гибель, вызываемую нарушениями клеточного гомеостаза (нарушениями регуляции ионных потоков, редокс баланса, нарушениями работы лизосом) - это эксайтотоксичность, ферроптоз и лизосомальная гибель клеток [25]. Отметим, что эксайтотоксичность, ранее признаваемая форма гибели нервных клеток [15] под воздействием нейромедиаторов, способных гиперактивировать NMDA- и АМРА-рецепторы, в последней классификации NCCD (2023 г.) отсутствует [22]. Иммуногенная клеточ-

ная гибель выделялась ранее в отдельный тип [16], но теперь понятно, что она представляет собой любой тип гибели клеток, вызывающий иммунный ответ [24]. Иммунный ответ стимулируется выделением связанных с повреждением молекулярных паттернов (DAMPs), к которым, например, относится АТФ, мочевая кислота, ДНК, белки теплового шока. Это активирует дендритные и другие иммунные клетки и имеет большое значение в предотвращении метастазирования опухолевых клеток. В последней классификации NCCD [22] иммуногенная клеточная гибель не упоминается, как и некоторые другие, которые ранее выделяли в отдельный тип гибели. Это, в частности, аноикис (апоптозоподобная гибель, вызываемая откреплением клеток от субстрата), а также метуоз, форма гибели клеток с образованием множественных заполненных жидкостью вакуолей из макропиносом и эндосом в цитоплазме клетки (отсюда и название, «метуо» на греческом означает «пить ло опьянения»). в результате чего клетка разбухает и гибнет. Метуоз описан в множестве устойчивых к апоптозу раковых клеток после введения индольных производных халкона, а также в глиобластоме при оверэкспрессии Ras [26]. Для этой формы гибели характерно отсутствие блеббинга и конденсации хроматина, а фрагментация ДНК не обязательно имеет место, и активация каспаз не является необходимой. Точный механизм этого типа гибели не установлен.

Далее кратко охарактеризованы формы неапоптотической регулируемой гибели по последней классификации NCCD [22].

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕАПОПТОТИЧЕСКИХ ФОРМ РЕГУЛИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Некроз, вызванный МРТ (циклофилин D-опосредованный некроз). Термин МРТ относится к формированию неизбирательно проницаемой поры митохондриальной мембраны, что приводит к быстрой диссипации $\Delta \psi_m$, набуханию и гибели митохондрий. Точный механизм возникновения некроза, вызванного МРТ, неясен, но считается, что в нем участвует, в частности, циклофилин D, поскольку ингибиторы циклофилина D защищают от триггеров некроза, вызванного МРТ. Несмотря на наличие слова «некроз», это тоже форма RCD, которая обычно проявляется некротическим морфотипом. Она инициируется, в частности, тяжелым окислительным стрессом и характеризуется высоким уровнем цитозольного Ca²⁺.

Некроптоз – литический тип клеточной гибели, облигатно зависимой от рецептор-взаимодействующей серин/треонин-протеинкиназы 3

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

(RIPK3) и MLKL (mixed-lineage kinase domain-like pseudokinase, доменоподобная псевдокиназа киназы смешанного происхождения) [19]. Рецепторы гибели (Toll, TRAILR, TNFR1, FasL) после реакции с лигандами запускают деубиквитинирование RIPK1. Если каспаза-8 инактивирована, то RIPK1 фосфорилирует RIPK3 (отметим, что активация RIPK3 может также происходить независимо от RIPK1), начинается сборка амилоидоподобного комплекса некросомы, фосфорилирование псевдокиназы MLKL, которая транслоцируется к цитоплазматической мембране и формирует в ней пору. При этом происходит набухание ядра и других цитоплазматических органелл клетки, которая таким образом приобретает некротические черты. При дальнейшем разрыве цитоплазматической мембраны высвобождается ее содержимое, включая DAMP, что способствует воспалению и приводит к активации иммунного ответа. RIPK3 также способствует воспалению во время некроптоза независимо от образования клеточных пор посредством неканонической активации NF-иВ, интерлейкинов IL-16 и IL-18 [27]. Некроптоз можно ингибировать некростатином (ингибитором RIPK1), протеинфосфатазой 1В, которая дефосфорилирует RIPK3, и аврора А-киназой, которая ингибирует взаимодействия RIPK1-RIPK3, а также ингибитором RIPK3 GSK'872 и ингибитором MLKL некросульфонамидом [27]. Не все типы клеток экспрессируют RIPK3, и в этих клетках ингибирование каспаз просто предотвращает гибель клеток, опосредованную внеклеточными лигандами. NCCD считает, что митохондрии не вносят существенный вклад в этот процесс [4, 18, 19, 28], однако обнаружено, что, например, в ходе TNFR1опосредованного некроптоза взаимодействие между митохондриями и лизосомами играет важную роль в реализации гибели [29]. Некроптоз происходит в хондроцитах человека в процессах роста костей. Он участвует в формировании патологических признаков при ишемическом повреждении тканей и развитии нейродегенеративных, вирусных и онкологических заболеваний [30]. Описаны несколько случаев псевдонекроптотической гибели с участием MLKL, но не RIPK3, или RIPK3, но не MLKL [19]. Это указывает на многообразие форм, типов, подтипов гибели клеток.

Пироптоз — это литическая форма регулируемой гибели клеток, инициируемая в ответ на молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (РАМР) или повреждениями клеток или внеклеточного матрикса (DAMP), которые запускают сборку инфламмасом (пироптосом). Морфологически пироптоз характеризуется фрагментацией ДНК, имеющей случайный характер, и конденсацией хроматина, несколько отличной от апоптоза [19]. При пироптозе образуются пузырчатые выпячивания мембраны, подобные апоптотическим блеббам и тельцам, и последующий ее разрыв не имеет такого взрывоподобного вида, как при некрозе [10]. Ключевыми молекулами являются связанные с инфламмасомами каспаза-1 или -11/4/5, осуществляющие расщепление и активацию белков семейства гасдерминов (GSDM). В некоторых случаях показано, что для образования пироптосомы необходим выход катепсина В из дестабилизированных лизосом [31]. Каспаза-1 активируется инфламмасомой и инлуширует созревание интерлейкинов IL-1ß и IL-18, с участием каспаз снимается репрессия с цитозольного белка гасдермина GSDMD, который связывается в мембране клетки с фосфатидилинозитолфосфатом и фосфатидилсерином, формируя гасдерминовую пору [32]. Существует также каспаза-3-зависимый путь, где каспаза-3, активируемая химиотерапевтическими препаратами или потерей ДНК, отщепляет N-концевой фрагмент GSDME, что, в свою очередь, опосредует пироптоз в клетках с высокой экспрессией GSDME аналогично GSDMD [10]. Далее происходит разбухание клетки, нарушение барьерной функции плазматической мембраны и гибель с выходом интерлейкинов из клетки, запускающим иммунную реакшию. Первоначально предполагалось, ЧТО пироптоз характерен лишь для моноцитов и макрофагов, однако сейчас установлено, что он может иметь место и в клетках немоноцитарных линий. Этот тип гибели обнаружен при инфекциях, в случаях нейродегенеративных, раковых и аутоиммунных заболеваний [30].

НЕТотическая гибель клеток — литическая клеточная гибель, форма суицида нейтрофилов, вызываемого бактериальным липополисахаридом (ЛПС). При активации нейтрофилов в ответ на чужеродный агент из ЭПР высвобождаются ионы кальция, стимулирующие образование НАДФН-оксидазного комплекса, генерируются активные формы кислорода (АФК), образуются нейтрофильные гранулы, состоящие из антимикробных цитотоксических ферментов, гистонов и деконденсированного хроматина (NET - нейтрофильные внеклеточные ловушки-сети). АФК, продуцируемые митохондриями, также могут запустить этот тип активации нейтрофилов. NET с участием пептидил-аргининдезаминазы 4 вызывают разрушение ядерной мембраны и формирование гасдермин Д-зависимой поры плазматической мембраны, что приводит к гибели клетки. Избыточный НЕТоз встречается при волчанке, сепсисе, ревматоидном артрите и онкологических заболеваниях, таким образом, представляя собой одну из центральных проблем иммунологии [30, 33].

Ферроптоз – зависимая от ионов железа форма регулируемой клеточной гибели, не связанная с активацией каспаз, при этом избыток внешнего

железа не обязателен [34]. Этот тип гибели активируется при ингибировании цистин-глутаматного обменника эрастином, действии бутионин сульфоксимина, снижающего уровень внутриклеточного глутатиона, медицинских препаратов, например, сорафениба и сульфасалазина, и RAS-селективной летальной малой молекулы 3 [35, 36]. Ферроптоз может быть инициирован трансферрином и глутамином при дефиците аминокислот в плазме крови, а также оверэкспрессией трансферринового рецептора TFRC в клетках с мутацией RAS. Он имеет место при гибели раковых клеток, при нейротоксичности, нейродегенеративных заболеваниях, острой почечной недостаточности, лекарственной гепатотоксичности, ишемии/реперфузии печени и сердца и активации Т-клеточного иммунитета [37]. При ферроптозе происходит угнетение синтеза внутриклеточного глутатиона и зависимой от него глутатионпероксидазы 4, что вызывает повреждение всей антиоксилантной зашиты клетки и является главным критерием ферроптоза на молекулярнобиохимическом уровне [34]. Главной морфологической особенностью ферроптоза является сморщивание митохондрий с уплотнением, уменьшением или даже исчезновением крист и разрывом внешней митохондриальной мембраны. Ядро остается нефрагментированным, но хроматин может конденсироваться, и при участии АФК, генерируемых в реакции Фентона, происходит значительное перекисное окисление липидов мембран, в том числе митохондриальных. Отмечаются также признаки UPR (unfolded protein response – ответ на неверно собранные белки) и стресса ЭПР [34]. Хелаторы железа дефероксамин, дексразоксан, 2,2-бипиридил, ингибитор MEK U0126, перехватчики липофильных радикалов и ингибиторы пероксидации липидов, такие как ферростатин-1, липрокстатин-1 или α-токоферол, подавляют этот тип гибели [35, 36]. Ядерный фактор 2-родственный эритроидному фактору (NFE2L2), глутатионпероксидаза 4, белок теплового шока бета-1 также действуют как негативные регуляторы ферроптоза, снижая поглощение клеточного железа, ограничивая выработку АФК и падение уровня глутатиона соответственно [37]. Ингибиторы каспаз, катепсина и кальпаиновых протеаз, некроптоза и аутофагии (z-VAD-fmk, E64d, ALLN, некростатин-1, бафиломицин A1, 3-метиладенин, хлорохин) защитного действия не оказывают. Следует отметить, что есть работы, в которых указывается на ингибирование апоптоза хелаторами железа дефероксамином и фенантролином [38, 39]. Дефероксамин также предотвращает H₂O₂- и артесунат-индуцированную лизосомальную гибель, опосредованную железом, но не являющуюся ферроптозом [35]. Это указывает, что ингибирующее действие хелаторов не является критерием, достаточным для характеризации ферроптоза. В некоторых случаях для ферроптоза требуется экспрессия катепсина В, а его ингибирование (с использованием СА-074Ме) или ингибирование H⁺-АТФазы V-типа (с использованием бафиломицина А1) ограничивало индуцированный эрастином ферроптоз, что дает основание отнести его к лизосомозависимой гибели клеток [40]. Появились данные об участии аутофагической машинерии (ATG3. ATG5. ATG4B, ATG7, ATG13 и BECN1) и накапливании аутофагосом при ферроптозе [10], о запуске ферроптоза ферритинофагией [36], RAB7А-зависимой липофагией, HSP90-ассоциированной шаперон-опосредованной аутофагией, что позволило авторам характеризовать его как зависимую от аутофагии клеточную гибель [41], в противоположность точке зрения NCCD [19]. Таким образом, молекулярные механизмы ферроптоза установлены еще далеко не полностью.

Аутофагическая гибель клеток биохимически связана с липидированием легкой цепи 3 ассоциированного с микротрубочками белка 1 (MAP1LC3, или LC3) и деградацией секвестосомы 1 (SQSTM1, известной как p62). NCCD рекомендует использовать этот термин только для случаев RCD, на которые могут повлиять фармакологические или генетические вмешательства, направленные как минимум на два различных компонента молекулярного механизма аутофагии. Однако все применяемые ингибиторы аутофагии недостаточно избирательны, например, хлорохин может ингибировать не только аутофагию, но и TNFR1-зависимый некроптоз [42], а также экспрессию PARP [43]. Бафиломицин А1 является ингибитором не только V-АТФазы, но и Са²⁺-АТФазы в ЭПР (SERCA), которая является АТФазой Р-типа [44], и может вызвать каспазанезависимый апоптоз через транслокацию AIF из митохондрий в ядро [45]. Широко применяемый 3-метиладенин оказывает независимые от аутофагии эффекты в качестве ингибитора PI3-киназы класса III; все эти эффекты необходимо учитывать при оценке аутофагии [34]. Хотя аутофагия сопровождает RCD в огромном количестве патофизиологических состояний, гибель клеток происходит лишь в некоторых случаях [18].

Аутоз. В 2013 г. авторами работы [46] был описан новый тип клеточной гибели, регулируемый АТG-генами и характеризующийся повышенным уровнем негативного регулятора аутофагии белка Rubicon; это приводит к подавлению созревания и деградации аутофагосом и их чрезмерному накоплению на начальной стадии аутоза. Характерны также фрагментация и вакуолизация ЭПР, умеренная конденсация хроматина и начало образования перинуклеарной вакуоли за счет фокального расширения просвета между внутренней и внешней ядерными мембранами, при-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

чем в этих регионах перинуклеарного набухания содержатся органеллы, в частности, митохондрии. В процессе аутоза происходят также изменения ионного транспорта и набухание органелл, а для его финальной стадии характерно исчезновение всех органелл и образование значительной по размеру фокальной перинуклеарной вакуоли. Большую роль в реализации этого типа гибели играет Na⁺/K⁺-АТФаза, ингибиторы которой способны подавлять аутоз. Отметим, что при аутозе клетки гибнут, будучи распластанными на внеклеточном матриксе [46-48]. In vivo такая форма гибели обнаружена в мозгу крыс в условиях ишемии, при вирусных инфекциях и поражениях печени [30]. Не все клетки способны активировать этот тип гибели: например, при ишемии/реперфузии почек аутоз происходит в почечных перицитах, но не в клетках канальцев или эндотелия [48]. Как отмечается в рекомендациях NCCD (2015 г.), предстоит установить, активируется ли Na⁺/K⁺-АТФаза во всех случаях аутофагии, и при положительном ответе эти два термина будут синонимами. В противном случае аутоз будет являться отдельным случаем клеточной гибели [18]. Большую роль в завершении клеточной гибели, зависимой от аутофагии (в том числе и аутоза), играют лизосомы (стадия образования аутолизосомы), без нормального функционирования которых процесс блокируется.

Энтотическая гибель клеток — это неавтономная клеточная гибель, при которой живая клетка интернализуется соседней клеткой (холтером, или клеткой-хозяином) [49]. Характерной особенностью этого процесса, отличающей его от фагоцитоза, является наличие энтотической вакуоли, вовлечение молекул межклеточной адгезии (Е-кадгерина, катенина) и активное участие в процессе со стороны поглощаемой клетки путем активации ГТФазы RhoA и эффекторных киназ **ROCKI и ROCKII.** Судьба поглощенной клетки, как и клетки-хозяина, варьирует – от гибели до выживания, хотя по статистике 70% поглощенных клеток все же погибают [50]. Таким образом, характерной чертой энтоза является появление структур «клетка-в-клетке», называемых также «bird eye» или «signet ring cells» («глаз птицы» или «перстень с печаткой»). Описаны пять последовательных стадий энтоза [51], показана его зависимость от состояния цитоскелета клетки и аппарата Гольджи, а также активности лизосом; обнаружено также участие в процессе энтоза компонентов аутофагической машинерии ATG5 и ATG7. Как отмечается в литературе, характерные для энтоза структуры широко распространены в опухолевых тканях. Считается, что энтоз может способствовать прогрессированию опухоли, т.к. за счет поглощенных клеток клетки-хозяева получают источник метаболитов и энергии, а поглощенные клетки в случае незавершенного энтоза могут выжить и дать начало рецидиву опухоли. С другой стороны, клеточная гибель в результате завершенного энтоза может быть хорошей (или даже единственной) альтернативой в случае, когда другие типы гибели заблокированы или невозможны по каким-либо причинам. Так, в опухолях поджелудочной железы феномен энтоза является показателем пониженного метастазирования [50]. Инициировать энтоз способных к этому процессу клеток в условиях in vitro может недостаток глюкозы, открепление клеток от матрикса и действие некоторых веществ, например, паклитаксела или производных дисульфирама [49, 52, 53]. Молекулярный механизмы инициации энтоза активно изучается.

Лизосомо-зависимая клеточная гибель (LDCD), согласно рекоменлациям NCCD, связана с разрывом лизосомальной мембраны (LMP, lysosomal membrane permeability) и выходом протеаз (катепсинов) в цитозоль при возможном открывании митохондриальной поры и участии эффекторных каспаз [19]. Эта формулировка показывает, что LDCD недостаточно охарактеризована. Вместе с тем установлено, что биохимический каскад LDCD отличается от аутофагического. Катепсины В и D, наиболее важные гидролазы лизосом, сохраняют свою активность и после выхода в цитозоль при физиологическом значении рН [31, 54] и являются главными исполнителями LDCD. Их ингибирование, стабилизация мембран лизосом за счет изменения содержания холестерина, повышение эндогенной активности белка теплового шока Hsp70 подавляет LDCD [19]. Эта форма гибели имеет место при нейродегенеративных процессах, воспалении, атрофии различных желез, старении, действии АФК. Активация лизосомального пути клеточной гибели происходит и при действии лизосомотропных агентов (сфингозина, кальпаинов, ципрофлоксацина, гидроксихлорохина, метилового эфира L-лейцил-L-лейцина (LLOMe)). LDCD тесно связана с адаптивным ответом на стресс и различными видами RCD [10, 19, 31], но механизмы реализации этих типов отличаются. Так, активация инфламмасомы NLRP3 при пироптозе связана с высвобождением катепсина В в результате разрушения лизосом, но, в отличие от некроптоза, катепсины действуют скорее как инициатор пироптотической гибели клеток, а не как исполнитель [31].

Партанатоз — тип гибели клеток с крупномасштабной фрагментацией ДНК, не зависимый от каспаз и не подавляемый панкаспазными ингибиторами апоптоза (Z-VAD.fmk или BAF), реализующийся без образования апоптотических телец и набухания клетки. При наличии повреждений ДНК поли(АДФ-рибозо)полимераза-1 (PARP-1), участвующая в репарации ДНК, стимулирует выработку поли(АДФ-рибозы) (PAR). При гиперактивации PARP-1, вызванной масштабными повреждениями ДНК, PAR перемещается из ядра в цитозоль, попадает в митохондрии и связывается с AIF (фактором, индуцирующим апоптоз), что вызывает транслокацию последнего в ядро, активацию эндонуклеаз, крупномасштабную фрагментацию ДНК (50 КБ), снижение уровня НАД⁺, повреждение и гибель клеток. Поскольку AIF человека имеет сайт связывания с ДНК, высказывалось предположение, что масштабная фрагментация ДНК является результатом прямого воздействия [55]. Однако по литературным данным у мышей, несмотря на отсутствие такого ДНК-связывающего домена, партанатоз также имеет место [55], поэтому обсуждается возможность нескольких механизмов его реализации. Так, показано, что важную роль в партанатозе играет фактор ингибирования миграции макрофагов, который является главной нуклеазой, связывающейся с AIF и продуцирующей большие фрагменты ДНК, и гексокиназа 1. Обнаружено, что снижение уровня НАД⁺ не является критическим фактором в процессе партанатоза, он может иметь место при достаточном количестве НАД⁺. При этом отсутствие нормальной активности РАКР-1 приводит к отсутствию репарации и стабильности ДНК. Этот тип гибели был обнаружен при гипоксии, окислительном стрессе, воспалении, гипогликемии, при эксайтотоксичности, артрите, колите, гибели β-клеток поджелудочной железы и других патологиях [19, 56]. Специфический ингибитор партанатоза — олапариб [57].

Несмотря на призывы NCCD избегать изобретения и использования неологизмов, за последние несколько лет к списку названий клеточной гибели добавились новые термины, такие как ПАНоптоз, оксеиптоз, алкалиптоз, эребоз, купроптоз, дисульфидптоз, которые отсутствуют в классификации NCCD.

ПАНоптоз (PANoptosis) – форма гибели, объединяющая черты пироптоза (P), апоптоза (A) и некроптоза (N), в которой они влияют друг на друга и регулируют друг друга, причем каждая форма по отдельности не может полностью объять все признаки, характерные для ПАНоптоза [58, 59]. В процессе этого типа гибели, активируемого рецепторами к бактериальным и вирусным белкам, из белков ZBP1 (Z-DNA-связывающий белок 1), RIP3, NLRP3, ASC (апоптоз-ассоциированный Speck-подобный белок, содержащий CARD) и FADD (домен смерти, связанный с Fas), каспазы-1 и каспазы-8 формируется комплекс врожденного иммунитета – ПАНоптосома. Как видно из молекулярного состава, одним из важных компонентов ПАНоптосомы является инфламмасома, активация которой имеет решающее значение для пироптоза и ПАНоптоза. Отмечается, ЧТО ЭТОТ ТИП клеточной гибели

встречается при инфекционных и онкологических заболеваниях, что является стимулом для его дальнейшего исследования.

Оксеиптоз (oxeiptosis) – название, предложенное для каспаза-независимой невоспалительной апоптоз-подобной клеточной гибели, осуществляющейся с активацией сигнального пути KEAP1/PGAM5/AIFM1. KEAP1 (Kelch-подобный ЕСН-ассоциированный белок 1), который окисляется по С-концевым остаткам цистеина зависимым от АФК способом, - хорошо известный сенсор внутриклеточных АФК. Было установлено, что оксеиптоз может быть индуцирован различными стимулами, такими как воздействие озона, Н₂О₂, алкалоидом сангвинарином, природным кумарином аллоимператонином, вирусной инфекцией и наночастицами с 5-фторурацилом [30, 60-62]. Макрофаги вызывают оксеиптоз в клетках мезотелиомы путем ROS-зависимой активации PGAM5, митохондриальной серинтреониновой фосфатазы, которая дефосфорилирует AIFM1 по Ser116 [61]. Это считается главным маркером оксеиптоза [62]. Как известно, активация сигнального пути KEAP1-NFE2L2 (известного также как Nrf2) лежит в основе защитной реакции клетки на окислительный стресс [24]. Одгиперактивированный KEAP1 может нако опосредовать Н₂О₂-индуцированный оксеиптоз независимым от NFE2L2 способом с участием PGAM5. В отличие от AIFM1-опосредованного каспаза-независимого апоптоза и партанатоза, оксеиптоз не требует транслокации AIFM1 из митохондрий в ядро [60, 63]. При оксеиптозе может происходить независимая от каспаз фрагментация ДНК и конденсация хроматина, а также блеббинг плазматической мембраны, как при апоптозе [30, 60, 61]. Выработка АФК происходит при многих патологиях, и известно, что АФК инициируют также другие типы RCD, например, апоптоз, некроптоз, ферроптоз [24, 39, 64]. В чем причина специфичности инициации именно оксеиптоза, пока не установлено, но предполагается, что понимание роли AIFM1, зависящей от местоположения и модификации этого белка, может помочь в этом вопросе [24]. В настоящее время нет ясного понимания оксеиптоза как отдельной формы клеточной гибели.

Алкалиптоз (alkaliptosis) — форма регулируемой гибели (некроза [20]), впервые описанная после применения опиоидного анальгетика JTC801 [20, 24], эффективно уничтожающего опухолевые клетки разных тканей (поджелудочной железы, почек, простаты, кожи и мозга человека). Отмечается, что он может быть инициирован ингибированием зависимой от NF-хВ карбоангидразы 9, играющей роль в регуляции рН-гомеостаза [20, 30]. ACSS2 (acetate-activating enzyme acetyl-CoA) — опосредованная продукция ацетил-коэн-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

зима А и последующее ацетилирование гистонов способствовали NF-хВ-зависимому подавлению СА9 [65]. При алкалиптозе не наблюдаются фрагментация или пикнотизация ядер и значительные морфологические изменения клетки, а время реализации этой гибели составляет 8-24 ч [20]. Защелачивающие агенты также способны вызвать алкалиптоз. Активация ионных каналов и окислительный стресс при алкалиптозе не были выявлены, но летальное защелачивание цитоплазмы клеток (рН около 7.8) имело место [20, 65, 66]. Недавно было обнаружено, что мишенью для JTC801 является D1-субъединица V0-АТФазы клеточных мембран (ATP6V0D1), связанная со STAT3, но не с карбоангидразой 9. ATP6V0D1опосредованное ингибирование STAT3, регулирующего рН-гомеостаз и проницаемость мембран лизосом, способствует алкалиптозу *in vitro*. ATP6V0D1 также опосредует противоопухолевую активность JTC801 in vivo [66]. Известные генетические или фармакологические способы подавления других типов RCD (апоптоза, некроптоза, ферроптоза, аутофагии) не ингибировали эту гибель. Напротив, применение N-ацетилцистеина и N-ацетилаланина, снижающих pH среды, и закисление внешней среды другими способами оказывали защитный эффект [24]. Отметим, что JTC801 вызывал апоптоз в клетках остеосаркомы. Является ли алкалиптоз отдельной формой клеточной гибели или представляет собой разновидность уже известных, еще только предстоит выяснить.

Эребоз (erebosis) впервые описан в 2022 г. [67] как форма физиологической гибели энтероцитов Drosophila без признаков апоптоза, аутофагии или некроза. В процессе этой гибели происходит уплощение ядер и их небольшое увеличение в размере, изменение структуры хроматина, затрудняющее окраску ядерными красителями, а также уменьшение объема цитоплазмы вокруг ядра, уменьшение числа органелл, потеря тубулина и компонента нуклеолей фибрилларина, деградация актина, разрушение цитоскелета и блеббинг клеточной мембраны, каспаза-независимые разрывы и деградация ДНК на поздней стадии эребоза, что приводит к клеточной деградации. Изза потери флуоресценции погибающих клеток, трансфецированных генами GFP и RFP, и слабого окрашивания ядер погибших клеток красителями DAPI или PI этому типу гибели было дано название эребоз («глубокая тьма»). При этом эребозные клетки нетранскрипционным путем накапливают секретируемый клетками-соседями ангиотензин-превращающий фермент, роль которого в эребозе пока не установлена. Количество эребозных клеток в кишечнике сохранялось на постоянном уровне в течение длительного времени, что может свидетельствовать об их важной функции, например, барьерной, подобно корнификации кератиноцитов в коже [67]. В связи с этим авторы предположили, что эребоз участвует в обновлении поверхностных клеток кишечника без иммунных реакций. Молекулярные механизмы эребоза находятся в стадии изучения.

Дисульфидптоз (disulfidptosis), пожалуй, самое новое слово в терминологии, посвященной клеточной гибели [68, 69]. Глюкозное голодание клеток с высокой экспрессией белка SLC7A11 (который также известен как xCT, натрий-независихлорид-зависимый цистин-глутаматный мый антипортер) вызывает истошение НАДФН, образование аберрантных дисульфидных связей в белках цитоскелета, открепление от мембраны и коллапс фибриллярного актина, сморщивание клетки и дальнейшую гибель, имеющую ряд отличий от апоптоза, некроптоза, аутофагии и ферроптоза и не чувствительную к их фармакологическому и генетическому ингибированию [68]. Восстановители, предотвращающие дисульфидный стресс (дитиотреитол, β-меркаптоэтанол), полностью подавляли гибель клеток, вызванную лишением глюкозы на 8–11 ч [68]. Очевидно, что для выделения этого типа гибели в отдельную категорию необходимы дополнительные исследования.

Купроптоз (cuproptosis) — также недавно введенный неологизм для независимой от каспаз гибели клеток, которая индуцируется избыточным уровнем внутриклеточной меди. Это повышение меди может быть вызвано, в частности, оверэкспрессией SLC31A1 (переносчик Cu), нокдауном трансмембранной АТФазы, выводящей медь из клетки (АТР7В), экзогенными ионоформи/хелаторами меди, например, элескломолом или дисульфирамом [21, 70]. Было установлено, что при действии элескломола ферредоксин-1 (FDX1) способствует липоилированию дигидролипоамид-S-ацетилтрансферазы (DLAT), катализирует восстановление меди из комплекса «элескломол-Си²⁺» до Си⁺ и ее высвобождение в митохондриях, что индуцирует зависимую OT дисульфидных связей и ионов Cu⁺ агрегацию липоилированной DLAT [21, 70]. Это вызывает снижение растворимости DLAT и в дальнейшем приводит к митохондриальному протеотоксическому стрессу, повышению генерации митохондриальных АФК. потере Fe-S кластерных белков и гибели клеток [30, 70]. При этом типе гибели не выявлены морфологические изменения ядра, вакуолизация цитоплазмы, а известные ингибиторы апоптоза, АФК-вызванной гибели, некроптоза или ферроптоза не подавляли купроптоз [21]. Элескломол, применяемый для лечения рака, вызывал купроптоз лишь в присутствии ионов меди, и это позволяет предположить, что гибель клеток была вызвана токсичностью меди. Купроптоз встречается при болезни Вильсона-Коновалова в

клетках печени, мозга и других органов. Токсичность меди была хорошо известна и раньше, однако механизмы, лежащие в ее основе, до сих пор являются предметом дискуссий. Так, ранее в ряде работ был сделан вывод о том, что повышенный уровень меди вызывает апоптоз [70-72]. Учитывая современное развитие классификации форм клеточной гибели, можно предположить, что не во всех этих случаях гибель осуществлялась по классическом апоптотическому пути или же что при этом апоптоз не являлся единственной формой гибели. Например, было обнаружено, что в присутствии дитиокарбаматов (дисульфирама и других) транспорт меди в клетку увеличивается, в несколько раз повышается ее внутриклеточный уровень, начинается генерация АФК, ингибируется активность 20S-протеасомы, что в итоге ведет к дальнейшей гибели клеток, как предполагалось, по типу апоптоза, и именно токсичность внутриклеточной меди является причиной этого эффекта. Однако доказательством наличия апоптоза здесь служила только активация PARP и морфология клеточных ядер [71] или экстернализация фосфатилилсерина [72]. В свете современных представлений наличие апоптоза здесь уже не представляется однозначным (например, экстернализация фосфатидилсерина и конденсация хроматина имеют место не только при апоптозе [17], активация PARP происходит при партанатозе, и говорить об апоптозе в этом случае можно было только как о противоположности некрозу, что, очевидно, и было сделано авторами). Этот же вывод о неапоптотическом характере гибели в присутствии избытка меди сделан в работе [70] и относительно более современных публикациях 2019-2022 гг. В то же время авторы работы [73] показали, что повышение уровня меди в клетке в результате действия ионофоров меди (в том числе дисульфирама) ингибировало каспазу-3 и индуцировало развитие параптозоподобной гибели. Это еще раз подчеркивает необходимость более тщательного подхода к вопросу классификации клеточной гибели. Таким образом, вышеперечисленные новые формы гибели еще недостаточно охарактеризованы. Будут ли они признаны в дальнейшем, покажет время, однако очевидно, что Комитету по классификации клеточной гибели еще предстоит большая работа по оценке обоснованности их выделения в отдельную категорию.

ПАРАПТОЗ И ПАРАПТОЗОПОДОБНАЯ КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ

Параптоз — форма клеточной гибели, вызываемая стрессом ЭПР, сопровождающимся накоплением в нем поврежденных или неправильно свернутых белков, обширной неаутофагической вакуолизацией цистерн ЭПР и, в ряде случаев,

митохондрий с последующими повреждениями митохондрий, цитоскелета и гибелью клеток. Название этой формы гибели означает «рядом с апоптозом». В 2009 г. параптоз был включен в список типов RCD [16]. Согласно последующим рекомендациям NCCD, он не указан в числе типов клеточной гибели с четко установленным молекулярным механизмом [17], однако морфология и некоторые биохимические особенности заставляют рассматривать его как отдельный тип RCD. Начиная с 2000 г. накоплено много информации о параптозе или параптозоподобной клеточной гибели, отличающейся от других известных форм раздуванием цистерн ЭПР и, в ряде случаев, митохондрий, для которой не характерно участие аутофагической машинерии (накопление аутофагосом и аутолизосом), активация каспаз 3/7, блеббинг клеточной мембраны, фрагментация ДНК и ядра и распад клетки на апоптотические тельца. Индукторами параптоза могут быть ультрафиолетовое облучение и радиация [6, 74], а также разнообразные природные субстанции и медицинские препараты: целастрол [75-77], йессотоксин [78, 79], сапонин гинзенозид Rh2 [80], хонокиол, токотриенол [8, 81-83]), куркумин и его производные [76, 77], простагландин J2 [84], лектины (агглютинин зародышей пшеницы [85]), ксантоноиды [86], ксантохумол [87], офиоболин А [88], лоперамид[89], литохолевая кислота [90], каннабиоиды [91], таксол [92], туникамицин [93], разработанный для лечения глиобластомы препарат озимертиниб [94], произодные пиразоло[3,4-h]хинолина [95], ионофоры, хелаторы меди и металлокомплексы [73, 96, 97], дитиокарбаматы и их производные [5, 98, 99] и многие другие, подробный перечень которых представлен в недавно вышедших обзорах [10, 14, 100, 101]. Впервые параптоз был обнаружен при оверэкспрессии рецепторов IGF1R в опухолевых и нормальных клетках [102, 103]. В настоящее время установлено, что гиперактивация рецепторов TAJ/TROY/TNFRSF19, EGF, 1-нитропирена, нейрокинина-1, ваниллоидного рецептора подтипа 1 (TRPV1) также инициирует этот тип гибели [14, 104]. Как известно, ЭПР, являющийся основным местом синтеза и созревания клеточного белка, высокочувствителен к падению энергизованности клетки, изменениям уровня внутриклеточного Са²⁺ и редокс-баланса. Установлено, что дисбаланс в процессах синтеза и созревания белков вызывает стресс ЭПР и играет главную роль в инициации параптоза [14, 100]. Такой дисбаланс может быть вызван ингибированием сериновых протеаз и других факторов протеостаза под действием модуляторов дисульфидных связей, нарушениями работы протеасомальной системы клетки, генерацией АФК и общими нарушения тиольного клеточного гомеостаза [4, 5, 14, 76, 77, 82, 84, 86, 89, 95, 96, 98-100, 105-108]. Это приво-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

дит к накапливанию неверно собранных белков в ЭПР, в ответ на которое в клетке разворачивается UPR – цепь событий, призванных минимизировать последствия этих повреждений белков. При неспособности справиться с увеличивающимся количеством незрелого белка через механизм ERAD (механизм удаления несовершенного белка из ЭПР через убиквитинирование для дальнейшего расщепления протеасомой) в ЭПР развивается осмотический шок, и его везикулы напоступления бухают вследствие воды ИЗ цитоплазмы [4, 76, 99, 109], в результате чего возрастает плотность цитозоля и ядра, происходят нерегулярные разрывы ДНК, повреждаются и сам ЭПР, и митохондрии, и цитоскелет, в конечном счете клетка погибает. В процессах UPR и ERAD участвует множество белков, переносчиков и регуляторов, их повреждение на любом этапе может привести к остановке всего процесса удаления незрелого белка. Так, ингибирование SH-групп белков под действием производных дисульфирама ингибирует каспазы [73, 110] и многие другие ферменты клетки, а ингибирование деубиквитиназ препятствует расщеплению дефектных убиквитинированных белков протеасомой и приводит к развитию стресса ЭПР и параптозу клеток [98, 99]. Стресс ЭПР может быть также следствием нарушения ионного клеточного гомеостаза. Например, параптоз происходит при активации хлоридного внутриклеточного канала-1 CLIC1 [111], высокопроводимых Са-зависимых К⁺-каналов [105, 112], а также при их ингибировании офиоболином А [88]. Как правило, при параптозе имеет место активация семейства митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) [9, 14, 82, 103, 104]. Известно, что эти сигнальные каскады участвуют в программах выживания и пролиферации клеток. Однако было установлено, что одна из киназ этого семейства ERK-2 фосфорилирует каспазу-9 по Thr125, что ингибирует апоптоз и, вероятно, является способом переключить гибель на путь параптоза [103, 113]. Взаимодействие JNК-1 с МАРК может быть еще одним таким способом [103]. Отметим, что не для всех клеток характерно участие каспазы-9 в параптозе, например, ее расщепление при применении YRL1091 (производного пиразоло[3,4h]хинолина) обнаружено в клетках MDA-MB-231, но не в МСЕ-7 [95]. Таким образом, ее процессинг не обязателен для параптоза [14]. Для параптоза характерно высвобождение Са из ЭПР через IP3- или рианодиновые рецепторы, что может приводить к его входу в митохондрии через митохондриальнй Са-унипортер с их последующей вакуолизацией [14, 108, 114, 115], повреждению митохондрий и генерации АФК [14, 116]. Обсуждается роль MAMS (мембран, связанных с митохондриями) в этом процессе [14, 114, 116]. Ингибитором параптоза является многофункциональный адаптерный белок AIP-1/Alix, препятствующий фосфорилированию МАРК [14, 30, 103]. Его ингибирование, вызванное YRL1091, приводит к инициации параптозной гибели в клетках MDA-MB-231 и MCF-7 [95]. Несмотря на общие черты, присущие гибели клеток в вышеуказанных случаях, в зависимости от стимула и типа клеток имеется и ряд различий. Например, авторы работы [92] показали, что таксол в высоких дозах вызывает параптоз, независимый от MEK, JNK и Р38. Обнаружены активация в параптозоподобной гибели сигнального пути PI3K/AKT/mTOR [74, 82, 109] и связанный с mTOR независимый от аутофагии процессинг LC3В при параптозе, необходимый для образования цитоплазматических вакуолей [9, 82, 95, 109, 117]. При параптозе в некоторых случаях наблюдается ингибирование аутофагии через повреждение лизосомальных функций [9, 98, 109], хотя описана и активация протективной аутофагии [85, 118]; очевидно, ингибирование аутофагии может иметь место и после первоначальной ее активации при истощении ресурсов клетки [109]. При ингибировании валозин-содержащего белка VCP/p97, участника ERAD, транскрипционный фактор ATF4 усиливает параптоз через DDIT4 damage-inducible (DNA transcript 4) и mTORC2/Akt сигнальный путь [119]. Образование вакуолей из митохондрий также не является строго обязательной чертой параптоза, который во многих случаях происходит только с вакуолизацией ЭПР [74, 81, 82, 84, 87, 92, 98, 106, 109]. Некоторые авторы предполагают, что это может быть связано с необходимостью активизации ERK2 и JNK для вакуолизации ЭПР, тогда как разбухание митохондрий связано только с активностью ERK2 [120]. Генерация АФК также не всегда имеет место при параптозе [4, 96, 98, 106], но внешний окислительный стресс способен инициировать параптоз. Авторы работы [105] обнаружили, что гибель клеток глиомы mM-CSF T9, подкожно привитых мышам, запускалась по параптозоподобному пути под действием АФК, генерируемых нейтрофилами, и в этом случае параптоз сопровождался оверэкспрессией белков теплового шока. Вследствие такого разнообразия сигнальных путей клеточную гибель, связанную с вакуолизацией ЭПР, стали называть параптозоподобной (PLCD). В ряде работ отмечается, что некоторые агенты могут инициировать и параптоз, и другие формы клеточной гибели в зависимости от условий воздействия. Так, хонокиол, гинзенозид Rh2, производные дисульфирама и усниновой кислоты, фотодинамическая терапия в зависимости от условий и типа клеток способны вызвать клеточную гибель путем и параптоза и апоптоза [14, 80, 81, 115], аутофагии, параптоза, и апоптоза [6, 75, 121] или параптоза и энтоза [53]. Возможно, это связано с тем фактом, что чув-

ствительность клеток к ряду веществ может меняться в зависимости от фазы клеточного цикла и связанной с этим различной активностью метаболических путей. Важность изучения параптоза подчеркивается тем, что он происходит в процессе развития, при нейродегенерации, различных заболеваниях – при вирусных инфекциях, глаукоме [11, 12, 14]. На ксенографтах мышей in vivo показана инициация параптозной гибели при действии множества природных субстанций и металлокомплексов [10, 14, 115]. Потенциальная значимость параптоза в онкотерапии обнаружена авторами работы [13]. У мышей с меланомой при ингибировании PERK запускался SEC61β-индуцированный параптоз, что вело к активации противоопухолевого Т-клеточного иммунитета и вызывало иммуногенную клеточную гибель, благодаря чему рост опухоли ослаблялся. Способ запуска параптоза через гиперактивный Akt, который ингибирует отвечающий за протеостаз VCP и противодействует апоптозу, вызванному химиотерапией, представляет собой один из возможных терапевтических путей для использования связанных с Akt vязвимостей в раковых клетках [119]. Обнаружено, что в клетках трижды негативного рака молочной железы (с отрицательными результатами иммуногистохимии для статуса рецептора эстрогена, рецептора прогестерона и статуса рецептора HER2) высокая экспрессия TNFRSF19 коррелирует с повышенной выживаемостью, и показано, что TNFRSF19 через МАРК-сигнальный путь вызывает в этих клетках гибель путем параптоза [104]. Выше уже указывались природные соединения с противоопухолевой активностью, вызывающие клеточную гибель именно путем параптоза – хонокиол, куркумин и т.д. [76, 77], что может быть использовано в таргетной терапии [30]. Есть все основания полагать, что эта форма гибели будет четко охарактеризована и принята в классификацию NCCD.

Представленные в обзоре данные свидетельствуют о продолжении на сегодняшний день работы по систематизации форм клеточной гибели, об их разнообразии. При всем многообразии этих форм можно выделить две группы типов клеточной гибели: нерегулируемая, или, как ее еще называют, случайная (accidental), и регулируемая. В ходе нерегулируемой гибели нарушение избирательной проницаемости плазматической мембраны осуществляется столь быстро, что не успевают запуститься программы, минимизирующие повреждающее действие внутриклеточных компонент погибшей клетки на соседние клетки и ткани. При регулируемой клеточной гибели, которая вызывается более слабыми повреждающими воздействиями, в клетке запускается программа минимизации повреждающего действия погибающей клетки на ее окружение. Разнообразие на-

блюдаемых форм клеточной гибели указывает, что таких программ много, и фармакологическое или генетическое ингибирование одной программы переключает гибель на лругой тип [22, 42]. Например, производные дисульфирама ингибируют апоптоз, но инициируют параптоз [98]. Более того, изменение повреждающего воздействия во время инишиации клеточной гибели может изменить тип клеточной гибели. Так, постоянная инкубация клеток молочной железы человека МСГ-7 с окисленными производными дисульфирама вызывает у них параптозоподобную гибель, а удаление этих производных во время инициации клеточной гибели этим агентом переключает параптоз на энтоз [53]. Учитывая тот факт, что все формы клеточной гибели реализуются в общей системе внутриклеточной сигнализации, вполне естественным выглядит предположение о возможности одновременной реализации разных путей гибели в клетке, хотя зачастую преобладает один из них. Это предположение подтверждается тем, что предлагается такая форма клеточной гибели, как ПАНотоз, включающая признаки пироптоза, апоптоза и некроптоза [58, 59]. На возможность одновременной реализации разных форм клеточной гибели указывает и тот факт, что при действии пероксида водорода в клетках одновременно проявляется апоптоз и, по-видимому, ферроптоз [39], а кумарин с противоопухолевой активностью (аллоимператонин) вызывает в клетках опухоли молочной железы апоптоз, ферроптоз и оксеиптоз, ингибируя их рост и инвазию [62]. Гибель миокардиоцитов при повреждении митохондрий может осуществляться несколькими путями (апоптоз, аутофагия, ферроптоз, некроптоз, МРТ-некроз, пироптоз и аутоз) [34]. Такая возможность вызывает вопросы о целесообразности олнозначной классификации типов клеточной гибели. Остается непонятным, сколько и какие сочетания клеточной гибели могут реализовываться в клетках одновременно. Это вполне согласуется с предложениями не делить регулируемую клеточную гибель на формы, типы и подтипы, а указывать как RCD с определенными морфологическими и молекулярными признаками [15, 16]. Однако этих признаков может быть много, и выходом может быть использование небольшого количества базовых блоков, признаков, например, апоптозоподобные, параптозоподобные, некропозоподобные, лизосомозависимые и т.п. Такой принцип классификации также остается пока недостаточно ясным. Все это свидетельствует о необходимости продолжения систематизации представления о формах клеточной гибели, их молекулярных механизмах. Это направление исследований имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение для медицины.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проводилось с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (http://ckp-rf.ru/ckp/3037/).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-00224-24-01 на 2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Majno G. and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, **146** (1), 3–15 (1995).
- Levin S., Bucci T. J., Cohen S. M., Fix A. S., Hardisty J. F., LeGrand E. K., Maronpot R. R., and Trump B. F. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol. Pathol.*, 27 (4), 484– 490 (1999). DOI: 10.1177/019262339902700419
- Lee D., Kim I. Y., Saha S. and Choi K. S. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. *Pharmacol. Therapeut.*, **162**, 120–133 (2016). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.003
- Shubin A. V., Demidyuk I. V., Komissarov A. A., Rafieva L. M. and Kostrov S. V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, 7 (34), 55863–55889 (2016). DOI: 10.18632/oncotarget.10150
- Park S. S., Lee D. M., Lim J. H., Lee D., Park S. J., Kim H. M., Sohn S., Yoon G., Eom Y. W., Jeong S. Y., Choi E. K., and Choi K. S. Pyrrolidine dithiocarbamate reverses Bcl-xL-mediated apoptotic resistance to doxorubicin by inducing paraptosis. *Carcinogenesis*, **39** (3), 458–470 (2018). DOI: 10.1093/carcin/bgy003
- Kessel D. Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.*, **95** (1), 119–125 (2019). DOI: 10.1111/php.12952
- Fontana F., Raimondi M., Marzagalli M., Di Domizio A., and Limonta P. The emerging role of paraptosis in tumor cell biology: Perspectives for cancer prevention and therapy with natural compounds. *Biochim.*
Biophys. Acta. Rev. Cancer, **1873** (2), 188338 (2020). DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188338

- Raimondi M., Fontana F., Marzagalli M., Audano M., Beretta G., Procacci P., Sartori P., Mitro N., and Limonta P. Ca(2+) overload- and ROS-associated mitochondrial dysfunction contributes to δ-tocotrienolmediated paraptosis in melanoma cells. *Apoptosis*, 26 (5–6), 277–292 (2021). DOI: 10.1007/s10495-021-01668-y
- Li G.-N., Zhao X.-J., Wang Z., Luo M.-S., Shi S.-N., Yan D.-M., Li H.-Y., Liu J.-H., Yang Y., Tan J.-H., Zhang Z.-Y., Chen R.-Q., Lai H.-L., Huang X.-Y., Zhou J.-F., Ma D., Fang Y., and Gao Q.-L. Elaiophylin triggers paraptosis and preferentially kills ovarian cancer drug-resistant cells by inducing MAPK hyperactivation. *Signal Transduc. Target. Ther.*, 7 (1), 317 (2022). DOI: 10.1038/s41392-022-01131-7
- Wang X., Hua P., He C., and Chen M. Non-apoptotic cell death-based cancer therapy: Molecular mechanism, pharmacological modulators, and nanomedicine. *Acta Pharm. Sin. B*, **12** (9), 3567–3593 (2022). DOI: 10.1016/j.apsb.2022.03.020
- Monel B., Compton A. A., Bruel T., Amraoui S., Burlaud-Gaillard J., Roy N., Guivel-Benhassine F., Porrot F., Génin P., Meertens L., Sinigaglia L., Jouvenet N., Weil R., Casartelli N., Demangel C., Simon-Lorière E., Moris A., Roingeard P., Amara A., and Schwartz O. Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *EMBO J.*, **36** (12), 1653–1668 (2017). DOI: 10.15252/embj.201695597
- Huang X., Huang Y., Yang Y., Wei S., and Qin Q. Involvement of fish signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in SGIV replication and virus induced paraptosis. *Fish Shellfish Immunol.*, **41** (2), 308–316 (2014). DOI: 10.1016/j.fsi.2014.09.011
- Mandula J. K., Chang S., Mohamed E., Jimenez R., Sierra-Mondragon R. A., Chang D. C., Obermayer A. N., Moran-Segura C. M., Das S., Vazquez-Martinez J. A., Prieto K., Chen A., Smalley K. S. M., Czerniecki B., Forsyth P., Koya R. C., Ruffell B., Cubillos-Ruiz J. R., Munn D. H., Shaw T. I., Conejo-Garcia J. R., and Rodriguez P. C. Ablation of the endoplasmic reticulum stress kinase PERK induces paraptosis and type I interferon to promote anti-tumor T cell responses. *Cancer Cell*, **40** (10), 1145–1160.e1149 (2022). DOI: 10.1016/j.ccell.2022.08.016
- Hanson S., Dharan A., P V. J., Pal S., Nair B. G., Kar R., and Mishra N. Paraptosis: a unique cell death mode for targeting cancer. *Front. Pharmacol.*, 14, 1159409 (2023). DOI: 10.3389/fphar.2023.1159409
- Kroemer G., El-Deiry W. S., Golstein P., Peter M. E., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M. V., Malorni W., Knight R. A., Piacentini M., Nagata S., and Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.*, **12** (Suppl. 2), 1463–1467 (2005). DOI: 10.1038/sj.cdd.4401724

- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., El-Deiry W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner M., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Malorni W., Nuñez G., Peter M. E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., and Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.*, 16 (1), 3–11 (2009). DOI: 10.1038/cdd.2008.150
- Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. M., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., Dawson T. M., Dawson V. L., El-Deiry W. S., Fulda S., Gottlieb E., Green D. R., Hengartner M. O., Kepp O., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M. E., Piacentini M., Rubinsztein D. C., Shi Y., Simon H. U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., and Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, **19** (1), 107–120 (2012). DOI: 10.1038/cdd.2011.96
- 18. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J. M., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Alnemri E. S., Altucci L., Andrews D., Annicchiarico-Petruzzelli M., Baehrecke E. H., Bazan N. G., Bertrand M. J., Bianchi K., Blagosklonny M. V., Blomgren K., Borner C., Bredesen D. E., Brenner C., Campanella M., Candi E., Cecconi F., Chan F. K., Chandel N. S., Cheng E. H., Chipuk J. E., Cidlowski J. A., Ciechanover A., Dawson T. M., Dawson V. L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K. M., Di Daniele N., Dixit V. M., Dynlacht B. D., El-Deiry W. S., Fimia G. M., Flavell R. A., Fulda S., Garrido C., Gougeon M. L., Green D. R., Gronemeyer H., Hajnoczky G., Hardwick J. M., Hengartner M. O., Ichijo H., Joseph B., Jost P. J., Kaufmann T., Kepp O., Klionsky D. J., Knight R. A., Kumar S., Lemasters J. J., Levine B., Linkermann A., Lipton S. A., Lockshin R. A., López-Otín C., Lugli E., Madeo F., Malorni W., Marine J. C., Martin S. J., Martinou J. C., Medema J. P., Meier P., Melino S., Mizushima N., Moll U., Muñoz-Pinedo C., Nuñez G., Oberst A., Panaretakis T., Penninger J. M., Peter M. E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J. H., Puthalakath H., Rabinovich G. A., Ravichandran K. S., Rizzuto R., Rodrigues C. M., Rubinsztein D. C., Rudel T., Shi Y., Simon H. U., Stockwell B. R., Szabadkai G., Tait S. W., Tang H. L., Tavernarakis N., Tsujimoto Y., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Villunger A., Wagner E. F., Walczak H., White E., Wood W. G., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Melino G., and Kroemer G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. Cell Death Differ., 22 (1), 58–73 (2015). DOI: 10.1038/cdd.2014.137
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E. S., Altucci L., Amelio I., Andrews D. W., Annicchiarico-Petruzzelli M.,

Antonov A. V., Arama E., Baehrecke E. H., Barlev N. A., Bazan N. G., Bernassola F.. Bertrand M. J. M., Bianchi K., Blagosklonny M. V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F. K., Chandel N. S., Cheng E. H., Chipuk J. E., Cidlowski J. A., Ciechanover A., Cohen G. M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J. R., Czabotar P. E., D'Angiolella V., Dawson T. M., De Laurenzi V., De Maria R., Dawson V. L., Debatin K. M., DeBerardinis R. J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V. M., Dixon S. J., Duckett C. S., Dynlacht B. D., El-Deiry W. S., Elrod J. W., Fimia G. M., Fulda S., García-Sáez A. J., Garg A. D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D. R., Greene L. A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J. M., Harris I. S., Hengartner M. O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P. J., Juin P. P., Kaiser W. J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R. N., Klionsky D. J., Knight R. A., Kumar S., Lee S. W., Lemasters J. J., Levine B., Linkermann A., Lipton S. A., Lockshin R. A., López-Otín C., Lowe S. W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J. C., Martin S. J., Martinou J. C., Medema J. P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E. A., Molkentin J. D., Moll U. M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J. M., Pereira D. M., Pervaiz S., Peter M. E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J. H. M., Puthalakath H., Rabinovich G. A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C. M. P., Rubinsztein D. C., Rudel T., Ryan K. M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H. U., Sistigu A., Stockwell B. R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S. W. G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander Heiden M. G., Villunger A., Virgin H. W., Vousden K. H., Vucic D., Wagner E. F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J. A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotov-sky B., Zitvogel L., Melino G., and Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ., 25 (3), 486-541 (2018).

DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4

- Song X., Zhu S., Xie Y., Liu J., Sun L., Zeng D., Wang P., Ma X., Kroemer G., Bartlett D. L., Billiar T. R., Lotze M. T., Zeh H. J., Kang R., and Tang D. JTC801 Induces pH-dependent Death Specifically in Cancer Cells and Slows Growth of Tumors in Mice. *Gastroenterology*, **154** (5), 1480–1493 (2018). DOI: 10.1053/j.gastro.2017.12.004
- Tsvetkov P. and Coy S. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science*, 375 (6586), 1254–1261 (2022). DOI: 10.1126/science.abf0529

22. Vitale I., Pietrocola F., Guilbaud E., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostini M., Agostinis P., Alnemri E. S., Altucci L., Amelio I., Andrews D. W., Ageilan R. I., Arama E., Baehrecke E. H., Balachandran S., Bano D., Barlev N. A., Bartek J., Bazan N. G., Becker C., Bernassola F., Bertrand M. J. M., Bianchi M. E., Blagosklonny M. V., Blander J. M., Blandino G., Blomgren K., Borner C., Bortner C. D., Bove P., Boya P., Brenner C., Broz P., Brunner T., Damgaard R. B., Calin G. A., Campanella M., Candi E., Carbone M., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F. K. M., Chen G.-Q., Chen Q., Chen Y. H., Cheng E. H., Chipuk J. E., Cidlowski J. A., Ciechanover A., Ciliberto G., Conrad M., Cubillos-Ruiz J. R., Czabotar P. E., D'Angiolella V., Daugaard M., Dawson T. M., Dawson V. L., De Maria R., De Strooper B., Debatin K.-M., Deberardinis R. J., Degterev A., Del Sal G., Deshmukh M., Di Virgilio F., Diederich M., Dixon S. J., Dynlacht B. D., El-Deiry W. S., Elrod J. W., Engeland K., Fimia G. M., Galassi C., Ganini C., Garcia-Saez A. J., Garg A. D., Garrido C., Gavathiotis E., Gerlic M., Ghosh S., Green D. R., Greene L. A., Gronemeyer H., Häcker G., Hajnóczky G., Hardwick J. M., Haupt Y., He S., Heery D. M., Hengartner M. O., Hetz C., Hildeman D. A., Ichijo H., Inoue S., Jäättelä M., Janic A., Joseph B., Jost P. J., Kanneganti T.-D., Karin M., Kashkar H., Kaufmann T., Kelly G. L., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R. N., Klionsky D. J., Kluck R., Krysko D. V., Kulms D., Kumar S., Lavandero S., Lavrik I. N., Lemasters J. J., Liccardi G., Linkermann A., Lipton S. A., Lockshin R. A., López-Otín C., Luedde T., MacFarlane M., Madeo F., Malorni W., Manic G., Mantovani R., Marchi S., Marine J.-C., Martin S. J., Martinou J.-C., Mastroberardino P. G., Medema J. P., Mehlen P., Meier P., Melino G., Melino S., Miao E. A., Moll U. M., Muñoz-Pinedo C., Murphy D. J., Niklison-Chirou M. V., Novelli F., Núñez G., Oberst A., Ofengeim D., Opferman J. T., Oren M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J. M., Pentimalli F., Pereira D. M., Pervaiz S., Peter M. E., Pinton P., Porta G., Prehn J. H. M., Puthalakath H., Rabinovich G. A., Rajalingam K., Ravichandran K. S., Rehm M., Ricci J.-E., Rizzuto R., Robinson N.. Rodrigues C. M. P., Rotblat B., Rothlin C. V., Rubinsztein D. C., Rudel T., Rufini A., Ryan K. M., Sarosiek K. A., Sawa A., Sayan E., Schroder K., Scorrano L., Sesti F., Shao F., Shi Y., Sica G. S., Silke J., Simon H.-U., Sistigu A., Stephanou A., Stockwell B. R., Strapazzon F., Strasser A., Sun L., Sun E., Sun Q., Szabadkai G., Tait S. W. G., Tang D., Tavernarakis N., Troy C. M., Turk B., Urbano N., Vandenabeele P., Vanden Berghe T., Vander Heiden M. G., Vanderluit J. L., Verkhratsky A., Villunger A., von Karstedt S., Voss A. K., Vousden K. H., Vucic D., Vuri D., Wagner E. F., Walczak H., Wallach D., Wang R., Wang Y., Weber A., Wood W., Yamazaki T., Yang H.-T., Zakeri Z., Zawacka-Pankau J. E., Zhang L., Zhang H., Zhivotovsky B., Zhou W., Pia-

centini M., Kroemer G., and Galluzzi L. Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death Differ.*, **30** (5), 1097–1154 (2023). DOI: 10.1038/s41418-023-01153-w

- Liu X., Yang W., Guan Z., Yu W., Fan B., Xu N., and Liao D. J. There are only four basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations. *Cell Biosci.*, 8 (1), 6 (2018). DOI: 10.1186/s13578-018-0206-6
- Tang D., Kang R., Berghe T. V., Vandenabeele P., and Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.*, **29** (5), 347–364 (2019). DOI: 10.1038/s41422-019-0164-5
- Yuan J. and Ofengeim D. A guide to cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2023). DOI: 10.1038/s41580-023-00689-6
- Maltese W. A. and Overmeyer J. H. Methuosis: nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *Am. J. Pathol.*, **184** (6), 1630–1642 (2014). DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.02.028
- Sauler M., Bazan I. S., and Lee P. J. Cell Death in the Lung: The Apoptosis-necroptosis axis. *Ann. Rev. Physiol.*, **81**, 375-402 (2019).
 DOI: 10.1146/annurev-physiol-020518-114320
- Galluzzi L., Kepp O., and Kroemer G. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microb. cell*, 3 (3), 101–108 (2016). DOI: 10.15698/mic2016.03.483
- Yashin D. V., Romanova E. A., Ivanova O. K., and Sashchenko L. P. The Tag7-Hsp70 cytotoxic complex induces tumor cell necroptosis via permeabilisation of lysosomes and mitochondria. *Biochimie*, **123**, 32–36 (2016). DOI: 10.1016/j.biochi.2016.01.007
- Park W., Wei S., Kim B.-S., Kim B., Bae S.-J., Chae Y. C., Ryu D., and Ha K.-T. Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Exp. Mol. Med.*, 55 (8), 1573–1594 (2023). DOI: 10.1038/s12276-023-01078-x
- Alu A., Han X., Ma X., Wu M., Wei Y., and Wei X. The role of lysosome in regulated necrosis. *Acta Pharm. Sin. B*, **10** (10), 1880–1903 (2020). DOI: 10.1016/j.apsb.2020.07.003
- Liu X., Zhang Z., Ruan J., Pan Y., Magupalli V. G., Wu H., and Lieberman J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535 (7610), 153–158 (2016). DOI: 10.1038/nature18629
- Vorobjeva N. V. and Chernyak B. V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Moscow)*, 85 (10), 1178–1190 (2020). DOI: 10.1134/s0006297920100065
- 34. Mishra P. K., Adameova A., Hill J. A., Baines C. P., Kang P. M., Downey J. M., Narula J., Takahashi M., Abbate A., Piristine H. C., Kar S., Su S., Higa J. K., Kawasaki N. K., and Matsui T. Guidelines for evaluating myocardial cell death. *Am. J. Physiol. Heart Circ.*

Physiol., **317** (5), H891–h922 (2019). DOI: 10.1152/ajpheart.00259.2019

 Scott J., Lemberg Kathryn M., Lamprecht Michael R., Skouta R., Zaitsev E. M., Gleason C. E., Patel D. N., Bauer A. J., Cantley A. M., Yang W. S., Morrison B., and Stockwell B. R. Ferroptosis: An Iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, **149** (5), 1060– 1072 (2012).

DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042

- Grignano E., Birsen R., Chapuis N., and Bouscary D. From Iron chelation to overload as a therapeutic strategy to induce ferroptosis in leukemic cells. *Front. Oncol.*, 10, 586530 (2020). DOI: 10.3389/fonc.2020.586530
- Xie Y., Hou W., Song X., Yu Y., Huang J., Sun X., Kang R., and Tang D. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ.*, 23 (3), 369–379 (2016). DOI: 10.1038/cdd.2015.158
- Moon J. H., Jeong J. K., and Park S. Y. Deferoxamine inhibits TRAIL-mediated apoptosis via regulation of autophagy in human colon cancer cells. *Oncol. Rep.*, 33 (3), 1171–1176 (2015). DOI: 10.3892/or.2014.3676
- Solovieva M. E., Solovyev V. V., Kudryavtsev A. A., Trizna Y. A., and Akatov V. S. Vitamin B12b enhances the cytotoxicity of dithiothreitol. *Free Rad. Biol. Med.*, 44 (10), 1846–1856 (2008). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.002
- Gao H., Bai Y., Jia Y., Zhao Y., Kang R., Tang D., and Dai E. Ferroptosis is a lysosomal cell death process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503** (3), 1550–1556 (2018). DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.078
- Zhou B., Liu J., Kang R., Klionsky D. J., Kroemer G., and Tang D. Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death. *Semin. Cancer Biol.*, 66, 89–100 (2020). DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.03.002
- Yashin D. V., Ivanova O. K., Soshnikova N. V., Sheludchenkov A. A., Romanova E. A., Dukhanina E. A., Tonevitsky A. G., Gnuchev N. V., Gabibov A. G., Georgiev G. P., and Sashchenko L. P. Tag7 (PGLYRP1) in complex with Hsp70 induces alternative cytotoxic processes in tumor cells via TNFR1 receptor. *J. Biol. Chem.*, **290** (35), 21724–21731 (2015). DOI: 10.1074/jbc.M115.639732
- Eloranta K., Cairo S., Liljeström E., Soini T., Kyrönlahti A., Judde J. G., Wilson D. B., Heikinheimo M., and Pihlajoki M. Chloroquine triggers cell death and inhibits PARPs in cell models of aggressive hepatoblastoma. *Front. Oncol.*, **10**, 1138 (2020). DOI: 10.3389/fonc.2020.01138
- Mauvezin C., Nagy P., Juhász G., and Neufeld T. P. Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat. Commun.*, 6, 7007 (2015). DOI: 10.1038/ncomms8007
- 45. Yuan N., Song L., Zhang S., Lin W., Cao Y., Xu F., Fang Y., Wang Z., Zhang H., Li X., Wang Z., Cai J., Wang J., Zhang Y., Mao X., Zhao W., Hu S., Chen S., and Wang J. Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lym-

phoblastic leukemia. *Haematologica*, **100** (3), 345–356 (2015). DOI: 10.3324/haematol.2014.113324

- 46. Liu Y., Shoji-Kawata S., Sumpter R. M., Jr., Wei Y., Ginet V., Zhang L., Posner B., Tran K. A., Green D. R., Xavier R. J., Shaw S. Y., Clarke P. G., Puyal J., and Levine B. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPaseregulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** (51), 20364–20371 (2013). DOI: 10.1073/pnas.1319661110
- Bialik S. and Dasari S. K. Autophagy-dependent cell death – where, how and why a cell eats itself to death. J. *Cell Sci.*, 131 (18), (2018). DOI: 10.1242/jcs.215152
- Bai L., Wu Q., Zhang X., and Zhao Y. Autosis as a selective type of cell death. *Front. Cell Dev. Biol.*, 11, 1164681 (2023). DOI: 10.3389/fcell.2023.1164681
- Overholtzer M., Mailleux A. A., Mouneimne G., Normand G., Schnitt S. J., King R. W., Cibas E. S., and Brugge J. S. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, **131** (5), 966– 979 (2007). DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.040
- Martins I., Raza S. Q., Voisin L., Dakhli H., Law F., De Jong D., Allouch A., Thoreau M., Brenner C., Deutsch E., and Perfettini J. L. Entosis: The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death. *Biomed. J.*, **40** (3), 133–140 (2017). DOI: 10.1016/j.bj.2017.05.001
- Garanina A. S., Kisurina-Evgenieva O. P., Erokhina M. V., Smirnova E. A., Factor V. M., and Onishchenko G. E. Consecutive entosis stages in human substrate-dependent cultured cells. *Sci. Rep.*, 7 (1), 12555 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-12867-6
- Durgan J., Tseng Y. Y., Hamann J. C., Domart M. C., Collinson L., Hall A., Overholtzer M., and Florey O. Mitosis can drive cell cannibalism through entosis. *eLife*, 6 (2017). DOI: 10.7554/eLife.27134
- 53. Solovieva M., Shatalin Y., Odinokova I., Krestinina O., Baburina Y., Mishukov A., Lomovskaya Y., Pavlik L., Mikheeva I., Holmuhamedov E., and Akatov V. Disulfiram oxy-derivatives induce entosis or paraptosis-like death in breast cancer MCF-7 cells depending on the duration of treatment. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.*, **1866** (9), 130184 (2022). DOI: 10.1016/j.bbagen.2022.130184
- Guicciardi M. E., Deussing J., Miyoshi H., Bronk S. F., Svingen P. A., Peters C., Kaufmann S. H., and Gores G. J. Cathepsin B contributes to TNF-alphamediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.*, **106** (9), 1127–1137 (2000). DOI: 10.1172/jci9914
- 55. Yu S. W., Wang H., Poitras M. F., Coombs C., Bowers W. J., Federoff H. J., Poirier G. G., Dawson T. M., and Dawson V. L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, **297** (5579), 259–263 (2002). DOI: 10.1126/science.1072221

- Деев Р. В., Билялов А. И. и Жампеисов Т. М. Современные представления о клеточной гибели. *Гены и Клетки*, XIII (1), 6–19 (2018).
 DOI: 10.23868/201805001
- Weaver A. N. and Yang E. S. Beyond DNA Repair: additional functions of PARP-1 in cancer. *Front. Oncol.*, 3, 290 (2013). DOI: 10.3389/fonc.2013.00290
- Lee S. and Karki R. AIM2 forms a complex with pyrin and ZBP1 to drive PANoptosis and host defence. *Nature*, **597** (7876), 415–419 (2021). DOI: 10.1038/s41586-021-03875-8
- Shi C. and Cao P. PANoptosis: a cell death characterized by pyroptosis, apoptosis, and necroptosis. *J. Inflamm. Res.*, 16, 1523–1532 (2023). DOI: 10.2147/jir.s403819
- Holze C., Michaudel C., Mackowiak C., Haas D. A., Benda C., Hubel P., Pennemann F. L., Schnepf D., Wettmarshausen J., Braun M., Leung D. W., and Amarasinghe G. K. Oxeiptosis, a ROS-induced caspaseindependent apoptosis-like cell-death pathway. *Nat. Immunol.*, **19** (2), 130–140 (2018). DOI: 10.1038/s41590-017-0013-y
- Pallichankandy S., Thayyullathil F., Cheratta A. R., Subburayan K., Alakkal A., Sultana M., Drou N., Arshad M., Tariq S., and Galadari S. Targeting oxeiptosis-mediated tumor suppression: a novel approach to treat colorectal cancers by sanguinarine. *Cell Death Discov.*, 9 (1), 94 (2023). DOI: 10.1038/s41420-023-01376-3
- Zhang J., Gao R. F., Li J., Yu K. D., and Bi K. X. Alloimperatorin activates apoptosis, ferroptosis, and oxeiptosis to inhibit the growth and invasion of breast cancer cells in vitro. *Biochem. Cell Biol.*, **100** (3), 213–222 (2022). DOI: 10.1139/bcb-2021-0399
- Scaturro P. and Pichlmair A. Oxeiptosis: a discreet way to respond to radicals. *Curr. Opin. Immunol.*, 56, 37–43 (2019). DOI: 10.1016/j.coi.2018.10.006
- Villalpando-Rodriguez G. E., and Gibson S. B. Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2021, 9912436 (2021).
 DOI: 10.1155/2021/9912436
- 65. Que D., Kuang F., Kang R., Tang D., and Liu J. ACSS2-mediated NF-*κ*B activation promotes alkaliptosis in human pancreatic cancer cells. *Sci. Rep.*, **13** (1), 1483 (2023). DOI: 10.1038/s41598-023-28261-4
- 66. Chen F., Zhu S., Kang R., Tang D., and Liu J. ATP6V0D1 promotes alkaliptosis by blocking STAT3mediated lysosomal pH homeostasis. *Cell Rep.*, 42 (1), 111911 (2023). DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111911
- Ciesielski H. M., Nishida H., Takano T., Fukuhara A., Otani T., Ikegawa Y., Okada M., Nishimura T., Furuse M., and Yoo S. K. Erebosis, a new cell death mechanism during homeostatic turnover of gut enterocytes. *PLoS Biol.*, **20** (4), e3001586 (2022). DOI: 10.1371/journal.pbio.3001586

- Liu X., Nie L., Zhang Y., Yan Y., Wang C., Colic M., Olszewski K., Horbath A., Chen X., Lei G., Mao C., Wu S., Zhuang L., Poyurovsky M. V., James You M., Hart T., Billadeau D. D., Chen J., and Gan B. Actin cytoskeleton vulnerability to disulfide stress mediates disulfidptosis. *Nat. Cell Biol.*, 25 (3), 404–414 (2023). DOI: 10.1038/s41556-023-01091-2
- Wang L.-Y., Liu X.-J., Li Q.-Q., Zhu Y., Ren H.-L., Song J.-N., Zeng J., Mei J., Tian H.-X., Rong D.-C., and Zhang S.-H. The romantic history of signaling pathway discovery in cell death: an updated review. *Mol. Cell. Biochem.* (2023). DOI: 10.1007/s11010-023-04873-2
- Xie J., Yang Y., Gao Y., and He J. Cuproptosis: mechanisms and links with cancers. *Mol. Cancer*, 22 (1), 46 (2023). DOI: 10.1186/s12943-023-01732-y
- Chen D., Cui Q. C., Yang H., and Dou Q. P. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copperbinding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.*, 66 (21), 10425–10433 (2006). DOI: 10.1158/0008-5472.can-06-2126
- 72. Cen D., Brayton D., Shahandeh B., Meyskens F. L., Jr., and Farmer P. J. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. J. Med. Chem., 47 (27), 6914–6920 (2004). DOI: 10.1021/jm049568z
- Tardito S., Bassanetti I., Bignardi C., Elviri L., Tegoni M., Mucchino C., Bussolati O., Franchi-Gazzola R., and Marchiò L. Copper binding agents acting as copper ionophores lead to caspase inhibition and paraptotic cell death in human cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **133** (16), 6235–6242 (2011). DOI: 10.1021/ja109413c
- 74. Hu L., Wang H., Zhao Y., and Wang J. ¹²⁵I seeds radiation induces paraptosis-like cell death via PI3K/AKT signaling pathway in HCT116 cells. *Biomed. Res. Int.*, **2016**, 8145495 (2016). DOI: 10.1155/2016/8145495
- 75. Wang W. B., Feng L. X., Yue Q. X., Wu W. Y., Guan S. H., Jiang B. H., Yang M., Liu X., and Guo D. A. Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90. *J. Cell Physiol.*, **227** (5), 2196–2206 (2012). DOI: 10.1002/jcp.22956
- 76. Yoon M. J., Kang Y. J., Lee J. A., Kim I. Y., Kim M. A., Lee Y. S., Park J. H., Lee B. Y., Kim I. A., Kim H. S., Kim S. A., Yoon A. R., Yun C. O., Kim E. Y., Lee K., and Choi K. S. Stronger proteasomal inhibition and higher CHOP induction are responsible for more effective induction of paraptosis by dimethoxycurcumin than curcumin. *Cell Death Dis.*, 5 (3), e1112 (2014). DOI: 10.1038/cddis.2014.85
- 77. Yoon M. J., Kim E. H., Kwon T. K., Park S. A., and Choi K. S. Simultaneous mitochondrial Ca²⁺ overload and proteasomal inhibition are responsible for the induction of paraptosis in malignant breast cancer cells.

Cancer Lett., **324** (2), 197–209 (2012). DOI: 10.1016/j.canlet.2012.05.018

- Korsnes M. S., Espenes A., Hetland D. L., and Hermansen L. C. Paraptosis-like cell death induced by yessotoxin. *Toxicol. in vitro*, 25 (8), 1764–1770 (2011). DOI: 10.1016/j.tiv.2011.09.005
- Alfonso A., Vieytes M. R. and Botana L. M. Yessotoxin, a promising therapeutic tool. *Marine Drugs*, 14 (2), (2016). DOI: 10.3390/md14020030
- Li B., Zhao J., Wang C. Z., Searle J., He T. C., Yuan C. S., and Du W. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis and paraptosis-like cell death in colorectal cancer cells through activation of p53. *Cancer Lett.*, **301** (2), 185–192 (2011). DOI: 10.1016/j.canlet.2010.11.015
- Wang Y., Zhu X., Yang Z., and Zhao X. Honokiol induces caspase-independent paraptosis via reactive oxygen species production that is accompanied by apoptosis in leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430 (3), 876–882 (2013). DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.063
- Liu X., Gu Y., and Bian Y. Honokiol induces paraptosis-like cell death of acute promyelocytic leukemia via mTOR & MAPK signaling pathways activation. *Apoptosis*, 26 (3–4), 195–208 (2021). DOI: 10.1007/s10495-020-01655-9
- Zhang J. S., Li D. M., Ma Y., He N., Gu Q., Wang F. S., Jiang S. Q., Chen B. Q., and Liu J. R. γ-Tocotrienol induces paraptosis-like cell death in human colon carcinoma SW620 cells. *PLoS One*, 8 (2), e57779 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0057779
- 84. Kar R., Singha P. K., Venkatachalam M. A., and Saikumar P. A novel role for MAP1 LC3 in nonautophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells. *Oncogene*, 28 (28), 2556–2568 (2009). DOI: 10.1038/onc.2009.118
- 85. Tsai T. L., Wang H. C., Hung C. H., Lin P. C., Lee Y. S., Chen H. H. W., and Su W. C. Wheat germ agglutinin-induced paraptosis-like cell death and protective autophagy is mediated by autophagy-linked FYVE inhibition. *Oncotarget*, 8 (53), 91209–91222 (2017). DOI: 10.18632/oncotarget.20436
- 86. Seo M. J., Lee D. M., Kim I. Y., Lee D., Choi M.-K., Lee J.-Y., Park S. S., Jeong S.-Y., Choi E. K., and Choi K. S. Gambogic acid triggers vacuolization-associated cell death in cancer cells via disruption of thiol proteostasis. *Cell Death Dis.*, **10** (3), 187 (2019). DOI: 10.1038/s41419–019-1360-4
- Mi X., Wang C., Sun C., Chen X., Huo X., Zhang Y., Li G., Xu B., Zhang J., Xie J., Wang Z., and Li J. Xanthohumol induces paraptosis of leukemia cells through p38 mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Oncotarget*, 8 (19), 31297–31304 (2017). DOI: 10.18632/oncotarget.16185
- Bury M., Girault A., Mégalizzi V., Spiegl-Kreinecker S., Mathieu V., Berger W., Evidente A., Kornienko A., Gailly P., Vandier C., and Kiss R. Ophiobolin A induces paraptosis-like cell death in hu-

802

man glioblastoma cells by decreasing BKCa channel activity. *Cell Death Dis.*, **4** (3), e561 (2013). DOI: 10.1038/cddis.2013.85

- Kim I. Y., Shim M. J., Lee D. M., Lee A. R., Kim M. A., Yoon M. J., Kwon M. R., Lee H. I., Seo M. J., Choi Y. W., and Choi K. S. Loperamide overcomes the resistance of colon cancer cells to bortezomib by inducing CHOP-mediated paraptosis-like cell death. *Biochem. Pharmacol.*, **162**, 41–54 (2019). DOI: 10.1016/j.bcp.2018.12.006
- 90. Gafar A. A., Draz H. M., Goldberg A. A., Bashandy M. A., Bakry S., Khalifa M. A., AbuShair W., Titorenko V. I., and Sanderson J. T. Lithocholic acid induces endoplasmic reticulum stress, autophagy and mitochondrial dysfunction in human prostate cancer cells. *Peer J.*, 4, e2445 (2016). DOI: 10.7717/peerj.2445
- Wasik A. M., Almestrand S., Wang X., Hultenby K., Dackland Å. L., Andersson P., Kimby E., Christensson B., and Sander B. WIN55,212-2 induces cytoplasmic vacuolation in apoptosis-resistant MCL cells. *Cell Death Dis.*, 2 (11), e225 (2011). DOI: 10.1038/cddis.2011.106
- Sun Q., Chen T., Wang X., and Wei X. Taxol induces paraptosis independent of both protein synthesis and MAPK pathway. J. Cell. Physiol., 222 (2), 421–432 (2010). DOI: 10.1002/jcp.21982
- 93. Kim S. H., Shin H. Y., Kim Y. S., Kang J. G., Kim C. S., Ihm S. H., Choi M. G., Yoo H. J., and Lee S. J. Tunicamycin induces paraptosis potentiated by inhibition of BRAFV600E in FRO anaplastic thyroid carcinoma cells. *Anticancer Res.*, **34** (9), 4857– 4868 (2014).
- 94. Hu L., Shi J., Shen D., Zhai X., Liang D., Wang J., Xie C., Xia Z., Cui J., Liu F., Du S., Meng S., and Piao H. Osimertinib induces paraptosis and TRIP13 confers resistance in glioblastoma cells. *Cell Death Discov.*, 9 (1), 333 (2023). DOI: 10.1038/s41420-023-01632-6
- 95. Nguyen P. L., Lee C. H., Lee H., and Cho J. Induction of paraptotic cell death in breast cancer cells by a novel pyrazolo[3,4-h]quinoline derivative through ROS production and endoplasmic reticulum stress. *Antioxidants*, **11** (1), 117 (2022). DOI: 10.3390/antiox11010117
- 96. Chen X., Zhang X., Chen J., Yang Q., Yang L., Xu D., Zhang P., Wang X., and Liu J. Hinokitiol copper complex inhibits proteasomal deubiquitination and induces paraptosis-like cell death in human cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **815**, 147–155 (2017). DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.09.003
- 97. Hager S., Pape V. F. S., Pósa V., Montsch B., Uhlik L., Szakács G., Tóth S., Jabronka N., Keppler B. K., Kowol C. R., Enyedy É A., and Heffeter P. High copper complex stability and slow reduction kinetics as key parameters for improved activity, paraptosis induction, and impact on drug-resistant cells of anticancer thiosemicarbazones. *Antioxid. Redox Signal.*, **33** (6), 395–414 (2020). DOI: 10.1089/ars.2019.7854

- 98. Solovieva M., Shatalin Y., Fadeev R., Krestinina O., Baburina Y., Kruglov A., Kharechkina E., Kobyakova M., Rogachevsky V., Shishkova E., and Akatov A. V. Vitamin B(12b) Enhances the cytotoxicity of diethyldithiocarbamate in a synergistic manner, inducing the paraptosis-like death of human larynx carcinoma cells. *Biomolecules*, **10** (1), (2020). DOI: 10.3390/biom10010069
- 99. Solovieva M., Shatalin Y., Odinokova I., Krestinina O., Baburina Y., Lomovskaya Y., Pankratov A., Pankratova N., Buneeva O., Kopylov A., Medvedev A., and Akatov V. Disulfiram oxy-derivatives suppress protein retrotranslocation across the ER membrane to the cytosol and initiate paraptosis-like cell death. *Membranes* (12), 845, (2022). DOI: 10.3390/membranes12090845
- 100.Wang Y., Wen X., Zhang N., Wang L., Hao D., Jiang X., and He G. Small-molecule compounds target paraptosis to improve cancer therapy. *Biomed. Pharmacother.*, **118**, 109203 (2019). DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109203
- 101. Chen F., Tang H., Cai X., Lin J., Xiang L., Kang R., and Liu J. Targeting paraptosis in cancer: opportunities and challenges. *Cancer Gene Ther.*, (2024). DOI: 10.1038/s41417-023-00722-y
- 102.Sperandio S., de Belle I., and Bredesen D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (26), 14376–14381 (2000). DOI: 10.1073/pnas.97.26.14376
- 103.Sperandio S., Poksay K., de Belle I., Lafuente M. J., Liu B., Nasir J., and Bredesen D. E. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ.*, **11** (10), 1066–1075 (2004). DOI: 10.1038/sj.cdd.4401465
- 104.Liu S., Tian Y., Liu C., Gui Z., Yu T., and Zhang L. TNFRSF19 promotes endoplasmic reticulum stressinduced paraptosis via the activation of the MAPK pathway in triple-negative breast cancer cells. *Cancer Gene Ther.*, **31** (2), 217–227 (2024). DOI: 10.1038/s41417-023-00696-x
- 105.Hoa N., Myers M. P., Douglass T. G., Zhang J. G., Delgado C., Driggers L., Callahan L. L., VanDeusen G., Pham J. T., Bhakta N., Ge L., and Jadus M. R. Molecular mechanisms of paraptosis induction: implications for a non-genetically modified tumor vaccine. *PLoS One*, **4** (2), e4631 (2009). DOI: 10.1371/journal.pone.0004631
- 106.Kim I. Y., Kwon M., Choi M. K., Lee D., Lee D. M., Seo M. J., and Choi K. S. Ophiobolin A kills human glioblastoma cells by inducing endoplasmic reticulum stress via disruption of thiol proteostasis. *Oncotarget*, 8 (63), 106740–106752 (2017). DOI: 10.18632/oncotarget.22537
- 107. Hager S., Korbula K., Bielec B., Grusch M., Pirker C., Schosserer M., Liendl L., Lang M., Grillari J., Nowikovsky K., Pape V. F. S., Mohr T., Szakács G., Keppler B. K., Berger W., Kowol C. R., and Heffeter P. The thiosemicarbazone Me(2)NNMe(2) induces

paraptosis by disrupting the ER thiol redox homeostasis based on protein disulfide isomerase inhibition. *Cell Death Dis.*, **9** (11), 1052 (2018). DOI: 10.1038/s41419-018-1102-z

- 108.Lee H. J., Lee D. M., Seo M. J., Kang H. C., Kwon S. K., and Choi K. S. PSMD14 targeting triggers paraptosis in breast cancer cells by inducing proteasome inhibition and Ca²⁺ imbalance. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (5), (2022). DOI: 10.3390/ijms23052648
- 109.Wang L., Gundelach J. H., and Bram R. J. Cycloheximide promotes paraptosis induced by inhibition of cyclophilins in glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis.*, 8 (5), e2807 (2017). DOI: 10.1038/cddis.2017.217
- 110. Dumay A., Rincheval V., Trotot P., Mignotte B., and Vayssière J. L. The superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate has antagonistic effects on apoptosis by triggering both cytochrome c release and caspase inhibition. *Free Rad. Biol. Med.*, **40** (8), 1377– 1390 (2006).

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.005

- 111. Zhu D., Chen C., Xia Y., Kong L. Y., and Luo J. A purified resin glycoside fraction from pharbitidis semen induces paraptosis by activating chloride intracellular channel-1 in human colon cancer cells. *Integr. Cancer Ther.*, **18**, 1534735418822120 (2019). DOI: 10.1177/1534735418822120
- 112. Hoa N. T., Zhang J. G., Delgado C. L., Myers M. P., Callahan L. L., Vandeusen G., Schiltz P. M., Wepsic H. T., and Jadus M. R. Human monocytes kill M-CSF-expressing glioma cells by BK channel activation. *Lab. Invest.*, **87** (2), 115–129 (2007). DOI: 10.1038/labinvest.3700506
- 113. Allan L. A., Morrice N., Brady S., Magee G., Pathak S., and Clarke P. R. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat. Cell Biol.*, 5 (7), 647–654 (2003). DOI: 10.1038/ncb1005
- 114. Kim E., Lee D. M., Seo M. J., Lee H. J., and Choi K. S. Intracellular Ca²⁺ Imbalance Critically

Contributes to Paraptosis. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8** (1703), (2021). DOI: 10.3389/fcell.2020.607844

- 115. Pyrczak-Felczykowska A., Reekie T. A., Jąkalski M., Hać A., Malinowska M., Pawlik A., Ryś K., Guzow-Krzemińska B., and Herman-Antosiewicz A. The isoxazole derivative of usnic acid induces an er stress response in breast cancer cells that leads to paraptosis-like cell death. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (3), 1802 (2022). DOI: 10.3390/ijms23031802
- 116. Yokoi K., Yamaguchi K., and Umezawa M. Induction of paraptosis by cyclometalated iridium complex-peptide hybrids and CGP37157 via a mitochondrial Ca²⁺ overload triggered by membrane fusion between mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 61 (8), 639–655 (2022).
 DOI: 10.1021/acs.biochem.2c00061
- 117. Singha P. K., Pandeswara S., Venkatachalam M. A., and Saikumar P. Manumycin A inhibits triple-negative breast cancer growth through LC3-mediated cytoplasmic vacuolation death. *Cell Death Dis.*, **4** (1), e457 (2013). DOI: 10.1038/cddis.2012.192
- 118. Zhang C., Jiang Y., Zhang J., Huang J., and Wang J. 8-p-Hdroxybenzoyl tovarol induces paraptosis like cell death and protective autophagy in human cervical cancer hela cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **16** (7), 14979–14996 (2015).
- 119. Lee D. M. and Kim I. Y. Akt enhances the vulnerability of cancer cells to VCP/p97 inhibition-mediated paraptosis. *Cell Death Dis.*, **15** (1), 48 (2024). DOI: 10.1038/s41419-024-06434-x
- 120. Шубин А. В. Протеазы как цитотоксические агенты и маркеры злокачественных опухолей легкого : Дис. ... канд. биол. наук (Инст. молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН, М., 2014).
- 121. Wang C., Li T. K., Zeng C. H., Fan R., Wang Y., Zhu G. Y., and Guo J. H. Iodine-125 seed radiation induces ROS-mediated apoptosis, autophagy and paraptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *Oncol. Rep.*, **43** (6), 2028–2044 (2020). DOI: 10.3892/or.2020.7576

Paraptosis and Other Types of Non-Apoptotic Regulated Cell Death

M.E. Solovieva*, Yu.V. Shatalin*, and V.S. Akatov*

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

The review is devoted to modern ideas about paraptosis, as one of the types of regulated cell death, in comparison with other types of cell death. Paraptosis is a form of cell death caused by endoplasmic reticulum stress, accompanied by an accumulation of damaged or misfolded proteins, extensive non-autophagic vacuolation of cisterns of endoplasmic reticulum and, in some cases, mitochondria, with subsequent damage to mitochondria, the cytoskeleton, and cell death. The knowledge regarding the molecular mechanisms of paraptosis is of interest for the treatment of cancers resistant to apoptosis-inducing agents.

Keywords: cell death, apoptosis, necrosis, paraptosis

УДК 616-006.4

ПОВЫШЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОСТРОГО ЛИМФОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В ТРЕХМЕРНЫХ ВЫСОКОПЛОТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

© 2024 г. Д.Ю. Штатнова*, М.И. Кобякова*, **, #, Я.В. Ломовская*, Е.И. Фетисова*, К.С. Краснов*, Р.С. Фадеев*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия **Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия

#E-mail: ritaaaaa49@gmail.com Поступила в редакцию 15.03.2024 г. После доработки 17.06.2024 г. Принята к публикации 17.07.2024 г.

Проведено исследование формирования лекарственной устойчивости клеток острого лимфоидного лейкоза (клеточные линии Jurkat, MOLT 3, MOLT 4) в высокоплотных клеточных культурах. Показано, что в высокоплотных культурах клеток острого лимфоидного лейкоза повышается устойчивость к действию химиотерапевтических препаратов относительно клеток, культивируемых в условиях низкой плотности. Результаты исследования механизма повышения лекарственной устойчивости клеток острого лимфоидного лейкоза в высокоплотных культурах показали, что повышение лекарственной устойчивости может опосредоваться изменением их пролиферативной активности. Полученные в работе результаты представляют интерес для разработки стратегии подавления лекарственной устойчивости клеток острого лимфоидного лейкоза, зависящей от плотности клеточной культуры.

Ключевые слова: острый лимфоидный лейкоз, лекарственная устойчивость, высокоплотные культуры, пролиферативная активность.

DOI: 10.31857/S0006302924040129, EDN: NGGKKX

Острый лимфоидный лейкоз (ОЛЛ) – злокачественная опухоль лимфоидного ростка гемопоэтической системы. ОЛЛ является наиболее часто встречающимся онкологическим заболеванием v детей – 75% случаев возникают в возрасте до 6 лет [1-3]. ОЛЛ у младенцев (до 1 года) имеет наихудший клинический исход, показатели излечения составляют всего 20-50% [1-3]. 5-летняя выживаемость для людей в возрасте 20 лет и старше составляет 20-40%, для людей в возрасте до 20 лет составляет 65% [1-3]. На данный момент основным способом лечения ОЛЛ является применение химиотерапевтических препаратов. Однако эффективность их применения ограничивается развитием резистентности к их действию у ОЛЛклеток, главным образом находящихся в нишах костного мозга [4], что в последующем определяет рецидив заболевания. Многие исследователи

связывают формирование резистентности у клеток ОЛЛ в нишах костного мозга с условиями микроокружения и, прежде всего, с клетками стромы костного мозга, опуская вопрос о взаимном влиянии лейкозных клеток друг на друга [5]. В то же время известно, что озлакачествление костного мозга сопровождается повышенной клеточностью, где доля лейкозных бластов может составлять более 80% от всего клеточного состава [6]. Показано, что количество лейкозных бластов может напрямую влиять на эффективность химиотерапии, поскольку цитотоксическая активность многих химиотерапевтических препаратов зависит от количества опухолевых клеток [7]. Однако механизмы такой резистентности остаются крайне мало изученными. В связи с этим целью данной работы является исследование возможных механизмов многоклеточной резистентности клеток ОЛЛ к действию химиотерапевтических препаратов в высокоплотных культурах. Изучение механизмов устойчивости клеток ОЛЛ к индукции клеточной гибели в высокоплотных куль-

Сокращения: ОЛЛ – острый лимфоидный лейкоз, ВПК – высокоплотная клеточная культура, ЛУ – лекарственная устойчивость.

турах важно для создания новых эффективных способов терапии заболевания и понимания механизмов межклеточных коммуникаций в патологически измененном костном мозге.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В качестве объекта исследования в работе использовали клетки острого лимфоидного лейкоза человека линий Jurkat, MOLT 3 и MOLT 4, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (Sigma-Aldrich, США) при 37°С, в условиях 5%-го содержания CO₂ в воздухе.

Клетки высевали в количестве $5 \cdot 10^3$ в 100 мкл питательной среды в лунки U-образного 96 луночного культурального планшета. Через сутки после посева количество клеток в лунке увеличивалось до $1 \cdot 10^4$ ($1 \cdot 10^5$ кл/мл), и мы использовали их как культуры низкой плотности. Через 4 и 5 суток культивирования без смены питательной среды количество клеток в лунке вырастало до $5 \cdot 10^4$ ($5 \cdot 10^5$ кл/мл) и $1 \cdot 10^5$ ($1 \cdot 10^6$ кл/мл) соответственно, формируя трехмерный многоклеточный агрегат – высокоплотную клеточную культуру (далее ВПК).

Анализ жизнеспособности. Жизнеспособность клеток после 24 ч инкубации с химиотерапевтическими агентами (топотекан, цитарабин, этопозид и цисплатин) определяли по отношению количества живых клеток в опытных и контрольных (без добавления химиотерапевтических агентов) условиях. Количество живых клеток после инкубации с химиотерапевтическими агентами оценивали по интенсивности восстановления резазурина (Sigma-Aldrich, США). Для этого к клеткам добавляли резазурин (30 мкг/мл), инкубировали с красителем в течение 4 ч при 37°С и 5% СО₂ в инкубаторе и измеряли интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 532 нм и длине волны испускания 590 нм с использованием планшетного спектрофлюориметра Infinite F200 (Тесап, Швейцария).

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла. Для изучения распределения по фазам клеточного цикла клетки отмывали в фосфатносолевом буфере (300 g, 5 мин), фиксировали 70%-м этанолом (24 ч, -20° C). Окрашивание проводили в течение 15 мин при 37°C в среде следующего состава: фосфатно-солевой буфер, 0.1% тритона X-100, 10 мкг/мл йодида пропидия, 100 мкг/мл РНКазы (Биолот, Россия). Анализ проводили с помощью проточного цитометра BD

Accuri C6 (BD Bioscience, США). Полученные результаты обрабатывали в программе ModFit LT 4.1.

Анализ митотической активности. Для определения митотической активности клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере (300 g, 5 мин), фиксировали 70%-м этанолом (24 ч, -20° C). Затем окрашивали флуоресцентным красителем bisBenzimide H 33342 в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 мин при комнатной температуре и проводили подсчет числа митотических клеток с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 (Leica, Германия), анализировали не менее 500 клеток.

Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение $(M \pm SD)$. Опыты проводили не менее, чем в трех повторностях $(n \ge 3)$. Статистическую значимость отличия определяли с использованием дисперсионного анализа (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В высокоплотных клеточных культурах повышается устойчивость клеток острого лимфоидного лейкоза к действию химиотерапевтических препаратов. Нами показано, что у клеток острого лимфоидного лейкоза человека линии Jurkat при культивировании в высокоплотных клеточных культурах происходит повышение устойчивости к клеточной гибели, индуцированной действием химиотерапевтических препаратов. При культивировании клеток Jurkat в течение суток при низкой плотности культуры (1·10⁵ кл/мл) величина *IC*₅₀ для топотекана составляла 0.005 0.001 мкМ, этопозида - 0.13 ± 0.06 мкМ, а при концентрациях цитарабина 26 мкМ количество живых клеток составляло $60.2 \pm 2.5\%$. На 4-е сутки при культивировании клеток Jurkat при высокой плотности культуры (5·10⁵ кл/мл) величина IC_{50} для топотекана составляла 6.1 ± 0.1 мкМ, для этопозида — 9.2 ± 1.1 мкМ, а при концентрации цитарабина 26 мкМ число живых клеток составляло более $80 \pm 5\%$. В свою очередь, при культивировании клеток Jurkat в течение 5 суток при высокой плотности культуры 1·10⁶ кл/мл с топотеканом и цитарабином число живых клеток составляло более $85 \pm 2\%$, с этопозидом $-60 \pm 5\%$ относительно необработанных клеток (рис. 1).

Сходное повышение устойчивости к действию использованных в работе химиотерапевтических препаратов было показано также и для клеточных линий ОЛЛ человека MOLT 3 и MOLT 4, культивируемых в культурах высокой плотности (рис. 2). Исходя из полученных результатов, наиболее выраженный эффект показали клетки



Рис. 1. Жизнеспособность клеток Jurkat после 24 ч инкубации с топотеканом, цитарабином и этопозидом, добавленных к культуре после 1, 2, 3, 4 и 5 суток от момента посева клеток. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($n \ge 3$).



Рис. 2. Жизнеспособность клеток MOLT 3 (а) и MOLT 4 (б) после 24 ч инкубации с топотеканом, цитарабином и этопозидом, добавленных к культуре через 1, 2, 3, 4 и 5 суток от момента посева клеток. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($n \ge 3$).



Рис. 3. Пролиферативная активность клеток Jurkat в высокоплотных клеточных культурах. Кривая роста (а), распределение по фазам клеточного цикла (б) и митотическая активность (в) клеток Jurkat в культурах низкой и высокой плотности. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($n \ge 3$); * – p < 0.05 в сравнении с клетками, культивированными 1 сутки.

Jurkat, поэтому все дальнейшие исследования проводили именно на этой клеточной линии.

Повышение лекарственной устойчивость клеток острого лимфоидного лейкоза Jurkat в высокоплотных клеточных культурах может опосредоваться изменением их пролиферативной активности. В ряде публикаций формирование резистентности у клеток солидных опухолей (карциномы, саркомы, глиомы и т.д.) в высокоплотных культурах (конфлюэнт, агрегат, сфероид) к противоопухолевым препаратам связывают с выходом клеточной культуры в стационарную фазу клеточного цикла и изменением пролиферативной активности [7, 8]. В связи с этим мы провели исследование пролиферативной активности клеток ОЛЛ Jurkat в высокоплотных клеточных культурах. Пролиферативную активность клеток оценивали по анализу кривой роста, распределению клеток по фазам клеточного цикла и митотической активности.

Анализ кривой роста клеточной линии Jurkat показал, что на 4-е сутки культивирования клетки находятся в экспоненциальной фазе, а на 5-е сутки выходят в стационарную фазу (рис. 3а). Дополнительно мы исследовали митотическую активность и распределение по фазам клеточного цикла клеток Jurkat, культивированных в течение 4 суток (далее ВПК-4с) и 5 суток (далее ВПК-5с), в сравнении с клетками, культивированными при низкой плотности клеточной культуры. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла показал, что количество клеток в популяции Jurkat BПК-4с уменьшалось в S-фазе с $35.7 \pm 1.8\%$ до 24.7 \pm 0.6% (p < 0.05) и в G2/M-фазе – с $20.3 \pm 1.4\%$ до 17.7 $\pm 0.19\%$ (p < 0.05), увеличивалось в G0/G1-фазе с 43.9 ± 2.4% до 57.6 ± 0,43% (p < 0.05) и не изменялось в М-фазе относительно

клеток, культивируемых при низкой плотности культуры. В свою очередь, количество клеток в популяции Jurkat ВПК-5с увеличивалось в G0/G1-фазе с 43.9 ± 2.4% до 61.9 ± 1.2% (p < 0.05), уменьшалось в S-фазе с 35.7 ± 1.8% до 20.5 ± 0.5% (p < 0.05), не изменялось в G2/M-фазе и снижалось с 3.5 ± 0.4% до 2.6 ± 0.3% в М-фазе относительно клеток, культивируемых в культуре низкой плотности (рис. 36).

Полученные данные указывают на то, что повышение лекарственной устойчивости клеток Jurkat в высокоплотных клеточных культурах может быть связано со снижением их пролиферативной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании показана возможность повышения устойчивости к действию химиотерапевтических препаратов у клеток острого лимфоидного лейкоза человека в высокоплотных клеточных культурах. Повышение лекарственной устойчивость клеток ОЛЛ в высокоплотных клеточных культурах может опосредоваться изменением их пролиферативной активности. Выяснение механизмов лекарственной устойчивости, опосредованной условиями микроокружения, важно для выявления новых фармакологических мишеней консервативной терапии направленного действия.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания для ИТЭБ РАН (№ 075-00224-24-01).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Terwilliger T. and Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.*, 7 (6), e577 (2017). DOI: 10.1038/bcj.2017.53
- Ekpa Q. L., Akahara P. C., Anderson A. M., Adekoya O. O., Ajayi O. O., Alabi P. O., Okobi O. E., Jaiyeola O., and Ekanem M. S. A review of acute lymphocytic leukemia (ALL) in the pediatric population: evaluating current trends and changes in guidelines in the past decade. *Cureus*, **15** (12), e49930 (2023). DOI: 10.7759/cureus.49930
- Inaba H. and Mullighan C. G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **105** (11), 2524–2539 (2020). DOI: 10.3324/haematol.2020.247031
- Ma C., Witkowski M.T., Harris J., Dolgalev I., Sreeram S., Qian W., Tong J., Chen X., Aifantis I., and Chen W. Leukemia-on-a-chip: Dissecting the chemo-

resistance mechanisms in B cell acute lymphoblastic leukemia bone marrow niche. *Sci. Adv.*, **6**, eaba5536 (2020). DOI: 10.1126/sciadv.aba5536

- Dander E., Palmi C., D'Amico G., and Cazzaniga G. The bone marrow niche in B-cell acute lymphoblastic leukemia: The role of microenvironment from pre-leukemia to overt leukemia. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (9), 4426 (2021). DOI: 10.3390/ijms22094426
- 6. Hoffbrand A. V. and Pettit J. E. *Clinical Hematology* (Mosby, Incorporated, 2000), vol. 2, p. 408.
- Jo Y., Choi N., Kim K., Koo H. J., Choi J., and Kim H. N. Chemoresistance of cancer cells: requirements of tumor microenvironment-mimicking *in vitro* models in anti-cancer drug development. *Theranostics*, 8 (19), 5259–5275 (2018). DOI: 10.7150/thno.29098
- Sabelström H., Quigley D. A., Fenster T., Foster D. J., Fuchshuber C. A. M., Saxena S., Yuan E., Li N., Paterno F., Phillips J. J., James C. D., Norling B., Berger M. S., and Persson A. I. High density is a property of slow-cycling and treatment-resistant human glioblastoma cells. *Exp. Cell Res.*, **378** (1), 76–86 (2019). DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.03.003

Increased Drug Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells in Three-Dimensional High-Density Cell Cultures

D.Yu. Shtatnova*, M.I. Kobyakova*, **, Y.V. Lomovskaya*, E.I. Fetisova*, K.S. Krasnov*, and R.S. Fadeev*

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

**Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia

In this study, the development process of drug resistance in acute lymphoblastic leukemia cells (Jurkat, MOLT 3, and MOLT 4 cell lines) was examined in high-density cell cultures. It has been shown that in high-density cultures of acute lymphoblastic leukemia cells resistance to the action of chemotherapeutic drugs increases comparing to the cells cultured under low-density conditions. The results obtained after investigation of the mechanism underlying increased drug resistance in acute lymphoblastic leukemia cells in high-density cultures showed that an increase in drug resistance in high-density cultures of cells can be mediated by a change in their proliferative activity. These findings can be applied in developing a strategy to overcome drug resistance in acute lymphoblastic leukemia cells, which depends on the density of the cell culture.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, drug resistance, high-density cultures, proliferative activity

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 577.152.3:595.384

БЕЛКИ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КРАБА-СТРИГУНА И КАМЧАТСКОГО КРАБА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2024 г. В.Г. Молчанов*, А.Е. Егоров*, Д.А. Осетрина*, В.Ю. Новиков**, Н.М. Новожилов***, А.А. Тимченко****, Е.А. Согорин*****, М.А. Тимченко*, #

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

**Полярный филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича, ул. Академика Книповича, 6, Мурманск, 183038, Россия

***Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997, Россия

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

****Институт биологического приборостроения РАН — обособленное подразделение Федерального

исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,

ул. Институтская, 7, Пущино Московской области, 142290, Россия

[#]E-mail: maria_timchenko@mail.ru Поступила в редакцию 28.03.2024 г. После доработки 07.07.2024 г. Принята к публикации 17.07.2024 г.

За время своего длительного существования ракообразные, несмотря на отсутствие высокоспецифичной адаптивной иммунной системы, как у позвоночных, успешно адаптировались к выживанию в своей естественной среде обитания, богатой микроорганизмами, в том числе благодаря наличию антимикробных пептидов. Один из ценных источников антимикробных пептидов – гепатопанкреас, представляющий отходы промысла и переработки краба. Методом зимографии и ¹H-ЯМР-спектроскопии нами было обнаружено, что в состав экстракта из гепатопанкреаса крабастригуна входит небольшой пептид (около 3 кДа), который гидролизует клеточную стенку и полисахарид клеточной стенки *M. lysodeikticus*. Найденный пептид может представлять интерес для практического применения. Из гепатопанкреаса камчатского краба с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе был выделен белок (около 14 кДа), который также проявляет активность в отношении клеточной стенки грамположительной бактерии *M. lysodeikticus*, что было показано методами зимографии и турбидиметрии.

Ключевые слова: антимикробные белки и пептиды, гепатопанкреас, камчатский краб, краб-стригун.

DOI: 10.31857/S0006302924040136, **EDN:** NGFZNR

Рост невосприимчивых к антибиотикам патогенов, имеющих механизмы резистентности к существующим противомикробным препаратам, серьезно ограничивают возможности для лечения распространенных инфекций, поэтому актуальной задачей является поиск новых лекарственных средств с антибактериальной активностью. В качестве перспективных кандидатов для создания таких препаратов могут выступать антимикробные пептиды (АМП). АМП являются одним из основных компонентов врожденной иммунной защиты и встречаются во всех царствах: от бактерий до млекопитающих. Перспективность

вания АМП объясняется их небольшим размером, системным действием, высоким сродством и широким спектром активности, устойчивостью к протеолизу, быстрым подавлением роста бактерий и грибов, ограниченной иммуногенностью и отсутствием резистентности к ним у бактерий [1]. Многообещающим источником для открытия биоактивных пептидов являются морские беспозвоночные, которые представляют собой пойкилотермные организмы, ферменты которых способны функционировать в широком диапазоне температур. На данный момент антимикробная активность была обнаружена у нескольких десятиногих ракообразных, включая омаров, крабов, креветок и пресноводных раков, как в гемолимфе или гемоцитах, так и в других органах [2–5].

Сокращения: АМП – антимикробный пептид, ГПК – гепатопанкреас краба, ЯМР – ядерно-магнитный резонанс.

Мощная антимикробная активность у ракообразных объясняется тем, что ракообразные постоянно подвергаются воздействию различных патогенов. Ведущими молекулярными факторами врожденной иммунной системы являются антимикробные белки и пептиды. На данный момент уже выделено несколько семейств антимикробных белков и пептидов (крустины, пенеидины, антилипополисахаридные факторы, лизоцимы и др.), а также постоянно появляются новые индивидуальные микробные пептиды ракообразных [6].

Одним из источников новых АМП может выступать гепатопанкреас, пищеварительная железа членистоногих и моллюсков. Важным фактом является то, что гепатопанкреас представляет собой отходы промысла крабов [7]. Надо отметить, что основная доля добычи краба в РФ приходится на крабов из отряда *Decapoda*: краба-стригуна опилио (инфраотряд *Brachyura*) и камчатского краба (инфраотряд *Anomura*). Но к настоящему времени имеется лишь ограниченное число работ, посвященных изучению ферментов из гепатопанкреаса этих видов краба, в основном коллагеназ, хитиназ и протеаз [7–9].

На сегодняшний день АМП камчатского краба мало изучены. Первые шаги к исследованию антибактериальной активности в органах камчатского краба были сделаны в работе [10]. В экстрактах гемолимфы, гемоцитов, а также некоторых тканей камчатского краба была обнаружена и антибактериальная активность в отношении грамотрицательных микроорганизмов V. anguillarum, E. coli и грамположительных бактерий C. glutamicum, а также слабая активность в отношении грамположительного микроорганизма S. aureus. Исследования термостабильности и устойчивости к протеиназам показали, что антибактериальные факторы из камчатского краба имеют белковую природу, а также обладают лизоцимподобной и гемолитической активностью.

Кроме того, в гемоцитах удалось найти и охарактеризовать три катионных пептида, богатых цистеином (Cys), названных паралитоцинами 1— 3 [11], и хотя они не проявляли антимикробной активности в отношении целевых штаммов *E. coli, P. aeruginosa* или *S. aureus*, была обнаружена умеренная антимикробная активность в отношении нескольких штаммов морских микроорганизмов. Кроме того, скрининг библиотеки кДНК выявил последовательность крустина, катионного Суs-богатого белка, в гемоцитах камчатского краба, кодирующую зрелый пептид из 98 аминокислот. Крустин камчатского краба был отнесен к группе крустинов II типа [12].

Гепатопанкреас (ГПК) камчатского краба, содержащий огромное количество еще не исследованных белков и пептидов, может представлять огромный интерес как источник АМП. Первое упоминание об антибактериальных свойствах экстракта из гепатопанкреаса камчатского краба приводится в работе [10]. Нами в экстракте ГПК камчатского краба был обнаружен пептид (около 5 кДа) [13], гидролизующий как клеточную стенку M. lvsodeikticus, так и полисахарил, вхоляший в пептидогликана клеточной состав стенки M. lysodeikticus. Расщепление полисахарида подтверждалось также методом ¹H-ЯМР-спектроскопии. Анализ антибактериальной активности полученных экстрактов в отношении грамотрицательного микроорганизма E. coli и грамположительного *В. cereus* показал, что в присутствии экстракта пептидов прекращался рост клеток *В. cereus*, и на начальном этапе роста сильно замедлялся рост *E. coli*. Эффективность в отношении грамположительных бактерий был немного выше по сравнению с лизоцимом.

Работы, посвященные исследованию АМП краба-стригуна также немногочисленны. В отдельных работах показано, что обработка протеазами гомогенатов отходов краба-стригуна опилио, таких, как цефалоторакс, органы пищеварительной системы, приводит к появлению пептидных фракций с высокой антибактериальной активностью, особенно в случае гепатопанкреаса [14, 15].

Авторы работы [16] провели тестирование на антибактериальную активность фракций из гепатопанкреаса краба-стригуна, полученных после его гидролиза с помощью эндопротеазы «Протамекс» и концентрирования твердофазной экстракцией. Было обнаружено, что полученные фракции проявляли антибактериальную активность в отношении грамположительной L. innocua. С помощью масс-спектрометрии были идентифицированы одиннадцать пептидов (1.0-2.2 кДа), имеющих по меньшей мере 80% аминокислотной гомологии с четырьмя антимикробными пептидами. Два пептида имели гомологию с крустин-подобным пептидом черной тигровой креветки и антимикробным пептидом GAPDH желтоперого тунца. Также были идентифицированы пептиды, имеющие гомологию с антибактериальным пептидом Одорранаин-С7 из лягушки Odorrana grahami и предполагаемым антибактериальным пептидом азиатской божьей коровки Harmonia axvridis.

В данной работе были выделены экстракты низкомолекулярных белковых фракций из ацетонового порошка гепатопанкреаса краба-стригуна и гепатопанкреаса камчатского краба, получение которого включало стадию водной экстракции, которая, по нашим предположениям, позволила бы сохранить максимальное количество низкомолекулярных белков. Было проведено исследование их активности в отношении клеточной стенки грамположительной бактерии *M. lysodeikticus* и полисахарида клеточной стенки *M. lysodeikticus* методами зимографии и ¹H-ЯМР-спектроскопии. Методом аффинной хроматографии экстракта из гепатопанкреаса камчатского краба на гепарин-сефарозе была получена фракция белка, для которого также была оценена антибактериальная активность в отношении клеточной стенки грамположительной бактерии *M. lysodeikticus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Для экстракции веществ липидной природы при получении ацетонового порошка гепатопанкреаса использовали ацетон квалификации «осч» и н-бутиловый спирт квалификации «ч».

Для экстракции пептидов использовали ацетонитрил квалификации «осч», трифторуксусную кислоту квалификации «ч», дитиотреитол (ДТТ) (Sigma, США) и муравьиную кислоту квалификации «ч».

Реактивы для электрофореза: акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид, аммоний надсернокислый, глицин, глицерин — фирмы Amresco (США); додецилсульфат натрия — Fluka (Швейцария); тетраметилэтилендиамин, бромфеноловый синий, Кумасси R-250 — Serva (Германия); β-меркаптоэтанол, трис(гидроксиметил)аминометан — Sigma (США).

В качестве ЯМР-стандарта использовали 3-триметилсилил- $[2,2,3,3-^{2}H_{4}]$ пропионат натрия (Sigma, США). Тяжелая вода (D₂O, 99.9% дейтерирования) была фирмы Sigma (США).

Остальные химические вещества, используемые в эксперименте, такие как Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄, гидроксид натрия, хлорид натрия, ацетат натрия, имели квалификацию «чда».

Получение ацетонового порошка гепатопанкреаса камчатского краба. Перед использованием мороженый гепатопанкреас без размораживания измельчали на куттере, заливали охлажденным до -20°С ацетоном (соотношение по массе ГПК : ацетон = 1 : 8 – на 1 кг ГПК 10 л ацетона), выдерживали 15–20 ч в морозильной камере при -20°С и периодическом перемешивании. Затем суспензию фильтровали на нутч-фильтре через слой фильтровальной бумаги. Осадок собирали и повторяли экстракцию охлажденным ацетоном 2–3 раза по 1 ч до полного обесцвечивания фильтрата.

Далее осадок заливали охлажденным до -20° C н-бутанолом (1 : 10) и оставляли при периодическом перемешивании в морозильной камере на 15–20 ч. Суспензию отделяли от раствора фильтрованием и промывали охлажденным н-бутанолом аналогично обработке ацетоном.

После экстракции н-бутанолом повторяли обработку охлажденным ацетоном до полного удаления следов н-бутанола.

Промытый обезжиренный осадок белков сушили. Сушку выполняли предварительно в вакуумном сушильном шкафу ШСВ-45к (Медфизприбор, СССР) для удаления ацетона и окончательно в лиофильной сушилке Heto FD 8 (Hetoholten A/s, Дания) в течение 20 ч. Получали лиофилизированный комплексный ферментный препарат.

Для экстракции веществ липидной природы использовали ацетон квалификации «х.ч.» (ТУ 2633-018-44493179-98) и н-бутиловый спирт квалификации «ч» (ГОСТ 6006-78).

Получение ацетонового порошка гепатопанкреаса со стадией водной экстракции. 500 г гепатопанкреаса краба были разморожены до температуры около 0°С и гомогенизированы. Затем к гомогенату был добавлен 1 л дистиллированной воды (соотношение по массе ГПК и воды = 1:2). Смесь перемешивали в течение 30 мин, переносили в центрифужные пробирки приблизительно по 250-300 г в каждую и центрифугировали при температуре 2-4°C в течение 60 мин при 25000 об/мин. Водную фракцию собирали и сушили в сублиматоре при температуре от -25° C постепенным повышением до 25°С в течение 20 ч при вакууме не более 0.6 гПа. Сухой препарат промывали холодным ацетоном небольшими порциями 3-4 раза. Промытый препарат сушили в вакуумном сушильном шкафу при комнатной температуре в течение 3 ч.

Получали около 60 г сухого препарата из ГПК камчатского краба и около 50 г из ГПК крабастригуна.

Экстракция низкомолекулярных белковых фракций из ацетонового порошка гепатопанкреаса. Образцы экстрактов пептидов из ацетонового порошка гепатопанкреаса крабов получали двумя способами.

Первый способ был описан в работе [10]. Лиофилизированные образцы ацетонового порошка гепатопанкреаса камчатского краба (~100 мг) экстрагировали 10 объемами (об./об.) 60% (об./об.) ацетонитрила, содержащего 0.1% трифторуксусной кислоты, в течение 24 ч при 4°С. Супернатант собирали, хранили при 4°С и остаток еще раз экстрагировали в тех же условиях. Объединенные супернатанты инкубировали при -20°С в течение 1–2 ч, чтобы образовались две жидкие фазы – фаза, богатая ацетонитрилом, и фаза, богатая водой. Две фазы разделяли и хранили в замороженном виде при -20°С. Водный экстракт (нижняя фаза) лиофилизировали и для зи-

мографии растворяли в 50 мкл натрий-фосфатного буфера (25 мМ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 5.5).

Второй способ основан на методе получения пептидов для масс-спектрометрического анализа, описанного в работе [17].

Лиофилизат ацетонового порошка гепатопанкреаса камчатского краба растворяли при перемешивании в 2 мМ дитиотреитоле, содержащем 0.1% муравьиной кислоты. Раствор центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин при 4°С и отбирали супернатант, обогащенный пептидами, поскольку низкомолекулярные пептиды и белки более растворимы в 2 мМ дитиотреитоле, чем высокомолекулярные. Обогащенный пептидами супернатант лиофилизировали и для зимографии растворяли в 50 мкл натрий-фосфатного буфера, pH 5.5.

Зимография в полиакриламилном геле с додеиилсульфатом натрия. Зимографию для обнаружения гидролазной активности в отношении клеточной стенки проводили согласно протоколу [18]. Клеточная стенка *M. lysodeikticus* была предоставлена Опытным биотехнологическим производством ИБХ РАН. Препарат клеточной стенки M. lysodeikticus получали путем механического разрушения клеток, отделения клеточной стенки на центрифуге, ее промывки и сушки. Проводили электрофорез [19] полученных экстрактов ГПК в 16%-м полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, который был сополимеризован с клеточной стенкой (1 мг/мл). В качестве положительного контроля использовали лизоцим куриного белка HEWL (0.5 мг/мл) (Amresco, США). Ренатурацию проводили в буфере (25 мМ Трис-НСІ, рН 7.2), содержащем 1% (об./об.) Тритона Х-100, в течение двух часов при 37°С, последующее окрашивание раствором 0.01%-го метиленового синего с 0.01%-м КОН проводили в течение 20 мин с последующей отмывкой дистиллированной водой в течение 12 ч. При необходимости гель делили на две части, и вторую часть окрашивали красителем Кумасси R-250. Окраску осуществляли согласно процедуре, описанной в работе [18]. Для выявления активности при других значениях рН в качестве ренатурирующего буфера использовали 25 мМ натрий фосфатный буфер (рН 5.5) и 25 мМ Трис-HCl (pH 9.0), содержащие 1% (об./об.) Тритона Х-100. О наличии гидролазной активности судили по отсутствию окраски фона.

Анализ гидролазной активности образцов пептидов в отношении полисахарида клеточной стенки *M. lysodeikticus* методом ¹Н-ЯМР-спектроскопии. Полисахарид клеточной стенки был предоставлен Опытным биотехнологическим производством ИБХ РАН. Раствор полисахарида клеточной стенки получали из препарата клеточной стенки *M. lysodeikticus* путем его ферментативной обработки амидазой и одной стадии хроматографической очистки. Количество полисахарида измеряли антроновым методом определения восстанавливающих углеводов (по глюкозе) [20]. Образец содержал полисахарид в концентрации 3.3 мг/мл в буфере, содержащем 20 мМ ацетата натрия, 0.5 M NaCl, pH 5.5.

Для оценки гидролазной активности готовили следующие образцы (общий объем образца – 570 мкл): контроли – полисахарид (180 мкл полисахарида (3.3 мг/мл), 390 мкл 25 мМ натрий фосфатного буфера рН 5.5), экстракт ГПК крабастригуна, полученный с помощью ацетонитрила (10 мкл экстракта пептида, 560 мкл 25 мМ натрий фосфатного буфера, рН 5.5), и реакционную содержащую 50 мкл полисахарида смесь. (3.3 мг/мл). 10 мкл экстракта ГПК краба-стригуна и 510 мкл 25 мМ натрий фосфатного буфера, рН 5.5. Контроли и реакционная смесь инкубировались при 37°С в течение двух суток. Перед ЯМР-анализом к 570 мкл образцов добавляли 30 мкл стандарта – 4 мМ раствор 3-триметилсилил-[2,2,3,3-²H₄] пропионата натрия в 1 М фосфатном буфере (pH 7.2), содержащем D_2O .

Образцы (600 мкл) помещали в ЯМР-ампулу диаметром 5 мм. 1D-спектры регистрировали в ЦКП ИТЭБ РАН на ЯМР-спектрометре AVANCE III 600 фирмы Bruker (Германия) с рабочей частотой по протонам 598.95 МГц с использованием стандартных импульсных последовательностей из библиотеки импульсных последовательностей фирмы Bruker. Все измерения проводили при температуре 298 К (25°С). Для подавления сигнала от протонов воды использовали метод предварительного насыщения с применением 1D-импульсной последовательности ZGPR. Число накоплений составляло от 64 до 1024 сканов, интервал между сканами – 10 с, этого было достаточно для релаксации протонов. Для исследования кинетики гидролиза спектры регистрировали через определенные промежутки времени. Отнесение химических сдвигов проводили по сигналу стандарта при 0.00 м.д., выступающего в качестве внутреннего образца сравнения. Обработку спектров и вычисление интегралов проводили в программе TOPSPIN (Bruker). Для подтверждения результатов использовали спектральную базу данных программного обеспечения AMIX (Bruker).

Аффинная хроматография на гепарин-сефарозе экстракта низкомолекулярной белковой фракции из гепатопанкреаса камчатского краба. Для хроматографии использовали экстракт ГПК камчатского краба, полученный способом без стадии водной экстракции ГПК и выделенный из ацетонового порошка с помощью ацетонитрила и трифторуксусной кислоты. К лиофильно высушенному образцу добавляли 25 мМ натрий фосфатный буфер



Рис. 1. Исследование активности экстрактов ГПК крабов в отношении клеточной стенки M. lysodeikticus с помощью зимографии (инвертированное фото). Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы; 2 и 3 экстракты ГПК камчатского краба, полученные ацетонитрила помошью соответственно С И дитиотреитола, как описано в работе [13]; 4 и 5 экстракты ГПК камчатского краба, полученные ацетонитрила соответственно помошью С И дитиотреитола, при получении ГПК использовали стадию водной экстракции; 6 и 7 – экстракты ГПК краба-стригуна. полученные соответственно C помощью ацетонитрила и дитиотреитола, при получении ГПК использовали стадию водной экстракции.

(рН 7.0), центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин. супернатант пропускали через фильтр 0.45 мкм и наносили на колонку с гепарин-сефарозой (1 мл Heparin SepFast HighRes Column, BioToolomics, Великобритания), уравновешенной 25 мМ натрий фосфатным буфером (рН 7.0), промывали этим же буфером. Элюцию осуществляли градиентом хлорида натрия от 0 до 2 M NaCl. Хроматографические фракции анализировали на наличие белка в 16%-м полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, активность белка в отношении клеточной стенки детектировали методом зимографии [18]. Белковые фракции сходили с колонки при концентрации NaCl 1.2-1.7 М. Концентрация очищенного белка была оценена спектрофотометрически и составила 1.41 о.е./мл.

Турбидиметрический анализ активности в отношении клеточной стенки *М. lysodeikticus*. Поглощение суспензии клеточной стенки при 540 нм ($A_{540} = 1$) указывает примерно на 1 мг клеточной стенки/мл [18]. Очищенную клеточную стенку 0.99 *OD*₅₄₀ ресуспендировали в 3 мл буфера, необходимого для исследования. Конечное поглощение суспензии при 540 нм составляло 0.33. К 690 мкл суспензии клеточной стенки добавляли 10 мкл фракции белка, полученной с помощью аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе (1.41 о.е./мл). В качестве контроля использовали лизоцим (1 мг/мл), образец которого готовили таким же способом. Препараты инкубировали при 37°С. Через определенные промежутки времени измеряли поглощение при 540 нм во время инкубации. Турбидиметрический анализ проводили на спектрофотометре UV-2401 (Shimadzu, Япония).

Статистический анализ. Эксперименты повторяли, самостоятельно осуществляя процесс получения экстрактов и дальнейший их анализ, более трех раз.

Статистический анализ и построение графиков проводили в программе Sigma Plot 12.5 (Systat Software, Германия). Представленные данные турбидиметрического анализа были получены путем усреднения результатов трех отдельных экспериментов. Погрешности представляют собой стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было обнаружено, что в состав экстракта низкомолекулярной фракции белков, выделенного из ацетонового порошка гепатопанкреаса камчатского краба, получение которого не включало стадию водной экстракции, входит небольшой пептид (около 5 кДа), который гидролизует как клеточную стенку *M. lysodeikticus*, так и полисахарид клеточной стенки *M.lysodeikticus*, но не активен в отношении желатина [13].

В данной работе была проведена модификация метода получения лиофильно высушенного порошка гепатопанкреаса краба и добавлена стадия водной экстракции, что, исходя из наших предположений, позволило бы сохранить максимальное количество низкомолекулярных белков, так как после их экстракции сразу следовала сублимационная сушка, а затем промывка безводным ацетоном уже высушенного остатка, что исключало бы возможное растворение низкомолекулярных пептидов в водно-ацетоновом растворе при обработке влажного ГПК, как осуществлялось нами ранее.

С помощью этого метода были получены образцы ГПК камчатского краба и краба-стригуна. Методом зимографии был проведен анализ активности в отношении клеточной стенки грамположительной бактерии *M. lysodeikticus* экстрактов, выделенных из этих образцов с помощью ацетонитрила и трифторуксусной кислоты, а также с помощью дитиотреитола и муравьиной кислоты. В качестве контроля активности использовали экстракты ГПК камчатского краба, полученные без стадии водной экстракции, как описано нами ранее [13].

На рис. 1 представлена зимограмма, полученная для препаратов ГПК камчатского краба и краба-стригуна. Электрофорезный гель содержал в своем составе клеточную стенку (~1 мг/мл), а активность определяли по появлению белых полос в месте расщепления субстрата на зимограмме после ренатурации нанесенных белков при прокрашивании метиленовым синим. Для определения молекулярного веса использовали белковые маркеры с известными значениями молекулярных весов.

Как видно из рис. 1, модификация метода получения ГПК камчатского краба с включением дополнительного этапа водной экстракции приводит к исчезновению полос с ферментативной активностью в области 5 кДа, которые нами детектировались ранее [13], что может быть связано с их ферментативным гидролизом на стадии водной экстракции присутствующими в ГПК ферментами. В то же время, в экстракте краба-стригуна, полученном таким способом, обнаруживается активность в этой же области, что свидетельствует о том, что экстракты краба-стригуна обладают активностью в отношении клеточной стенки грамположительной бактерии *М. lysodeikticus*. Из рис. 2 можно видеть, что пептид из экстракта ГПК краба-стригуна немного меньше по размеру пептида с такой же активностью из ГПК камчатского краба.

Для того чтобы убедиться, что расщепление клеточной стенки пептидом, входящим в состав ГПК краба-стригуна, происходит по полисахаридным цепям пептидогликана, как и в случае камчатского краба [13], было проведено исследование его активности в отношении полисахарида клеточной стенки *M. lysodeikticus* (NAM-NAG) с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии. Анализ проводили для экстракта ГПК краба-стригуна, полученного с помощью ацетонитрила и трифторуксусной кислоты.

Были получены протонные ЯМР-спектры исходного полисахарида, экстракта низкомолекулярной белковой фракции, выделенной ацетонитрильным методом, в отсутствие полисахарида, и полисахарида после инкубации в течение двух дней при 37°С с экстрактом пептидов (рис. 3).

Как видно из приведенных спектров ЯМР (рис. 3), после инкубации с экстрактом ГПК краба-стригуна спектр полисахарида существенно менялся в области связанных ацетильных групп



Рис. 2. Анализ активности экстрактов ГПК крабов в отношении клеточной стенки *M. lysodeikticus* с помощью зимографии. Дорожки: *I* – маркеры молекулярного веса; *2* – положительный контроль – лизоцим куриного белка; *3* – экстракт ГПК крабастригуна, полученный с помощью ацетонитрила, при получении ГПК использовали стадию водной экстракции; *4* – экстракт ГПК камчатского краба, полученный с помощью ацетонитрила, ГПК получали без стадии водной экстракции, как описано в работе [13]. Гель прокрашен метиленовым синим.

и области аминогрупп, а также области сахарного кольца. Для экстракта в отсутствие полисахарида в этих областях сигналы не наблюдались. Следовательно, ЯМР-спектроскопия подтвердила расщепление полисахарида клеточной стенки экстрактом из ГПК краба-стригуна.

Обнаруженная гидролазная активность у пептидов, входящих в состав ГПК крабов, позволила предположить, что, вероятно, одним из способов их выделения может быть аффинная хроматография на гепарин-сефарозе, благодаря сродству к полисахаридам. Нами было проведено хроматографическое разделение на гепарин-сефарозе образца экстракта ГПК камчатского краба, полученного с помощью ацетонитрила и трифторуксусной кислоты, как описано нами в работе [13]. Полученные фракции анализировались на активность с помощью зимографии. К сожалению, разделение предполагаемых пептидов на колонке осуществить не удалось, но была обнаружена фракция, содержащая еще один потенциальный антибактериальный белок с молекулярным весом, близким к лизоциму. Данный белок сходил одним пиком и, по всей видимости, также расщеплял клеточную стенку, но по пептидным фрагментам, поскольку расщепление наблюдали только в части зимограммы, окрашенной краси-



Рис. 3. ¹Н-ЯМР-спектры гидролиза полисахарида клеточной стенки *M. lysodeikticus* экстрактом из ацетонового порошка ГПК краба-стригуна при рН 5.5 (представлены разные области спектра, в которых наблюдается изменение сигналов исходного полисахарида при расщеплении). NAM-NAG – полисахарид, состоящий из ковалентно сшитых N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) и N-ацетилглюкозамина (NAG).

телем Кумасси (рис. 4). Надо отметить, что сам белок прекрасно прокрашивался метиленовым синим, в то время как не окрашивался Кумасси. Такая особенность была обнаружена и у исследуемых нами пептидов из ГПК камчатского краба и краба-стригуна. Исходя из того, что метиленовый синий — катионный краситель, можно предположить, что исследуемые нами АМП представляют собой анионные пептиды, не содержащие аргинины, с которыми, в основном, реагирует краситель Кумасси, а также содержат в малом количестве или совсем не содержат гистидин, лизин, триптофан, тирозин и фенилаланин, с которыми данная краска также реагирует, хотя и слабее [21]. Следует добавить, что обнаруженный белок с молекулярной массой 14 кДа не относится к лизоцимам, которые хорошо окрашиваются красителем Кумасси.



Рис. 4. Исследование активности белковой фракции, выделенной методом аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе из гепатопанкреаса камчатского краба, в отношении клеточной стенки *M. lysodeikticus* с помощью зимографии. Дорожки *I* и *2* – прокрашивание метиленовым синим, дорожки *3*–*5*– прокрашивание Кумасси. Дорожки: *I* и *4* – белковая фракция с гепарин-сефарозы, *2* и *5* – проскок с колонки с гепарин-сефарозой, *3* – маркеры молекулярной массы.

Способность белка, выделенного с помощью гепарин-сефарозы, расщеплять клеточную стенку подтверждали методом турбидиметрии (рис. 5).

Как видно из полученных результатов инкубация клеточной стенки при 37°С с выделенным белком приводит к расщеплению клеточной стенки, о чем свидетельствует снижение мутности образца.

Вероятнее всего, обнаруженный белок относится к эндопептидазам, расщепляющим пептидогликан по пептидным фрагментам.

Таким образом, в гепатопанкреасе как камчатского краба, так и краба стригуна присутствуют пептиды и белки, способные расщеплять клеточную стенку грамположительных бактерий, что может свидетельствовать о наличии у них антибактериальной активности, что было показано нами ранее для пептида из ГПК камчатского краба [13].

Как известно, АМП могут представлять собой нативные биоактивные пептиды или пептиды, полученные из белка-предшественника путем эндогенного протеолиза. Например, в работе [22] описан нативный пептид пенаеидин, который был идентифицирован из гемоцитов морского ракообразного – белоногой креветки *Penaeus vannamei*. У крабов были обнаружены и другие нативные пептиды, богатые гидрофобными аминокислотами и обладающие противомикробной активностью: тахиплезин у мечехвоста *Tachypleus tridentatus*, гиастатин и аразин 1 у краба-паука

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024



Рис. 5. Кинетика расщепления клеточной стенки при рН 7.0 в присутствии белка из ГПК камчатского краба, элюированного с гепарин-сефарозы, и лизоцима куриного белка.

Hyas araneus, а также каллинектин у синего краба *Callinectes sapidus* [23–26].

В то же время, у берегового краба *С. maenas* был найден богатый пролином антибактериальный пептид, полученный путем эндогенного протеолиза [27].

Однако, несмотря на то, что спектр обнаруженных АМП крабов растет, большинство из них мало охарактеризовано. Нами в работе в ГПК краба-стригуна были обнаружены пептиды с молекулярной массой около 3—5 кДа, расщепляющие полисахаридные фрагменты пептидогликана и обладающие антибактериальной активностью. Также в ГПК камчатского краба обнаружен белок с молекулярной массой около 14 кДа, расщепляющий клеточную стенку, вероятно, путем гидролиза пептидных фрагментов пептидогликана. Надо заметить, что обнаруженные пептиды, скорее всего, относятся к анионным АМП.

В работе [15] при масс-спектрометрическом анализе биомассы краба-стригуна были обнаружены гидрофобные АМП, имеющие в своем составе медь и гликозидную часть. Эти пептиды имели отрицательный заряд, низкую молекулярную массу около 800 Да и оказывали антибактериальное действие против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Одна из гипотез происхождения такого типа пептидов состояла в том, что они получались из гликозилированных фрагментов гемоцианина, присутствующего в гемолимфе и/или гемоцитах. Гемоцианины известны как дыхательные белки, которые представляют собой металлопротеины, содержащие два атома меди, обратимо связывающие одну молекулу кислорода (O_2) . Было показано, что некоторые пептидные фрагменты, образующиеся из С-концевой части гемоцианина ракообразных, обладают противомикробным действием.

Сравнение по молекулярной массе, заряду и активности пока не позволило отнести обнаруженные нами пептиды к ранее известным АМП крабов. Поэтому предстоит еще дальнейшая работа по идентификации обнаруженных пептидов и белка из ГПК камчатского краба, что может иметь большое значение для расширения списка известных АМП и решения проблемы с бактериальной устойчивостью к противомикробным препаратам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основными промысловыми видами крабов в России являются камчатский краб (*Paralithodes camtschaticus*) и краб-стригун (*Chionoecetes opilio*). Несмотря на то, что оба относятся к отряду *Decapoda*, краб-стригун является истинным крабом, в то время как камчатский краб относится к крабоидам. К настоящему времени сведения о структуре и функциях бактериолитических ферментов этих крабов немногочисленны, любые исследования в этой области представляют научный интерес, так как вносят вклад в понимание, каким образом реализуется у них иммунная защита и какие белки играют в ней важную роль.

Результаты наших исследований показывают, что в ГПК камчатского краба и краба-стригуна присутствуют пептиды (~3–5 кДа), проявляющие антибактериальную активность благодаря расщеплению полисахарида в пептидогликане клеточной стенки бактерий. Кроме того, с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе был выделен белок (~14 кДа), также расщепляющий клеточную стенку. Идентификация обнаруженных АМП, установление механизма расщепления пептидогликана, подбор оптимальных условий для их активности требуют дальнейших исследований.

Следовательно, гепатопанкреас камчатского краба, представляющий собой отходы промысла крабов, может рассматриваться как источник новых АМП, которые могут стать основой для создания «природных» антибиотиков и помогут в решении проблемы антибиотикорезисте́нтности благодаря иному механизму действия на бактерии. АМП краба могут найти множество применений: в качестве биоконсервантов в пищевых продуктах, в кормах для животных, а также в медицинской сфере.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотруднику группы прикладной энзимологии ИБП ФИЦ ПНЦБИ РАН А.М. Лукину и сотруднику группы экспериментальных исследований и инженерии олигомерных структур ИБ РАН Г.А. Енину за помощь в проведении эксперимента.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00278 (задача, касающаяся обнаружения антибактериальной активности в ГПК камчатского краба и краба-стригуна).

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

- Bulet P., Stöcklin R., and Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, **198**, 169–184 (2004).
 DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x
- Schwab G. E., Reeves P. R., and Turner K. J. Bactericidal Activity of Serum of the Yabbie (*Parachaeraps bicarinatus*). Br. J. Exp. Pathol., 47 (3), 266–274 (1966). PMC2093715
- Stewart J. E. and Zwicker B. M. Natural and induced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*: products of hemocyte-plasma interaction. *Canad. J. Microbiol.*, **18** (9), 1499–1509 (1972). DOI: 10.1139/m72-229
- Chisholm J. R. S. and Smith V. J. Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *J. Marine Biol. Association of the United Kingdom*, **72** (3), 529–542 (1992). DOI: 10.1017/S0025315400059324
- Noga E. J., Arroll T. A., Bullis R. A., and Khoo L. Antibacterial activity in hemolymph of white shrimp *Penaeus setiferus. J. Mar. Biotechnol.*, 4 (3), 181–184 (1996).
- Smith V. J. and Dyrynda E. A. Antimicrobial proteins: from old proteins, new tricks. *Mol. Immunol.*, 68 (2 Pt B), 383–398 (2015). DOI: 10.1016/j.molimm.2015.08.009
- 7. Ponomareva T., Timchenko M., Filippov M., Lapaev S., and Sogorin E. Prospects of red king crab hepatopancreas processing: fundamental and applied

biochemistry. *Recycling*, **6** (1), 3 (2021). DOI: 10.3390/recycling6010003T

- Рысакова К. С., Новиков В. Ю., Шумская Н. В. и Мухортова А. М. Выделение хитиназ из гепатопанкреаса камчатского краба и краба-стригуна опилио. В сб. Матер. 16-й Всерос. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана (Росхит-23)» (Изд-во Дальневосточного федерального университета, Владивосток, 2023), сс. 55–59. DOI: 10.24866/7444-5553-8, EDN: YHTJSV
- Glyantsev S. P., Adamyan A. A., Vishnevsky A. V., and Sakharov Yu. Crab collagenase in wound debridement. *J. Wound Care*, 6 (1), 13–16 (1997). DOI: 10.12968/jowc.1997.6.1.13, EDN: SGNGPV
- Haug T., Kjuul A. K., Stensvåg K., Sandsdalen E., and Styrvold O. B. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunol.*, **12** (5), 371–385 (2002). DOI: 10.1006/fsim.2001.0378
- Moe M. K., Haug T., Sydnes M. O., Sperstad S. V., Li C., Vaagsfjord L. C., de la Vega E., and Stensvåg K. Paralithocins, antimicrobial peptides with unusual disulfide connectivity from the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. J. Natural Products, 81 (1), 140–150 (2018). DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00780
- Sperstad S. V., Haug T., Paulsen V., Rode T. M., Strandskog G., Solem S. T., Styrvold O. B., and Stensvåg K. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, Hyas araneus, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus. Devel. Compar. Immunol.*, 33 (4), 583–591 (2009). DOI: 10.1016/j.dci.2008.10.010
- Molchanov V., Yegorov A., Molchanov M., Timchenko A., Novikov V., Novojilov N., and Timchenko M. Novel Antimicrobial peptide from the hepatopancreas of the red king crab. *Int. J. Mol. Sci.*, 24 (21), 15607 (2023). DOI: 10.3390/ijms242115607
- Beaulieu L., Thibodeau J., Bryl P., and Carbonneau M. E. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (*Chionoecetes opilio*) by-product fractions: a source of high-valued biomolecules. *Bioresource Technol.*, **100** (13), 3332–3342 (2009). DOI: 10.1016/j.biortech.2009.01.073
- Beaulieu L., Thibodeau J., Desbiens M., Saint-Louis R., Zatylny-Gaudin C., and Thibault S. Evidence of antibacterial activities in peptide fractions originating from snow crab (Chionoecetes opilio) by-products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2 (3), 197–209 (2010). DOI: 10.1007/s12602-010-9043-6
- El Menif E., Offret C., Labrie S., and Beaulieu L. Identification of peptides implicated in antibacterial activity of snow crab hepatopancreas hydrolysates by a bioassay-guided fractionation approach combined with mass spectrometry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **11** (3), 1023–1033 (2019). DOI: 10.1007/s12602-018-9484-x
- 17. Fukutomi T., Kodera Y., Kogo T., Furudate S.-I., Omori A., and Maeda T. A simple method for peptide

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

purification as a basis for peptidome analysis. *J. Electro-phoresis*, **49** (1), 15–21 (2005). DOI: 10.2198/jelectroph.49.15

- Fukushima T. and Sekiguchi J. Zymographic techniques for the analysis of bacterial cell wall in bacillus. In *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J., 2016), vol. 1440, pp. 87–98. DOI: 10.1007/978-1-4939-3676-2 7
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685 (1970). DOI:10.1038/227680a0
- Fales F. W., Russell J. A., and Fain J. N. Some applications and limitations of the enzymic, reducing (Somogyi), and anthrone methods for estimating sugars. *Clin. Chem.*, 7, 389–403 (1961).
- Compton S. J. and Jones C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.*, 151 (2), 369–374 (1985). DOI: 10.1016/0003-2697(85)90190-3
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Dorsselaer A., Rodriguez J., and Bachère E. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.*, **272** (45), 28398–28406 (1997). DOI: 10.1074/jbc.272.45.28398
- Stensvåg K., Haug T., Sperstad S. V., Rekdal O., Indrevoll B., and Styrvold O. B. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus. Devel. Compar. Immunol.*, **32** (3), 275–285 (2008). DOI: 10.1016/j.dci.2007.06.002
- 24. Sperstad S. V., Haug T., Vasskog T., and Stensvåg K. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Molecular Immunol.*, **46** (13), 2604–2612 (2009). DOI: 10.1016/j.molimm.2009.05.002
- Noga E. J., Stone K. L., Wood A., Gordon W. L., and Robinette D. Primary structure and cellular localization of callinectin, an antimicrobial peptide from the blue crab. *Devel. Compar. Immunol.*, **35** (4), 409–415 (2011). DOI: 10.1016/j.dci.2010.11.015
- Kushibiki T., Kamiya M., Aizawa T., Kumaki Y., Kikukawa T., Mizuguchi M., Demura M., Kawabata S. I., and Kawano K. Interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics*, **1844** (3), 527–534 (2014). DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.12.017
- Schnapp D., Kemp G. D., and Smith V. J. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.*, 240 (3), 532–539 (1996). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0532h.x

Hepatopancreatic Proteins of Snow Crab and Red King Crab with Antibacterial Activity

V.G. Molchanov*, A.Y. Yegorov*, D.A. Osetrina*, V.Yu. Novikov**, N.M. Novojilov***, A.A. Timchenko****, E.A. Sogorin*****, and M.A. Timchenko*

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

> **Polar Branch of Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, ul. Akademika Knipovicha 6, Murmansk, 183038 Russia

***M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

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

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

Troughout their long history, crustaceans, despite lacking a highly specific vertebrate-like adaptive immune system, have successfully adapted to living within their environment rich in microorganisms, in part due to the presence of antimicrobial peptides. One valuable source of antimicrobial peptides is hepatopancreas, a waste product from crab fishery and its processing. Data from zymogram and ¹H NMR spectra showed that the extract of snow crab hepatopancreas contains a small peptide (about 3 kDa) that hydrolyzes the cell wall and the cell wall polysaccharide of *M. lysodeikticus*. The discovered peptide may be of interest for practical application. A protein (about 14 kDa), isolated from the red king crab hepatopancreas using affinity chromatography on heparin-Sepharose, is also active against the cell wall of the gram-positive bacterium *M. lyso-deikticus*, as it was demonstrated with zymography and turbidimetric methods.

Keywords: antimicrobial proteins and peptides, hepatopancreas, king crab, snow crab

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 612.821.6

ТЕТА-ОСЦИЛЛЯЦИИ И КОМПАРАТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ГИППОКАМПА

© 2024 г. В.Ф. Кичигина*, #

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия #E-mail: vkitchigina@gmail.com Поступила в редакцию 18.03.2024 г. После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 19.06.2024 г.

Обнаружение изменений/новизны окружающей среды имеет базовое значение для адаптивного поведения. Путем сравнения (компарации) текущего контекста с предыдущим, живые организмы могут делать прогнозы и корректировать свои действия. Механизмы и структуры мозга, участвующие в функции компарации, пока в достаточной мере не выяснены. Имеющиеся работы подчеркивают особый вклад гиппокампа в процесс компарации; указывается, что выявление новизны осуществляется нейронами гиппокампа посредством реализации механизмов совпадения-несовпадения, или рассогласования. Здесь мы приводим сведения о существующих гипотезах того, как реализуются эти механизмы, какие еще структуры мозга участвуют в обнаружении несоответствий, как они связаны с гиппокампом, и какие процессы этому способствуют. Предполагается, в частности, что не новизна сама по себе, а только та новизна, которая контрастирует с ранее приобретенным опытом, инициирует процесс рассогласования. Анализируются доводы о том, что решающую роль в функционировании гиппокампа как компаратора играет тета-ритм. Тета-осцилляции, вызванные появлением нового сигнала/изменением обстановки, опосредуют механизм временной координации структур, участвующих в функции сравнения. При компарации тета-ритм функционирует как активный фильтр: он участвует в отборе и пропуске нового сигнала в систему регистрации в гиппокампе. Возрастание тета-осцилляций и их когерентности в структурах мозга, обрабатывающих новую информацию, служит сигналом рассогласования, облегчающим изменение стратегии поведения. Кроме тета-ритма, гамма-осцилляции также участвуют в компарации: во время генерации тета-ритма в префронтальной коре, временное совпадение гамма-осцилляций в других областях мозга с определенной фазой тета-цикла может выполнять функцию компарации во время процесса запоминания. Глубокое понимание механизмов осуществления компараторной функции и ее нарушений может помочь в лечении таких патологий, как шизофрения, болезнь Альцгеймера, височная эпилепсия и многих других.

Ключевые слова: компарация, септо-гиппокампальная система, поведение, память, детекция новизны, рассогласование.

DOI: 10.31857/S0006302924040149, EDN: NGEUXB

Посвящается памяти заслуженного деятеля науки РФ Ольги Сергеевны Виноградовой (к 95-летию со дня рождения)

Выживание организма часто зависит от его способности обнаруживать изменения в окружающей обстановке и реагировать на неожиданные и потенциально угрожающие ему события [1–3]. Известно, что у животных существует механизм для эффективной обработки поступающей информации и выявления изменений путем сравнения (компарации) особенностей новой обстановки с предшествующим состоянием среды. Это позволяет им делать довольно точные прогнозы/предсказания относительно того, что случится вследствие «стандартного» поведения в новом окружении, и, как следствие, вносить в него необходимые изменения. С помощью механизма совпадения-несовпадения формируется персональный опыт, кодируемый и сохраняемый в эпизодической (автобиографической) памяти [4–6].

Функция компарации, осуществляемая мозгом, интенсивно изучается, однако ее механизмы и структуры, участвующие в ней, пока окончательно не выяснены. Уникальное анатомическое

Сокращения: МСДБ – медиальное септальное ядро и ядро диагонального пучка Брока, ЗИ – зубчатая извилина, ПФК – префронтальная кора, длПФК – дорзолатеральная префронтальная кора, фМРТ – функциональная магнитно-резонансная томография, ЛПП – локальные полевые потенциалы.



Рис. 1. Модели компаратора. (а) – Схематическое изображение мозга человека с обозначением основных структур, участвующих в процессе компарации. (б) – Компаратор в модели Виноградовой. Обозначения: МЭК – медиальная энторинальная кора, ЛЭК – латеральная энторинальная кора, Пресуб – пресубикулум, Суб – субикулум, ММТ – медиальное мамиллярное тело (часть гипоталамуса), АВТ – антеровентральное ядро таламуса, ЗЛК – задняя лимбическая кора, ЗИ – зубчатая извилина, МСДБ – медиальная септальная область, ЛС – латеральное септальное ядро, КШ – коллатерали Шаффера, РФ – ретикулярная формация, мЯШ – медианное ядро шва. Источники – работы [16, 19, 47]. (в) – Компаратор в модели Ньюмана. Обозначения: длПФК – дорзолатеральная префронтальная кора, ЗИ – зубчатая извилина. Источник – работа [6]. Пояснения в тексте.

строение, связи с другими областями мозга и пластические свойства гиппокампа делают его идеально подходящей структурой, выполняющей сравнение прошлого опыта и реального окружения (рис. 1a,б). Существуют различные гипотезы, моделирующие функцию компарации, которые рассматривают, кроме гиппокампа, и другие структуры мозга. Относительно центральной области, благодаря которой реализуется механизм совпадения-несовпадения, в литературе имеются противоречия.

Известно, что в новой обстановке или при поступлении нового сигнала в гиппокампе генерируются тета-осцилляции (сетевая синусоидальная активность, имеющая частоту от 4 до 12 Гц). В литературе имеется большой пласт работ, посвященных механизму происхождения и функциональному значению тета-ритма; предполагается, в частности, что ключевую роль в этих процессах играет часть передне-базального мозга, медиальная септальная область (медиальное септальное ядро и ядро диагонального пучка Брока – МСДБ) (см. работу [7]). Многие исследования о роли тета-ритма в работе гиппокампа опираются на особое значение этой осцилляторной активности в его компараторной функции. Однако остаются вопросы, в частности: 1) ограничено ли тетадиапазоном участие осцилляций в функции рассогласования, и 2) какую роль играет изменение выраженности ритмической активности в осушествлении компараторной функции. Выяснение существующих в данном аспекте проблем имеет большое значение, т.к. снижение способности выявления изменений/новизны в окружающей среде свидетельствует о когнитивных отклонениях, приводящих к развитию нейродегенеративных заболеваний. Понимание механизма компарации и его нарушений может помочь в терапии таких патологий, как шизофрения, болезнь Альцгеймера, височная эпилепсия и др.

В обзоре обсуждаются нерешенные вопросы и предложения по дальнейшим исследованиям.

ГИПОТЕЗЫ КОМПАРАТОРНОЙ ФУНКЦИИ МОЗГА

В нейрофизиологии использование термина «компаратор» чаще всего подразумевает клеточные механизмы, требуемые для сравнения ожидаемых результатов поведения с его фактическими результатами [8, 9]. Нейронные компараторы часто описываются как детекторы совпадения/несовпадения, так как они определяют, совпадает или не совпадает фактическое поведение с ожидаемым [10].

В одной из самых ранних работ, имеющих отношение к функции компарации [11], предполагалось, что ключевым моментом в поведении живых организмов является планирование, и что планирование имеет перспективную направленность на ожидаемый результат. Согласно автору этой работы Э. Фон Хольсту (E. Von Holst), фактические результаты запланированного (референтного) действия сравниваются в мозге с ожидаемыми результатами, закодированными в эфферентной копии; при этом планирование

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

возможно изменять в том случае, если поведение не соответствует ожидаемому.

Термин «компаратор» в физиологии был введен Дж. Миллером (G.A. Miller) с коллегами в 1960 г. для объяснения того, как организмы используют планирование действий для целенаправленных движений по когнитивным картам [12]. Модель, предложенная авторами, явилась связующим звеном между «когнитивными функциями и действием».

В России идея компарации развивалась в 60-х годах XX века П.К. Анохиным. Им была представлена модель планирования поведения, где подчеркивалась критическая важность компараторной системы для формирования будуще-го поведения; рассогласование между ожиданием и реальным результатом, как предполагалось, приводит к формированию новой программы действий [13].

Впервые предположение о гиппокампе как структуре, осуществляющей компараторную функцию в мозге, была выдвинута О.С. Виноградовой в 1970 г. [14]. При регистрации ответов нейронов поля САЗ гиппокампа на натуральные стимулы (звуковые тоны, вспышки, засветку помешения, шелчки и т.д.) у бодрствующих кроликов ею и ее коллегами было обнаружено, что гиппокампальные нейроны снижали или повышали частоту разрядов, но при повторном предъявления стимулов эти реакции затухали; однако изменение параметров стимула приводило к возобновлению реакций. В то же время нейроны входных структур, как со стороны ствола мозга, так и со стороны неокортекса, демонстрировали, как правило, незатухающие или усиливающиеся/формирующиеся по мере повторения сигналов реакции. Предполагалось, что эти нейроны гиппокампа детектировали отсутствие «конгруэнтности», или соответствия, т.е. наличие рассогласования (mismatch) между следовой системой (хранящейся информацией о сигнале) и действительным стимулом. Отсутствие или угасание реакций расценивалось как формирование такого соответствия (match). Основываясь на таком свойстве гиппокампальных нейронов. Виноградова выдвигала свою первоначальную гипотезу компаратора как «детектора новизны» [14, 15]. Позже идея о гиппокампе как компараторе сенсорных сигналов несколько раз обновлялась ею [16–19]. В качестве местоположения компаратора указывалось поле САЗ гиппокампа: именно в эту область поступают сигналы по двум входам: с одной стороны, от ствола мозга, являясь относительно «сырыми», и, с другой стороны, от неокортекса, уже детально проанализированные. От коры к гиппокампу сигналы поступают через перфорантный путь (идущий от энторинальной коры) и зубчатую извилину (ЗИ), в то время как от ствола мозга – через медиальную септальную область: мелиальное септальное ядро и ядро диагонального пучка Брока (МСДБ) (см. рис. 1а,б). Предполагалось, что через эти два входа информация поступает в гиппокамп упорядоченно во времени, а именно, от энторинальной коры сигналы поступают с некоторой задержкой по сравнению с таковыми, поступающими от МСДБ. Такая упорядоченность осуществляется благодаря тета-ритму, генерируемому в гиппокампе, что облегчает процесс сравнения [19] (детали см. в разделе «Тета-осцилляции как инструмент в осуществлении компараторной функции»). Система САЗ «открыта», когда градуально формирующийся кортикальный сигнал отсутствует или слаб; она «закрывается», когда кортикальный сигнал уже оформлен.

Примерно в то же время, когда О.С. Виноградова создавала свою гипотезу компарации (вторая половина XX века – начало XXI века), Р. Ньюман (R. Numan) разрабатывал свою концепцию, основанную на сравнении ожидаемого и реального результатов поведения, в которой значительное место также отводилось гиппокампу [20-22]. Ньюман фокусировал свою гипотезу на использовании плана действий, который он называл программой. При этом предполагалось, что, когда организм взаимодействует с окружающей обстановкой, механизм оценки эффективности двигательной программы базируется на обратной связи, извлеченной из результатов реальных действий. Ньюман полагал, что задний гиппокамп (дорзальный гиппокамп у не-приматов), дорзолатеральная префронтальная кора (длПФК, или ее гомолог у не-приматов), а также МСДБ являются центральными областями этой системы [6, 21–23]. Его гипотеза постулировала, что двигательная программа (план действия) составляется в длПФК, базируясь на текущем контексте, мотивационном и эмоциональном состояниях организма и на предыдущем опыте, хранящемся в памяти. Когда двигательная программа уже сформирована, длПФК передает эфферентную копию программы (в виде разряда) гиппокампу, где она временно хранится как рабочая память. Проведенный Ньюманом анализ предполагает, что и дл $\Pi \Phi K$, и гиппокамп хранят рабочую память для плана действия; при этом гиппокампальная рабочая память служит компаратором, чья функция – сигнализировать о соответствии или несоответствии информации, для усиления или модификации действия. В своей гипотезе Ньюман расположил компаратор в поле СА1 гиппокампа: «Область СА1 гиппокампа служит, по крайней мере частично, ассоциативным компаратором совпадений-несовпадений (associative match-mismatch comparator)» [23]. При этом он предполагал, что эфферентная копия, сформированная в длПФК и передаваемая в гиппокамп, сохраняется как рабочая память сначала в поле

САЗ, а затем, когда инициируется ответ, эта копия передается в поле СА1. Таким образом, в гиппокампе ожидаемый ответ (закодированный в эфферентной копии) сравнивается с реальным ответом, извлеченным при реафферентации. Если ожидаемый и реальный ответы совпадают, гиппокамп передает сигнал в длПФК для консолидации текущего плана действия. В случае несовпадения, ошибочный сигнал также передается в длПФК, но при этом возникающий сигнал ошибки приводит к формированию новой двигательной программы как следствию только что законченного действия. Когда двигательная программа начинает осуществляться, МСДБ активирует гиппокампальный тета-ритм, что инициирует реафферентацию (сенсорные изменения, зависящие от ответа), передаваемую гиппокампу, для сравнения с эфферентной копией [23] (см. рис. 1в).

В 1982 г. Дж. Грэй (J.A. Gray) [24] представил описание компараторной модели, подобной таковой у Ньюмана [21], однако Грей располагал компаратор в субикулуме (выходной области гиппокампа). Здесь информация о текущем сенсорном окружении и ожидаемых движениях в нем извлекалась из сенсорной ассоциативной коры и префронтальной коры соответственно. Эта информация передавалась к субикулуму через энторинальную кору. Предсказания об ожидаемых ответах/реакциях в поведении также передавались к субикулуму от таламуса, цингулума, височной и префронтальной областей коры. Таким образом, такой набор входов обеспечивал компаратор сенсорной информацией об окружающей обстановке, текущих и целевых двигательных программах и об ожидаемом изменении в поведении. Когда поведенческий акт инициировался, реальный (зависящий от окружения) ответ передавался через энторинальную кору к субикулуму для сравнения с ожидаемой реакцией. Если наблюдалось рассогласование между этими входами, ошибочный сигнал передавался к более высокоуровневым системам (предположительно в ПФК), которые прекращали или тормозили текущую программу действия. В случае же совпадения поддерживалась текущая двигательная программа.

И модель Ньюмана, и модель Грэя предполагали, что при компараторной дисфункции (невозможности определить несоответствие между ожидаемой и реальной реакцией в поведении, т.е. выявить ошибку) будет поддерживаться/сохраняться текущий план действия. Это приведет к возрастанию вероятности неизменности ответа, что является общим свойством у животных различных видов с повреждением септо-гиппокампальной системы. Ньюман в 1978 г. предположил [21], что повреждение септо-гиппокампальной системы ухудшает поведенческую гибкость как в пространственных, так и в непространственных задачах, если внешние ориентиры, помогающие изменить поведение, недоступны. Когда же заметные внешние сигналы доступны (т.е. в облегченной задаче, где ориентирами являются внешние «ключи»), животные могут успешно обнаруживать ошибки и поддерживать поведенческую гибкость через другие области мозга. даже когда септо-гиппокампальная система повреждена; поведение в этом случае регулируется сигналами окружающей среды [25]. Многочисленные эксперименты показали, что повреждение септо-гиппокампальной системы (МСДБ, свод, гиппокамп) не ухулшает выполнение залач, управляемых отчетливыми экстероцептивными сигналами [26-31], хотя это и не является универсальным (например, см. [32]).

M. Mosep (M.B. Moser) и Э. Mosep (E.I. Moser) с коллегами в 2002 г. [33] представили свои доказательства наличия детектора несоответствия и расположили его в поле СА1 гиппокампа крыс. Они регистрировали активность отдельных пирамидных нейронов в этом поле, а крысы в это время учились находить передвигаемую скрытую платформу в кольцевом водном лабиринте (т.е., в гиппокамп-зависимой задаче). После того, как крысы научались находить платформу, нейроны снижали частоту разрядов. Последующее перемещение платформы на новое место приводило к увеличению частоты клеточных разрядов; оно сохранялось до тех пор, пока крыса искала новое место. Авторы предполагали, что повышение активности вызвалось изменением в расположении площадки по сравнению с тем местом, о котором животное помнило. Однако клетки СА1 не увеличивали частоты разрядов, если платформа перемещалась в каждом тесте. Это позволило авторам предположить, что не новизна сама по себе (в данном случае, конкретное расположение платформы, когда ожидание отсутствовало), а только та новизна, которая контрастирует с ранее приобретенным опытом (изменение первоначального расположения площадки), вызывает повышение активности [33].

В серии уникальных экспериментов с использованием функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) у человека, Д. Кумаран (D. Kumaran) и Э. Магуир (E.A. Maguire) в 2006 г. также получили свидетельства ассоциативных процессов совпадения-несовпадения в гиппокампе [34]. Авторы предположили, что гиппокамп распознает новизну, сравнивая текущий сенсорный вход и информацию, хранящуюся в памяти; новизна определяется, когда сенсорный вход не совпадает с ожиданием, извлеченным из опыта. В этих экспериментах участников подвергали тесту, где знакомые предметы появлялись в новом временном порядке (форма временной ассоциативной новизны). При этом сначала

они рассматривали предметы в специфической последовательности (A > B > C > D). После этого участникам предъявляли те же объекты в одной из следующих последовательностей: той же са́мой (A > B > C > D), абсолютно другой (C > A > D > B), или частично отличающейся (A > B > D > C), где последние два объекта менялись местами. Авторы обнаружили, что активность в гиппокампе была наибольшей в случае частичной новизны (где менялись местами последние два объекта); в то же время активность при предъявлении абсолютно другой последовательности была такой же, как и при показе исходной. Эти результаты продемонстрировали, что активация гиппокампа была максимальной, когда взятые из опыта предсказания того, какой объект появится следующим в последовательности, нарушались сенсорной реальностью. Таким образом, в этой работе была установлена биологическая реальность ассоциативных вычислений совпалений-несовпалений в гиппокампе человека. Исследователи заключили (так же, как это было сделано в более ранней работе в экспериментах на крысах [33], см. выше), что гиппокамп не реагирует на новизну как таковую, а участвует только в ассоциативном процессе совпадения-несовпадения. В других аналогичных работах с использованием фМРТ с высоким разрешением у человека [10, 35] определяли ключевую область гиппокампа, ответственную за выявление совпадения-несовпадения. Было обнаружено, что только поле СА1 вовлечено в этот процесс.

Построение реалистичной модели нейрона поля CA1 гиппокампа [36] выявило, что она может воспроизводить ряд явлений и сигналы, описанные во многих исследованиях, которые послужили доказательством того, что именно поле CA1 является детектором несовпадения. В ней показано, что область CA1 гиппокампа действует как детектор ассоциативных несоответствий, сравнивая прогнозирующие сигналы от CA3 с сигналами от слоя III энторинальной коры, отражающими сенсорные входы.

Важно, что применение фМРТ, где изучалась активность многих структур мозга у человека [34], позволило выявить, что переринальная и энторинальная области коры отвечали активацией на *новизну как таковую*: там активация была одинаковой при абсолютно новой последовательности предметов и при частичном ее изменении. По-видимому, «задачей» этих регионов мозга была не компарация, а детальная обработка всех характеристик сигналов.

Дж. Лисман (J.E. Lisman) и А. Грейс (A.A. Grace) в 2005 г. также привели доказательства осуществления компарации в области СА1 дорзального гиппокампа крыс [37]. Их компаратор обнаруживает новизну, сравнивая ожидаемые

события, которые извлекаются из памяти и передаются в CA1 из CA3, с фактическими событиями (текущей реальностью), которые передаются в CA1 из неокортекса.

Д. Сантос-Пата (D. Santos-Pata) с коллегами в 2021 г. «поместили» компаратор в энторинальногиппокампальную сеть [38]. Основанием для этого было предположение о том, что энторинальная цепь обеспечивает конвергенцию корковых входных сигналов и выходных сигналов гиппокампа в пределах одной области. Такая конвергенция осуществляется благодаря существованию возвратного торможения от СА1 к СА3 и ЗИ [39], а также проекций от слоев IV-VI энторинальной коры к гранулярным и ГАМКергическим нейронам ЗИ и от более глубоких слоев энторинальной коры к СА1 [40]. Это, а также пластические свойства гиппокампальных связей и создают условия для реализации процесса «компарации» между корковыми входными сигналами и выходными сигналами гиппокампа [41]. В указанной работе авторы предполагали, что основные вычисления, выполняемые компараторной энторинальногиппокампальной сетью, нужны для минимизации несоответствия (mismatch) входа-выхода гиппокампа [38].

Анализ нейронной активности, регистрируемой О.С. Виноградовой и ее коллегами в разных областях гиппокампа и его входных структурах [19], показывает принципиальные различия между нейронами поля САЗ с равномерным мультимодальным, преимущественно тормозным типом реакций с быстрым угашением и СА1-субикулярными нейронами, существенная часть которых имеет фазические реакции и структурированные оп-ответы, в зависимости от характеристик стимулов. Эти различия являются результатом организации афферентных входов к СА1 и СА3. Анализ нейронных реакций во входных структурах гиппокампа, их электрическая стимуляция, и хроническое отключение показывают большую функциональную значимость входа от ретикулярной формации ствола мозга для длительных (тонических) реакций, характерных для нейронов поля САЗ. Этот входной сигнал перед поступлением в гиппокамп подвергается предварительной обработке в релейной структуре, МСДБ, где он становится более однородным. В этой работе также постулируется, что по другому входу (через энторинальную кору и пресубикулум) в гиппокамп поступает проанализированная в неокортексе информация (см. рис. 1б). Однако до входа в САЗ она дополнительно обрабатывается в зубчатой извилине, другой релейной структуре, где также происходит упрощение сигналов. В результате САЗ получает на свои два входа (от МСДБ и ЗИ) сообщения лишь о наличии и уровне входных сигналов в каждом из этих входов и выполняет относительно простые функции определения

совпадения/несовпадения их весов (match/mismatch). Для этой компараторной системы наличие сигнала на ретикуло-септальном входе эквивалентно качеству новизны. Кортикальный сигнал появляется с некоторой задержкой после его анализа в неокортексе и формирования в прегиппокампальных структурах; кроме того, задержка постепенно увеличивается за счет постепенных изменений, подобных длительной потенциации в синапсах перфорантного пути и ЗИ. Нейроны САЗ с потенциированными синапсами коркового входа не реагируют на сенсорные стимулы, т.е. повышенная эффективность корковых сигналов может расцениваться как «знакомость сигнала», прекращающая реакции нейронов САЗ. Целостность обоих входов необходима для постепенного «привыкания» (угашения) сенсорных реакций в гиппокампе. Таким образом, гиппокамп рассматривался как структура, необходимая для обнаружения ассоциативных несоответствий между тем, что ожидается на основе прошлого опыта, и текущими сенсорными данными [19].

ТЕТА-ОСЦИЛЛЯЦИИ КАК ИНСТРУМЕНТ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ КОМПАРАТОРНОЙ ФУНКЦИИ

Тета-ритм гиппокампа представляет собой сетевую синусоидальную активность в диапазоне от 4 до 12 Гц [42–46]. Экстраклеточные токи, лежащие в основе возникновения тета-осцилляций, генерируются в результате взаимодействия входов, идущих в гиппокамп со стороны неокортекса (через энторинальную кору) и ствола мозга (через МСДБ) и опосредуются потенциал-зависимыми Са²⁺-токами в дендритах пирамидных клеток гиппокампа [47] (рис. 2а).

ГАМКергические и холинергические проекции от МСДБ к гиппокампу (рис. 2а) играют решающую роль в генерации и регуляции тета-ритма [18, 40-42]. Повреждение или отключение МСДБ нарушает генерацию этого ритма [42, 43, 47-52] и приводит к поведенческим нарушениям, сходным с таковыми, возникающими при прямом повреждении гиппокампа [8, 49–51]. Тетаосцилляции обычно сопровождаются «гнездящимися» на тета-волне более высокочастотными гамма-осцилляциями (30–100 Гц) [46]. Выдвигалось множество гипотез о поведенческих коррелятах гиппокампального тета-ритма, в том числе: произвольное движение, обработка информации, сенсомоторная интеграция, обнаружение новизны, внимание и память (7, 19, 42, 43, 56, 57]. В 2002 г. Г. Бузаки (G. Buzsáki) приходит к выводу, что тета-цикл можно рассматривать как информационный квант, позволяющий обмениваться информацией взаимодействующим структурам благодаря фазовой синхронизации [43].



Рис. 2. Тета осцилляции в септо-гиппокампальной системе. (а) – Схема, демонстрирующая современные представления о механизмах генерации тета-ритма в гиппокампе. МСДБ представляет собой пейсмекер тета-ритма (эндогенными пейсмекерами являются ГАМКергические клетки), в то время как гиппокамп – источник ритмических токов, в сумме формирующих тета-осцилляции, регистрируемые в локальных полевых потенциалах (ЛПП) и электроэнцефалограммах. Пусковым моментом для их возникновения является поступление в мозг сенсорной информации, что вызывает возрастание количества нейронов МСДБ, работающих в тета-режиме. При достижении критического числа септальных нейронов, вовлеченных в ритмический процесс, возникают тета-осцилляции у ГАМКергических нейронов гиппокампа и глутаматергических клеток энторинальной коры. Вследствие этого на сомах и апикальных дендритах пирамидных нейронов гиппокампа генерируются соответственно ритмические тормозные и возбуждающие постсинаптические потенциалы. Благодаря этому пирамидный нейрон становится диполем: по нему начинает течь ток, причем источник тока находится на сомах пирамид, а сток – в слое апикальных дендритов. При наличии большого числа таких источников тока возникают полевые тета-осцилляции. Источники – работы [7, 39, 55, 57, 60, 61, 66]. (б) -Репрезентативная демонстрация изменений выраженности тета-осцилляций в активности нейрона МСДБ и ЛПП гиппокампа (в данном случае под влиянием активации адренорецепторов введением агониста альфа2-адренорецепторов клонидина и их блокады введением антагониста альфа2-адренорецепторов идазоксана): слева – демонстрация экстраклеточной регистрации активности нейрона МСДБ и ЛПП гиппокампа, посередине – графики спектральной плотности для ритмической активности нейрона, справа – графики спектральной плотности для ЛПП гиппокампа. Видны параллельные изменения мощности тета-осцилляций в активности нейрона МСДБ и ЛПП гиппокампа. Калибровка – 1 с, 0.5 мВ для ЛПП и 0.1 мВ для нейрона. Источники – работы [48, 69].

Еще в конце XX века было показано, что нейроны МСДБ обладают *эндогенным* свойством генерировать ритмические залпы потенциалов действия и регулярные одиночные разряды [54–61]. Виноградова и ее коллеги предполагали, что рандомизированная (неупорядоченная, «сырая») активность, идущая от ствола мозга, подвергаясь перед поступлением в гиппокамп предваритель-

ной обработке в МСДБ, становится частотно-модулированной в тета-диапазоне. При этом выраженность (мощность) тета-осцилляций в гиппокампе зависит от доли нейронов МСДБ, участвующих в ритмическом процессе, а его частота в пределах тета-диапазона (4-12 Гц) определяется частотой септальных залповых тета-разрядов [7, 19, 49]. Входные сигналы, идущие к МСДБ от глутаматергической ретикулярной формации, норадренергического синего пятна и дофаминергической вентральной тегментальной области ствола мозга, увеличивают как частоту септальных залпов, так и долю нейронов, участвующих в тета-активности, повышая выраженность тета-ритма в гиппокампе (см. рис. 26). В то же время серотонинергические ядра шва среднего мозга снижают ритмичность нейронов МСДБ и мощность тета-осцилляций в полевой активности гиппокампа [52, 66-73]. Основное влияние МСДБ на гиппокамп заключается в «сбросе» и «переустановке» текущей активности («reset»). При этом генерируется короткая тормозная пауза, имеющая ГАМКергическую природу, и запускается тета-модуляция текушей активности с четко установленной фазой тета-ритма (такую «переустановку» вызывает как стимуляция МСДБ, так и сенсорные стимулы). На фоне непрерывного тета-ритма, «reset» отсутствует и снижается реактивность нейронов гиппокампа как к электрической стимуляции входных путей, так и к сенсорным раздражителям [7, 19, 71] (рис. 3а). Предполагается, что тета-ритм имеет двойную функцию при обработке информации: 1) облегчает и продлевает действие раздражителей, поступающих в гиппокамп в фазу с одновременно запущенным тета-ритмом («фильтрация внутрь»), и 2) предотвращает прием интерферирующих сигналов, появляющихся в ходе уже текущих тета-осцилляций, вызванных предыдущим событием («фильтрация наружу»), что устраняет помехи при обработке и регистрации информации (рис. 36). Исходя из этого, тетаритм может рассматриваться как механизм избирательного внимания; он продлевает реакцию на выбранный стимул и одновременно защищает его обработку от помех, представляя собой необходимое условие для формирования следа памяти. Таким образом, кроме синхронизации обоих гиппокампальных входов, тета-осцилляции могут иметь дополнительную функцию, обеспечивая «временное окно» для обработки информации только при появлении сигналов с определенной «привязкой» к тета-ритму, что должно повысить точность работы компаратора [7, 19, 52].

К. Андерсон (К.L. Anderson) с коллегами регистрировали внутримозговую сетевую активность и обнаружили тета-когерентность (тета-синхронизацию с постоянным сдвигом фазы [74]) между латеральной ПФК и медиальной височной долей при вспоминании списка слов. В это время тетакогерентность между исследуемыми структурами была значительно выше, чем во время контрольной процедуры. Анализ причинно-следственной связи Грейнджера указывал на двунаправленность потока информации между этими областями, но с преобладанием влияния от медиальной височной доли к латеральной ПФК [74]. Эти результаты имеют важное значение, поскольку фазовая синхронизация осцилляторной активности между различными областями мозга облегчает как рабочую память, так и процессы долговременной памяти [75]. В аналогичной работе с участием людей [76] было сделано предположение, что тета-ритм в ПФК и временное совпадение гамма-осцилляций в других областях мозга с определенной фазой тета-цикла в ПФК может выполнять функцию компарации во время процесса рабочей памяти. Похожие результаты были получены в другой работе с участием людей [77], где было обнаружено более сильное возрастание мощности тета-ритма при точном определении местоположения предметов по сравнению с неточным выбором.

Показано, что во время нового обучения тетаритм, регистрируемый вдоль дорзо-вентральной оси гиппокампа, увеличивается по мощности [78-80]; это способствует возрастанию тета-когерентности между вентральным СА1/субикулумом и медиальной ПФК и поддерживает новое обучение [81]. Ньюман предполагал [6], что изменение/возрастание базового уровня мощности тета-осцилляций может сигнализировать, что компаратор «переместился» из САЗ в СА1. Сюда эфферентная копия поступает через трисинаптический путь (энторинальная кора > 3И > CA3 > > CA1) (см. рис. 1в), а когда инициируется действие, реальный сигнал передается через прямой путь: энторинальная кора > CA1. Эти два входа сравниваются в поле СА1 дорзального гиппокампа. Похожее событие обнаружили Д. Зоу (D. Zou) с соавторами в 2009 г. [82] и М. Айтаке (М. Aitake) с коллегами в 2011 г. [83]: при несовпадении (mismatch) между ожидаемым и реальным ответом, тета-ритм возрастает по сравнению с базовым уровнем. Авторы полагают, что, возможно, именно это возрастание тета-осцилляций служит сигналом рассогласования, облегчающим включение поведенческой реакции. В подтверждение этой идеи, С. Пенлей (S.C. Penley) с соавторами в 2013 г. показали, что и мощность тета, и его когерентность возрастали вдоль дорзовентральной оси гиппокампа, когда крысы пересекали новый лабиринт, что отличалось от того, что было в прежнем (знакомом) лабиринте [78]. Эти факты позволяют предполагать функциональную интеграцию такого ассоциативного несовпадающего сигнала вдоль всей дорзовентральной оси гиппо-



Рис. 3. Роль тета-осцилляций при компарации и отборе сигналов, поступающих в гиппокамп для регистрации и дальнейшего хранения в мозге. (а) – Изменения сенсорных реакций нейронов МС на фоне действия клонидина, усиливающего тета-осцилляции. Вверху – экстраклеточная регистрация реакции нейрона на свист в контроле и после возникновения непрерывных тета-осцилляций (вызванных инъекцией клонидина), приводящего к исчезновению ответа; калибровка – 1 с. Внизу – перестимульные гистограммы и растровые развертки нейронных реакций на сенсорные стимулы; верхние гистограммы: исчезновение активационного оп-ответа на тон, сопровождающегося в контроле повышением тета-модуляции (перед оп-ответом видно краткое торможение; после введения клонидина на первые два стимула оно воспроизводится, а затем реакция исчезает; нижние гистограммы: подавление тормозной реакции на щелчок. Отметки раздражителей (полосы и стрелки) – под записями нейронной активности и растрами. Бин – 100 мс. (б) – Схема, поясняющая функцию тета-осцилляций как активного фильтра при компарации и отборе сигналов. Поступление нового стимула вызывает возбуждение структур ствола, обеспечивающих уровень активации, необходимый для формирования в МСДБ синхронного ритмического сигнала, обеспечивающих уровень активации, необходимый для формирования в МСДБ синхронного ритмического сигнала, обеспечивающих уровень активации, необходимый и и тетаритма и сенсорный ответ, т.е. регистрацию нового стимула гиппокампальной сетью (фильтрация «внутрь»). Второстепенный стимул не вызывает реакции (фильтрация «наружу»), что предохраняет обработку предыдущего сигнала от интерференции. Дополнительные пояснения в тексте. Источники – работы [7, 19, 46, 48].

кампа. Если это так, этот несовпадающий сигнал может передаваться от вентрального CA1/субикулума по моносинаптическому пути к медиальной ПФК. Но как может план действия модифицироваться в длПФК? Тестируя людей, Дж. Кавана (J.F. Cavanagh) с коллегами в 2009 г. обнаружили, что тета-мощность возрастала в медиальной ПФК сразу после совершения ошибки, и что фазовая тета-когерентность между медиальной ПФК и длПФК в этой пробе также драматически возрастала при ошибке. Степень изменений тетамощности и синхронизации предсказывали ха-

рактер последующих корректировок поведения [84].

Учитывая эти факты, Ньюман полагал, что при формировании плана действия, составляемого в длПФК, и передачи его эфферентной копии (в виде разряда) в поле CA1 гиппокампа, являющегося ассоциативным компаратором совпадения-несовпадения (см. выше), возникающие в гиппокампе тета-осцилляции служат сигналом ошибки прогнозирования во время решения задач, зависящих от гиппокампа, благодаря которому происходит формирование новой двигательной программы [6, 23].

Однако сигнал ошибки также может регистрироваться в других областях мозга, в таких, как вентральная тегментальная область [85] и передняя цингулярная кора [86]. При помещении крыс в неожиданную для них обстановку, когда животные должны были менять стратегию поведения для получения вознаграждения, нейроны дорзомедиальной ПФК демонстрировали активность «распознавания» результатов измененного поведения, т.е. «предсказывали», успешным ли будет поведение, чтобы получить подкрепление [87]. Как механизм, предположительно работающий в гиппокампальной формации, взаимодействует с этими кортикальными и субкортикальными областями для обеспечения поведенческой гибкости и памяти, предстоит выяснить в будущих исследованиях.

Интересно, что Э. Ольвера-Кортес (Е. Olvera-Cortés) с коллегами в 2002 г. [88] и Ю. Сакимото (Y. Sakimoto) с соавторами в 2013 г. [89] обнаружили, что мощность тета-осцилляций возрастала, когда крысы выполняли гиппокамп-зависимую задачу, и не возрастала, когда они выполняли гиппокамп-независимую задачу. Таким образом, эти данные позволяют предположить, что, если гиппокамп не участвует в обучении, тета-ритм не является инструментом для компарации.

Независимо от мнений разных авторов о центральной области, где происходит процедура вычисления совпадения/несовпадения, компарация и отбор сигналов для регистрации и хранения в мозге несомненно осуществляется при непосредственном участии гиппокампальной системы; при этом тета-ритм координирует активность структур, участвующих в этой функции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чтобы извлечь значимую для поведения информацию из окружающей действительности, мозг постоянно интегрирует и сравнивает поступающие извне сенсорные сигналы с теми, которые хранятся в памяти. Подавляющее большинство гипотез о механизмах компарации указывает на ключевую роль гиппокампа в осуществлении этого процесса.

О.С. Виноградова впервые ассоциировала компаратор с гиппокампом. Она «поместила» его в поле САЗ, основываясь на том, что основной функцией этого поля является обнаружение новизны сигнала, а не детальное кодирование его свойств. В ее гипотезе нейроны гиппокампа, реагирующие на новые стимулы отчетливыми реакциями и возрастанием тета-ритма, тем самым детектируют несоответствие между следовой системой и действительным стимулом. В то же время угасание или отсутствие реакций, сопровождаемое ослаблением/исчезновением тета-осцилляций, расценивается как наличие или формирование соответствия. В работе компаратора тета-осцилляции опосредуют механизм временной координации областей мозга, связанных с гиппокампом. Кроме этого, при компарации тета-ритм является активным фильтром: он участвуют в отборе и пропуске нового сигнала в систему регистрации в гиппокампе. Компаратор Виноградовой был гипотетически построен на анализе и интерпретации нейронной активности гиппокампа и всех связанных с ним структур, исследование которых осуществлялось ее коллективом в течение 35 лет экспериментальной работы.

Создавая свою гипотезу компарации, Ньюман, как и Виноградова, расположил компаратор в гиппокампе, но поместил его при этом в поле СА1. Ньюман фокусировал свою гипотезу на использовании мозгом плана действий/программы, составляемой в длПФК, которая передается в конечном итоге в поле СА1 гиппокампа, где сохраняется в виде рабочей памяти. В гиппокампе ожидаемый ответ, закодированный в эфферентной копии, сравнивается с реальным ответом, и при совпадении консолидируется в длПФК; в случае несовпадения, сигнал ошибки в виде тетаритма приводит к формированию новой двигательной программы. Таким образом, по Ньюману, поле СА1 служит ассоциативным компаратором совпадений-несовпадений, а ПФК консолидирует старую программу или формирует новую программу действия соответственно. Тета-ритм, по предположению Ньюмана, активирует функцию сравнения, позволяя гиппокампу сопоставлять ожидаемые действия с их фактическими результатами: когда двигательная программа инициируется, МСДБ усиливает гиппокампальный тета-ритм; это активирует компаратор, что вызывает зависимые от реакции изменения, передаваемые в гиппокамп для сравнения с эфферентной копией. В своей окончательной версии гипотеза Ньюмана базировалась как на нейронных, так и на поведенческих экспериментальных данных.

Большинство других авторов также рассматривали поле CA1 гиппокампа как центральную область для осуществления компарации.

Дж. Грэй располагал компаратор в субикулуме, выходной области гиппокампа, где информация о текущем сенсорном окружении и ожидаемых действиях извлекалась из сенсорной ассоциативной коры и префронтальной коры соответственно. В его гипотезе консолидация или прекращение текущей программы действия осуществлялись в префронтальной коре. В этом отношении гипотезы Грэя и Ньюмана совпадают.

Недавние исследования позволили предположить, что компаратор находится в энторинальногиппокампальной сети. В этой модели пластические свойства гиппокампальных связей создают условия для реализации процесса сравнения между корковыми входными сигналами и выходными сигналами гиппокампа; при этом выполняемые компараторной энторинально-гиппокампальной сетью операции минимизируют несоответствия входа-выхода гиппокампа.

Таким образом, разные авторы расходятся во мнении относительно того, какая именно область гиппокампа является центральной в осуществлении компарации. Однако большинство данных, полученных в исследованиях с участием людей, в том числе с применением фМРТ с высоким разрешением, свидетельствуют о том, что поле СА1 гиппокампа является ключевой структурой, вовлеченной в процесс компарации. Интересно, что изучение активности многих структур мозга у человека с использованием фМРТ позволило выявить, что переринальная и энторинальная области неокортекса отвечают активацией на новизну как таковую. Возможно, что в этих регионах мозга осуществляется детальная обработка сигналов, в том числе и выделение любых новых признаков.

Относительно роли осцилляций в работе гиппокампа как компаратора большинство авторов сходится во мнении, что тета-ритм выполняет важную функцию временной координации структур, участвующих в функции сравнения. При планировании поведения и сравнении реальных результатов с ожидаемыми, закодированными в эфферентной копии, тета-ритм также опосредует процесс реафферентации, для сравнения с этой копией. Изменение стратегии поведения облегчается возрастанием тета-осцилляций и их когерентности во взаимосвязанных структурах, что служит сигналом рассогласования. Однако организация гиппокампом функции рассогласования не ограничена тета-диапазоном. Гаммаосцилляции также участвуют в компарации: во время генерации тета-ритма в ПФК, временное совпадение гамма-осцилляций в других областях мозга с определенной фазой тета-цикла может

выполнять функцию компарации во время процесса запоминания.

Снижение способности выявления изменений в окружающей обстановке свидетельствует о когнитивных отклонениях, приводящих к развитию нейродегенеративных заболеваний. Понимание механизмов осуществления компараторной функции и ее нарушений может помочь в лечении таких патологий, как шизофрения, болезнь Альцгеймера, височная эпилепсия и других.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mumford D. On the computational architecture of the neocortex. I. The role of the thalamo-cortical loop. *Biol. Cybern.*, 65, 135 (1991). DOI: 10.1007/BF00202389
- Mumford D. On the computational architecture of the neocortex. II. The role of cortico-cortical loops. *Biol. Cybern.*, 66, 241 (1992). DOI: 10.1007/BF00198477
- Friston K. A theory of cortical responses. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **360**, 815–836 (2005). DOI: 10.1098/rstb.2005.1622
- Garrido M. I., Sahani M., and Dolan R. J. Outlier Responses Reflect Sensitivity to Statistical Structure in the Human Brain. *PLoS Comput. Biol.*, 9 (3), e1002999 (2013). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002999
- Garrido M. I., Barnes G. R., Kumaran D., Maguire E. A., and Dolan R. J. Ventromedial prefrontal cortex drives hippocampal theta oscillations induced by mismatch computations. *NeuroImage*, **120**, 362–370 (2015). DOI: 10.1016/j.neuroimage.2015.07.016
- Numan R. A prefrontal-hippocampal comparator for goal-directed behavior: the intentional self and episodic memory. *Front Behav Neurosci.*, 9, 323 (2015). DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00323
- Vinogradova O. S. Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Progr. Neurobiol.*, 45 (6), 523 (1995). DOI: 10.1016/0301-0082(94)00051-i
- Numan R. Cortical-limbic mechanisms and response control: a theoretical review. *Physiol. Psychol.*, 6, 445 (1978). DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00323

- 9. Numan R. Septal modulation of the working memory for voluntary behavior. In: *The behavioral neuroscience of the septal region*. Ed. by R. Numan (Springer-Verlag, NewYork, 2000), pp. 298–326.
- Duncan K., Ketz N., Inati S. J., and Davachi L. Evidence for area CA1 as a match/mismatch detector: a high-resolution fMRI study of the human hippocampus. *Hippocampus*, 22, 389–398 (2012). DOI: 10.1002/hipo.20933
- Von Holst E. Relations between the central nervous system and the peripheral organs. *Br. J. Anim. Behav.*, 2 (3), 289–294 (1954).
 DOI: 10.1016/S0950-5601(54)80044-X
- 12. Miller G. A., Galanter E. and Pribram K. H. *Plans and the structure of behavior*, Ed. by H. Rinehart & Winston (New York, 1960).
- Anokhin P. K. Cybernetic sand the integrative activity of the brain. In: *A handbook of contemporary soviet psychology*, Ed. by M. Coleand and I. Maltzman (Basic-Books, New York, 1969), pp. 830–856.
- Vinogradova O. S. Registration of information and the limbic system. In: *Short-term changes in neural activity and behavior*, Ed. by G. Horn and R. A. Hinde (Cambridge University Press, Cambridge, 1970), pp. 95– 140.
- Виноградова О. С. Гиппокамп и память (Наука, М., 1975).
- Виноградова О. С., Бражник Е. С., Кичигина В. Ф. и Стафехина В. С. Роль афферентных входов в организации нейронной активности гиппокампа как компаратора. In: *Gagra Symp. Proc.*, vol. 7 (Mezniereba Publ. House, Tbilisi, 1981), pp. 288–307.
- Vinogradova O. S., Brazhnik E. S., Kitchigina V. F. and Stafekhina V. S. Acetylcholine, theta-rhythm and activity of the hippocampal neurons in the rabbit. IV. Sensory stimulation. *Neuroscience*, **53** (4), 993–1007 (1993). DOI: 10.1016/0306-4522(93)90484-w
- Vinogradova O. S. Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog. Neurobiol.*, 45 (6), 523–583 (1995). DOI: 10.1016/0301-0082(94)00051-i.
- Vinogradova O. S. Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus*, **11**, 578–598 (2001). DOI: 10.1002/hipo.1073
- Numan R. The effects of frontal and septal ablation on response regulation in the cat (Doctoral dissertation, University of Tennessee, 1972). *Dissertation Abstr. Int.*, 33 (11), 5545B–5546B (1973).
- Numan R. Cortical-limbic mechanisms and response control: a theoretical review. *Physiol. Psychol.*, 6, 445– 470 (1978). DOI: 10.3758/BF03326750
- Numan R. Septal modulation of the working memory for voluntary behavior. In: *The Behavioral Neuroscience* of the Septal Region, Ed. by R. Numan (Springer-Verlag, New York, 2000), pp. 298–326.

- 23. Numan R. The prefrontal-hippocampal comparator: volition and episodic memory. *Percept. Mot. Skills*, 128 (6), 2421–2447 (2021).
 DOI: 10.1177/00315125211041341
- 24. Gray J. A. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system* (Oxford University Press, New York, 1982).
- Griffiths K. R., Morris R. W., and Balleine B. W. Translational studies of goal-directed action as a framework for classifying deficits across psychiatric disorders. *Front. Syst. Neurosci.*, 8, 101 (2014). DOI: 10.3389/fnsys.2014.00101
- Eichenbaum H., Fagan A., Mathews P., and Cohen N. J. Hippocampal system dysfunction and odor discrimination learning in rats: impairmentor facilitation depending on representational demands. *Behav. Neurosci.*, **102**, 331–339 (1988). DOI: 10.1037/0735-7044.102.3.331
- Ennaceur A. and Meliani K. A new one-trial test for neurobiological studies of memoryinrats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav. Brain Res.*, 51, 83–92 (1992). DOI: 10.1016/s0166-4328(05)80315-8
- Kelsey J. E. and Vargas H. Medial septal lesions disrupt spatial, but not nonspatial, working memory in rats. *Behav. Neurosci.*, **107** (5), 65–574 (1993). DOI: 10.1037//0735-7044.107.4.565
- Cho Y. H. and Kesner R. P. Relational object association learning in rats with hippocampal lesions. *Behav. Brain Res.* 67, 91–98 (1995).
 DOI: 10.1016/0166-4328(94)00109-s
- Gaffan E. A., Bannerman D. M., Warburton E. C. and Aggleton J. P. Rats processing of visual scenes: effects of lesions to fornix, anterior thalamus, mammillary nuclei or the retrohippocampal region. *Behav. Brain Res.*, **121**, 103–11 (2001). DOI: 10.1016/0166-4328(94)00109-s
- Janisewicz A. M., and Baxter M. G. Transfer effects and conditional learning in rats with selective lesions of medial septal/diagonal band cholinergic neurons. *Behav. Neurosci.*, **117**, 1342–1352 (2003). DOI: 10.1037/0735-7044.117.6.1342
- 32. M'Harzi M. and Jarrard L. Effects of medial and lateral septal lesions on acquisition of a place and cue radial maze task. *Behav. Brain Res.*, 49, 159–165 (1992). DOI:10.1016/S0166-4328(05)80160-3
- Fyhn M., Molden S., Hollup S., Moser M. B. and Moser E. I. Hippocampal neurons responding to firsttime dislocation of a target object. *Neuron*, 35, 555–566 (2002). DOI: 10.1016/s0896-6273(02)00784-5
- 34. Kumaran D. and Maguire E. A. An unexpected sequence of events: Mismatch detection in the human hippocampus. *PLoS Biol.*, 4 (12), e424 (2006). DOI: 10.1371/journal.pbio.0040424
- Chen J., Olsen R. K., Preston A. R., Glover G. H., and Wagner A. D. Associative retrieval processes in the human medial temporal lobe: hippocampal retrieval suc-

cess and CA1 mismatch detection. *Learn. Mem.*, **18**, 523–528 (2011). DOI: 10.1101/lm.2135211

- Berteau S. and Bullock D. J. Simulations reveal how M-currents and memory-based inputs from CA3 enable single neuron mismatch detection for EC3 inputs to the CA1 subfield of hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 124, 544–556 (2020). DOI: 10.1152/jn.00238.2019
- Lisman J. E. and Grace A. A. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information in to longterm memory. *Neuron*, 46, 703–713 (2005). DOI: 10.1016/j.neuron.2005.05.002
- Santos-Pata D., Amil A. F., Raikov I. G., Rennó-Costa C., Mura A., Soltesz I., Verschure P. F. M. J. Entorhinal mismatch: a model of self-supervised learning in the hippocampus. *iScience*, 24 (4), 102364 (2021). DOI: 10.1016/j.isci.2021.102364
- Sik A., Ylinen A., Penttonen M. and Buzsáki G. Inhibitory CA1-CA3-hilar region feedback in the hippocampus. *Science*, 265, 1722–1724, (1994). DOI: 10.1126/science.8085161
- Melzer S., Michael M., Caputi A., Eliava M., Fuchs E. C., Whittington M. A., and Monyer H. Longrange-projecting gabaergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex. *Science*, 335, 1506–1510, (2012). DOI: 10.1126/science.1217139
- Lőrincz A. and Buzsáki G. Two-phase computational model training long-term memories in the entorhinalhippocampal region. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **911**, 83 (2000). DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06721.x
- Bland B. H. T. The medial septum: Node of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. In: *The behavioral neuroscience of the septal region*, Ed. by R. Numan (Springer-Verlag, 2000), pp. 115–145.
- 43. Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33, 325–340 (2002).
 DOI: 10.1016/s0896-6273(02)00586-x
- Lewis P. R. and Shute C. C. D. The cholinergicl imbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain*, **90**, 521–540 (1967). DOI: 10.1093/brain/90.3.521
- Amaral D. G. and Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic and non cholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 240, 37–59 (1985). DOI: 10.1002/cne.902400104
- Mysin I. A Model of the CA1 field rhythms. *ENEURO*, 8 (6), 0192-21.2021 (2021).
- Green J. D. and Arduini A. A. Hippocampal electrical activity in arousal. J. Neurophysiol., 17, 533–557 (1954). DOI: 10.1523/ENEURO.0192-21.2021
- Donovick P. J. Effects of localized septal lesions on hippocampal EEG activity and behavior in rats. J. Comp. Physiol. Psychol., 66, 569–578 (1968). DOI: 10.1037/h0026514

- 49. Бражник Е. С. и Виноградова О. С. Нейронная активность «изолированного гиппокампа». *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова*, **28**, 372 (1978).
- 50. Виноградова О. С., Бражник Е. С., Кичигина В. Ф. и Стафехина В. С. Тета-модуляция гиппокампальных нейронов у кролика и ее корреляция с другими параметрами спонтанной и вызванной активности. *Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*, **42**, 95–111 (1992).
- Кичигина В. Ф., Кудина Т. А., Зенченко К. И. и Виноградова О. С. Фоновая активность нейронов гиппокампа кролика при функциональном отключении структур, регулирующих тета-ритм. *Журн.* высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова, 48, 505–515 (1998).
- Кичигина В. Ф. Механизмы регуляции и функциональное значение тета-осцилляций в септо-гиппокампальной системе мозга. Дис. ... д-ра биол. наук (ИТЭБ РАН, Пущино, 2006).
- Olton D. S., Walker J. A. and Wolf W. A. A disconnection analysis of hippocampal function. *Brain Res.*, 233, 241–253 (1982). DOI: 10.1016/0006-8993(82)91200-8
- Walsh T. J. The medial septum and working/episodic memory. In *The behavioral neuroscience of the septal region*, Ed. by R. Numan (Springer-Verlag, New York, 2000), pp. 327–362.
- Pang K. C., Jiao X., Sinha S., Beck K. D. and Servatius R. J. Damage of GABA extinction of active avoidance: effects on proactive interference. *Hippocampus*, 21, 835–846 (2011). DOI: 10.1002/hipo.20799
- Vanderwolf C. H. Limbic-diencephalic mechanisms of voluntary movement. *Psychol. Rev.*, 78 (8), 3–113 (1971). DOI: 10.1037/h0030672
- Buzsáki G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus*, **15**, 827–840 (2005). DOI: 10.1002/hipo.20113
- Petsche H., Gogolak G., and Zwieten P. A. Rhythmicity of septal cell discharges at various levels of reticular excitation. EEG. *Clin. Neurophysiol.* **19**, 25–33 (1965). DOI: 10.1016/0013-4694(65)90004-0
- Бражник Е. С. и Виноградова О. С. Влияние полной подрезки септум на активность ее нейронов. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова, 30, 141– 152 (1980).
- 60. Бражник Е. С. Сравнительные характеристики залповых нейронов септум при устранении восходящих влияний ретикулярной формации у кроликов (хирургическими и фармакологическими воздействиями). Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова, **36**, 721–729 (1986).
- 61. Stewart M. and Fox S. E. Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci.*, **13** (5), 163–168 (1990). DOI: 10.1016/0166-2236(90)90040-h
- 62. Kitchigina V. F., Vinogradova O. S., and Bragin A. G. Neuronal activity of the septum transplanted into the neocortical barrel field of the rat. *Restorative Neurology*
& *Neurosci.*, **2**, 109–122 (1991). DOI: 10.3233/RNN-1991-2301

- Sweeney J. E., Lamour Y., and Bassant M. H. Arousaldependent properties of medial septal neurons in the ananesthetized rat. *Neuroscience*, 48, 353–362 (1992). DOI: 10.1016/0306-4522(92)90495-n
- 64. Brazhnik E. S. and Fox S. E. Intracellular recordings from medial septal neurons during hippocampal theta rhythm. *Exp. Brain Res.*, **114**, 442–453 (1997). DOI: 10.1007/pl00005653
- Vinogradova O. S., Kitchigina V. F., and Zenchenko C. I. Pacemaker neurons of the forebrain medial septal area and theta rhythm of the hippocampus. *Membr. Cell. Biol.*, **11**, 715–725 (1998). PMID: 9718568
- 66. Segal M. and Bloom F. E. The action of norepinephrine in the rat hippocampus. III. Hippocampal cellular responses to locus coeruleus stimulation in the awake rat. *Brain Res.*, **107** (3), 499–511 (1976). DOI: 10.1016/0006-8993(76)90140-2
- Yamomoto T., Watanabe S., Oishi R., and Ueki S. Effects of midbrain raphe stimulation and lesion on EEG activity in rats. *Brain Res. Bull.*, 4, 491–495 (1977). DOI: 10.1016/0361-9230(79)90033-9
- Бражник Е. С., Виноградова О. С., Стафехина В. С. и Кичигина В. Ф. Спонтанная активность гиппокампальных нейронов во время модуляции тетаритма холинергическими веществами. *Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*, **42** (5), 944– 954 (1992).
- Кичигина В. Ф. и Гордеева Т. А. Регуляция септального пейсмекера тета-ритма ядрами шва среднего мозга. *Журн. высш. нерв. деятельности им.* И.П. Павлова, 45, 848–859 (1995).
- Vertes R. P. and Kocsis B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal system controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, **81** (4), 893–926 (1997). DOI: 10.1016/s0306-4522(97)00239-x
- Vinogradova O. S., Kitchigina V. F., Kudina T. A., and Zhenchenko K. I. Spontaneous activity and sensory responses of hippocampal neurons during persistent theta rhythm evoked by median raphe nucleus blockade in rabbit. *Neuroscience*, 94, 745–753 (1999). DOI: 10.1016/s0306-4522(99)00253-5
- Кичигина В. Ф. и Кутырева Е. В. Модуляция тетаактивности в септо-гиппокампальной системе агонистов альфа2-адренорецепторов клонидином. *Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*, 52, 195–204 (2002).
- 73. Kitchigina V. F., Kutyreva E. V. and Brazhnik E. S. Modulation of theta rhythmicity in the medial septal neurons and hippocampal EEG in the awake rabbit via actions at noradrenergic α2-receptors. *Neuroscience*, **120**, 509–521 (2003). DOI: 10.1016/s0306-4522(03)00331-2
- 74. Anderson K. L., Rajagovindan R., Ghacibeh G. A., Meador K. J., and Ding M. Theta oscillations mediate interaction between prefrontal cortex and medial tem-

poral lobe in human memory. *Cereb. Cortex*, **20**, 1604–1612 (2010). DOI: 10.1093/cercor/bhp223

- Fell J. and Axmacher N. The role of phase synchronization in memory processes. *Nat. Rev. Neurosci.*, 12, 105–118 (2011). DOI: 10.1038/nrn2979
- 76. Sauseng P., Griesmayr B., Freunberger R. and Klimesch W. Control mechanisms in working memory: a possible function of EEG theta oscillations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 1015–1022 (2010). DOI: 10.1016/j.neubiorev.2009.12.006
- 77. Kaplan R., Doeller C.F., Barnes G.R., Litvak V., Düzel E., Bandettini P.A. and Burgess N. Movementrelated theta rhythm in humans: coordinating self-directed hippocampal learning. *PLoS. Biol.*, **10**, e1001267 (2012). DOI: 10.1371/journal.pbio.1001267
- Penley S. C., Hinman J. R., Long L. L., Markus E. J., Escabí M. A., and Chrobak J. J. Novel space alters theta and gamma synchrony across the longitudinal axis of the hippocampus. *Front. Syst. Neurosci.*, 7, 20. (2013). DOI: 10.3389/fnsys.2013.00020
- 79. Yang S., Yang S., Moreira T., Hoffman G., Carlson G. C., Bender K. J., Bradley A. E., and Tang C.-M. Interlamellar CA1 network in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 12919–12924 (2014). DOI: 10.1073/pnas.1405468111
- Long L. L., Bunce J. G., and Chrobak J. J. Theta variation and spatiotemporal scaling along the septotemporal axis of the hippocampus. *Front. Syst. Neurosci.*, 9, 37 (2015). DOI: 10.3389/fnsys.2015.00037
- Benchenane K., Peyrache A., Khamassi M., Tierney P. L., Gioanni Y., Battaglia F. P., and Wiener S. I. Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal-prefrontal network upon learning. *Neuron*, 66, 921–936 (2010). DOI: 10.1016/j.neuron.2010.05.013
- Zou D., Aitake M., Hori E., Umeno K., Fukuda M., Ono T., and Nishijo H. Rat hippocampal theta rhythm during sensory mismatch. *Hippocampus*, **19**, 350–359 (2009). DOI: 10.1002/hipo.20524
- Aitake M., Hori E., Matsumoto J., Umeno K., Fukuda M., Ono T., and Nishijo H. Sensory mismatch induces autonomic responses associated with hippocampal theta waves in rats. *Behav. Brain Res.*, **220**, 244–253 (2011). DOI: 10.1016/j.bbr.2011.02.011
- Cavanagh J. F., Cohen M. X., and Allen J. J. Prelude to and resolution of anerror: EEG phase synchrony reveals cognitive control dynamics during action monitoring. *J. Neurosci.*, 29, 98–105 (2009).
 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4137-08.2009
- Del Arco A., Park J., Wood J., Kim Y., and Moghaddam B. Adaptive encoding of outcome prediction by prefrontal cortex ensembles supports behavioral flexibility. *J. Neurosci.*, **37** (35), 8363–8373 (2017). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0450-17.2017
- 86. Schultz W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, **36**, 241–263 (2002).

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

834

- 87. Holroyd C. B. and Coles M. G. The neural basis of human error processing: reinforcement learning, dopamine, and the error-related negativity. *Psychol. Rev.*, 109, 67–709 (2002).
 DOI: 10.1037/0033-295X.109.4.679
- 88. Olvera-Cortés E., Cervantes M., and Gonzalez-Burgos I., Place-learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats.

Brain Res. Bull., **58**, 261 (2002). DOI: 10.1016/s0361-9230(02)00769-4

 Sakimoto Y., Hattori M., Takeda K., Okada K., Sakata S. Hippocampal theta wave activity during configural and non-configural tasks in rats. *Exp. Brain Res.*, 225, 177–185 (2013). DOI: 10.1007/s00221-012-3359-2

Theta Oscillations and Comparator Function of the Hippocampus

V.F. Kitchigina*

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

Responses triggered by change/novelty of the stimuli are fundamental to adaptive behavior. By comparing the current observation with the previous one, living organisms can make predictions and change their actions. Brain mechanisms and its structures involved in the comparator function have not yet been fully elucidated. The evidence accumulated emphasizes the particular importance of the hippocampus in the comparator system; it is shown that novelty detection is carried out by hippocampal neurons through the implementation of the match-mismatch mechanism or divergence. This paper includes information on existing hypotheses that propose how these mechanisms are implemented, what other brain structures are involved in mismatch detection, how they are connected to the hippocampus, and what processes contribute to this function. It is assumed, in particular, that it is not novelty per se, but rather that one that contrasts with previously acquired experience and initiates the process of divergence. The arguments are analyzed that the theta rhythm plays a key role in the functioning of the hippocampus as a comparator. Theta oscillations caused by the appearance of a new signal/change in the environment, mediate, in particular, the mechanism of temporal coordination of structures involved in the comparator function. In the comparator system, the theta rhythm acts as a filter: it participates in the selection and transmission of a new signal to registration of information in the hippocampus. Increases in theta oscillations and their coherence in brain structures that process new information serve as a signal of mismatch, facilitating a change in behavioral strategy. Gamma-oscillations, like the theta rhythm, also play a significant role in the comparator system: during generation of the theta rhythm in the prefrontal cortex, temporal coincidence of gamma-oscillations in other brain regions with certain phase of the thetha cycle may serve as the comparator function in the process of memorization. A deeper understanding of the mechanisms of the comparator function or mechanisms of its damage will give us a better idea about the treatment of disorders, such as schizophrenia, Alzheimer's disease, temporal lobe epilepsy and many others.

Keywords: comparator, septo-hippocampal system, behavior, memory, novelty detection, divergence

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 576.5

АДРЕНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИИ МИОКАРДА И СОСУДОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ

© 2024 г. М.Х. Галимова^{*, #}, А.С. Аверин^{**}

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия **Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия #E-mail: mgalimova@mail.ru Поступила в редакцию 15.03.2024 г.

После доработки 15.03.2024 г. Принята к публикации 19.06.2024 г.

Регуляция работы сердечно-сосудистой системы в условиях гипотермии и после ее воздействия является одной из важных и актуальных задач медико-биологических исследований. Это связано как с тяжелыми последствиями перенесенной гипотермии, так и с потенциальными преимуществами, которые дает ее использование в медицинских целях. Адренергическая регуляция является ключевой для нормального функционирования сердечно-сосудистой системы. Существует три группы адренергических рецепторов: $\alpha 1$, $\alpha 2$ и β , которые в разной пропорции экспрессируются в миокарде и кровеносных сосудах. Активация каждого из подтипов адренорецепторов может вызывать разнонаправленные эффекты, которые в значительной степени модифицируются в условиях пониженной температуры. Эффективность β-адренергической стимуляции снижается и даже может действовать однонаправленно с гипотермией, приводя к нарушениям в работе миокарда. Выраженность эффектов α 1-адреноагонистов в сердце и сосудах также снижается, однако чувствительность к стимуляции αla-рецепторов в сосудах может возрастать. Активация данного типа рецепторов имеет кардиопротективный эффект. Широкий спектр кардиопротективных эффектов дает также активация α2-адренорецепторов. Вместе с тем в настоящее время появляется все больше свидетельств прямых инотропных и сосудистых эффектов, опосредуемых этим типом рецепторов. Имеются отдельные свидетельства, показывающие усиление данных эффектов в условиях гипотермии. В представленном обзоре рассмотрено современное состояние исследования эффектов стимуляции отдельных типов адренорецепторов в условиях нормы и гипотермии. Проанализированы механизмы физиологического действия и перспективы их дальнейших исследований.

Ключевые слова: миокард, кровеносные сосуды, гипотермия, адренергические рецепторы.

DOI: 10.31857/S0006302924040153, EDN: NGESBZ

Известно, что гипотермия может как предоставлять значительные возможности по снижению уровня метаболизма и предотвращения повреждений ткани, так и нести серьезную угрозу жизни в случаях непреднамеренной гипотермии. Это делает вопрос изучения регуляции сердечнососудистой системы в условиях глубокой гипотермии крайне актуальным. С одной стороны, снижение сердечного выброса указывает на необходимость использовать кардиотоники, с другой — на фармакологические инструменты коррекции тонуса сосудов. В процессе гипотермии/разогревания миокард может получать повреждения, что делает более предпочтительным использование сигнальных каскадов, не только регулирующих сократимость, но и обеспечивающих кардиопротекцию.

Широко известно: глубокая гипотермия ведет к множественным рассогласованиям в работе сердечно-сосудистой системы, что затрудняет контроль над физиологическими параметрами пациентов, переживших переохлаждение. Это может быть обусловлено как снижением афинности отдельных биологически активных веществ, так и различной температурной устойчивостью сигнальных каскадов, опосредующих их влияние. В настоящее время остается нерешенным вопрос об оптимальных подходах к поддержке сократимости сердца и контролю тонуса сосудов в условиях гипотермии. Есть основания полагать, что

Сокращение: АР – адренергические рецепторы.

среди адренергических сигнальных путей могут быть выявлены наиболее устойчивые к гипотермии, обладающие кардиопротекторными свойствами.

Исследование особенностей регуляции сердечно-сосудистой системы в условиях гипотермии имеет большое значение в связи с тем, что, с одной стороны, накоплено много подходов, в которых снижение температуры тела позволяет уменьшить повреждения тканей в различных условиях, например: гипотермия может смягчать неврологические и кардиологические последствия остановки сердца как в экспериментах на животных [1], так и в клинической практике [2-4]. С другой стороны, в случае непреднамеренной гипотермии, несмотря на значительные успехи медицины и применение таких методик, как экстракорпоральная мембранная оксигенация или сердечно-легочный обход, выживаемость пациентов с гипотермией составляет 30-40% [5].

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА СИЛУ Сокращений миокарда и тоническое напряжение сосудов

При понижении температуры происходит рост силы сокращения, как описано в литературе для миокарда морской свинки [6, 7] и для большого числа других животных: собак [8], кроликов и крыс [9] с максимумом около 20°С. При дальнейшем снижении температуры сократимость начинает уменьшаться, при этом кардиомиоциты испытывают Ca²⁺-перегрузку [7, 10], происходит увеличение продукции активных форм кислорода [11], что, по-видимому, и приводит к снижению сократимости после разогревания [12, 13].

Снижение температуры приводит к расслаблению гладкой мускулатуры центральных сосудов, таких как грудная аорта и сонные артерии [14— 16]. В то же время, встречаются сообщения о повышении тонического напряжения в ответ на охлаждение в почечной артерии свиньи [17] и коронарных артериях ягнят [18]. Существуют предположения, что за подобные различия могут отвечать как разного рода холодовые рецепторы [15], так и различия в структуре ткани, в частности, большая доля эластиновых волокон способствует вазорелаксантному эффекту гипотермии [19].

Адреналин-норадреналин. Общепризнано, что адренергическая регуляция является ключевой для сердечно-сосудистой системы. В настоящее время выделяется 3 группы адренергических рецепторов (AP): α1, α2 и β. Внутри каждой подгруппы выделяют по 3 основных подтипа [20]. Наиболее физиологичными активаторами AP является связка адреналин-норадреналин, при этом они могут с разной эффективностью взаимодействовать со всеми 3 типами адренорецепторов, соотношение которых меняется в зависимости от типа ткани [21–26]. В связи с этим физиологические эффекты могут значительно отличаться.

α1-Адренергические рецепторы. В миокарде α1-АР представлены в существенно меньшем количестве, нежели β-АР. Однако, несмотря на это, они играют большую роль в регуляции сократимости, трофики и ремоделирования миокардиальной ткани [25, 27]. В миокарде большинства животных экспрессируются все 3 изоформы: α1a, αlb и αld, но пропорции между ними и распределение по отделам сердна может существенно отличаться. На общем фоне выделяется миокард крысы, содержащий примерно в 10 раз больше α1-АР по сравнению с миокардом других животных [25, 27]. С одной стороны, это накладывает определенные ограничения на перенос полученных результатов на миокард человека, с другой – делает миокард крысы особенно интересным для изучения функции α1-АР, которые, как было показано в нашей лаборатории, играют значительную роль в регуляции сердца и сосудов гибернирующих животных [28], для которых характерно периодическое погружение в состояние спячки с гипотермией до околонулевых значений. Активация α1-АР может приводить как к отрицательному, так и к положительному инотропному эффекту [29-31].

Стимуляция αla-AP вызывает рост сократимости миокарда [32, 33], причем рост сохраняется даже в патологическом миокарде [34, 35]. Однако, в миокарде кролика αla-агонист A61603 вызывал отрицательный инотропный эффект [36]. Положительный инотропный ответ также обеспечивает и αlb-AP [32, 33, 37]. Активация αld-AP, напротив, ведет к снижению силы сокращений левого желудочка [38].

Среди трех подтипов α 1-АР выраженный кардиопротекторный потенциал был показан для нескольких агонистов α 1а-АР [34–36]. В то время как активация всей популяции α 1-АР может запускать воспалительный процесс в сердце [39, 40], неселективное блокирование ведет к значительному увеличению риска развития сердечной патологии [41].

В сосудах, так же как и в миокарде, экспрессируются все три подтипа αla-AP. Все они вызывают вазоконстрикторный эффект, при этом пропорции между количеством тех или иных рецепторов зависят от типа сосуда и вида исследуемого животного. В аорте крысы доминирует αld-AP [42], хотя в сократительном ответе на метаболиты адреналина значительная часть обеспечена активацией αla-AP [43], при этом αla-AP ответственны за выброс NO эндотелиоцитами [44]. В условиях гипотермии данные литературы об ответе на фенилэфрин весьма противоречивы. В предсердиях морской свинки возможно как усиление положительного инотропного и хронотропного эффектов [45], так и их ослабление [46]. В миокарде мыши в нормотермных условиях фенилэфрин приводил к двум разнонаправленным эффектам: снижению сократимости и увеличению Ca²⁺-тока L-типа – в исследовании при 22°C оба эти эффекта ослабевали [47]. В миокарде кролика снижение температуры до 32°C не изменяло итоговой величины роста силы сокращения, но приводило к смещению концентрационной кривой вправо [48].

В работах на сосудистых препаратах было показано потенцирование ответа на α1-стимуляцию, причем субтип специфически α1а-изоформы (преобладает в хвостовой артерии), в то время как субтип α1d-изоформы (преобладает в грудной аорте) имел тенденцию к угнетению [49]. Стоит отметить, что, если в сократительном ответе на стимуляцию α1d-изоформы важную роль играют потенциал-зависимые кальциевые каналы, то в α1а-изоформе возрастает роль TRPC6 [50].

Учитывая тот факт, что в грудной аорте присутствуют и α 1а-адренорецепторы [51], остается неясным, способна ли их активация вызывать сокращение в условиях гипотермии. Ослабление ответа при гипотермии может происходить как в препаратах с интактным эндотелием, так и в кольцах аорты, лишенных эндотелия [52]. Однако имеется значительно больше данных о важности эндотелия в реализации вызванного гипотермией снижения чувствительности к фенилэфрину [53–55]. Гипотермия вызывает релаксантный эффект на кольцах аорты, предварительно сокращенных фенилэфрином, а также ослабляет ответ на фенилэфрин после разогревания из состояния гипотермии. Данные эффекты являлись зависимыми от эндотелия и включали в себя активацию каскадов NO и PGI2 [53]. Также в ослаблении сократительного ответа на фенилэфрин может быть задействован сигнальный каскад, связанный с эндотелиальной Rho-киназой [55].

Таким образом, сведения об эффектах активации α 1-AP в сердце и сосудах весьма противоречивы и нуждаются в уточнении. Относительно эффектов A61603 (α 1а-адреноагониста с выраженными кардиопротективными свойствами) в данный момент информация отсутствует.

α2-Адренергические рецепторы. Как и другие типы адренорецепторов, в сердце могут экспрессироваться все три подтипа α 2-AP [21, 56]. При этом ранее основное внимание уделялось их центральному действию, приводящему к снижению выброса катехоламинов [57, 58].Также считалось, что прямые эффекты стимуляции α 2-AP незначительны [59-61]. Однако в последнее время накапливается все больше данных о прямых эффектах активации α2-АР как на отдельных образцах ткани, так и на препаратах целого сердца [62-65]. В нашей лаборатории были получены данные, по которым агонист α2-АР гуанабенз снижал силу сокращения и Ca²⁺-ток L-типа[66]. Также снижение Ca²⁺-тока L-типа было показано и для дексмедетомидина [67]. В дополнение к этому, нами было показано, что помимо прямых эффектов на сократимость, активация α2-АР сдерживает ответ неселективной адренергической стимуляции [66, 68]. В настоящее время α2-рецепторный путь рассматривается как потенциальный механизм кардиопротекции и терапии сердечнососудистых заболеваний [21, 69]. Среди а2-адреноагонистов выделяется дексмедетомидин, кардиопротекторным свойствам которого посвящено большое число работ [56, 70-72].

В кровеносных сосудах также могут встречаться все три подтипа α 2-AP, однако их распределение очень вариативно и зависит от вида животного и типа сосуда [73]. Неселективные α 2-адреноагонисты клонидин и UK 14304 вызывают вазорелаксацию аорты, предсокращенной фенилэфрином (α 1-адреноагонист) [74], хотя авторы связывают эти эффекты взаимодействием с α 1d-AP. Однако это предположение ставят под сомнение результаты, полученные в условиях блокирования α 1-AP празозином, при этом вазорелаксантный эффект может быть не связан с NO.

Для дексмедетомидина были показаны как вазорелаксантные, так и вазоконстрикторные эффекты, при этом через $\alpha 2a$ -AP эндотелия запускается релаксация, в то время как через $\alpha 2b$ -AP – сокращение гладкомышечных клеток [75]. В аорте крысы с удаленным эндотелием дексмедетомидин вызывал сократительный ответ, в то время как на интактных препаратах – нет [76]. Кроме того, дексмедетомидин может ограничивать сократимость сосудов, связываясь с $\alpha 1d$ -AP [77].

Сведения о действии на сердечную функцию в условиях гипотермии $\alpha 2$ -адреноагонистов и, в частности, дексмедетомидина весьма ограничены. Однако косвенным свидетельством того, что дексмедетомидин может использоваться в условиях гипотермии, является тот факт, что анестезиологические смеси с его применением зачастую вызывают гипотермию, давая при этом хороший результат по переносимости анестезии [78, 79]. Также применение дексмедетомидина для первичной седации обеспечивает наименьший риск возникновения осложнений в условиях терапевтической гипотермии по сравнению с другими препаратами [80, 81].

При стимуляции α2-AP сократительный ответ может значительно усиливаться в условиях

умеренной гипотермии в аорте кролика [82] и в некоторых венах собаки и человека [83–85]. В условиях мягкой гипотермии в пиальных артериях кролика происходит инверсия эффекта дексмедетомидина с вазорелаксантного на вазоконстрикторный [86].

Таким образом, в настоящий момент кардиопротективные эффекты α2-адреноагониста дексмедетомидина описаны достаточно хорошо, вместе с тем, имеется определенный недостаток данных относительно его прямых инотропных эффектах как в нормальных условиях, так и при гипотермии.

В-Алренергические рецепторы. В1-АР являются преобладающей формой в сердце и обеспечивают большую часть инотропного ответа миокарда в норме, в то время как при патологии значимость 61-рецепторов заметно снижается, и 62-АР играют компенсаторную роль [87]. При этом гиперактивация β1-АР в большинстве случаев расценивается как кардиотоксическая, а активация β2-АР выполняет кардиопротективную роль [88-90]. Примечательно, что β2-АР участвуют в кардиопротекторных эффектах холодовой акклиматизации [91], что делает изучение этого сигнального пути особенно интересным в контексте гипотермии. β3-АР весьма малочисленны в здоровом миокарде, но их количество возрастает при патологии [92], при этом инотропный ответ может носить разнонаправленный характер [92-94]. Этому типу рецепторов также отводится кардиопротекторная роль, и их активация рассматривается как возможная терапевтическая стратегия при некоторых заболеваниях сердечно-сосудистой системы [95-98].

В сосудах представлены все три подтипа β-рецепторов, и все они опосредуют вазорелаксантный эффект [99, 100], хотя в условиях воздействия неселективных агонистов, таких как адреналин и норадреналин, релаксантный эффект β1и β2-АР превалирует [101]. В грудной аорте крысы селективный агонист β3-АР вызывает вазорелаксантный эффект как с наличием эндотелия, так и при его отсутствии [102, 103].

В условиях низкой температуры может повышаться чувствительность к β -адренергической стимуляции в сердце крысы [108], кролика [104], мор-ской свинки [105], причем через β 1-, нежели β 2-рецепторы в миокарде и гладких мышцах [105, 106]. При этом имеются свидетельства и снижения чувствительности в миокарде предсердий кролика [45, 107] и крысы [107]. При охлаждении до 15°С β -адренергическая стимуляция повышает уровень цАМФ в 4 раза, что говорит о высокой устойчивости к гипотермии этого сигнального пути [108]. Однако при глубоком охлаждении совместное действие гипотермии и β -адренергической стимуляции может приводить к Ca²⁺-перегрузкам клеток миокарда и снижению сократительной способности [109]. Также в миокарде крысы было показано, что, если при 30°С изопротеренол вызывает мощный рост силы сокращений, то при 10°С в ответ на действие β-адреноагониста сила сокращений достоверно снижается.

В гладких мышцах гипотермия усиливает релаксантный эффект β1-стимуляции [110]. Несмотря на это, в опытах *in vivo* некоторые из β-адреноагонистов давали эффекты, приводящие к вазоконстрикции, повышению периферического сопротивления и угнетению сократимости сердца [108, 111]. В то же время, при охлаждении до 25°С на собаках изопротеренол мало влиял на сердечный выброс, одновременно приводя к общей вазодилатации [112]. Также отсутствие эффекта изопротеренола на какие-либо гемодинамические параметры было показано при 24°С у крыс [12].

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что в условиях гипотермии, видимо, сохраняется эффективность β-адренергической сигнализации. Вместе с тем, подобная стимуляция легко ведет к кальциевой перегрузке клеток миокарда и, в конечном итоге, приводит к угнетению сократительной функции сердца.

Подводя итог, следует сказать, что из адреноагонистов в настоящий момент наибольший интерес представляют дексмедетомедин как вещество с большим кардиопротективным потенциалом, который может быть полезен для миокарда, перенесшего охлаждение. Также привлекает к себе внимание способностью вызывать выраженный положительный инотропный эффект в сочетании с определенным кардиопротективным потенциалом αla-адреноагонист A61603. Однако инотропные эффекты данных соединений еще не вполне охарактеризованы, особенно в условиях гипотермии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 23-25-00204.

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

- Tsai M.-S., Huang C.-H., Yu P.-H., Tsai C.-Y., Chen H.-W., Cheng H.-J., Chang W.-T., Wang T.-D., and Chen W.-J. Prolonged cooling duration mitigates myocardial and cerebral damage in cardiac arrest. *Am. J. Emerg. Med.*, 33 (10), 1374–1381 (2015). DOI: 10.1016/j.ajem.2015.07.030
- Oumeiri B. E., Louagie Y., and Buche M. Reoperation for ascending aorta false aneurysm using deep hypothermia and circulatory arrest. *Interact. Cardiovasc. Thorac Surg.*, **12** (4), 605–608 (2011). DOI: 10.1510/icvts.2010.262378
- Mauduit M., Anselmi A., Soulami R. B., Tomasi J., Flecher E., Langanay T., Corbineau H., Rouzé S., and Verhoye J.-P. Early and long-term results of hypothermic circulatory arrest in aortic surgery: a 20-year singlecentre experience. *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)*, 22 (7), 572–578 (2021). DOI: 10.2459/JCM.00000000001152
- Tomita A., Fujimoto T., Takada S., and Hayashi Y. Anesthetic management of a patient with severe aortic regurgitation undergoing reoperation for ascending aorta false aneurysm using hypothermia: prevention of ventricular fibrillation by nifekalant. *JA Clin. Rep.*, 7 (1), 43 (2021). DOI: 10.1186/s40981-021-00446-8
- Bjertnæs L. J., Hindberg K., Næsheim T. O., Suborov E. V., Reierth E., Kirov M. Y., Lebedinskii K. M., and Tveita T. Rewarming From Hypothermic Cardiac Arrest Applying Extracorporeal Life Support: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Med. (Lausanne)*, 8, 641633 (2021). DOI: 10.3389/fmed.2021.641633
- Mackiewicz U. and Lewartowski B. Temperature dependent contribution of Ca²⁺ transporters to relaxation in cardiac myocytes: important role of sarcolemmal Ca²⁺⁻ATPase. *J. Physiol. Pharmacol.*, **57**, 3–15 (2006). PMID: 16601311
- Shutt R. H. and Howlett S. E. Hypothermia increases the gain of excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 295 (3), C692–C700 (2008).
 DOI: 10.1152/ajpcell.00287.2008
- Sprung J., Stowe D. F., Kampine J. P., and Bosnjak Z. J. Hypothermia modifies anesthetic effect on contractile force and Ca²⁺ transients in cardiac Purkinje fibers. *Am. J. Physiol.*, **267** (2), H725–H733 (1994). DOI: 10.1152/ajpheart.1994.267.2.H725
- Shattock M. J. and Bers D. M. Inotropic response to hypothermia and the temperature-dependence of ryanodine action in isolated rabbit and rat ventricular muscle: implications for excitation-contraction coupling. *Circ. Res.*, **61** (6), 761–771 (1987). DOI: 10.1161/01.res.61.6.761
- Liu B., Wang L. C., and Belke D. D. Effect of low temperature on the cytosolic free Ca²⁺ in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium*, **12** (1), 11 (1991). DOI: 10.1016/0143-4160(91)90080-x

- Schaible N., Han Y. S., Tveita T., and Sieck G. C. Role of superoxide ion formation in hypothermia/rewarming induced contractile dysfunction in cardiomyocytes. *Cryobiology*, **81**, 57–64 (2018). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2018.02.010
- Han Y.-S., Tveita T., Kondratiev T. V., Prakash Y. S., and Sieck G. C. Changes in cardiovascular beta-adrenoceptor responses during hypothermia. *Cryobiology*, 57 (3), 246–250 (2008). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.09.006
- Schaible N., Han Y. S., Hoang T., Arteaga G., Tveita T., and Sieck G. Hypothermia/rewarming disrupts excitation-contraction coupling in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **310** (11), H1533–H1540 (2016). DOI: 10.1152/ajpheart.00840.2015
- Miller V. M., Miller W. L., and South F. E. Vascular smooth muscle responsiveness in a hibernator: effects of season and temperature. *Am. J. Physiol.*, **250** (1), R77–R82 (1986). DOI: 10.1152/ajpregu.1986.250.1.R77
- Mustafa S. Hypothermia induces opposite response in vascular and non-vascular smooth muscles. *J. Therm. Biol.*, **95**, 102818 (2021). DOI: 10.1016/j.jtherbio.2020.102818
- Mustafa S. and Thulesius O. Cooling is a potent vasodilator of deep vessels in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **79**, 899 (2001). PMID: 11760091
- Herrera B., Eisenberg G., Holberndt O., Desco M. M., Rábano A., García-Barreno P., and Del Cañizo J. F. Paradoxical effects of temperature on vascular tone. *Cryobiology*, **41** (1), 43–50 (2000). DOI: 10.1006/cryo.2000.2263
- Dahdah N. S., Russo P., and Wagerle L. C. Phosphorylation in coronary artery cold-induced contraction in the newborn lamb. *Cryobiology*, **42** (1), 40–48 (2001). DOI: 10.1006/cryo.2001.2299
- Herrera B., Desco M. M., Eisenberg G., García-Barreno P., and Del Cañizo J. F. Role of elastic fibers in cooling-induced relaxation. *Cryobiology*, 44 (1), 54–61 (2002). DOI: 10.1016/S0011-2240(02)00004-4
- Matušková L. and Javorka M. Adrenergic receptors gene polymorphisms and autonomic nervous control of heart and vascular tone. *Physiol. Res.*, **70** (1), S495– S510 (2021). DOI: 10.33549/physiolres.934799
- Alekseev A. E., Park S., Pimenov O. Yu., Reyes S., and Terzic A. Sarcolemmal α2-adrenoceptors in feedback control of myocardial response to sympathetic challenge. *Pharmacol. Ther.*, **197**, 179–190 (2019). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.01.007
- Flordellis C., Manolis A., Scheinin M., and Paris H. Clinical and pharmacological significance of alpha2adrenoceptor polymorphisms in cardiovascular diseases. *Int. J. Cardiol.*, **97** (3), 367–372 (2004). DOI: 10.1016/j.ijcard.2003.10.014
- 23. Michel L. Y. M., Farah C., and Balligand J.-L. The Beta3 Adrenergic Receptor in Healthy and Pathological

Cardiovascular Tissues. *Cells*, **9** (12), 2584 (2020). DOI: 10.3390/cells9122584

- Motiejunaite J., Amar L., and Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 82 (3–4), 193–197 (2021). DOI: 10.1016/j.ando.2020.03.012
- O'Connell T. D., Jensen B. C., Baker A. J., and Simpson P. C. Cardiac alpha1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. *Pharmacol. Rev.*, 66 (1), 308–333 (2014). DOI: 10.1124/pr.112.007203
- Varma D. R. and Deng X. F. Cardiovascular alpha1-adrenoceptor subtypes: functions and signaling. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 78, 267 (2000). PMID: 10772055
- Nozdrachyov A. D., Tsirkin V. I., and Korotaeva Y. V. The role of alpha1-adrenoceptors for activity of the heart in humans and animals. Part 1 (Review). *Ross. Fiziol. Zh. im. I.M. Sechenova*, **102** (2), 130–145 (2016). PMID: 29671479
- Averin A. S., Andreeva L. A., Popova S. S., Kosarsky L. S., Anufriev A. I., Nenov M. N., and Nakipova O. V. α1-Adrenergic receptor regulates papillary muscle and aortic segment contractile function via modulation of store-operated Ca²⁺ entry in long-tailed ground squirrels Urocitellus undulates. *J. Comp. Physiol. B*, (2021). DOI: 10.1007/s00360-021-01394-6
- Chu C., Thai K., Park K. W., Wang P., Makwana O., Lovett D. H., Simpson P. C., and Baker A. J. Intraventricular and interventricular cellular heterogeneity of inotropic responses to α(1)-adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **304** (7), H946– H953 (2013). DOI: 10.1152/ajpheart.00822.2012
- Fedida D. and Bouchard R. A. Mechanisms for the positive inotropic effect of alpha 1-adrenoceptor stimulation in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.*, **71** (3), 673– 688 (1992). DOI: 10.1161/01.res.71.3.673.
- Nishimaru K., Kobayashi M., Matsuda T., Tanaka Y., Tanaka H., and Shigenobu K. Alpha-Adrenoceptor stimulation-mediated negative inotropism and enhanced Na⁺/Ca²⁺ exchange in mouse ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **280** (1), H132–H141 (2001). DOI: 10.1152/ajpheart.2001.280.1.H132
- 32. Michel M. C., Hanft G., and Gross G. Functional studies on alpha 1-adrenoceptor subtypes mediating inotropic effects in rat right ventricle. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 539 (1994).
 DOI: 10.1111/j.1476.5281.1004 tb14771 x
 - DOI: 10.1111/j.1476-5381.1994.tb14771.x
- Nagashima M., Hattori Y., Tohse N., and Kanno M. Alpha 1-adrenoceptor subtype involved in the positive and negative inotropic responses to phenylephrine in rat papillary muscle. *Gen. Pharmacol.*, 28 (5), 721–725 (1997). DOI: 10.1016/s0306-3623(96)00356-4
- 34. Cowley P. M., Wang G., Chang A. N., Makwana O., Swigart P. M., Lovett D. H., Stull J. T., Simpson P. C., and Baker A. J. The α1A-adrenergic receptor subtype mediates increased contraction of failing right ventric-

ular myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **309** (5), H888–H896 (2015). DOI: 10.1152/ajpheart.00042.2015

- Janssen P. M. L., Canan B. D., Kilic A., Whitson B. A., and Baker A. J. Human Myocardium has a robust α1asubtype adrenergic receptor inotropic response. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **72** (3), 136–142 (2018). DOI: 10.1097/FJC.000000000000604
- 36. Thomas R. C., Cowley P. M., Singh A., Myagmar B.-E., Swigart P. M., Baker A. J., and Simpson P. C. The alpha-1a adrenergic receptor in the rabbit heart. *PLoS One*, **11** (6), e0155238 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0155238
- Zhang S., Takahashi R., Yamashita N., Teraoka H., and Kitazawa T. Alpha1B-adrenoceptor-mediated positive inotropic and positive chronotropic actions in the mouse atrium. *Eur. J. Pharmacol.*, 839, 82–88 (2018). DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.08.038
- Turnbull L., McCloskey D. T., O'Connell T. D., Simpson P. C., and Baker A. J. Alpha 1-adrenergic receptor responses in alpha 1AB-AR knockout mouse hearts suggest the presence of alpha 1D-AR. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 284 (4), H1104–H1109 (2003). DOI: 10.1152/ajpheart.00441.2002
- Chen L., Wang W., Peng X., Liu L., Zhang A., Li X., Ma K., and Wang L. α1-Adrenoceptors activate the NLRP3 inflammasome through downregulation of Kir2.1 in cardiac inflammation. *Exp. Physiol.*, **107** (6), 589–600 (2022). DOI: 10.1113/EP090243
- Xin J.-Z., Wu J.-M., Hu G.-M., Gu H.-J., Feng Y.-N., Wang S.-X., Cong W.-W., Li M.-Zh., Xu W.-L., Song Y., Xiao H., Zhang Y.-Y., and Wang L. α1-AR overactivation induces cardiac inflammation through NLRP3 inflammasome activation. *Acta Pharmacol. Sin.*, 41 (3), 311–318 (2020). DOI: 10.1038/s41401-019-0305-x
- Zhang J., Simpson P. C., and Jensen B. C. Cardiac a1A-adrenergic receptors: emerging protective roles in cardiovascular diseases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **320** (2), H725–H733 (2021). DOI: 10.1152/ajpheart.00621.2020
- Docherty J. R. The pharmacology of α1-adrenoceptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.*, **855**, 305–320 (2019). DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.04.047
- Yamaki F., Zhang X., Shioda N., Yoshioka K., Obara K., and Tanaka Y. Normetadrenaline and metadrenaline induce rat thoracic aorta/prostate contraction via α1D/1A-adrenoceptor stimulation. *Eur. J. Pharmacol.*, **877**, 173079 (2020). DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173079
- 44. Arce C., Vicente D., Segura V., Flacco N., Montó F., Almenar L., Agüero J., Rueda J., Jiménez-Altayó F., Vila E., Noguera M. A., D'Ocon P., and Ivorra M. D. Activation of α1A-adrenoceptors desensitizes the rat aorta response to phenylephrine through a neuronal NOS pathway, a mechanism lost with ageing. *Br. J.*

Pharmacol., **174** (13), 2015–2030 (2017). DOI: 10.1111/bph.13800

- Omar S. A., Hammad D., and Varma S. Reduced beta adrenergic responsiveness in isolated rabbit atria during hypothermia. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 23 (3), 199–203 (1979). PMID: 230156
- Mori K., Hashimoto H., and Hasegawa H. Influence of temperature on the sensitivity of the adrenoceptors in the isolated atria of guinea pigs and rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 55 (2), 189–197 (1979). DOI: 10.1016/0014-2999(79)90391-1
- Nishimaru K., Sekine T., Tanaka Y., Tanaka H., and Shigenobu K. Temperature sensitive effects of alphaadrenergic stimulation in mouse ventricular myocardial. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **104** (2), 173–180 (1999). PMID: 10634310
- Endoh M., Hillen B., and Schümann H. J. Influence of temperature and frequency on the positive inotropic action of phenylephrine in the isolated rabbit papillary muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **228** (2), 213– 221 (1977). PMID: 921412
- Ishida H., Saito S.-Y., and Ishikawa T. α1A-Adrenoceptors, but not α1B- or α1D-adrenoceptors, contribute to enhanced contractile response to phenylephrine in cooling conditions in the rat tail artery. *Eur. J. Pharmacol.*, **838**, 120–128 (2018). DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.09.004
- Suzuki F., Morishima S., Tanaka T., and Muramatsu I. Snapin, a new regulator of receptor signaling, augments alpha1A-adrenoceptor-operated calcium influx through TRPC6. J. Biol. Chem., 282 (4), 29563–29573 (2007). DOI: 10.1074/jbc.M702063200
- Hussain M. B. and Marshall I. Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **122** (5), 849– 858 (1997). DOI: 10.1038/sj.bjp.0701461
- Chung J.-Y., Kim J.-E., Yoon H.-J., Song S.-Y., Kim S.-O., and Roh W.-S. Moderate hypothermia attenuates α(1)-adrenoceptor-mediated contraction in isolated rat aorta: the role of the endothelium. *Cryobiology*, **65** (1), 33–40 (2012). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.03.009
- Cho J. W., Lee C. H., Jang J. S., Kwon O. C., Roh W. S., and Kim J. E. Moderate and deep hypothermia produces hyporesposiveness to phenylephrine in isolated rat aorta. *Korean J. Thorac Cardiovasc. Surg.*, 46 (6), 402–412 (2013). DOI: 10.5090/kjtcs.2013.46.6.402
- Lagneau F., Kirstetter P., and Bernard C. Effect of mild hypothermia on the vascular actions of phenylephrine in rat aortic rings. *Br. J. Anaesth.*, **82** (6), 938–940 (1999). DOI: 10.1093/bja/82.6.938
- 55. Lee S. H., Ok S.-H., Subbarao R. B., Kim J.-Y., Bae S. I., Hwang Y., Tak S., and Sohn J.-T. Nitric oxide-mediated inhibition of phenylephrine-induced contraction in response to hypothermia is partially

modulated by endothelial Rho-kinase. *Int. J. Med. Sci.*, **17** (1), 21–32 (2020). DOI: 10.7150/ijms.39074

- 56. Ibacache M., Sanchez G., Pedrozo Z., Galvez F., Humeres C., Echevarria G., Duaso J., Hassi M., Garcia L., Díaz-Araya G., and Lavandero S. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Biochim. Biophys. Acta*, **1822** (4), 537–545 (2012). DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.12.013
- Brede M., Nagy G., Philipp M., Sorensen J. B., Lohse M. J., and Hein L. Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Mol. Endocrinol.*, **17** (8), 1640–1646 (2003). DOI: 10.1210/me.2003-0035
- Moura E., Afonso J., Hein L., and Vieira-Coelho M. A. Alpha2-adrenoceptor subtypes involved in the regulation of catecholamine release from the adrenal medulla of mice. *Br. J. Pharmacol.*, **149** (8), 1049–1058 (2006). DOI: 10.1038/sj.bjp.0706950
- Dukes I. D. and Vaughan Williams E. M. Effects of selective alpha 1-, alpha 2-, beta 1-and beta 2-adrenoceptor stimulation on potentials and contractions in the rabbit heart. *J. Physiol.*, **355**, 523–546 (1984). DOI: 10.1113/jphysiol.1984.sp015436
- Flacke W. E., Flacke J. W., Blow K. D., McIntee D. F., and Bloor B. C. Effect of dexmedetomidine, an alpha 2-adrenergic agonist, in the isolated heart. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, 6 (4), 418–423 (1992). DOI: 10.1016/1053-0770(92)90006-s
- Housmans P. R. Effects of dexmedetomidine on contractility, relaxation, and intracellular calcium transients of isolated ventricular myocardium. *Anesthesiology*, **73** (5), 919–922 (1990). DOI: 10.1097/00000542-199011000-00020
- 62. Evdokimovskii E. V., Jeon R., Park S., Pimenov O. Y., and Alekseev A. E. Role of α2-adrenoceptor subtypes in suppression of L-type Ca²⁺ current in mouse cardiac myocytes. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (8), 4135 (2021). DOI: 10.3390/ijms22084135
- Hongo M., Fujisawa S., Adachi T., Shimbo T., Shibata S., Ohba T., and Ono K. Age-related effects of dexmedetomidine on myocardial contraction and coronary circulation in isolated guinea pig hearts. *J. Pharmacol. Sci.*, **131** (2), 118–125 (2016). DOI: 10.1016/j.jphs.2016.05.002
- 64. Zefirov T. L., Faskhutdinov L. I., Ziyatdinova N. I., Galieva A. M., and Zefirov A. L. Effect of stimulation of α2-adrenergic receptors on action potential of working cardiomyocytes in rat atrium. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 603–605 (2019). DOI: 10.1007/s10517-019-04579-w
- 65. Ziyatdinova N. I., Kuptsova A. M., and Faskhutdinov L. I. Effect of α2-Adrenoceptor stimulation on functional parameters of Langendorff-isolated rat heart. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **165** (5), 593–596 (2018). DOI: 10.1007/s10517-018-4220-9

- 66. Kokoz Y. M., Evdokimovskii E. V., Maltsev A. V., Nenov M. N., Nakipova O. V., Averin A. S., Pimenov O. Yu., Teplov I. Y., Berezhnov A. V., Reyes S., and Alekseev A. E. Sarcolemmal α2-adrenoceptors control protective cardiomyocyte-delimited sympathoadrenal response. J. Mol. Cell. Cardiol., **100**, 9–20 (2016). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.09.006
- Zhao J., Zhou C.-L., Xia Z.-Y., and Wang L. Effects of dexmedetomidine on L-type calcium current in rat ventricular myocytes. *Acta Cardiol. Sin.*, 29, 175–180 (2013). PMCID: PMC4804780
- 68. Averin A. S., Nakipova O. V., Kosarsky L. S., and Pimenov O. Activation of sarcolemmal $\alpha 2$ adrenoceptors support Ca²⁺ homeostasis and prevents ventricular arrhythmia under sympathetic stress. *Biophysica*, **64** (5), 793–798 (2019)
- Gavras I., Manolis A. J., and Gavras H. The alpha2adrenergic receptors in hypertension and heart failure: experimental and clinical studies. *J. Hypertens.*, **19** (12), 2115–2124 (2001).
 DOI: 10.1097/00004872-200112000-00001
- Wang C., Yuan W., Hu A., Lin J., Xia Z., Yang C. F., Li Y., and Zhang Zh. Dexmedetomidine alleviated sepsis-induced myocardial ferroptosis and septic heart injury. *Mol. Med. Rep.*, **22** (1), 175–184 (2020). DOI: 10.3892/mmr.2020.11114
- Wu W., Du Z., and Wu L. Dexmedetomidine attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte injury by promoting telomere/telomerase activity: Possible involvement of ERK1/2-Nrf2 signaling pathway. *Cell Biol. Int.*, 46 (7), 1036–1046, (2022). DOI: 10.1002/cbin.11799
- Yu J.-L., Jin Y., Cao X.-Y., and Gu H.-H. Dexmedetomidine alleviates doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting mitochondrial reactive oxygen species generation. *Hum. Cell*, 33 (1), 47–56 (2020). DOI: 10.1007/s13577-019-00282-0
- 73. Bylund D. B., Regan J. W., Faber J. E., Hieble J. P., Triggle C. R., and Ruffolo R. R., Jr. Vascular alpha-adrenoceptors: from the gene to the human. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73** (5), 533–543 (1995). DOI: 10.1139/y95-068
- 74. Castillo E. F., Ortíz C. S., López R. M., Ruíz A., Vélez M., and Castillo C. Evidence against alpha-adrenoceptors mediating relaxation in rat thoracic aortae: alpha-agonists relaxation depends on interaction with alpha-adrenoceptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **20** (4), 339–349 (2006). DOI: 10.1111/j.1472-8206.2006.00421.x
- 75. Wong E. S. W., Man R. Y. K., Vanhoutte P. M., and Kwok F. J. Ng. Dexmedetomidine induces both relaxations and contractions, via different {alpha}2-adrenoceptor subtypes, in the isolated mesenteric artery and aorta of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **335** (3), 659– 664 (2010). DOI: 10.1124/jpet.110.170688
- Kim H.-J., Sohn J.-T., Jeong Y.-S., Cho M. S., Kim H. J., Chang K. C., Shin M.-K., Park C.-S., and Chung Y.-K. Direct effect of dexmedetomidine on rat

isolated aorta involves endothelial nitric oxide synthesis and activation of the lipoxygenase pathway. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **36** (4), 406–412 (2009). DOI: 10.1111/j.1440-1681.2008.05082.x

- 77. Byon H.-J., Ok S.-H., Lee S. H., Kang S., Cho Y., Han J. Y., and Sohn J.-T. Dexmedetomidine inhibits phenylephrine-induced contractions via alpha-1 adrenoceptor blockade and nitric oxide release in isolated rat aortae. *Int. J. Med. Sci.*, **14** (2), 143–149 (2017). DOI: 10.7150/ijms.17456
- 78. Ambar N., Eshar D., Shrader T. C., and Beaufrère H. Anesthetic effects of intramuscular alfaxalone-ketamine in naked mole rats (*Heterocephalus glaber*). J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci., 59 (5), 539–545 (2020). DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000170
- Eshar D. and Beaufrère H. Anesthetic effects of dexmedetomidine-ketamine-midazolam administered intramuscularly in five-striped palm squirrels (*Funambulus pennantii*). Am. J. Vet. Res., 80 (12), 1082–1088 (2019). DOI: 10.2460/ajvr.80.12.1082
- Elliott M., Fairchild K., Zanelli S., McPherson C., and Vesoulis Z. Dexmedetomidine during therapeutic hypothermia: a multicenter quality initiative. *Hosp. Pediatr.*, **14** (1), 30–36 (2024). DOI: 10.1542/hpeds.2023-007403
- Elliott M., Burnsed J., Heinan K., Letzkus L., Andris R., Fairchild K., and Zanelli S. Effect of dexmedetomidine on heart rate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy undergoing therapeutic hypothermia. *J. Neonatal Perinatal Med.*, **15** (1), 47–54 (2022). DOI: 10.3233/NPM-210737
- Atalik E. K., Sahin A. S., Kiliç M., and Doğan N. Role of the endothelium on the response to adrenoceptor agonists of rabbit aorta during cooling. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **14** (1), 25–30 (2000). DOI: 10.1111/j.1472-8206.2000.tb00390.x
- Flavahan N. A., Lindblad L. E., Verbeuren T. J., Shepherd J. T., and Vanhoutte P. M. Cooling and alpha 1and alpha 2-adrenergic responses in cutaneous veins: role of receptor reserve. *Am. J. Physiol.*, **249** (5 Pt 2), H950–H955 (1985). DOI: 10.1152/ajpheart.1985.249.5.H950
- Harker C. T., Ousley P. J., Harris E. J., Edwards J. M., Taylor L. M., and Porter J. M. The effects of cooling on human saphenous vein reactivity to adrenergic agonists. *J. Vasc. Surg.*, **12** (1), 45–49 (1990). DOI: 10.1067/mva.1990.20311
- Vanhoutte P. M. and Flavahan N. A. Effects of temperature on alpha adrenoceptors in limb veins: role of receptor reserve. *Fed. Proc.*, 45 (9), 2347–2354 (1986). PMID: 3015688
- Iida H., Iida M., Ohata H., Nagase K., and Dohi S. Hypothermia attenuates the vasodilator effects of dexmedetomidine on pial vessels in rabbits in vivo. *Anesth. Analg.*, **98** (2), 477–482 (2004). DOI: 10.1213/01.ANE.0000099365.30804.42

- Khamssi M. and Brodde O. E., The role of cardiac beta1- and beta2-adrenoceptor stimulation in heart failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 16 (Suppl. 5), S133–137 (1990). PMID: 11527117
- 88. Baker A. J. Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflugers Arch.*, 466 (6), 1139–1150 (2014).
 DOI: 10.1007/s00424-014-1491-5
- Fajardo G., Zhao M., Berry G., Wong L.-J., Mochly-Rosen D., and Bernstein D. β2-adrenergic receptors mediate cardioprotection through crosstalk with mitochondrial cell death pathways. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **51** (5), 781–789 (2011). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.06.019
- 90. Song Y., Xu C., Liu J., Y. Li, Wang H., Shan D., Wainer I. W., Hu X., Zhang Y., Woo A. Y.-H., and Xiao R.-P. Heterodimerization with 5-HT2BR is indispensable for β2AR-mediated cardioprotection. *Circ. Res.*, **128** (2), 262–277 (2021).

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317011

- 91. Tibenska V., Marvanova A., Elsnicova B., Hejnova L., Vebr P., Novotný J., Kolar F., Novakova O., and Zurmanova J. M. The cardioprotective effect persisting during recovery from cold acclimation is mediated by the β2-adrenoceptor pathway and Akt activation. *J. Appl. Physiol.*, **130** (3), 746–755 (2021). DOI: 10.1152/japplphysiol.00756.2020
- 92. Moniotte S., Kobzik L., Feron O., Trochu J. N., Gauthier C., and Balligand J. L. Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*, **103** (12), 1649–1655 (2001). DOI: 10.1161/01.cir.103.12.1649
- 93. Angelone T., Filice E., Quintieri A. M., Imbrogno S., Recchia A., Pulerà E., Mannarino C., Pellegrino D., and Cerra M. C. Beta3-adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway. *Acta Physiol. (Oxford)*, **193** (3), 229–239 (2008). DOI: 10.1111/j.1748-1716.2008.01838.x
- 94. Treinys R., Zablockaitė D., Gendvilienė V., Jurevičius J., and Skeberdis V. A. β₃-Adrenergic regulation of L-type Ca²⁺ current and force of contraction in human ventricle. *J. Membr. Biol.*, **247** (4), 309–318 (2014). DOI: 10.1007/s00232-014-9635-2
- 95. García-Prieto J., Manuel García-Ruiz J., Sanz-Rosa D., Pun A., García-Alvarez A., Davidson S. M., Fernández-Friera L., Nuno-Ayala M., Fernández-Jiménez R., Bernal J. A., Izquierdo-Garcia J. L., Jimenez-Borreguero J., Pizarro G., Ruiz-Cabello J., Macaya C., Fuster V., Yellon D. M., and Ibanez B. β3 adrenergic receptor selective stimulation during ischemia/reperfusion improves cardiac function in translational models through inhibition of mPTP opening in cardiomyocytes. *Basic Res. Cardiol.*, 109 (4), 422 (2014). DOI: 10.1007/s00395-014-0422-0
- 96. Kayki-Mutlu G., Karaomerlioglu I., Arioglu-Inan E., and Altan V. M. Beta-3 adrenoceptors: A potential

therapeutic target for heart disease. *Eur. J. Pharmacol.*, **858**, 172468 (2019). DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172468

- Pott C., Brixius K., Bloch W., Ziskoven C., Napp A., and Schwinger R. H. G. Beta3-adrenergic stimulation in the human heart: signal transduction, functional implications and therapeutic perspectives. *Pharmazie*, 61 (4), 255–260 (2006). PMID: 16649533
- Salie R., Khlani Hassan Alsalhin A., Marais E., and Lochner A. Cardioprotective Effects of Beta3-Adrenergic Receptor (β3-AR) pre-, per-, and post-treatment in ischemia-reperfusion. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **33** (2), 163–177 (2019). DOI: 10.1007/s10557-019-06861-5
- 99. Oriowo M. A. Different atypical beta-adrenoceptors mediate isoprenaline-induced relaxation in vascular and non-vascular smooth muscles. *Life Sci.*, **56** (15), PL269–275 (1995). DOI: 10.1016/0024-3205(95)00076-3
- 100. López-Canales O. A., Castillo-Hernandez M. C., Vargas-Robles H., Rios A., López-Canales J. S., and Escalante B. Role of adenylyl cyclase in reduced β-adrenoceptor-mediated vasorelaxation during maturation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **49** (7), e5285 (2016). DOI: 10.1590/1414-431X20165285
- 101. Shiina S., Kanemura A., Suzuki C., Yamaki F., Obara K., Chino D., and Tanaka Y. β-Adrenoceptor subtypes and cAMP role in adrenaline- and noradrenaline-in-duced relaxation in the rat thoracic aorta. *J. Smooth Muscle Res.*, **54** (0), 1–12 (2018). DOI: 10.1540/jsmr.54.1
- 102.Trochu J. N., Leblais V., Rautureau Y., Bévérelli F., Le Marec H., Berdeaux A., and Gauthier C. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **128** (1), 69–76 (1999). DOI: 10.1038/sj.bjp.0702797
- 103.Zhao Q., Chen H., Jing J., Wang X., Liu R., Li X., Li H., and Cui X. Role of β3 adrenoceptor in rat thoracic aorta contractility. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **10** (9), 9132–9145 (2017). PMCID: PMC6965945
- 104.Riishede L. and Nielsen-Kudsk F. Myocardial effects of adrenaline, isoprenaline and dobutamine at hypothermic conditions. *Pharmacol. Toxicol.*, **66** (5), 354– 360 (1990). DOI: 10.1111/j.1600-0773.1990.tb00762.x
- 105.Williams R. G. and Broadley K. J. Responses mediated via beta 1, but not beta 2-adrenoceptors, exhibit hypothermia-induced supersensitivity. *Life Sci.*, **31**, 2977 (1982). DOI: 10.1016/0024-3205(82)90064-9
- 106.Chess-Williams R. G. and Broadley K. J. Temperature dependence of beta 1-adrenoceptor-mediated responses examined by use of partial agonists. *Eur. J. Pharmacol.*, **108** (1), 25–32 (1985).
 DOI: 10.1016/0014-2999(85)90279-1
- 107. Melnikov A. L., Løkebø J. E., Lathrop D. A., and Helgesen K. G. Alteration of the cardiac effects of isoproterenol and propranolol by hypothermia in isolated

rat atrium. *Gen. Pharmacol.*, **27** (4), 665–668 (1996). DOI: 10.1016/0306-3623(95)02078-0

- 108.Dietrichs E. S., Schanche T., Kondratiev T., Gaustad S. E., Sager G., and Tveita T. Negative inotropic effects of epinephrine in the presence of increased β-adrenoceptor sensitivity during hypothermia in a rat model. *Cryobiology*, **70** (1), 9–16 (2015). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.10.012
- 109.Mann D. L., Kent R. L., and Parsons B., Cooper G. 4th, Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation*, **85** (2), 790–804 (1992). DOI: 10.1161/01.cir.85.2.790
- 110. Foster P. S., Goldie R. G., Paterson J. W., and Spina D. Effect of hypothermia on beta 1-adrenoceptor-mediated relaxation of pig bronchus. *Br. J. Pharmacol.*, **80** (4), 699–702 (1983).
 DOI: 10.1111/j.1476-5381.1983.tb10060.x
- 111. Kondratiev T. V. and Tveita T. Effects of sympathetic stimulation during cooling on hypothermic as well as posthypothermic hemodynamic function. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **84** (10), 985–991 (2006). DOI: 10.1139/v06-051
- 112. Lauri T. Cardiovascular responses to beta-stimulation with isoproterenol in deep hypothermia. J. Appl. Physiol., 81 (2), 573–577 (1996).
 DOI: 10.1152/jappl.1996.81.2.573

Adrenergic Regulation of the Functioning of the Cardiovascular System under Hypothermic Conditions

M.H. Galimova* and A.S. Averin**

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

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

Regulation of the function of the cardiovascular system under and after hypothermia is one of important and relevant tasks in biomedical research. It is because of both - serious complications of hypothermia and the potential outcome benefits with hypothermia used for medicinal purposes. Adrenergic regulation is central for the normal function of the cardiovascular system. There are three types of adrenergic receptors known as $\alpha 1$, $\alpha 2$ and β , the expression levels of which are different in the myocardium and blood vessels. Activation of each of the adrenergic receptor subtypes can cause differently directed effects, which are significantly modified under the conditions of low temperature. The effectiveness of β -adrenergic stimulation decreases and β -adrenergic stimulation can even act like hypothermia, leading to impairment of myocardial function. The severity of the effects of αl adrenergic agonists both on myocardial tissue and in blood vessels is also diminished, however, sensitivity to stimulation of α la receptors in blood vessels may increase. The activation of α 1 adrenergic receptors mediates protective effect in the heart. The activation of α 2 adrenergic receptors has a fairly wide range of protective effects on the heart. However, there is now increasing evidence of direct inotropic and vascular effects mediated by this type of receptor. There is also some evidence that these effects become more pronounced under hypothermia. This review examines the current state of research on the effects of stimulation of certain types of adrenergic receptors under normal and hypothermic conditions, analyzes the mechanisms of physiological action and prospects for their further research.

Keywords: myocardium, blood vessels, hypothermia, adrenergic receptors

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 57.056

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАРДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ УРИДИН-5'-МОНОФОСФАТА И УРИДИНА В МОДЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА КРЫС С ПОМОЩЬЮ ИЗОПРЕНАЛИНА

© 2024 г. Н.В. Белослудцева^{*, #}, Т.А. Урюпина^{*}, Д.А. Хуртин^{**}, Н.В. Хундерякова^{*}, Г.Д. Миронова^{*}

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия **Марийский государственный университет, пл. Ленина, 1, Йошкар-Ола, 424001, Россия #E-mail: belosludtsevanv@iteb.pushchino.ru Поступила в редакцию 20.03.2024 г. После доработки 15.07.2024 г. Принята к публикации 17.07.2024 г.

Изучено влияние уридина и его монофосфорилированного производного на уровень основных биохимических маркеров повреждения миокарда в крови и электрическую активность сердца в модели кардиомиопатии у крыс, вызванной изопреналином. Показано, что введение изопреналина (150 мг/кг, подкожно) вызывает увеличение активности сывороточных ферментов аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрасферазы, их соотношения (коэффициента де Ритиса), а также активности лактатдегидрогеназы в лимфоцитах крови, что подтверждает развитие повреждения миокарда у экспериментальных животных. Анализ электрокардиографических данных выявил увеличение продолжительности интервалов RR, P-R, QT, QTс и комплекса QRS, что указывает на удлинение фазы деполяризации и реполяризации относительно длительности сердечного цикла у крыс с изопреналин-индуцированным повреждением миокарда. Предварительное введение экспериментальным животным уридина и уридин-5-монофосфата в дозах 30 мг/кг одинаково эффективно препятствует повышению ферментативной активности аспартатаминотрансферазы и коэффициента де Ритиса, приводит к снижению продолжительности интервалов P-R, ORS, OT и OTc, а также к частичной нормализации метаболической активности лимфоцитов крови крыс. Полученные данные указывают на то, что уридин и уридин-5-монофосфат оказывают сходное протекторное действие на сократительную функцию кардиомиоцитов и могут рассматриваться в качестве средств метаболической защиты для комплексной терапии ишемической болезни сердца.

Ключевые слова: уридин, УМФ, кардиомиопатия, изопреналин, электрокардиография, окислительное фосфорилирование, гликолиз.

DOI: 10.31857/S0006302924040168, EDN: NFWNTA

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одной из наиболее значимых медико-социальных проблем и ведущей причиной смертей в большинстве стран, включая Россию. Несмотря на то, что смертность от ССЗ в развитых странах постепенно снижается, ишемическая болезнь сердца и другие патологии миокарда остаются основными причинами ухудшения здоровья, низкого качества жизни и инвалидизации во всем мире [1].

Традиционно ишемическое повреждение миокарда при ССЗ рассматривается как следствие дисбаланса потребности миокарда в кислороде и субстратах метаболизма над их доступностью, возникающего при нарушениях коронарного кровообращения и сопутствующем появлении эпизодов ишемии [2]. Поэтому в течение длительного времени противоишемическая терапия была сосредоточена, в основном, на фармакологической модуляции работы сердечной мышцы (например, синтетическими бета-блокаторами, блокаторами кальциевых каналов и др.) и коронарного кровотока (с помощью нитроглицерина), отдельно или в комбинации, а также на механическом удалении бляшек коронарных артерий при операционном вмешательстве [2, 3].

Сокращения: ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания, УМФ – уридин-5-монофосфат, АСТ – аспартатаминотрансфераза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, СДГ – сункцинатдегидрогеназа, Ур – уридин, ИЗО – гидрохлорид изопреналина, ЭКГ – электрокардиограмма, АЛТ – аланинаминотрансфераза.

Ожидалось, что эти стратегии будут способствовать предотвращению инфаркта миокарда, устранению эпизодов ишемии и повышению выживаемости. К сожалению, накопленный клинический материал показывает, что около трети пациентов, перенесших успешную операцию, продолжают испытывать стенокардию, а современная медикаментозная терапия имеет лишь очень ограниченную эффективность [2–4]. Поэтому поиск принципиально новых эффективных способов профилактики и защиты миокарда при ССЗ остается актуальной задачей здравоохранения.

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что низкая эффективность традиционной терапии, основанной на использовании гемодинамических средств и механическом устранении бляшек, обусловлена многофакторной природой ишемического повреждения миокарда, включающей окислительный стресс, ионный (прежде всего, кальциевый и калиевый) дисбаланс и митохондриальную дисфункцию [5-8]. В отдельную группу патологий сердца были выделены стрессиндуцированные кардиомиопатии, наблюдающиеся на фоне предшествовавшего эмоционального или физического стресса при отсутствии выраженной патологии коронарных артерий. Патомиокарда генез поражения при ланных состояниях связывают с воздействием массированного выброса катехоламинов за счет их высвобождения из адренергических нервных терминалей, наибольшее количество которых наблюдается в апикальных отделах левого желудочка [9, 10]. Следствием избыточной активации β-адренорецепторов катехоламинами является неконтролируемый ток ионов кальция внутрь кардиомиоцитов с последующей активацией протеаз и Ca²⁺обменных каналов, что ведет к ускорению окислительных процессов и накоплению активных форм кислорода и, в конечном итоге, вызывает апоптоз и некроз кардиомиоцитов. В дальнейшем, такие состояния могут являться причинами внезапной сердечной смерти, особенно у лиц молодого возраста [10].

В экспериментальных моделях для изучения механизмов развития этой патологии сейчас широко используются стимуляторы β-аденорецепторов, в частности производное адреналина изопреналин. Известно, что изопреналин вызывает резкое увеличение силы и частоты сердечных сокращений. При этом у грызунов моделируются типичные повреждения тканей миокарда, а именно очаговый некроз и нарушения его сократимости. Показано, что введение изопреналина вызывает глубокие повреждения кардиомиоцитов, выражающиеся в нарушении энергетического обмена и ионного гомеостаза [11].

В последние годы в связи с развитием метаболомных исследований установлена важная патогенетическая роль интермедиатов и физиологических субстратов окисления митохондрий, участвующих в переходе от аэробного к анаэробному метаболизму и полном метаболическом перепрограммировании ишемизированного миокарда [5, 12-14]. В этом смысле использование метаболических модуляторов открывает путь к новому, комплексному способу предупреждения болезней сердца, основанном на представлении об ишемическом повреждении не как о простом дисбалансе потребности/обеспечения кислорода и метаболитов, а как о мультифакториальной клеточной патологии. К таким модуляторам можно отнести пиримидиновый нуклеозид уридин и уридин-5'-монофосфат (УМФ), которые являются метаболическими предшественниками уридиндифосфата, природного активатора митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов (митоКАТФ-каналов) [15].

Пиримидиновый нуклеозид уридин и его фосфорилированные производные играют важную роль в регуляции энергетического баланса и окислительного фосфорилирования, системного метаболизма, синтеза гликогена, поддержании структуры клеточных мембран и сократительной функции сердца [16-18]. Известно, что уридинмонофосфат может быть использован в качестве удобного средства доставки уридина в различные ткани организма, поскольку нефосфорилированный уридин катаболизируется в печени и вследствие этого обладает более низкой биодоступностью [16, 18]. В то же время в ряде экспериментальных моделей патологий сердца терапевтические эффекты уридина и УМФ, синтез которого в тканях напрямую зависит от уровня уридина в крови, были одинаково выраженными [19]. Стоит отметить, что использование обоих соединений имеет неоспоримые преимущества перед применением синтетических фармакологических препаратов, поскольку они имеют низкую токсичность и их концентрации в клетках можно регулировать.

Целью настоящей работы являлось исследование кардиопротекторных свойств уридина и его фосфата УМФ в отношении изменений биохимических маркеров повреждения миокарда в крови и электрической активности сердца в модели острого повреждения миокарда у крыс, вызванного высокими дозами агониста β -адренорецепторов изопреналина. Сравнительная оценка эффективности терапии уридином и его фосфорилированным производным в условиях данной модели в доступной литературе отсутствуют. Мы оценили эффект предварительного введения экспериментальным животным уридина и УМФ (оба в дозе 30 мкг/кг, в/б за 60 мин до инъекций изопреналина) на изменение сывороточной актив-

ности аспартатаминотрансферазы (ACT) и коэффициента де Ритиса во взаимосвязи с исследованием электропроводящей функции сердца методом электрокардиографии. С помощью цитохимического анализа было определено влияние уридина и УМФ на ферментативную активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ), отражающую интенсивность процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования соответственно, в лимфоцитах периферической крови животных с изопреналининдуцированном повреждением ткани сердца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные группы животных и условия их содержания. В работе использовали половозрелых самцов крыс линии Вистар массой 230-260 г. разведения питомника ИТЭБ РАН. Исследование проведено в соответствии с «Правилами проведения исследований с экспериментальными животными» (Приказ Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755). Все процедуры, проводимые с крысами, были одобрены Комиссией по биобезопасности и биоэтике (ИТЭБ РАН, разрешение № 8 от 08 февраля 2023 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента.

Животные были произвольно разделены на шесть групп и содержались в одинаковых условиях температуры и влажности при свободном доступе к стандартизированным кормам и воде. Экспериментальные группы включали: 1-я контроль («К») (физ. p-p, подкожно, 1.5 мл/кг веса тела животного) (n = 6); 2-ая — контроль + ури-(«K+Yp») (уридин, внутрибрюшинно, дин 30 мг/кг) (n = 5); 3-я — контроль + УМФ («К+УМФ») (УМФ, внутрибрюшинно, 30 мг/кг) (n = 5); 4-я - изопреналин-индуцированное повреждение миокарда («ИЗО») (гидрохлорид изопреналина, двукратно через 24 ч, подкожно, 150 мг/кг) (n = 5); 5-я – «ИЗО+Ур» – (уридин, внутрибрюшинно, 30 мг/кг за 60 мин до инъекций ИЗО) (*n* = 6); 6-я – «ИЗО+УМФ» – (УМФ. внутрибрюшинно, 30 мг/кг за 60 мин до инъекций ИЗО) (n = 6). В работе использовали свежеприготовленные растворы гидрохлорида изопреналина (Sigma-Aldrich, США), уридина (PanReac AppliChem Германия) и УМФ (Sigma-Aldrich, США) в стерильном физиологическом растворе. Сердца экспериментальных животных извлекали через 48 ч после первой инъекции изопреналина.

Регистрация и анализ электрокардиограммы у крыс. Электрокардиограммы (ЭКГ) записывали во II стандартном отведении в течение 10 мин с компьютерного электрокардиографа «Поли-Спектр-8/В» (Россия). Сигналы ЭКГ обрабатывали с помощью встроенного программного обеспечения для контурного анализа «Поли-

Спектр.NET/Экспресс» (Россия). Для каждой записи ЭКГ оценивали частоту сердечных сокращений (ЧСС), длительность интервалов R-R, P-R, QT и QTс и комплекса QRS. Для иммобилизации животных использовали комбинированный наркоз. Крыс анестезировали с помощью золетила 100 (Zoletil 100, Франция) в дозе 50 мг/кг, внутримышечно, с предмедикаметацией рометаром (АО «Биовета», Россия) в дозе 5 мг/кг, внутримышечно. Наркоз верифицировали по исчезновению реакции на болевые раздражители и угнетению роговичного рефлекса у животных.

Определение уровня биохимических маркеров повреждения миокарда в сыворотке крови крыс. Активность ферментов аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови экспериментальных крыс измеряли спектрофотометрическим методом с помощью коммерческих наборов АСТ-УФ-Новожидкая форма (100) (АО «Вектор-Бест», Россия) и АЛТ-УФ-Новожидкая форма (100) (АО «Вектор-Бест», Россия) с использованием автоматического планшетного ридера Spark-10М (Тесап, Австрия). Перед началом работы сыворотку крови инкубировали с помощью твердотельного термостата (ГНОМ. Россия) при 37°С в течение 30 мин и далее анализировали в соответствии с рекомендациями производителя.

Цитобиохимическое определение активности ферментов в лимфоцитах на мазке крови животных. Активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий и лактатдегидрогеназы в цитозоле в лимфоцитах периферической крови животных, полученной из кончика хвоста, определяли цитобиохимическим методом (патент РФ № 2364868), в основе которого лежит восстановление нитросинего тетразолия гидрохлорида до темно-синего диформазана [20]. Для приготовления однотипных мазков использовали автоматическое устройство V-Sampler (Vision, Германия). Микроскопирование мазков проводили на микроскопе Leica-DM 2000 с цветной фотокамерой Leica DFC 425 (Leica, Германия) при увеличении 1000× под масляной иммерсией. Для поиска и захвата клеток использовали разработанное программное обеспечение Bloodrunner (свидетельство RU №2010616976 от 19.10.2010 г., Россия) с последующим количественным анализом с помощью Cell Composer (свидетельство RU № 2012618186 от 10.10.2012 г., Россия). Вычисляли среднюю площадь окраски диформазана (в мкм²) в выборке из 100 лимфоцитов у каждого животного.

Статистическая обработка данных. Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7.0 и Excel 10.0 и представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Анализ на нормальность распределения данных прово-



Рис. 1. Структурные формулы уридин-5'-монофосфата и уридина.

дили с помощью критерия Шапиро—Уилка. Статистические различия между группами определялись с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением по критерию Тьюки. Различия между средними считали достоверными при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уридин и уридин-5'-монофосфат снижают активность сывороточных маркерных ферментов аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в модели изопреналин-индуцированного повреждения миокарда у крыс. В работе было изучено влияния профилактического введения крысам уридина и УМФ в дозах 30 мг/кг веса тела животного на ранние (48 ч) функциональные изменения миокарда в модели катехоламинового повреждения сердца путем двукратной (с интервалом 24 ч) инъекции изопреналина (150 мг/кг массы тела животного). Данная модель воспроизводит основные морфо-функциональные изменения миокарда при сердечной недостаточности [21, 22]. Доза УМФ и уридина (рис. 1) была подобрана на основании ранее проведенных в лаборатории исследований и литературных данных [23-25]. Схема эксперимента представлена на рис. 2.

Для подтверждения развития повреждения миокарда был проведен анализ активности биохимических биомаркеров разрушения кардиомиоцитов аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови крыс в исследуемых экспериментальных группах (рис. 3). Как известно, АСТ и АЛТ являются двумя наиболее ранними показателями повреждений сердца, причем АСТ более специфичен, чем АЛТ. Соотношение активностей данных ферментов (коэффициента де Ритиса) в сыворотке используется для определения процессов некроза кардиомиоцитов. Обнаружено, что введение изопреналина вызывает резкое (в 4 раза) увеличение активности АСТ и незначительное (на 21%) повышение активности АЛТ. Это сопровождается увеличением соотношения ACT/AЛT, что подтверждает развитие повреждения миокарда у экспериментальных животных. Введение крысам уридина и УМФ за 60 мин до инъекции изопреналина (группы «Ур+ИЗО» и «УМФ+ИЗО») приводило к статистически значимому подавлению активности ACT, но не АЛТ, и снижению коэффициента де Ритиса.

Полученные данные указывают на то, что уридин и УМФ оказывают защитное действие на клетки миокарда в исследуемой модели патологии сердца у крыс. В целом эти данные подтверждают, что воздействие высоких доз ИЗО вызывает выраженное повреждение миокарда в остром (48 ч) периоде и может быть использовано для выявления ранних патологических изменений.

Сравнение ранних изменений параметров ЭКГ при изопреналин-индуцированном повреждении сердца крыс на фоне терапии уридином и уридин-5'монофосфатом. С целью определения изменений электрической активности и проводящей функции сердца в работе было проведено электрокардиографическое исследование в условиях моделирования повреждения миокарда крыс на фоне терапии уридином и УМФ (рис. 4). Анализ данных ЭКГ показал, что введение изопреналина вызывало снижение показателя ЧСС и удлинение интервала R-R (рис. 5). Это согласуется с литературными данными о том, что избыточные дозы агонистов адренорецепторов вызывают нарушение синусового ритма и последующую брадикардию, свидетельствующие об общем нарушении сократимости и расслабления миокарда [26, 27]. Кроме того, введение изопреналина значительно увеличивало продолжительность комплекса QRS и интервал P-R, а также продолжительность зубца R, что указывает на нарушение внутрижелудочковой и атриовентрикулярной проводимости. Как известно, интервал QT и скорректированный интервал QT (QTc), который учитывает изменения ЧСС, являются параметрами деполяризации и реполяризации желудочков. Обнаружено, что изопреналин вызывает значительное увеличение продолжительности интервалов QT и QTc, свиде-



Рис. 2. Схема эксперимента и группы животных. В исследование было включено шесть экспериментальных групп крыс: контроль (n = 6), контроль + уридин (n = 5), контроль + УМФ (n = 5), изопреналина гидрохлорид (n = 5), изопреналин + уридин (n = 6), изопреналин + УМФ (n = 6).

тельствующее об удлинении фазы деполяризации и реполяризации относительно длительности сердечного цикла. Наблюдаемые изменения могут указывать на нарушения электрической проводимости сердца, которые регистрируются при каналопатиях, гипокалиемии, развитии аритмий, ишемии и инфаркте миокарда, а также при синдроме удлиненного интервала QT. Как видно из рисунка, введение уридина и УМФ крысам с повреждением сердца приводит к значительному сокращению QT и QTс по сравнению с опытной группой («ИЗО»). В то же время введение препаздоровым крысам (группы ратов «K+Yp». «К+УМФ») не влияло на данные показатели, и они оставались в пределах нормы.

Таким образом, введение уридина и УМФ вызывало схожие нормализующие эффекты в отношении изменений показателей ЭКГ у крыс в условиях катехоламин-индуцированного повреждения миокарда. Наши более ранние исследования показали, что уридин оказывает протекторное действие путем активации митоКАТФ-каналов при целом ряде патологий сердца, связанных с развитием окислительного стресса и дисфункцией митохондрий [17, 23, 25]. Недавние исследования в области транскриптомного и протеомного профилирования указывают на то, что уридин способствует регенерации тканей животных путем модулирования ключевых метаболических процессов [28].

Влияние уридина и уридин-5'-монофосфата на показатели интенсивности гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах крови крыс с изопреналин-индуцированным повреждением миокарда. Известно, что в ишемизированном миокарде наблюдается переход от аэробного к анаэ-



Рис. 3. Активность сывороточных ферментов АСТ (а), АЛТ (б) и коэффициент де Ритиса (в) у крыс в экспериментальных группах. Представлены среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n = 5-6). * -p < 0.05 относительно контрольной группы; [#] -p < 0.05 относительно группы «ИЗО».

робному метаболизму, при этом гликолиз становится основным источником АТФ [5–7]. В работе были исследованы активности цитоплазматиче-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

ского фермента гликолиза лактатдегидрогеназы, который участвует в окислении глюкозы до молочной кислоты в анаэробных условиях, и ключевого маркера митохондрий сукцинатлегидрогеназы в лимфоцитах крови крыс с изопреналининдуцированным повреждением миокарда. Обнаружено, что повреждение миокарда у крыс сопровождалось увеличением активности данных ферментов в лимфоцитах крови (рис. 6). Полученные данные могут быть связаны с развитием компенсаторных реакций, направленных на усиление гликолиза и окислительного фосфорилирования в лимфоцитах крови в ответ на введение животным избыточного количества изопреналина. Обнаружено, что введение уридина и УМФ крысам с повреждением миокарда приводило к статистически значимому снижению повышенной активности ЛДГ и СДГ. В контрольной группе животных введение УМФ вызывало повышение активности СДГ. Предположительно, УМФ может стимулировать активность ферментов шикла Кребса за счет образования АДФ и УДФ под действием УМФ-киназы [16, 18]. Однако этот вопрос требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показана сходная эффективность применения уридина и УМФ в качестве средств метаболической защиты при остром повреждении миокарда. вызванном избыточной стимуляцией β-адренорецепторов. Эти данные подтверждаются недавними клиническими исследованиями о том, что повышение уровня уридина в плазме способствует снижению риска развития фибрилляции предсердий и атеросклероза [29, 30]. Наши предыдущие исследования демонстрируют, что в условиях ишемии и реперфузии введение уридина и УМФ предотвращает развитие редокс дисгомеостаза миокарда и нарушения сердечного ритма у крыс [15, 19]. Положительное действие этих соединений в отношении окислительного стресса и воспаления миокарда может быть связано с активацией митоКАТФ-каналов и нормализацией активности систем антиоксидантной защиты [14, 15, 19].

Полученные данные о защитном действии уридина и УМФ в отношении повреждения миокарда при гиперстимуляции катехоламинами могут быть использованы для разработки эффективных комплексных подходов к лечению стрессиндуцированных инфарктов и сердечной недостаточности. Однако необходимы дальнейшие исследования для выяснения основных механизмов действия уридина и его фосфорилированных производных как при остром, так и при персистирующем повреждении миокарда.



Рис. 4. Типичные записи ЭКГ крыс во втором отведении в исследуемых экспериментальных группах.



Рис. 5. Основные параметры ЭКГ крыс в экспериментальных группах: продолжительность наиболее распространенных интервалов (в миллисекундах) R-R_{cp}, P-R, P, QRS, R и QT, QTc. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего для группы из пяти животных. * -p < 0.05 относительно контрольной группы; # - p < 0.05 относительно группы «ИЗО».



Рис. 6. Активность ферментов ЛДГ (а) и СДГ (б) в лимфоцитах крови крыс в экспериментальных группах. Представлены среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n = 5-6). * -p < 0.05 относительно контрольной группы; [#] -p < 0.05 относительно группы «ИЗО».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке ИТЭБ РАН в рамках государственного задания № 075-00224-24-03.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием лабораторных животных, соответствовали этическим стандартам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации (2000). Все протоколы были одобрены Комиссией по биобезопасности и биоэтике ИТЭБ РАН (разрешение № 8 от 08 февраля 2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lindstrom M., DeCleene N., Dorsey H., Fuster V., Johnson C. O., LeGrand K. E., Mensah G. A., Razo C., Stark B., Varieur Turco J., and Roth G. A. Global burden of cardiovascular diseases and risks collaboration. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **80** (25), 2372–2425 (2022). DOI: 10.1016/j.jacc.2022.11.001
- Marzilli M., Merz C. N., Boden W. E., Bonow R. O., Capozza P. G., Chilian W. M., DeMaria A. N., Guarini G., Huqi A., Morrone D., Patel M. R., and Weintraub W. S. Obstructive coronary atherosclerosis and ischemic heart disease: an elusive link! *J. Am. Coll. Cardiol.*, **60** (11), 951–956 (2012). DOI: 10.1016/j.jacc.2012.02.082

 Ponikowski P., Voors A. A., Anker S. D., Bueno H., Cleland J. G. F., Coats A. J. S., Falk V., González-Juanatey J. R., Harjola V.-P., Jankowska E. A., Jessup M., Linde C., Nihoyannopoulos P., Parissis J. T., Pieske B., Riley J. P., Rosano G. M. C., Ruilope L. M., Ruschitzka F., Rutten F. H., and van der Meer P. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.*, 37 (27), 2129–2200 (2016). DOI: 10.1093/eurheartj/ehw128

- Severino P., D'Amato A., Pucci M., Infusino F., Birtolo L. I., Mariani M. V., Lavalle C., Maestrini V., Mancone M., and Fedele F. Ischemic heart disease and heart failure: role of coronary ion channels. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (9), 3167 (2020). DOI: 10.3390/ijms21093167
- Marzilli M. Myocardial energy balance and metabolism as causes of myocardial ischemia. *Vascul. Pharmacol.*, **154**, 107273 (2024). DOI: 10.1016/j.vph.2023.107273
- Pepine C. J. and Douglas P. S. Rethinking stable ischemic heart disease: is this the beginning of a new era? *J. Am. Coll. Cardiol.*, 60, 11, 957–959 (2012). DOI: 10.1016/j.jacc.2012.04.046
- Tamis-Holland J. E., Jneid H., Reynolds H. R., Agewall S., Brilakis E. S., Brown T. M., Lerman A., Cushman M., Kumbhani Dh. J., Arslanian-Engoren C., Bolger A. F., and Beltrame J. F. Contemporary diagnosis and management of patients with myocardial infarction in the absence of obstructive coronary artery disease: A scientific statement from the american heart association. *Circulation*, **139** (18), 891–908 (2019). DOI: 10.1161/CIR.000000000000670

- 8. Kuznetsov A. V., Javadov S., Margreiter R., Grimm M., Hagenbuchner J., and Ausserlechner M. J. The role of mitochondria in the mechanisms of cardiac ischemia-reperfusion injury. Antioxidants (Basel), 8 (10), 454 (2019). DOI: 10.3390/antiox8100454
- 9. Ramaraj R. Stress cardiomyopathy: aetiology and management. Postgrad. Med. J., 83 (982), 543-546 (2007). DOI: 10.1136/pgmj.2007.058776
- 10. Yoganathan T., Perez-Liva M., Balvay D., Le Gall M., Lallemand A., Certain A., Autret G., Mokrani Ya., Guillonneau F., Bruce J., Nguyen V., Gencer U., Schmitt A., Lager F., Guilbert Th., Bruneval P., Vilar J., Maissa N., Mousseaux E., Viel Th., Renault G., Kachenoura N., and B. Tavitian Acute stress induces long-term metabolic, functional, and structural remodeling of the heart. Nat. Commun., 14 (1), 3835 (2023), DOI: 10.1038/s41467-023-39910-7
- 11. Boarescu P.-M., Boarescu I., Bulboaca A., Pârvu A., Gheban D., and Bolboaca S. Isoproterenol induced myocardial infarction in rats: dose identification. Clujul. Med., 91, S39-S40 (2018). DOI: 10.1016/j.phyplu.2023.100472
- 12. Diao H., Gu H., and Chen Q. M. Hyperkalemic or low potassium cardioplegia protects against reduction of energy metabolism by oxidative stress. Antioxidants (Basel), 2023 12 (2), 452 (2023). DOI: 10.3390/antiox12020452
- 13. Guarini G., Huqi A., Morrone D., and Marzilli M. Pharmacological agents targeting myocardial metabolism for the management of chronic stable angina : an update. Cardiovasc. Drugs Ther., 30 (4), 379-391 (2016). DOI: 10.1007/s10557-016-6677-y
- 14. Horton J. L. and Virag J. Use of multifactorial treatments to address the challenge of translating experimental myocardial infarct reduction strategies. Int. J. Mol. Sci., 20 (6), 1449 (2019). DOI: 10.3390/ijms20061449
- 15. Mironova G. D., Negoda A. E., Marinov B. S., Paucek P., Costa A. D., Grigoriev S. M., Skarga Y. Y., and Garlid K. D. Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K⁺ channel (mito-KATP) and its inward rectifier subunit (mitoKIR). J. Biol. Chem., 279 (31), 32562-32568 (2004). DOI: 10.1074/jbc.M401115200
- 16. Zhang Y., Guo S., Xie C., and Fang J. Uridine Metabolism and its role in glucose, lipid, and amino acid homeostasis. Biomed. Res. Int., 7091718 (2020). DOI: 10.1155/2020/7091718
- 17. Mironova G. D., Khrenov M. O., Talanov E. Y., Glushkova O. V., Parfenyuk S. B., Novoselova T. V., Lunin S. M., Belosludtseva N. V., Novoselova E. G., and Lemasters J. J. The role of mitochondrial KATP channel in anti-inflammatory effects of uridine in endotoxemic mice. Arch. Biochem. Biophys., 654, 70-76 (2018). DOI: 10.1016/j.abb.2018.07.006
- 18. Krylova I. B., Selina E. N., Bulion V. V., Rodionova O. M., Evdokimova N. R., Belosludtseva N. V., Shigaeva M. I.,

and Mironova G. D. Uridine treatment prevents myocardial injury in rat models of acute ischemia and ischemia/reperfusion by activating the mitochondrial ATPdependent potassium channel. Sci. Rep., 11 (1), 16999 (2019). DOI: 10.1038/s41598-021-96562-7

- 19. Belosludtseva N. V., Starinets V. S., Mikheeva I. B., Belosludtsev M. N., Dubinin M. V., Mironova G. D., and Belosludtsev K. N. Effect of chronic treatment with uridine on cardiac mitochondrial dysfunction in the C57BL/6 mouse model of high-fat diet-streptozotocininduced diabetes. Int. J. Mol. Sci., 23 (18), 10633 (2022). DOI: 10.3390/iims231810633
- 20. Liu Z., Li W., Geng L., Sun L., Wang Q., Yu Y., Yan P., Liang Ch., Ren J., Song M., Zhao Q., Lei J., Cai Yu., Li J., Yan K., Wu Z., Chu Q., Li J., Wang S., Li Ch., Han J.-D. J., Hernandez-Benitez R., Shyh-Chang Ng., Belmonte J. C. I., Zhang W., Qu J., and Liu G.-H., Cross-species metabolomic analysis identifies uridine as a potent regeneration promoting factor. Cell Discov., 8 (1), 6 (2022). DOI: 10.1038/s41421-021-00361-3
- 21. Yamamoto T., Koyama H., Kurajoh M., Shoji T., Tsutsumi Z., and Moriwaki Y. Biochemistry of uridine in plasma. Clin. Chim. Acta, 412 (19-20), 1712-1724 (2011). DOI: 10.1016/j.cca.2011.06.006
- 22. Krylova I. B., Kachaeva E. V., Rodionova O. M., Negoda A. E., Evdokimova N. R., Balina M. I., Sapronov N. S., and Mironova G. D. The cardioprotective effect of uridine and uridine-5'-monophosphate: the role of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel. Exp. Gerontol., 41 (7), 697-703 (2006).

DOI: 10.1016/j.exger.2006.03.005

- 23. Khunderyakova N. V., Yachkula T. V., Zakharchenko M. V., Plyasunova S. A., Sukhorukov V. S., Baranich, N. I., Litvinova E. G., Fedotcheva N., Schwartsburd P., and Kondrashova M., Cytobiochemical biomarkers of the state of mitochondria in Humans. I. A new assessment of Warburg effect by the ratio of lactate dehydrogenase to succinate dehydrogenase activity in lymphocytes as a distinct biomarker of pronounced differences between leukemia, norm and myopathy in young patients. J. World Mitochondria Soc., 2 (2) (2017). DOI: 10.18143/JWMS v2i2 1930
- 24. Nichtova Z., Novotova M., Kralova E., and Stankovicova T. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. Gen. Physiol. Biophys., 31 (2), 141-151 (2012). DOI: 10.4149/gpb 2012 015
- 25. Krestinin R., Baburina Y., Odinokova I., Kruglov A., Sotnikova L., and Krestinina O. The Effect of Astaxanthin on Mitochondrial Dynamics in Rat Heart Mitochondria under ISO-Induced Injury. Antioxidants (Basel), 12 (6), 1247 (2023). DOI: 10.3390/antiox12061247
- 26. Belosludtseva N. V., Pavlik L. L., Mikheeva I. B., Talanov E. Y., Serov D. A., Khurtin D. A., Belosludtsev K. N., and Mironova G. D. Protective Effect of

БИОФИЗИКА том 69 Nº 4 2024 Uridine on Structural and Functional Rearrangements in Heart Mitochondria after a High-Dose Isoprenaline Exposure Modelling Stress-Induced Cardiomyopathy in Rats. *Int*. *J. Mol. Sci.*, **24** (24), 17300 (2023). DOI: 10.3390/ijms242417300

- Feng W. and Li W. The study of ISO induced heart failure rat model. *Exp. Mol. Pathol.*, 88 (2), 299–304 (2010). DOI: 10.1016/j.yexmp.2009.10.011
- Pham V. A., Tran H. Th., Mai Th. Ph., Nguyen L. H., Nguyen V. H., Nguyen Th. H., Bui S. S., Vu A. V., Do H. Th., Trinh Q. V. Myocardial infarction model induced by isoproterenol in rats and potential cardio-

vascular protective effect of a nattokinase-containing hard capsule. *Phytomed. Plus*, **3**, 100472, 2667–0313 (2023). DOI: 10.1016/j.phyplu.2023.100472

- Xu X., Zhang X., Cheng S., Li Q., Chen C., and Ouyang M. Protective effect of uridine on atrial fibrillation: a Mendelian randomisation study. *Sci. Rep.*, **13** (1), 19639 (2023). DOI: 10.1038/s41598-023-47025-8
- Cheng T., Wang H., and Hu Y. The causal effects of genetically determined human blood metabolites on the risk of atrial fibrillation. *Front. Cardiovasc. Med.*, 10, 1211458 (2023). DOI: 10.3389/fcvm.2023.1211458

Study of the Cardioprotective Properties of Uridine-5'-Monophosphate and Uridine in a Rat Model of Myocardial Damage Induced by Isoprenaline

N.V. Belosludtseva*, T.A. Uryupina*, D.A. Khurtin**, N.V. Khunderyakova*, and G.D. Mironova*

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

**Mari State University, pl. Lenina 1, Yoshkar-Ola, Mari El, 424001 Russia

The effects of uridine and its monophosphoryl derivative both on the level of the main biochemical markers of myocardial damage in the blood and the electrical activity of the heart were investigated in a rat model of cardiomyopathy induced by isoprenaline. It was shown that the administration of isoprenaline (150 mg/kg, subcutaneously) caused an increase in the activity of serum enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), leading to the elevated AST/ALT ratio or De Ritis ratio, and enhanced activity of lactate dehydrogenase in blood lymphocytes, which confirms the development of myocardial damage in experimental animals. ECG analysis has revealed prolonged RR, P-R, QT, QTc intervals and QRS complex, which indicates that the duration of depolarization and repolarization phases increases relative to the duration of the cardiac cycle in rats with isoprenaline-induced myocardial damage. Preliminary administration of uridine and uridine-5'-monophosphate to experimental animals at a dose of 30 mg/kg equally effectively prevented an increase in the enzymatic activity of AST and the De Ritis ratio, led to a decrease in the duration of P-R, QRS, QT and QTc intervals as well as to partial normalization of metabolic activity of rat blood lymphocytes. These findings suggest that uridine and uridine-5'-monophosphate have a similar protective effect on the contractile function of cardiomyocytes and can be used as agents for metabolic therapy in the treatment of ischemic heart disease.

Keywords: uridine, UMP, cardiomyopathy, isoprenaline, electrocardiography, oxidative phosphorylation, glycolysis

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 577.121, 57.041, 616-079.4

¹Н-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ В МЕТАБОЛИЗМЕ ПРИ РАЗВИТИИ САРКОМЫ М-1 У КРЫС

© 2024 г. А.Е. Егоров*, А.С. Быков*, Т.И. Пономарева**, М.В. Молчанов*, Н.М. Панкратова***, А.Н. Панкратов***, А.Г. Аракелян*, С.Н. Корякин****, М.А. Тимченко*,#

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

**Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук, просп. Науки, 6, Пущино Московской области, 142290, Россия

***Институт математических проблем биологии РАН — филиал Федерального исследовательского центра

«Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша Российской академии наук»,

ул. проф. Виткевича, 1, Пущино Московской области, 142290, Россия

****Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского радиологического центра Министерства здравоохранения Российской Федерации,

ул. Королёва, 4, Обнинск, Калужская область, 249036, Россия

#E-mail: maria_timchenko@mail.ru Поступила в редакцию 14.03.2024 г. После доработки 18.06.2024 г. Принята к публикации 03.07.2024 г.

Для оценки эффективности метода ЯМР-метаболомики для обнаружения изменений в метаболизме при канцерогенезе с помощью ¹Н-ЯМР-спектроскопии нами было проведено сравнение количественного состава метаболитов в плазме крови крыс для здоровой группы животных и группы животных, которым перевивали саркому М-1. У исследуемых групп после перевития саркомы отбирали плазму на 12-е и на 36-е сутки для выявления метаболитов, ассоциированных с развитием опухоли. Анализ ЯМР-спектров с применением многомерных статистических методов показал, что исследуемые группы различались уже на 12-е сутки после перевивки, на 36-е сутки отличие было существенным. Количественно определяли 23 метаболита. На 12-е сутки достоверно отличались между группами только лактат и аллантоин, тогда как на 36-е сутки различались уже 9 метаболитов. Все обнаруженные метаболиты участвуют в метаболизме рака, что позволяет расценивать ¹Н-ЯМРспектроскопию как перспективный метод диагностики рака.

Ключевые слова: ЯМР-спектроскопия, метаболомика, саркома М-1.

DOI: 10.31857/S0006302924040178, EDN: NFUWPX

Во всем мире с каждым годом наблюдается увеличение частоты случаев возникновения рака и высокий уровень смертности от него. Ежегодно в России диагностируется более 600 тысяч новых случаев рака, причем смертность от онкологических заболеваний занимает второе место по летальности после заболеваний сердечно-сосудистой системы. В первый год с момента установления диагноза умирает практически каждый третий человек. Основная проблема заключается в том, что рак диагностируется уже на поздних стадиях, когда лечение может быть неэффективно. Следовательно, приоритетным направлением является внедрение широкого спектра методов для ранней диагностики рака. Обнаружение рака на ранних стадиях дает возможность проводить своевременное лечение, что увеличивает вероятность выживаемости, позволяет избежать сложной и болезненной противоопухолевой терапии, а также позволяет снизить стоимость лечения, что, в целом, улучшает качество жизни пациента.

Основными используемыми на сегодняшний день в медицине методами выявления рака на ранней стадии являются клинические и биохимические анализы крови, мочи, анализ крови на онкомаркеры, а также широкий спектр инструментальных методов: компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, флюорогра-

Список сокращений: ЯМР – ядерный магнитный резонанс; ТСП – 3-триметилсилил-[2,2,3,3-²Н4] пропионат натрия; м.д. – миллионная доля.

фия, ультразвуковые исследования. В качестве одного из перспективных методов ранней диагностики рака, а также оценки эффективности терапии может выступать спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия). ЯМР-анализ биологических жидкостей позволяет одновременно количественно определять до 70 метаболитов. ЯМР позволяет отслеживать изменения метаболических профилей при естественном прогрессировании заболевания или после различных стадий лечения за счет колебаний концентраций обнаруженных метаболитов. Этот метод соответствует многим критериям, которые позволяют ему быть мощным аналитическим инструментом для метаболомных исследований биологических жидкостей: минимальная пробоподготовка или ее отсутствие, экономическая эффективность, беспристрастность, быстрота (получение результата уже через 15 мин), надежность, воспроизводимость, возможность получения количественных данных, его недеструктивность. Благодаря этим особенностям можно будет уменьшить необходимость инвазивного сбора тканей.

ЯМР-спектроскопию используют для исслелования состава биологических жилкостей еще с 1980-х годов. Этот метод предоставляет подробную структурную информацию об органических молекулах и позволяет идентифицировать и каталогизировать большое количество соединений. К настоящему времени накоплено огромное количество данных по метаболическому анализу с помощью ЯМР-спектроскопии биологических жидкостей при различных видах рака как для модельных животных, так и для человека. Согласно литературным данным [1–4], чувствительность и специфичность выявления развития раковых заболеваний на ранних стадиях методом ЯМРспектроскопии достигает 90-100%, с такой же высокой специфичностью можно выявить развитие метастаз, а также провести дифференцировку различных видов рака с определением стадии рака.

Саркомы представляют собой редкие и гетерогенные опухоли мезенхимального происхождения и составляют 1% случаев рака у взрослых и 15% случаев рака у детей [5]. Большая часть сарком (\approx 75%) развивается из мягких тканей, меньшая часть (\approx 10%) — из костей [6].

Для сарком, как и для других опухолей, характерна аномальная метаболическая активность, но имеющиеся данные о метаболоме сарком мягких тканей и костей относительно скудны. Предыдущие исследования по метаболомике саркомы в основном проводились на клеточных линиях [7, 8] из-за гораздо большей простоты замораживания их метаболомного статуса; метаболом быстро реагирует на изменения в кислороде, кровоснабжении и т. д. Кроме того, с помощью масс-спектрометрического анализа была проведена оценка метаболитов в тканях при саркомах высокой степени злокачественности, включая лейомиосаркому высокой степени злокачественности, миксофибросаркому, недифференцированную плеоморфную саркому и остеосаркому [9]. Метод ЯМР-спектроскопии (³¹P-¹H-²H-ЯМР-спектроскопии) *in vivo* был применен для оценки концентрации фосфатных метаболитов в тканях при радиационно-индуцированной фибросаркоме [10].

Метаболомный анализ биологических жидкостей при некоторых видах саркомы применялся только в отдельных исследованиях. В работе [11] с помощью метода газовой хроматографии и массспектрометрии было проведено профилирование низкомолекулярных метаболитов в сыворотке и моче пациентов с остеосаркомой для установления изменений, связанных с канцерогенезом. Метод ¹Н-ЯМР-спектроскопии был использован только в работе [12] для определения дифференциального метаболического профиля в сыворотке крови пациентов с хондроидными опухолями (энхондромы и хондросаркомы).

Дальнейшая характеристика метаболического профиля при различных видах саркомы позволит усовершенствовать диагностику и определить новые терапевтические цели, что улучшит выживаемость и качество жизни пациентов.

В данной работе с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии был проведен анализ изменений в составе метаболитов и их концентрации при росте опухоли в плазме крови крыс с перевивной поверхностной солидной соединительнотканной саркомой М-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования выполнены на самцах беспородных белых крыс массой тела 150– 170 г. В работе использовали две группы крыс (по 5 крыс в каждой группе), представлявших собой контрольную группу и группу с привитой на заднюю лапку саркомой М-1 [13]. Животных содержали в стандартных условиях вивария Комплекса протонной терапии МРНЦ им. А.Ф. Цыба согласно всем нормативным актам, принятым для подобных учреждений.

Отбор образцов крови. Первый отбор крови проходил через 12 суток после перевивки опухоли, второй — на стадии некроза за несколько дней до терминальной стадии (36 суток после перевивки опухоли). Кровь забирали путем ампутации кончика хвоста. Кровь отбирали в вакуумные литий-гепариновые пробирки, центрифугировали (2200 g, 10 мин) и отбирали плазму, после чего помещали в морозильную камеру и хранили при -20°С до анализа.

Подготовка образца для ЯМР-спектроскопии. Образцы плазмы крыс (в среднем по 100 мкл каждый) размораживали, добавляли 500 мкл дистиллированной воды и 30 мкл 4 мМ стандарта ТСП – 3-триметилсилил-[2,2,3,3-²H₄] пропионата натрия (Sigma-Aldrich, США) в 1 М фосфатном буфере (рН 7.2) на тяжелой воде, интенсивно перемешивали и центрифугировали при 10000 об/мин 5 мин. Образец (600 мкл) помещали в ЯМР-ампулу диаметром 5 мм.

Регистрация и предварительная обработка 1D-**ЯМР-спектров.** Протонные 1D-спектры регистрировали в Центре коллективного пользования ИТЭБ РАН на ЯМР-спектрометре AVANCE III 600 фирмы Bruker (Германия) с рабочей частотой по протонам 598.95 МГц. Спектры регистрировали с использованием стандартных импульсных последовательностей из библиотеки импульсных последовательностей фирмы Bruker. Все измерения проводили при 298 К (25°С). Для подавления сигнала от протонов воды использовался метод предварительного насыщения с применением 1D-импульсной последовательности СРМG. Число накоплений составляло 64 скана, спектральная ширина – 24 м.д. При снятии ЯМРспектров интервал между сканами составлял 10 с. этого было достаточно для релаксации протонов всех наблюдаемых метаболитов. Отнесение химических сдвигов проводили по сигналу глюкозы, расположенному в интервале 5.15-5.30 м.д., в качестве внутреннего образца сравнения выступал ТСП. Для подтверждения наших результатов использовали спектральную базу ланных программного обеспечения AMIX (версия 3.9.7) фирмы Bruker. Обработку спектров и вычисление интегралов проводили в программе TOPSPIN (версия 2.1) фирмы Bruker.

Нецелевой анализ данных ЯМР-спектроскопии. Нецелевой анализ полученного набора спектральных данных ЯМР проводили с использованием языка программирования R (версия 4.3.0) в среде RStudio (версия 2023.06.0+421) и библиотеки metabom8 [14] с открытым исходным кодом, доступной на pecypce GitHub (github.com/tkimhofer/metabom8, версия 1.0.0). Калибровка спектров была выполнена по дублету глюкозы, распложенному в интервале 5.15-5.30 м.д. Так же были выполнены коррекция базовой линии, нормализация PQN [15], удалены высокопольные и низкопольные области спектра, содержащие шумы и сигнал от ТСП, кроме того, была удалена область 4.50-5.00 м.д., содержащая остаточные сигналы протонов воды. Анализ главных компонент (PCA) и дискриминантный анализ (O-PLS-DA) использовался для оценки межгрупповых различий и вклада в это отдельных метаболитов. Перед применением этих методов выполняли шкалирование данных методами Парето и UV.

Указанные многомерные методы анализа данных выполнялись с использованием уже упомянутой ранее библиотеки metabom8, в которой для их выполнения есть соответствующие функции.

Статистический анализ. Для оценки уровня значимости межгрупповых различий полученных показателей был проведен анализ полученных метаболитов в 12-е и 36-е сутки исследования непараметрическим *U*-критерием Манна–Уитни. Кроме того, было проведено сравнение групп контроля в 12-е и 36-е сутки для исключения из исследования метаболитов, имеющих отличия в группах контроля. Различия считали достоверными при $U_{\rm kp} \le 4$ (для двух групп по 5 особей в каждой) и p < 0.05.

Для исследования отобраны метаболиты, у которых нет значимых отличий в группах контроля.

Также использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена как интегральный показатель отличий между разными особями.

Для определения метаболитов плазмы крови, которые вносят основной вклад в диагностику при развитии саркомы, были построены ROCкривые для значимых по критерию Манна–Уитни метаболитов.

На основе анализа кривой рабочих характеристик приемника (ROC) также рассчитывали площадь под кривой ROC (AUC) для оценки значений чувствительности и специфичности.

Для поиска метаболитов были использованы интернет-ресурсы Biochemical Pathways (https:// biochemical-pathways.com/, дата доступа: 14.02.2024) и MetaboLights (https://www.ebi.ac.uk/ metabolights, дата доступа: 14.02.2024), для построения картинки применяли модуль python schemdraw. В качестве базы данных использовали KEGG PATHWAY (https://www.genome.jp/kegg/ pathway.html, дата доступа: 14.02.2024).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для контрольной группы крыс и группы с перевитой саркомой М-1 были получены ¹Н-ЯМРспектры плазмы крови на 12-е и 36-е сутки после перевивки.

Для оценки, существует ли значительная разница между исследуемыми группами (здоровыми и больными животными), полученные ¹Н-ЯМРспектры, для которых предварительно была проведена фазовая коррекция в программе TOPSPIN, анализировались с помощью многомерного статистического анализа с использованием метода главных компонент в библиотеке metabom8 [14]. Метод главных компонент является наиболее популярным неконтролируемым статистическим методом для обработки данных, полученных с помощью различных омикс-техно-



Рис. 1. Различия групп крыс (контрольной и с саркомой М-1) в пространстве главных компонент: (а) – различия, наблюдаемые на 12-е сутки перевивки опухоли, (б) – на 36-е сутки. Первые три главные компоненты описывают около 78% вариации исходных данных.

логий, и не требует никаких предварительных предположений или знаний. Неконтролируемые методы обычно представляют собой первый шаг в анализе данных, помогая визуализировать данные и обнаружить возможные выбросы [16]. Результаты анализа с помощью метода главных компонент спектров, полученных для плазмы крови здоровой группы и группы крыс с саркомой М-1 на 12-е сутки после ее перевивки, приведены на рис. 1.

Как видно из приведенных данных, группы дифференцируются между собой уже на 12-е сутки после привития саркомы, на 36-е сутки различия становятся значительными.

Для выявления метаболитов, которые вносят вклад в различие между группами, используются методы с обучающей выборкой [16], что позволяет более эффективно выявлять низкомолекулярные биомаркеры, характеризующие конкретное заболевание. К полученным данным для разных дней был применен один из таких статистических методов — дискриминантный анализ ортогональных проекций на латентные структуры (OPLS-DA) в библиотеке metabom8 (рис. 2), который показал хорошее разделение групп на 36-е сутки.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые группы отличаются, что позволяет предположить, что метаболиты, различие в которых позволяет дифференцировать группы, могут рассматриваться как биомаркеры данной стадии заболевания.

Был проведен поиск и количественный анализ метаболитов в плазме крови контрольной и больной групп. С помощью ЯМР-анализа с использованием базы данных AMIX (Bruker, Германия)



Рис. 2. Анализ различий групп крыс (контрольной и с саркомой M-1) с помощью OPLS-DA на 36-е сутки.

	. ,	15 1	x			
	Метаболиты	Химические сдвиги (м.д.) и мультиплетность, pH 7.2 ± 0.1	Отличие внутри контрольной группы на 12-е и 36-е сутки	Отличие между контрольной и экспериментальной группами на 12-е сутки	Отличие между контрольной и эксперимен- тальной группами на 36-е сутки	
1	Формиат	8.459 s [CH]				
2	Тирозин	6.903 d [аром. СН]; 7.198 d [аром. СН]				
3	Аллантоин	5.393 s [CH]		+	+	
4	Глюкоза	3.251 dd [2CH] (β-изомер); 5.239 d [1CH] (α-изомер)	+	+		
5	Серин	3.835 m [CH]; 3.970 m [CH2]			+	
6	Бетаин	3.26 s [N-(CH3)3]; 3.91 s [CH2]			+	
7	Треонин	1.331 d [CH3]; 3.579 d [CH]; 4.249 m [CH]			+	
8	Глицин	3.56 s [CH2]				
9	Холин	3.207 s [N-(CH3)3]; 3.525 m [CH2]; 4.067 m [CH2]	+			
10	Креатинин	3.048 s [CH3]; 4.059 s [CH2]	+			
11	Креатин	3.040 s [CH3]; 3.933 s [CH2]				
12	Лизин	1.487 m [CH2]; 1.733 m [CH2]; 1.908 m [CH2]; 3.030 t [CH2]; 3.755 t [CH]	+		+	
13	Глутамин	2.138 m [CH2]; 2.455 m [CH2]; 3.765 t [CH]			+	
14	Сукцинат	2.41 s [CH2]			+	
15	Пируват	1.487 s [CH3] (диол); 2.376 s [CH3] (кетон); (кетон/диол~10)			+	
16	Ацетон	2.230 s [CH3]				
17	Ацетат	1.920 s [CH3]	+		+	
18	Аланин	1.483 d [CH3]; 3.785 q [CH]	+			
19	Лактат	1.331 d [CH3]; 4.114 q [CH]		+	+	
20	3-Гидроксибутират	1.203 d [CH3]; 2.307 dd [CH2]; 2.410 dd [CH2]; 4.152 m [CH]	+		+	

Таблица 1. Метаболиты, обнаруженные в плазме крови крыс с помощью ¹Н-ЯМР-спектроскопии

860

	Метаболиты	Химические сдвиги (м.д.) и мультиплетность, pH 7.2 ± 0.1	Отличие внутри контрольной группы на 12-е и 36-е сутки	Отличие между контрольной и экспериментальной группами на 12-е сутки	Отличие между контрольной и эксперимен- тальной группами на 36-е сутки
21	Валин	0.994 d [CH3], 1.045 d [CH3]; 2.277 m [CH]; 3.612 d [CH]	+		+
22	Изолейцин	0.943 t [CH3]; 1.013 d [CH3]; 1.986 m [CH]; 1.268 m [½CH2]; 1.477 m [½CH2]; 3.674 m [CH]			
23	Лейцин	0.965 t [CH3]; 1.719 m [CH; CH2];			+

Таблица 1. Окончание

Примечание. s – Синглет, d – дублет, dd – дублет дублетов, t – триплет, m – мультиплет, «+» – достоверное отличие концентраций метаболитов в группах.

обнаружено и количественно определено 23 метаболита в плазме крови крыс (табл. 1).

3.738 m [CH]

U-критерий Манна—Уитни показал, что внутри контрольной группы на 12-е и 36-е сутки концентрации нескольких метаболитов достоверно отличались (табл. 1). Изменение концентраций данных метаболитов, скорее всего, связано с возрастом мышей. Для более точного определения маркеров развития саркомы эти метаболиты были исключены из дальнейшего рассмотрения. Различия считали достоверными при $U_{\rm kp} \leq 4$ (для двух групп из 5 особей каждая), p < 0.05. Для оценки вариации между особями использовали ранговую корреляцию Спирмена по всем обнаруженным метаболитам (рис. 3). Чем ближе коэффициент корреляции к единице, тем меньше различие между особями. На рис. 3 приведены результаты вычисления корреляции между векторами метаболитов для всех записей: записи 1–5 соответствуют контрольной группе на 12-е сутки, записи 6–10 – экспериментальной группе на 12-е сутки, записи 11–15 – контрольной группе на 36-е сутки и записи 16–20 – экспериментальной группе на 36-е сутки. Левая карта отображает корреляцию для полных векторов метаболитов, а правая карта – корреляцию для реду-



Рис. 3. Карта взаимной попарной ранговой корреляции Спирмена между векторами измерений метаболитов для всех особей: (а) — для всех метаболитов; (б) — после исключения метаболитов, достоверно изменяющихся внутри контрольной группы в ходе эксперимента.



Рис. 4. Средние значения концентраций статистически значимых метаболитов в группах на 12-е и 36-е сутки эксперимента.

цированных векторов, из которых удалены метаболиты, отличающиеся в контрольной группе на 12-е и на 36-е сутки, согласно табл. 1. Видно, что после удаления 8 метаболитов (табл. 1, столбец 3) корреляции между записями контрольной группы на 12-е и на 36-е сутки выравниваются по отношению к корреляциям между записями внутри группы. Также видно, что 6 запись, соответствующая одной особи в экспериментальной группе, существенно отличается уже на 12-е сутки от других особей в группе. Карта также показывает, что особи экспериментальной группы на 36-е сутки значимо различаются от группы контроля.

Обнаружено, что уже на 12-е сутки после перевивки саркомы содержание аллантоина и лактата в плазме крови крыс с опухолью достоверно возрастало по сравнению с контрольной группой. К 36-м суткам развития опухоли у больных крыс в качестве возможных маркеров саркомы определяется уже 9 метаболитов (табл. 1).

На рис. 4 показано изменение концентраций метаболитов, имеющих достоверное отличие между контрольной и экспериментальной группами на 12-е и 36-е сутки, за исключением метаболитов, по которым найдено достоверное отличие в контрольной группе на 12-е и 36-е сутки.

Далее для метаболитов, которые достоверно отличались по *U*-критерию Манна–Уитни, были построены ROC-кривые. Площадь под ROC-

кривой (AUC) отражает диагностическую силу исследуемого параметра (в нашем случае – метаболита). В качестве маркеров развития саркомы были отобраны метаболиты, у которых AUC строго больше 0.8. На рис. 5 показаны ROC-кривые для аллантоина и лактата на 12-е сутки эксперимента, при этом AUC имеют хорошее диагностическое значение – 0.88 и 0.92 соответственно.

На 12-е сутки группы различались по содержанию двух метаболитов — лактата и аллантоина, а через 36 суток — по содержанию 9 метаболитов (аллантоина, серина, бетаина, треонина, глутамина, сукцината, пирувата, лактата, лейцина). Построенные ROC-кривые для этих метаболитов показаны на рис. 6 с указанием значений AUC.

Таким образом, были выделены метаболиты, достоверно значимые при развитии опухоли между контрольной группой и группой с саркомой M-1 на 12-е и 36-е сутки после перевивки опухоли. В табл. 2 показаны значения AUC для ROCкривых метаболитов, которые могут быть маркерами развития саркомы, с указанием направления (+/–) динамики концентраций относительно группы контроля. Согласно экспертной шкале для значений AUC, по которой можно судить о качестве теста [17], считается, что значение $0.8 < AUC \le 0.9$ говорит об очень хорошем качестве теста, значение $0.9 < AUC \le 1 -$ об отличном качестве теста. В соответствии с этой градацией



Рис. 5. ROC-кривые (AUC) для достоверно значимых метаболитов на 12-е сутки эксперимента.



Рис. 6. ROC-кривые (AUC) для достоверно значимых метаболитов на 36-е сутки эксперимента. БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

ЕГОРОВ и др.

	Аллантоин	Серин	Бетаин	Треонин	Глутамин	Сукцинат	Пируват	Лактат	Лейцин
12-е	0.88							0.92	
сутки	+							—	
36-е	0.96	0.96	0.84	0.84	1	0.96	0.96	0.92	1
сутки	+	—	+	+	—	+	+	+	—

Таблица 2. Площадь под ROC-кривой метаболитов-маркеров на 12-е и 36-е сутки после перевивки саркомы М-1

Примечание. «+» – Увеличение концентрации метаболита в экспериментальной группе по сравнению с группой контроля, «-» – уменьшение концентрации метаболита в экспериментальной группе по сравнению с группой контроля.

на 12-е сутки эксперимента метаболит аллантоин является очень хорошим классификатором, а лактат — отличный классификатор развития саркомы. На 36-е сутки эксперимента 2 из 9 отобранных метаболита (бетаин и треонин) являются очень хорошими классификаторами, а остальные 7 (аллантоин, серин, глутамин, сукцинат, пируват, лактат, лейцин) — отличные классификаторы, они могут быть использованы в качестве маркеров развития саркомы. К тому же два из этих маркера (лактат и аллантоин) проявляют себя уже на 12-е сутки эксперимента.

864

Известно, что метаболические изменения, вызванные канцерогенезом, можно обобщить в шести признаках метаболизма рака: дерегулированное поглощение глюкозы и аминокислот, использование оппортунистических способов получения питательных веществ, использование промежуточных продуктов цикла гликолиза/трикарбоновой кислоты для биосинтеза и производства НАДФН, повышенная потребность в азоте, изменения в регуляции генов, управляемых метаболитами, и метаболических взаимодействиях с микроокружением опухоли [18].

Метаболические пути, в которых участвуют метаболиты, различающиеся между группами, представлены на рис. 7.

На поздней стадии (36-е сутки после перевивки саркомы) изменение концентрации большой части обнаруженных метаболитов коррелирует с перечисленными признаками рака. Рост уровня лактата и пирувата обусловлен аэробным гликолизом (эффектом Варбурга) [18]. Пролиферирующие клетки используют эффект Варбурга регули-



Рис. 7. Схематическое представление метаболических путей, в которых участвуют метаболиты, различающиеся между группами (выделены рамками).

руемым образом в периоды повышенной потребности в биосинтезе. Они превращают избыток пирувата в лактат вместо того, чтобы транспортировать его в митохондрии. Надо отметить, что в работе [11] при исследовании метаболизма сыворотки крови при остеосаркоме авторы описывают значительное снижение содержания пирувата и лактата, что не согласуется с метаболическими изменениями при других видах рака. Возможно, это характерная особенность остеосаркомы, но нельзя исключать. что это может быть связано как с малой выборкой, представленной в работе, так и со сложностью установления стадии рака и вероятными сопутствующими патологиями у пациентов, которые сложно детектировать, поскольку исследования проводятся не на модельных организмах.

Еще одним важным спутником канцерогенеза является глутамин, наиболее распространенная аминокислота в плазме, которая обеспечивает критические элементы для пролиферации клеток, такие как углерод и азот [18]. Снижение уровня глутамина может быть связано с усилением глутаминолиза, необходимого для обеспечения предшественников для синтеза нуклеиновых кислот [19, 20]. Приток глутамина в цитоплазму зависит, в том числе, и от серина, уровень которого также снижается. Изменения затрагивают и другие аминокислоты: снижаются уровни тирозина, лейцина, в то же время растет содержание треонина.

Кроме того, очевидно влияние развития опухоли на цикл Кребса, о чем свидетельствует рост уровней сукцината и пирувата.

Также на поздней стадии развития саркомы М-1 было обнаружено повышение уровня бетаина. Раковым клеткам требуются одноуглеродные фрагменты для поддержания их биосинтеза, пролиферации и выживания. Будучи важным донором метила, бетаин играет решающую роль в метаболизме рака. Бетаин может синтезироваться эндогенно в результате двухстадийной реакции окисления холина посредством митохондриальной холиндегидрогеназы и бетаин-альдегиддегидрогеназы. Как было показано в работе [21], высокий уровень бетаина в сыворотке связан с повышенным риском развития рака.

Следует отметить, что на ранней стадии развития саркомы (М-1) достоверно отличались между группами только два метаболита — лактат и аллантоин. Уровень лактата на начальном этапе снижался, как и в работе [11] при развитии остеосаркомы, а уровень аллантоина возрастал, причем эта тенденция характерна и для поздней стадии саркомы М-1. Аллантоин представляет собой основной продукт окисления уратов, конечных продуктов пуринового обмена, и является биомаркером окислительного стресса [22], который, как известно, ассоциируется со всеми этапами опухолевой болезни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение ¹Н-ЯМР-спектроскопии в сочетании с многомерным статистическим анализом позволило успешно отличить метаболический профиль плазмы крыс с саркомой М-1 от профиля здорового контроля. Библиотека metabom8 дала возможность существенно ускорить процедуру обработки и анализа ЯМР-спектров, что позволяет рассматривать ее в качестве перспективного подхода в клинической практике, имеющей дело с большими выборками. Метаболический профиль саркомы М-1 обнаружил нарушение в метаболизме лактата и аллантоина на ранней стадии развития опухоли (12-е сутки после перевивки), на более позлней сталии (36-е сутки после перевивки) наблюдалось нарушение в метаболических циклах, в которых были задействованы 9 метаболитов – ряд аминокислот (тирозин, серин, треонин, лейцин, глутамин), метаболиты, задействованные в аэробном гликолизе и цикле Кребса (лактат, пируват и сукцинат), биомаркер окислительного стресса аллантоин, а также бетаин. Полученные данные о составе метаболитов, обнаруженных на поздней стадии, коррелируют с накопленными в литературе данными по метаболизму различных видов рака.

Таким образом, ЯМР-метаболомика является, несомненно, перспективным диагностическим подходом для выявления рака, причем отдельные обнаруженные метаболиты могут выступать в качестве маркеров определенного его вида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам вивария Комплекса протонной терапии МРНЦ им. А.Ф. Цыба Т.С. Хозяшевой и Т.В. Колесниковой, а также заведующему группой прикладной энзимологии ИБП ФИЦ ПНЦБИ РАН Е.А. Согорину за помощь в проведении эксперимента.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственных заданий № 075-00224-24-00 (для ИТЭБ РАН) и № 122041100157-2 (для ИМПБ РАН — филиала ИПМ им. М.В. Келдыша РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с требованиями, разработанными комиссией по этике МРНЦ им. А.Ф. Цыба, и с Директивой Совета 2010/63 ЕС Европейского парламента и Регламентом Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в научных целях (Страсбург, Франция).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vignoli A., Ghini V., Meoni G., Licari C., Takis P. G., Tenori L., Turano P., and Luchinat C. High-throughput metabolomics by 1D NMR. *Angewandte Chemie* (*Int. ed. in English*), **58** (4), 968–994 (2019). DOI: 10.1002/anie.201804736
- Larkin J. R., Anthony S., Johanssen V. A., Yeo T., Sealey M., Yates A. G., Smith C. F., Claridge T. D. W., Nicholson B. D., Moreland J. A., Gleeson F., Sibson N. R., Anthony D. C., and Probert F. Metabolomic biomarkers in blood samples identify cancers in a mixed population of patients with nonspecific symptoms. *Clin. Cancer Res.*, 28 (8), 1651–1661 (2022). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-2855
- Casadei-Gardini A., Del Coco L., Marisi G., Conti F., Rovesti G., Ulivi P., Canale M., Frassineti G. L., Foschi F. G., Longo S., Fanizzi F. P., and Giudetti A. M. ¹H-NMR based serum metabolomics highlights different specific biomarkers between early and advanced hepatocellular carcinoma stages. *Cancers*, **12** (1), 241 (2020). DOI: 10.3390/cancers12010241
- Singh A., Prakash V., Gupta N., Kumar A., Kant R., and Kumar D. Serum metabolic disturbances in lung cancer investigated through an elaborative NMR-based serum metabolomics approach. *ACS Omega*, 7 (6), 5510–5520 (2022). DOI: 10.1021/acsomega.1c06941
- Florou V., Nascimento A. G., Gulia A., and de Lima Lopes G. Jr. Global health perspective in sarcomas and other rare cancers. *American Society of Clinical Oncology Educational Book (Am. Soc. of Clin. Oncol. Annu. Meet.*), **38**, 916–924 (2018).
 DOI: 10.1200/EDBK 200589
- 6. Casali P. G., Abecassis N., Aro H. T., Baue S., Biagini R., Bielack S., Bonvalot S., Boukovinas I., Bovee J. V. M. G., Brodowicz T., Broto J. M., Buonadonna A., De Álava E., Dei Tos A. P., Del Muro X. G., Dileo P., Eriksson M., Fedenko A., Ferraresi V., Ferrari A., Ferrari S., Frezza A. M., Gasperoni S., Gelderblom H., Gil T., Grignani G., Gronchi A., Haas R. L., Hassan B., Hohenberger P., Issels R., Joensuu H., Jones R. L., Judson I., Jutte P., Kaal S., Kasper B., Kopeckova K., Krákorová D. A., Le Cesne A., Lugowska I., Merimsky O., Montemurro M., Pantaleo M.A., Piana R., Picci P., Piperno-Neumann S.,

Pousa A.L., Reichardt P., Robinson M. H., Rutkowski P., Safwat A. A., Schöffski P., Sleijfer S., Stacchiotti S., Sundby Hall K., Unk M., Van Coevorden F., van der Graaf W. T. A., Whelan J., Wardelmann E., Zaikova O., and Blay J. Y. ESMO Guidelines Committee and EURACAN. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals Oncol.*, **29** (Suppl. 4), iv51–iv67 (2018). DOI: 10.1093/annonc/mdy096

- Chen K., Zhu C., Cai M., Fu D., Cheng B., Cai Z., Li G., and Liu J. Integrative metabolome and transcriptome profiling reveals discordant glycolysis process between osteosarcoma and normal osteoblastic cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **140** (10), 1715–1721 (2014). DOI: 10.1007/s00432-014-1719-y
- Das S., Chatterjee N., Bose D., Banerjee S., Jha T., and Saha K. D. Leishmanial sphingolipid induces apoptosis in Sarcoma 180 cancer cells through regulation of tumour growth via angiogenic switchover. *Tumour Biol.*, 36 (4), 3109–3118 (2015). DOI: 10.1007/s13277-014-2947-0
- Lou S., Balluff B., Cleven A. H. G., Bovée J. V. M. G., and McDonnell L. A. Prognostic metabolite biomarkers for soft tissue sarcomas discovered by mass spectrometry imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, 28 (2), 376–383 (2017). DOI: 10.1007/s13361-016-1544-4
- Shungu D. C., Bhujwalla Z. M., Li S. J., Rose L. M., Wehrle J. P., and Glickson J. D. Determination of absolute phosphate metabolite concentrations in RIF-1 tumors in vivo by ³¹P-¹H-²H NMR spectroscopy using water as an internal intensity reference. *Magnetic Resonance in Medicine*, **28** (1), 105–121 (1992). DOI: 10.1002/mrm.1910280111
- Zhang Z., Qiu Y., Hua Y., Wang Y., Chen T., Zhao A., Chi Y., Pan L., Hu S., Li J., Yang C., Li G., Sun W., Cai Z., and Jia W. Serum and urinary metabonomic study of human osteosarcoma. *J. Proteome Res.*, 9 (9), 4861–4868 (2010). DOI: 10.1021/pr100480r
- López-Garrido L., Bañuelos-Hernández A. E., Pérez-Hernández E., Tecualt-Gómez R., Quiroz-Williams J., Ariza-Castolo A., Becerra-Martínez E., and Pérez-Hernández N. Metabolic profiling of serum in patients with cartilage tumours using ¹H-NMR spectroscopy: A pilot study. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **58** (1), 65–76 (2020). DOI: 10.1002/mrc.4925
- Южаков В. В., Севанькаева Л. Е., Ульяненко С. Е., Яковлева Н. Д., Кузнецова М. Н., Цыганова М. Г., Фомина Н. К., Ингель И. Э. и Лычагин А. А. Эффективность фракционированного воздействия уизлучения и быстрых нейтронов на саркому М-1. *Радиац. биология. Радиоэкология*, **53** (3), 267-279 (2013). DOI: 10.7868/S0869803113020148, EDN: QBHSLV
- 14. Kimhofer T. Metabom8 (Version 1.0.0) [Computer software] (2021). URL: https://github.com/tkim-hofer/metabom8 (дата обращения: 10.06.2023).

- Dieterle F., Ross A., Schlotterbeck G., and Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal. Chem.*, 78 (13), 4281–4290 (2006). DOI: 10.1021/ac051632c
- Trygg J., Holmes E., and Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J. Proteome Res.*, 6 (2), 469–479 (2007). DOI: 10.1021/pr060594q
- Metz C. E. Basic principles of ROC analysis. *Seminars in Nuclear Medicine*, 8 (4), 283–298 (1978). DOI: 10.1016/s0001-2998(78)80014-2
- Esperança-Martins M., Fernandes I., Soares do Brito J., Macedo D., Vasques H., Serafim T., Costa L., and Dias S. Sarcoma metabolomics: current horizons and future perspectives. *Cells*, **10** (6), 1432 (2021). DOI: 10.3390/cells10061432
- 19. Lai H. S., Lee J. C., Lee P. H., Wang S. T., and Chen W. J. Plasma free amino acid profile in cancer pa-

tients. *Seminars in Cancer Biology*, **15** (4), 267–276 (2005). DOI: 10.1016/j.semcancer.2005.04.003

- Altman B. J., Stine Z. E., and Dang C. V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, **16** (10), 619–634 (2016). DOI: 10.1038/nrc.2016.71
- Xie H., Zhang K., Wei Y., Ruan G., Zhang H., Li S., Song Y., Chen P., Liu L., Wang B., and Shi H. The association of serum betaine concentrations with the risk of new-onset cancers: results from two independent nested case-control studies. *Nutrition & Metabolism*, **20** (1), 46 (2023). DOI: 10.1186/s12986-023-00755-y
- 22. Gruber J., Tang S. Y., Jenner A. M., Mudway I., Blomberg A., Behndig A., Kasiman K., Lee C. Y., Seet R. C., Zhang W., Chen C., Kelly F. J., and Halliwell B. Allantoin in human plasma, serum, and nasallining fluids as a biomarker of oxidative stress: avoiding artifacts and establishing real *in vivo* concentrations. *Antioxidants & Redox Signaling*, **11** (8), 1767–1776 (2009). DOI: 10.1089/ars.2008.2364

¹H-NMR Spectroscopy of Blood Plasma for Detection of Changes in Metabolism during the Development of Sarcoma M-1 in Rats

A.Y. Egorov*, A.S. Bykov*, T.I. Ponomareva**, M.V. Molchanov*, N.M. Pankratova***, A.N. Pankratov***, A.G. Arakelyan*, S.N. Koryakin****, and M.A. Timchenko*

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

**Branch of M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Institute of Mathematical Problems of Biology, Russian Academy of Sciences – Branch of M.V. Keldysh Institute of Applied Mathematics, Russian Academy of Sciences, ul. Professora Vitkevicha 1, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

****A.F. Tsyba Medical Radiological Research Centre – Branch of the «National Medical Research Radiological Centre», Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Koroleva 4, Obninsk, Kaluga Region, 249036 Russia

An assessment of the effectiveness of ¹H NMR-based metabolomic analysis for the detection of metabolic changes during carcinogenesis was made based on a comparison of the quantitative composition of metabolites in the blood plasma of rats for healthy rats and rats receiving M-1 sarcoma transplantation. Plasma was collected from the rats under study on day 12 and day 36 after sarcoma transplantation to identify metabolites associated with tumor development. Analysis of NMR spectra using multivariate statistical methods showed differences in the composition of metabolites for the groups of animals under study already on day 12 after sarcoma transplantation; on day 36 the differences were significant. 23 metabolites were quantified. On day 12, only the lactate and allantoin levels were significantly different between the groups, while on day 36, the levels of 9 metabolites were different in rats in all groups. All of the metabolites identified are involved in cancer metabolism, which makes ¹H NMR spectroscopy a promising method for cancer diagnosis.

Keywords: NMR spectroscopy, metabolomics, sarcoma M-1

УЛК 577.3

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФЛЭШ-ЭФФЕКТА В РАДИОБИОЛОГИИ

© 2024 г. С.И. Глухов*, Е.А. Кузнецова*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия *E-mail: serglukhovmb@gmail.com

Поступила в редакцию 15.03.2024 г. После доработки 16.07.2024 г. Принята к публикации 17.07.2024 г.

Использование ионизирующих излучений со сверхвысокой мощностью дозы, называемых флэшоблучением (≥40 Гр/с), способствует сохранению здоровых тканей с уровнем контроля над опухолью, сопоставимым с таковым при облучении со стандартной мощностью дозы. Настоящий обзор обобщает современные знания, посвященные исследованиям облучения опухолевых и нормальных клеточных линий, животных, включая опухоленосителей, в конвенциональном и флэш-режимах. Для сравнения приведены и данные по флэш-облучению фотонами, электронами, протонами, ионами гелия и углерода. Обсуждаются биофизические, молекулярно-биологические и иммунологические аспекты флэш-воздействия, необходимые для понимания радиационно-индуцированных процессов в клетках и тканях в целях совершенствования радиотерапии опухолей.

Ключевые слова: флэш-лучевая терапия, сверхвысокая мощность дозы, протонная и фотонная терапия, повреждение ДНК, апоптоз, биологические механизмы.

DOI: 10.31857/S0006302924040183, EDN: NFOWYQ

В работе 1966 г. было обнаружено, что при подведении летальной дозы 10-14 Гр ионизирующего излучения ускоренными электронами лабораторным мышам СЗН с мошностью подведения дозы 1 Гр/с двумя фракциями, разделенными во времени интервалом длиной 10 мин, происходит существенное (до 2 раз) достоверное снижение пострадиационной гибели к 4-м суткам (ЛД50/4), в то время как никакого снижения пострадиационной гибели при облучении с мощностью 0.017 Гр/с не происходило [1]. Дальнейший анализ показал, что при разделении на 2 пульса при подведении дозы со сверхвысокой мощностью дозы облучение вторым пульсом происходит в гипокических условиях, эквивалентных атмосфере инертного газа (азота), что снижает радиационное поражение активированными формами кислорода на модели выживания HeLa S3 in vitro [2]. На модели кожной токсичности было показано еще большее увеличение снижения пострадиационного поражения при дальнейшем росте мощности подводимой дозы до 66.7 Гр/с уже за одну фракцию облучения, при этом снижение концентрации тканевого кислорода приводило к тому же

Сокращения: ЛПЭ – линейная передача энергии, ИИ – ионизирующее излучение, АФК – активные формы кислорода.

уровню снижения радиационной токсичности и для стандартного режима подведения дозы 0.085 Гр/с [3]

Развитие исследований по радиационной токсичности при подведении дозы облучения со сверхвысокой мощностью получило второе рождение в связи с расширением применения ускорителей элементарных частиц (электроны, протоны), заряженных ионов и, конечно, мощных лазеров рентгеновского излучения в радиотерапии опухолей. Для перспективной радиотерапии со сверхвысокой мощностью подведения дозы в 2010-е годы был предложен термин флэш-радиотерапии [4], а сохранение здоровых тканей при таком режиме подвеления дозы получило название флэш-эффекта [5]. Снижение радиационной токсичности здоровых тканей при планировании лечения является бесспорным преимуществом перед традиционным режимом подведения дозы (1-3 Гр/мин). Тем не менее, локальная гипоксия, вероятно, важнейший фактор снижения радиационной токсичности при подведении дозы в режиме флэш, потенциально может снижать и противораковые свойства лечения, поскольку быстро растущие злокачественные новообразования, как правило, имеют сниженное обеспечение кислородом из-за отставания ангиогенеза [5]. Среди биологических моделей, подвергнутых облучению, в исследованиях радиопротекторного и противоопухолевого флэш-эффекта были использованы: культуры клеток и образцы плазмидной ДНК *in vitro* [2, 6–26], а также *in vivo* с использованием моделей мышей [7, 8, 20, 27-49], крыс [6, 50-52], Danio rerio [53-57], минипигов и кошек [58], собак [59], Caenorhabditis elegans [60]. Помимо ряда доклинических модельных *in vivo* и ветеринарных испытаний (речь о которых пойдет дальше в соответствующем разделе), для оценки потенциала флэш-радиотерапии было проведено экспериментальное лечение ускоренными электронами в режиме флэш первого пациента, страдавшего кожной лимфомой, которая уже неоднократно подвергалась радиотерапии со стандартным режимом подведения дозы, равно как и успела развить множественную устойчивость к химиотерапевтическим средствам. Применение флэш-радиотерапии спустя 5 месяцев завершилось полной ремиссией с восстановлением кожного покрова и волосяных фолликулов [61]. В настоящее время завершилось первое клиническое испытание флэш-радиотерапии (FAST-01), показавшее сопоставимый со стандартной радиотерапией контроль метастаза костей [62, 63], сейчас осуществляется уже следующее испытание -FAST-02 [64].

Традиционно для медицины флэш-радиотерапия начала проходить клинические испытания, не имея полной картины радиобиологических механизмов флэш-воздействия. Тем не менее, ученые радиобиологи, медицинские физики, биомедики и радиоонкологи наверстывают понимание глубинных механизмов радиопротекторного флэш-эффекта, ищут новые способы для комбинирования флэш-радиотерапии с иными методами терапии опухолей: химиотерапией или иммунотерапией [65]. К настоящему моменту были проведены исследования радиопротекторных свойств флэш-воздействия для частиц с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ): наибольшее число исследователей использовало частицы с умеренной и высокой ЛПЭ – электроны [2–4, 6, 8, 10-12, 23, 25-27, 29, 31, 33, 37, 38, 40, 41, 45, 47, 48, 50, 53, 55, 58-61, 66-72] и протоны [9, 17-22, 24, 28, 30, 32, 35, 42-44, 47, 49, 51-54, 56, 60, 73-80]. Реже были задействованы фотоны с низкой ЛПЭ [7, 16, 36, 39, 46, 66] или тяжелые частицы – ионы углерода [9, 13, 14, 34] или гелия [15, 57] с сугубо высокой ЛПЭ. Для разработки методов флэш-радиотерапии и ее комбинаций был произведен анализ современного состояния исследований природы радиопротекторного и противоопухолевого флэш-эффекта в рамках данного обзора.

ДОЗОВЫЙ ВОПРОС ВО ФЛЭШ-ЭФФЕКТЕ

В многочисленных работах по оценке радиопротекции было обнаружено лучшее сохранение

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

после воздействия ионизирующего излучения (ИИ) активно пролиферирующих тканей органов — кишечника, кожи, легочного эпителия, кроветворных тканей, а также меньшее нейровоспаление, сопряженное с сохранением когнитивных функций, и сохранение эмбрионального развития (табл. 1). При этом, как правило, радиопротекторный флэш-эффект наступал при воздействии доз не менее 10 Гр (за исключением кроветворной функции, где эффект виден уже при 4 Гр на мышиной модели и отчасти на модели эмбриогенеза перепелов).

Среди физико-химических гипотез, объясняющих радиопротекцию при флэш-воздействии, выделяют гипотезу исчерпания кислорода [2] при мощном кратковременном радиолизе и гипотезу снижения числа свободных радикалов в межрадикальных реакциях, сконцентрированных во времени и пространстве при краткосрочном воздействии излучения [81], что может объяснять и необходимость набрать определенную дозу для достижения радиопротекции за счет количественного исчерпания кислорода. Также существуют гипотезы, базирующиеся на разном метаболизме разных типов нормальных и раковых клеток, в частности, на разнице в метаболизме железа и сопряженного с его накоплением роста вероятности ферроптоза [82], а также изменение на уровне общего кооперативного ответа, известного как эффект свидетеля при участии иммунной системы [83]. Известно, что разная энергия частиц, ЛПЭ, способны несколько по-разному осушествлять радиолиз волы, а также повреждать биологические макромолекулы, в первую очередь ДНК, в разных типах клеток, что в дальнейшем может сказываться на окружающих облученные ткани необлученных областях организма посредством активации иммунитета при участии абскопального эффекта.

РАДИОЛИЗ ВОДЫ ИОНИЗИРУЮЩИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ ПРИ СВЕРХВЫСОКОЙ МОЩНОСТИ ПОДВЕДЕНИЯ ДОЗЫ И КИСЛОРОДНЫЙ ЭФФЕКТ

Согласно главенствующей гипотезе, радиационное поражение ДНК в клетках осуществляется не непосредственно ионизирующими вещество лучами (высокоэнергетическими фотонами рентгеновского или гамма-излучения) или потоками ускоренных частиц – протонами, нейтронами, электронами, ионами гелия или более тяжелых атомов, а продуктами радиолиза воды [84] – активными формами кислорода и отчасти азота со значительно отличающимся сроком жизни [85]. Известно, что радиолиз чистой воды сопряжен с 70-ти последующим протеканием порядка разных реакций рекомбинации, связанных с молекулами воды электронов (e_{aq}^{-}), атомов кисло-
				r				
	Тип частиц	Режим подн	ведения дозы,			Характер флэш- радиопротекции или ее	Ссылка	
N⁰		средн	яя I р/с	Доза, Гр	Животная			
		Флэш	Конвенцио-	модель	отсутствие			
			нальныи					
			Флэш-радиопр	оотекторный э	ффект присутст	Твует		
1	He ⁴	?	?	18-24	<i>D. rerio</i> эмбрионы	Лучшая сохранность эмбриогенеза	[57]	
						Лучшее сохранение		
2	-	>280	0.25	5 15	СЗН мглли	кишечных крипт (1.1 раза)	[/1]	
2	e	≥280	0.23	5-15	Сэтг мыши	и меньшие нарушения	[41]	
						микробиоты		
					C57BL/6	Лучшее сохранение кожи,		
3	e	200	0.17	27	мыши	эффект зависит от	[70]	
					MDIIIII	оксигенации		
						Лучшее сохранение		
						когнитивных функций,		
			0.00	• • • •		меньше повреждается	5.4.52	
4	<i>e</i> ⁻	5.6×10^{6}	0.09	2×10	C5/BI/6 мыши	гематоэнцефалический	[45]	
						оарьер, меньше		
						воспаление		
5	<i>a</i> ⁻	≥40	0.03	17	C57BL/6Ј или	стволовые клетки в легких	[26]	
-	C	,	0.02		<i>Terc</i> ^{-/-} мыши	меньше маркеров старения	[20]	
					D. rerio	Лучшая сохранность		
6	<i>e</i> ⁻	105	0.11	~26	эмбрионы	эмбриогенеза	[55]	
	е-	>100	~0.1	10, 12, 14	D. rerio эмбрионы, С57Вl6/Ј мыши	Лучшее сохранение	[72]	
						когнитивных функций,		
7						памяти, меньшее		
,						нейровоспаление,		
						сохранение эмбриогенеза у		
						зебрафиш		
0	L	9.3 или 930	30 0.06	23, 33	Balb/с мыши	Меньшее общее	[75]	
0	p					поражение кожи при		
						Сходном уровне цитокинов		
						меньшии уровень распада		
9	n^+	120	0.17	10	C57BL/6	уровень воспаления и	[73]	
	P	120	0.17	10	мыши	релокализации HMGB1 в		
						цитоплазму		
10		100	0.1	10 5 16 2	C57BL/6	п	[44]	
10	p '	100	0.1	10.5-16.3	мыши	Лучшая выживаемость	[44]	
					C57BL/6I	Лучшая выживаемость и		
11	p^+	~120	?	13, 16, 19, 22	мыши	снижение потери веса при	[28]	
						16 Гр		
				30, 35, 40	40 spe-	Лучшая радиопротекция	[40]	
				единовре-		кожи.		
12	+	100	1	менно; 2×15,	C57Bl/6j	Флэш-радиопротекция		
12	p^+	p^+	100	1	$2^{11.2}, 3^{10},$	5×10, мыши пропадает, если доза	пропадает, если доза	[49]
				Перерывом		снижается если на 7		
				2 мин		интервала		
			1		1		1	

Таблица 1. Радиопротекторный FLASH-эффект *in vivo*

Таблица 1. Окончание

N⁰	Тип частиц	Режим подведения дозы, средняя Гр/с		Лоза Гр	Животная	Характер флэш-	Ссылка
		Флэш	Конвенцио- нальный	доза, тр	модель	отсутствие	Coblina
13	p^+	130	0.4	25–30	FVB/N мыши	Лучшее сохранение кожи, эффект зависит от оксигенации	[42]
14	p^+	100	0.08	0-50	<i>D. rerio</i> эмбрионы	Меньше отек перикарда	[54]
15	p^+	8–9000	0.2	30, 40	<i>D. rerio</i> эмбрионы	Лучшая сохранность эмбриогенеза для 30 Гр	[56]
16	p^+	100 или 10 ⁶ 1		4 или ~8.5	<i>С. japonica</i> эмбрионы	Лучшее сохранение эмбриогенеза	[103]
17	p ⁺ , <i>e</i> ⁻	177 или 278 0.13		?	<i>D. rerio</i> эмбрионы	Лучшая сохранность эмбриогенеза	[53]
18	p ⁺ , <i>e</i> ⁻	1000 (p ⁺), 126 (e ⁻)	0.033 (p ⁺), 0.17 (e ⁻)	10, 20	C. elegans эмбрионы	Лучшая сохранность эмбриогенеза	[60]

Флэш-радиопротекторный эффект отсутствует

19	e-	>100	~0,4	5, 8, 16	C57BL/6J мыши	нет	[48]
20	p^+	~120	0.05-0.4	15, 16, 17, 18	С57BL/6ј мыши или <i>Rag1^{-/-}/</i> С57 мыши	Повышенная смертность после флэш-режима для обеих моделей	[43]

Примечание. p^+ – протоны, e^- – электроны, He^4 – гелий.

рода и водорода, ионов гидроксония, молекул кислорода, озона, водорода, их анионов (OH, H₂, H, HO₂⁻, HO₂, OH⁻, O₂⁻, O₂, O⁻, O₃, O₃⁻, HO₃), перекиси водорода (H₂O₂) и некоторых других продуктов радиолиза [86].

В живой системе ИИ воздействует на живую материю с разным уровнем организации и компартментализации – макромолекулярные комплексы; клеточные компартменты, органеллы и мембраны; клетки; ткани и органы живого организма. Высоко реакционноспособные активные формы кислорода (АФК) (ОН-радикал, супероксид-анион), реагирующие с ближайшей из возможных молекул в биологических системах, при-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

водят к повреждению макромолекул – ДНК, белков, липидов – непосредственно в области воздействия ИИ. Долго живущие АФК, такие как перекись водорода, способны диффундировать через липидные мембраны клетки и, распространяясь с кровотоком, активировать иммунную систему, эндотелий сосудов рядом каскадов передачи сигнала далеко за пределами облученной области [87]. Продукты радиационного поражения макромолекул способны посредством абскопального эффекта инициировать комплексный ответ организма на радиационное повреждение [88]. Радиационное воздействие на живые организмы в условиях снижения растворенного кислорода увеличивают пострадиационное выживание, что определяется меньшим уровнем $A\Phi K (HO_2^- и$

 O_2^{-}), генерируемых ИИ в условиях гипоксии [89]. Особенностью облучения в режиме флэш является его исключительная краткосрочность (микро- или миллисекунды), потенциально меняющая вероятность взаимного гашения высокореактивных радикалов, диффузию АФК в клетке и в организме, локальные градиенты АФК. Исследования вероятности рекомбинации между собой радикалов ДНК с продукцией межцепочечных сшивок, тем не менее, не обнаружили увеличения их продукции при исследовании уровня дополнительной компактизации такими сшивками хвоста ДНК-кометы [69].

Анализ генерации ОН-радикала на биохимическом уровне был проведен в реакции с перехватчиком – карбоксикумарином. Было показано, что при флэш режиме накапливается меньше ОН-радикалов. При этом исчерпание молекулярного кислорода (ΔpO_2), растворенного в воде, происходит с меньшей скоростью, что свидетельствует в пользу меньшей продукции АФК (ОНрадикал) при флэш-воздействии вследствие вероятного взаимного уничтожения свободных радикалов [9]. Наряду с кумарином обнаружение характерного для флэш-режима подведения дозы окисления пептидов и белков может быть произведено и методом масс-спектрометрии белков облученных клеток [66]. Вовлечение растворенного кислорода в создание АФК *in vitro* при флэш-воздействии было проведено с помощью водорастворимого биологически совместимого сенсора – Oxyphor 2P. Было обнаружено, что падение уровня кислорода при достижении концентрации перехватчика АФК – сывороточного альбумина – до уровня 3–5% (нормальный уровень альбумина сыворотки крови) в растворе достигается предельная скорость исчерпания растворенного кислорода при подведении дозы 20 Гр в режиме флэш (300 Гр/с, электроны, 10 МэВ) [8]. Как правило, флэш-радиопротекция достигается как раз при дозах не менее 10-20 Гр, а также 20-40 Гр, что говорит в пользу того, что практически все порожденные при флэш-воздействии высокореактивные АФК успеют прореагировать между собой или с окружающими макромолекулами без дополнительного накопления более долгоживущих АФК типа перекиси водорода или избыточного накопления органических пероксидов. Так, при росте мощности подведения дозы с 0.06 Гр/с до >9.3 Гр/с объем облученной в кровеносных сосудах крови растет в 50-100 раз [75], а также известно, что при облучении воды в проточной ячейке регистрируемый уровень АФК может превосходить в тысячи раз таковой, регистрируемый в стоячей воде [90].

Серия экспериментов по облучению в условиях гипоксии показала возникновение или усиление радиопротекторного флэш-эффекта, в то время как при исследованиях *in vitro* флэш-эффект при нормоксии и физиоксии чаще не наблюдался (табл. 2).

Снижение концентрации кислорода с 20.0 до 0.5% в среде с облучаемыми лимфоцитами приводит к росту доли (от общей совокупности с одноцепочечными разрывами ДНК) FPG-чувствительных сайтов в 2.3 раза с сопряженным уменьшением более окисных повреждений ДНК – одноцепочечных разрывов, в то время как облучение в конвенциональном режиме при аналогичном снижении концентрации кислорода в среде приводит к уменьшению доли FPG-чувствительных сайтов только в 1.3 раза. Дальнейшее снижение концентрации кислорода до 0.35% позволяет увеличить долю FPG-сайтов после конвенционального режима облучения до ≤ 2 раз [69]. При парциальном содержании кислорода 0.25-0.5% уровень щелочелабильных сайтов в ДНК облученных лимфоцитов был достоверно ниже после 20 Гр флэш-воздействия, в то время как при более 1% разница между режимами облучения пропадала [68]. Линия клеток рака простаты DU145 меньше гибнет при радиационном воздействии in vitro во время флэш-радиовоздействия при 1.6% кислорода [23]. Линия клеток китайского хомячка СНО-К1 показывает меньшую радиационную гибель в ответ на флэш-воздействие при 0.5% кислорода, в то же время при 0% и 21% радиационная гибель увеличивается [14]. Для легочных фибробластов и клеток аденокарциномы легкого – А549, Н1437 – показана лучшая пострадиационная выживаемость после флэш-облучения при 1% кислорода и дозе ≥8.5 Гр, при 4 Гр и большей концентрации кислорода радиопротекция исчезала [15]. На модели облучения 2D-клеточных культур и 3D-сфероидов из клеток той же культуры, имеющих гипоксическое ядро, для доз 10-15 Гр возрастает выживаемость клеток А549 при флэш-воздействии при росте доли гипоксических клеток в сфероиде. В 2D-культурах, где отсутствует гипоксическое ядро, не наблюдается рост устойчивости клеток к облучению при подведении его в режиме флэш. Для доз до 5 Гр и более 20 Гр разница была недостоверна. В ряду клеточных культур разница в выживаемости сфероидов при 10 Гр флэш-облучения варьирует от 1.6 до >2.0: А549, НТ29, MDA-МВ-321 [10]. По критерию набора длины тела при облучении в условиях гипоксии во флэш-режиме меньше страдает эмбриогенез D. rerio [55]. При облучении в режиме флэш в тканях опухоли ксенографта MDA-MB-231 и в прилегающих к здоровой коже мыши областях происходит снижение концентрации кислорода, причем в опухоли в более чем в 2 раза меньше (чем больше доза – 10, 20, 30 Гр, тем больше степень превосходства), а гипоксия длится 12-14 с. В то же время при конвенциональном режиме облучения (длящемся 250 с) не происходит никакого изменения кон-

N⁰	Тип частиц	Пик Брэгга (+/-/?)	Доза, Гр	Линия клеток (нормальная/раковая)	Цитотоксичность относительно стандартного режима	Ссылка
1	C ¹²	+/_	1-3	HFL1 (нормальная) HSGc-C5 (раковая)	Сопоставима	[13]
2	C ¹²	?	7.5	СНО-К1 (раковая)	Сопоставима	[14]
3	He ⁴	+/_	8, 12	А549 (раковая), Н1437 (раковая)	Сопоставима	[15]
4	<i>e</i> ⁻	—	10-30	HeLa S3 (раковая)	Снижена	[2]
5	<i>e</i> ⁻	—	0-18	NS1 (раковая)	Снижена при 18 Гр	[6]
6	<i>e</i> ⁻	_	5-25	DU145 (раковая)	Снижена при 18 Гр и физиоксии	[2]
7	<i>e</i> ⁻	—	0-10	FaDu (раковая)	Сопоставима	[67]
8	<i>e</i> ⁻	—	0-5	SKX (раковая)	Сопоставима	[67]
9	<i>e</i> ⁻	—		НЕК293Т (нераковая)	Сопоставима	[25]
10	p^+	+	15	IMR90 (нормальная)	Снижена	[18]
11	p^+	?	15	А549 (раковая)	Повышена	[18]
12	p^+	+	0-10	IMR90 (нормальная)	Сопоставима	[19]
13	p^+	+/-	0—9	HSG (раковая)	Сопоставима	[24]

Таблица 2. Цитотоксичность (при нормоксии или физиоксии) FLASH-режима в сравнении с конвенциональным режимом *in vitro* (клоногенный тест)

Примечание. p^+ – протоны, e^- – электроны, He^4 – гелий, C^{12} – углерод.

центрации кислорода [8], что в совокупности с данными по усилению радиопротекторного флэш-эффекта [14, 15, 23, 55, 68, 69] при гипоксии свидетельствует в пользу важности вклада кислорода в природу радиопротекторного флэшэффекта.

Серия экспериментов по облучению во флэшрежиме при увеличении парциального давления кислорода показала исчезновение радиопротекторного флэш-эффекта. Добавление кислорода в газовую смесь вентиляции легких до 100% приводит к исчезновению радиопротекторного эффекта на модели кожного поражения [70]. Доведение кислорода при вентиляции легких до 95% снижает протекцию когнитивных функций после флэш-воздействия [72]. Радиопротекция кожного покрова (рубцевание, толщина эпидермиса, толщина коллагена) после облучения в режиме флэш аннулируется использованием кислорода в ингаляционной газовой смеси [42]. Анализ прямого накопления перекиси водорода в чистой воде при концентрации растворенного кислорода 4% (физиологический уровень) также показал достоверно меньшее накопление перекиси в ответ

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

на флэш-режим воздействия электронного излучения [72]. Резкое снижение накопления перекиси водорода происходит при приближении мощности подведения дозы к 100 Гр/с [79].

Сравнение радиолиза воды пучками протонов 2 и 10 МэВ, осуществленное в замкнутой емкости, где останавливались все ускоренные частицы, показало существенно большее накопление перекиси водорода для протонов 2 МэВ [86, 91]. Поскольку для протонов с меньшей энергией в рамках условий эксперимента (протоны полностью останавливались в водной ячейке) большая доля дозы облучения приходится на конечный участок траектории протонов, приходящийся на пик Брэгга, то очевидно, что в пике Брэгга формируется большее число окислительных форм. флэш-эффект тем не менее был показан и при облучении в пике Брэгга.

Анализ вовлечения молекулярного кислорода в создание АФК измерялся по уровню исчерпания растворенного молекулярного кислорода при облучении с разной мощностью дозы (1, 3 и 50 Гр/с) рентгеном (225 КэВ), ускоренными протонами (225 МэВ) и ионами углерода (150 и

400 МэВ/нуклон) в замкнутой водной ячейке. Фотоны и частицы исчерпывают молекулярный кислород практически идентично друг другу [92]. Работа по определению уровня ОН-радикала с карбоксикумарином показала, что и для протонов с низкой ЛПЭ (высокоэнергетические протоны 27.5 и 55 МэВ) и для тяжелых ионов с высокой ЛПЭ – ускоренных ионов углерода (140 МэВ/нуклон) – накопление 7-ОН-3-карбоксикумарина происходит на сходном уровне [9]. Поскольку рост ЛПЭ частицы приводит к накоплению молекулярного кислорода в реакциях радиолиза воды [86, 91, 93], то это чревато редукцией локальной гипоксии при сверхмощном краткосрочном подведении дозы и может иметь дополнительные особенности в механизме реализации радиопротекторного флэш-эффекта, обнаруженного также для тяжелых ионов, как и для более легких частиц.

Среди наименее исследованных последствий радиолиза воды сверхвысокой мощностью дозы также можно отметить мгновенное закисление среды [94] в случае флэш-воздействия большой суммарной дозой, способное оказывать влияние на pH даже в забуференной среде.

ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК ПРИ ФЛЭШ-ВОЗДЕЙСТВИИ

Оценка уровня повреждений ДНК в радиобиологии отягощена массовым окислением [68] продуктами радиолиза не только отдельных нуклеотидов и азотистых оснований, возникающих в норме, но и группами повреждений нуклеотидов (азотистых оснований, остатков рибозы) в комбинации с безоснованными сайтами, межцепочечными и ДНК-белковыми сшивками. При значительных дозах радиации, а также после воздействия частиц с высокой ЛПЭ кластеры точечных повреждений сочетаются с множественными одноцепочечными разрывами и двухцепочечными разрывами сахаро-фосфатного остова ДНК [95]. Такие сложные для ферментативного анализа повреждения ДНК традиционно обнаруживаются по изменению размера фрагментов в анализах по изменению подвижности в геле или градиенте плотности очищенной от белков ДНК на уровне единичных клеток - метод ДНК-комет, или совокупной клеточной ДНК [96, 97]. Сложности с одновременным разделением слишком коротких и слишком длинных фрагментов ДНК, возникающие для методов на основе измерения подвижности, устраняются в методах, обнаруживающих работу ферментов репарации в области кластеров повреждений, получивших название «индуцированные излучением фокусы репарации» (IRIF) [98]. Для оценки степени повреждений ДНК после воздействия ИИ в режиме флэш были использованы методы обеих групп: метод ДНК-комет и

методы визуализации фокусов репарации – γH2A.X и 53BP1.

Облучение в дозе 3 Гр клеток HeLa протонами (20 МэВ) на лазерном ускорителе протонов Мюнхенского тандемного ускорителя Университета Людвига-Максимилиана приводило к генотоксическому стрессу (маркер үН2А.Х) при облучении во флэш-режимах 10⁹ Гр/с или 10⁴ Гр/с [99], что идентично данным, полученным на культуре нормальных фибробластов легких IMR90 [19]. При сравнении флэш-протонного излучения $(\sim 10^9 \, \Gamma p/c)$, конвенционального протонного или рентгеновского излучения в дозах 2-4 Гр не было обнаружено разницы в индукции фокусов уH2A.X на модели радиоустойчивых клеточных линий глиобластомы SF763 и U87-MG [99]. На клеточных культурах A549, MRC5, IMR 90 при сравнении стандартного (0.03 Гр/с) и флэш (40 Гр/с) облучения электронами (4.5 МэВ) в дозе 5 Гр определяли наличие фокусов белков 53BP1 и уH2A.X [100]. В данной работе отличия в клеточном ответе к 30 и 180 мин после облучения найдены не были. В другой работе той же научной группы было показано, что при флэш-облучении дозой 5 Гр достоверно снижается численность двухцепочечных разрывов ДНК по маркеру 53BP1, но не үH2A.Х в нормальных линиях фибробластов человека MRC5, IMR 90; в раковых клетках линии А549 нет достоверного снижения ни для одного из маркеров при сравнении разных режимов подведения дозы [19]. Группа исследователей под руководством Д.Ж. Бреннера на Радиологическом исследовательском ускорителе (США) провели исследования клеточных реакций на нормальных фибробластах человека (IMR90). Подведение доз вплоть до 10 Гр не обнаруживает разницы в накоплении фокусов үН2А.Х к 30 мин после протонного облучения при сравнении режимов флэш (100 или 1000 Гр/с) и конвенционального (0.05 Гр/с) [19]. В работе с использованием ускорителя электронов [68] не было обнаружено изменения уровня вносимых повреждений ДНК при росте мощности подведения дозы с 30 Гр/с до 2000 Гр/с, в то время как в этой же работе стандартная мощность подведения дозы – 0.1–3.0 Гр/с – существенно отличалась по уровню повреждений от мощностей доз более 30 Гр/с. Эксперименты на медицинском ускорителе электронов (10 МэВ) Медицинского радиационно-физического подразделения Университета Лунда (Швеция) показали отсутствие существенной разницы в повреждении ДНК (53ВР1 маркер двухцепочечных разрывов ДНК) для линий, демонстрировавших снижение клеточной гибели при флэш-режиме облучения (линии - MDA-MB-231, HeLa, LU-HNSCC4) для доз облучения в диапазоне 3-6 Гр [101]. Облучение клеток глиобластомы U87 не показало зависи-

мость уровня γH2A.X от режима подведения дозы на 1 и 24 ч после облучения [18].

В то время как для доз 6 Гр и менее радиопротекция генома, как правило, не наблюдается, при больших дозах появляется устойчивая тенденция к уменьшению уровня повреждений ДНК в ответ на флэш-воздействие. На линиях клеток аденокарциномы легкого А549 и немелкоклеточного рака легкого Н1437 было показано существенно меньшее число фокусов репарации уН2А.Х на 12 ч после облучения ионами гелия в режиме флэш при сниженном до 1% кислороде. При этом с ростом дозы от 8 до 12 Гр кратность различий возрастала на модели А549 с 1.5 до >2.0 раз [7]. Подведение дозы 20 Гр во флэш-режиме (100 или 1000 Гр/с) и в конвенциональном (0.05 Гр/с) при протонном облучении показало, что для дозы в 20 Гр наблюдается сушественное снижение числа фокусов үН2А.Х в облученных нормальных фибробластах человека в режиме 1000 Гр/с по сравнению с режимами 0.05 и 100 Гр/с (между которыми разницу обнаружить не удалось) через 30 мин после облучения [19]. Общий уровень повреждений ДНК в лимфоцитах крови, облученных *ex vivo*, как было установлено щелочной версией метода ДНК-комет, существенней растет после конвенционального режима облучения. При этом достоверно большие отличия в повреждениях ДНК данным методом обнаруживаются только для доз 20 Гр и более [69]. Достоверно меньший уровень повреждений ДНК по маркеру уН2А.Х на 12 ч (не ранее 4 ч и не позднее 24 ч) наблюдался в столбчатых клетках кишечника после получения 14 Гр тотального облучения абдоминальной области у мышей в режиме флэш (флэш-режим — 216 Гр/с, конвенциальный — $0.079 \ \Gamma p/c$). В то же время в подсаженной опухоли линии ID8, эпителиальной раковой линии яичника мыши, разницы в эффективности внесения двухцепочечных разрывов не наблюдалось в течение всего периода наблюдения за накоплением маркера разрывов [29]. При облучении в дозе ~9.6 Гр (конвенциональный режим) в клетках головного мозга, начиная с 1 ч после облучения, наблюдается достоверное удвоение числа фокусов уН2А.Х по сравнению с флэш; достоверность превосходства радиопротекции ДНК после флэш-режима сохраняется до 7 суток [19]. В работе совместной американо-корейской группы [102] отслеживался маркер разрывов ДНК – *ү*Н2А.Х – и было обнаружено на 6-й час после облучения существенно большее повреждение ДНК (порядка 2 раз, ранее никем не регистрировавшееся) и в клетках опухоли, и в клетках эндотелия (CD31+) сосудов при конвенциальном облучении (0.06 Гр/с) при сравнении с флэш-облучением (350 Гр/с); использовались ускоренные электроны (16 МэВ). Несколько неожиданно в этой же работе обнаружили примерно 2-кратное увеличение уровня окислительного стресса (DCHFDA – сенсор A Φ K) к тому же 6-му

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

ч после облучения, что фиксировалось уже для флэш-режима подведения дозы, лишь отчасти объяснимое большей активностью нейтрофилов (S100A8+) в опухоли.

Для определения уровня одноцепочечных разрывов ДНК, возникающих при флэш-режиме облучения, было проведено два in vitro исследования по измерению потери суперскрученности кольцевой плазмидной ДНК pBR322 (для чего достаточно единичного одноцепочечного разрыва ДНК) и ее линеаризации (возникновения двухцепочечного разрыва). Более раннее исследование показало наличие флэш-радиопротекции в 25% в адрес возникновения только одноцепочечных разрывов, но не двухцепочечных для 100 МэВ пучка электронов, но не для пучков 200 или 300 МэВ; при этом рабочий диапазон доз составил 0 — ~60 Гр [11]. В следующей работе авторы, сравнивая уровни 20 и 30 Гр ускоренных электронов с терапевтической энергией 16 МэВ, обнаружили 1.5-3.0-кратную ралиопротекцию после флэш-воздействия по уровню двухцепочечных разрывов и протекцию в 10-15% по уровню одноцепочечных разрывов [12].

Как и уровень двухцепочечных разрывов ДНК после относительно невысоких доз, уровень микроядер после 3 Гр протонного излучения не зависел от режима подведения дозы на in vitro моделях кератиноцитов [21] и HeLa [22]. В работе по анафлэш-радиопротекции эмбрионального лизу развития перепела японского было обнаружено, что в отличие от дозы 4 Гр, доза 8.5 Гр приводит к достоверному уменьшению числа эритроцитов периферической крови с микроядрами у эмбриона через 3.5 суток после облучения 5.5-суточных инкубационных яиц [103]. При анализе уровня персистирующих разрывов ДНК на модели облучения грудной клетки мышей дозой 17 Гр было показано достоверное снижение до 1.5 раз уровня маркера үН2А.Х через 3 месяца после облучения [20]. В качестве дополнительного дестабилизирующего фактора после воздействия ИИ в режиме флэш был определен дефицит функции теломеразы на мышиной *terc*^{-/-}-модели, где было показано, что генотип $terc^{-/-}$ приводит к потере радиопротекции при флэш-режиме с развитием фиброза [19], что может быть связано с низким уровнем потенциала по репопуляции легочного эндотелия при сокращенных теломерах, отягощенных повреждениями ДНК. Анализ вероятности возникновения межхромосомных перестроек на модели индукции двухнитевого разрыва системой gRNA/Cas9 в клетках линии НЕК293Т не показал зависимости частоты возникновения транслокаций хромосом от режима подведения дозы (10 Гр) [25]. Работа, посвященная оценке активации cGAS-STING-иммунного ответа, связанного с систематическим ответом при участии интерферона (STING) в ответ на повышение концентрации цитозольной фрагментированной ДНК и активацией циклоГМФ-АМФ синтазы (cGAS) в ответ на облучение рентгеном, показала активацию генов STING после конвенционального режима, но не флэш, при условии генетического нокдауна PD-L1 — контролера иммунного чекпойнта, а также большую степень присутствия ДНК в цитозоле нормальных клеток кишечных органоидов генотипа PD-L1-KO, но не для раковых клеток MC38 [7]. Митохондриальная ДНК, также активирующая в цитоплазме cGAS-зависимый путь активации стрессового ответа, меньше повреждается при облучении во флэш-режиме ускоренными протонами в пике Брэгга [18].

В среднем меньшая дестабилизация ДНК, обнаруживаемая после облучения в режиме флэш, в конечном итоге может быть одним из объяснений существенно меньшего клеточного старения, наблюдающегося после флэш-облучения, что обнаружено по уровню функционирования β-галактозидазы [19, 20, 26] и экспрессии TGF-β1 [19, 30, 46, 75] на фоне сниженного пострадиационного фиброза *in vivo* [7, 35]. Интересно, что в работах, где удалось показать радиопротекцию после флэш-режима облучения в тканях, относящихся к активно пролиферирующим, что выражалось в меньших кожных токсических поражениях, поражениях кишечника (табл. 2), кроветворной ткани [103], было показано и меньшее поражение ДНК, хотя и не всегда в явной форме: на фоне модифицированного генетического фона — инактивации PD-L1 [7] или теломеразного комплекса [20], что свидетельствует в пользу меньшего накопления скрытой нестабильности генома после флэш-режима облучения и в принципе согласуется с отсутствием разницы (при сравнении режимов флэш-облучения и конвенционального) в обнаружении повреждений ДНК в раковых линиях in vitro, клетках исходно менее генетически стабильных, где небольшие по степени повреждения ДНК растворяются в общей более выраженной массе спонтанных повреждений.

РАДИАЦИОННАЯ КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ: АПОПТОЗ, НЕКРОЗ, АУТОФАГИЯ, ПИРОПТОЗ

Традиционно исследования радиационного поражения связаны с оценкой степени радиационной гибели клеток в тканях и *in vitro* разными молекулярно-клеточными механизмами: апоптозом, некрозом, а также аутофагией, автолизом, ассоциированным с активацией иммунитета продуктами клеточной гибели пироптозом и ассоциированным с пролонгированным окислительным стрессом и метаболизмом железа ферроптозом [104, 105]. Результаты изучения механизмов гибели при флэш-воздействии пока сильно ограничены и находятся на стадии накопления данных. Было проведено несколько исследований по оценке разных механизмов клеточной гибели, большинство об активации апоптоза [16-18, 29, 31, 46, 77, 106], значительно меньше — некроза [17, 18, 106, 107], пироптоза [7] и аутофагии [18, 77]. Авторы большинства работ поддерживают большую активацию апоптоза и аутофагии после флэш-режима в противовес некрозу, либо меньшую активацию апоптоза в тканевых образцах облученных животных, где апоптоз определяли по окрашиванию ферментативно фрагментированной геномной ДНК методом TUNEL или по уровню Cas3-белка. Среди механистических работ присутствуют всего две. Было показано, что апоптоз запускается под контролем p53-Drp1сигнального пути и задействует меньшее поражение митохондрий, а также больше активирует аутофагию после 15 Гр флэш-протонного воздействия в нормальных фибробластах, в то время как после идентичной дозы в конвенциональном режиме активируется некротическая гибель [18]. Также в данной работе было показано, что сходный более апоптотический фенотип обнаруживается и после конвенционального режима, но при условии на порядок меньшей дозы излучения. Интересно, что принципиально более апоптотический фенотип (~5× раз) после флэш и некротический (~3× раза) после конвенционального режима наблюдался через 4 ч после воздействия, а уже через 24 ч наблюдалось лишь 2-кратное превышение общего апоптоза/некроза после конвенционального режима. В данной статье использовались для облучения протоны пика Брэгга, что поднимает вопрос о вкладе мгновенного локального закисления среды [94, 108] и мембранного митохондриального потенциала и его связи с проницаемостью митохондриальной мембраны при развитии апоптоза [109].

ИММУННАЯ РЕАКЦИЯ И ЭФФЕКТ СВИДЕТЕЛЯ

Безусловно, первостепенной задачей радиотерапии опухоли является избавление пациента от опухоли, и только во вторую очередь учитывается возможное снижение побочных эффектов. Несмотря на то, что было проведено первое экспериментальное благополучное излечение пациента от местной кожной лимфомы флэш-радиотерапией пучком электронов [61], первые клинические испытания [62] завершаются (FAST-01) или идут (FAST-02). Для определения области применимости новой радиотерапии необходимы широкие доклинические испытания на базе животных моделей.

Среди работ по контролю роста опухолей можно выделить группы исследований по контролю роста опухолей мозга глиомы и глиобластомы, инокулированной как подкожно, так и внутричерепной инъекцией (ортотопически) на моделях мышей и крыс, а также самых разнообразных подкожных и внутрибрюшинных графтов мышиных и человеческих линий раковых клеток (табл. 3).

Для внутричерепных графтов показано, что контроль опухоли не отягощен после флэш-возлействия избыточным иммунным воспалением. однако противоопухолевые свойства его не превосходят конвенциональное [6, 33, 52], вероятно, ввиду меньшего поражения и гематоэнцефалического барьера [45]. И хотя единственным исчерпывающим объяснением радиопротекторного флэш-эффекта специфическая активация иммунитета быть не может, что было показано сравнением в одной работе противоопухолевого ответа на моделях мышей с разной степенью иммунодефицита [37], где также не обнаружено и иного профиля иммунных клеток на модели ортотопической опухоли легкого, в ряде других работ, наоборот, обнаруживается более цитотоксический профиль иммунных клеток в опухоли после флэш-воздействия. Для некоторых случаев иммунного профиля дикого типа была показана инфильтрация лучшая цитотоксическими лимфоцитами CD8+ [46, 74], цитотоксическими макрофагами М1-подтипа [74] и, как правило, не худший, а иногда и лучший контроль опухоли, чем при конвенциональном режиме (табл. 3). При этом общий уровень воспалительных цитокинов [6, 37, 75] и профиль иммунных клеток часто не отличались между режимами [37, 38, 51]. Безусловно, большая статистика на разных генетических профилях опухолей, учитывающая и метаболизм раковой клетки в *in vivo* моделях, значительно востребована.

Уровень общего противоопухолевого ответа, активируемого путем так называемого радиобиологического эффекта свидетеля и общей активации иммунного ответа организма при вторичной инокуляции той же опухоли, был идентичен при флэш и конвенциональном режимах облучения [6], равно как и уровень иммунной памяти, проверенный повторной инокуляции той же опухоли спустя продолжительное время [37, 47]. В одной из работы было показано дополнительное усиление цитотоксических свойств Т-клеток после флэш-воздействия в комбинации с анти-PD-1 иммунотерапией, что свидетельствует в пользу потенциала для развития комбинированной флэш-радио- и иммунотерапии [38].

В свете радиопротекторных свойств флэш-излучения в адрес гипоксических клеток, к которым относятся и раковые, интересно было бы определить, насколько повышаемая устойчивость раковых клеток к цитотоксическим лимфоцитам, возникающая в ответ на конвенциональное радиационное воздействие [110], сохраняется и при флэш-терапии, и какую роль в итоговом противоопухолевом ответе будут играть эти два взаимно уравновешивающих эффекта.

ИССЛЕДОВАНИЯ ФЛЭШ-ЭФФЕКТА В РОССИИ

Группа исследователей из Троицкого института инновационных и термоядерных исследований (ГНЦ РФ ТРИНИТИ, Троицк, Москва) совместно с Российским научным центром рентгенорадиологии (Москва) и Московским научноисследовательским онкологическим институтом им. П.А. Герцена, а также Объединенным институтом высоких температур РАН (Москва) изучала биологические эффекты воздействия фотонов и электронов с разной мощностью дозы с использованием терапевтического аппарата «Рокус-АМ» (гамма-излучение, мощность дозы 1 Гр/мин) и установок высокоинтенсивного тормозного излучения «Ангара-5-1» (200-600 кэВ, мощность дозы (1-4)×10⁹ Гр/мин) и «Мир-М» (сильноточный наносекундный ускоритель электронов: выходная энергия — до 800 кВ, мощность дозы до 100 МГр/с). Показано, что в культивируемых клетках рака предстательной железы человека РСЗ, карциномы легкого (А549) и меланомы (MelMtp-x) человека фотонное излучение со сверхвысокой мощностью дозы индуцирует более значительные повреждения при дозах от 2 до 7 Гр, большее количество двунитевых разрывов ДНК по сравнению с таковыми после облучения на гамма-установке «Рокус-АМ», и различия более заметны при более высоких дозах облучения [111]; установила, что фотонное излучение со сверхвысокой мощностью дозы в диапазоне доз 1-6 Гр индуцирует апоптоз в лимфоцитах, выделенных из периферической крови здоровых доноров, в опухолевых линиях лимфоцитарного происхождения Raji и Jurkat (В- и Т-клеточные лимфомы человека) достоверно выше, чем гамма-излучение с низкой мощностью дозы, одновременно в меньшей степени индуцируя некроз [16].

Другие исследователи из Института ядерных исследований РАН (ИЯИ. Троицк. Москва) совместно с Российским научным центром рентгенорадиологии (Москва) и Институтом теоретической и экспериментальной биофизики РАН изубиологические эффекты чали воздействия ускоренных протонов на культивируемые опухолевые (НСТ116 и НТ29) и нормальные (фибробласты ADSC) клетки человека в интервале доз 3-30 Гр в пике Брэгга и вне его с разной мощностью дозы. Был обнаружен высокий уровень апоптоза в опухолевых клетках; показано, что режим одноимпульсного протонного облучения в пике Брэгга позволяет снизить апоптоз нормальных клеток [106]. Облучение проводили с использованием сильноточного линейного ускорителя протонов Института ядерных исследований РАН, который имеет энергию 105-269 МэВ, частоту импульсов 1-100 Гц, длительность импульсов 0.3-100 мкс и ток от 0.1 мкА до 10 мА [112]. Ускоритель

877

878 ГЛУХОВ, КУЗНЕЦОВА

Таблица 3. Контроль роста опухоли и иммунный ответ при флэш-радиотерапии

	Тип частиц/ волн	Режим подведения дозы, средняя мощность дозы (Гр/с), доза (Гр)			Характеристики биологических объектов и моделей		Флэш-эс		
№		Флэш	Конвен- цио- нальный	Доза, Гр	Графт (линия клеток)	Животное- опухолено- ситель	Флэш- радиопротекция здоровых тканей	Флэш- усиление/ослабление противоопухолевой активности	Ссылка
1	C ¹²	120	0.3	?	LM8	С3Н/Не мыши	Декларируется лучшее сохранение здоровых тканей	Лучшее подавление метастаз	[34]
2	?	200	0.033	20, 10×2	A549	Balb/c-nu мыши	Меньшая пострадиационная пневмония	Сопоставимо	[27]
3	Рент- ген	700– 1200	0.1	12-30	EMT6	C57BL/6, BAL b/c мыши	Лучшая выживаемость	Лучший контроль роста опухоли при сходной выжиываемости опухоленосителей	[39]
4	Рент- ген	100-120	0.03	13, 5×5	MC38	С57BL/6 мыши, <i>PD-</i> <i>L1-KO</i>	Меньше поражаются кишечные крипты при генотипе PD-L1-KO	Сопоставимо	[7]
5	Рент- ген	125	0.2	10	Ру8119 и Ру230	С57В1/6 мыши	Лучшая сохранность кишечных крипт	Сопоставимо, лучше инфильтрация опухоли CD8+, но не CD4+	[46]
6	e	$2.5 \cdot 10^{3} - 7.8 \cdot 10^{6}$	0.1	4×3.5, 2×7, 3×10, 14, 25 (пол- голо- вы)	H454/H454 Luc ⁺ ; U87/ U87 Luc ⁺	Nude, мыши	Нет	Сопоставимо	[33]
7	e	270	0.12	3×6, 3×8,11, 15,25, 30	B16F10 GL261	C57BL/6, мыши	Небольшое превосходство в сохранении кожи при 25 Гр	Сопоставимо, для 11 Гр конв. Лучше стимулирует CD8+ инфильтрацию опухоли	[40]
8	е_	300	0.1	10, 20, 30	ВSA до 5%, MDA-MB- 231 ксенографт	Nude мыши	_	_	[8]
9	e	216	0.079	14 или 16	ID8	C57BL/6 мыши	Снижение функций пищеварения, плотности кишечных крипт, стволовых клеток, перфораций кишечника	Сопоставимо	[29]
10	e	210	0.126	14	ID8 и UPK10	C57BL/6 мыши	Сопоставимая с конвенциональным	Лучшая инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами, сочетается с анти-PD-1 иммунотерапией	[38]
11	e	200	~0.07	4	M106, M108, M114	<i>BRүс^{-/-}</i> мыши, NSG <i>Z</i> <i>NOD/scid/</i> <i>IL-2Rg</i> null мыши	Лучшее сохранение предшественников лимфоидной линии в гуманизированных мышах	Для 2 из 3 (М106, М114) генотипов принципиально лучшие противоопухолевые свойства, для третьего (М108) – лучшее лечение при стандартном режиме	[31]
12	<i>e</i> ⁻	70-90	0.13	3×8, 12.5, 15	NS1	Fisher 344 крысы	Нет	Сопоставимо	[50]

Таблица 3. Окончание

	Тип частиц/ волн	Режим подведени средняя мощност (Гр/с), доза (I		я дозы, гь дозы Гр)	Характеристики биологических объектов и моделей		Флэш-эс		
Nº		Флэш	Конвен- цио- нальный	Доза, Гр	Графт (линия клеток)	Животное- опухолено- ситель	Флэш- радиопротекция здоровых тканей	Флэш- усиление/ослабление противоопухолевой активности	Ссылка
13	e	66	0.13	1–18, 2×8, 2×12.5	NS1	Fisher 344 крысы	-	Лучший контроль подкожного графта, активация иммунитета, но не для внутричерепного	[6]
14	e	2000	0.1	20, 2×6, 3×8	SV2, MEERL95, GL261, H454, U87, RKO	C57BL/6J мыши, Swiss nude: NU[Ico]- Foxn1nu мыши, NRG:NOD- Rag1null IL2rgnull мыши	-	Сопоставимо	[37]
15	p^+	~257	~4	25	?	Крысы	Лучшее сохранение когнитивных функций	Сопоставимо	[52]
16	p ⁺	60	0.05	?	?	?	Нет	Лучший контроль роста опухоли, больше соотношение CD8+/t _{per} лимфоцитов и M1/M2 макрофагов в опухоли	[74]
17	p ⁺	89	0.33- 0.63	40-60	СЗН	CDF1	Меньше фиброза и кожного изъязвления	Сопоставимо	[35]
18	p^+	69–124	~1	12, 30– 45	LSL- KrasG12D/ wt; p53FL/FL	C57BL/6, C3H/HeJ мыши; собаки	Лучшая сохранность мышц и костей	Сопоставимо	[30]
19	p^+	~78	~0.9	15, 18	MH641905	C57BL/6J мыши	Лучшая толщина мышц кишечника, число возобновленных кишечных крипт	Сопоставимо	[32]
20	p^+	~257	~4	15, 25	RG2	Fischer 344 крысы	Быстрее происходит заживление кожи, эффект зависит от кислорода	Сопоставимо	[51]
21	p^+	~257	~4	25	RG2	Fischer 344 крысы	Меньше поражаются когнитивные функции	Сопоставимо	[52]
22	p ⁺ , <i>e</i> ⁻	≥110	0.1	10, 20	GL261	С57BL/6J мышь	Лучшее сохранение когнитивных свойств, сходное для протонов и электронов	Сопоставимо	[47]

Примечание. р⁺ – протоны, е⁻ – электроны, С¹² – углерод, Рентген – рентгеновские лучи.

позволяет облучать в разных режимах: одноимпульсный флэш-режим (сокращенно назван SPLASH) при ~ 10^6 Гр/с, «обычный» флэш-режим при ~100 Гр/с и конвенциональный режим при <1 Гр/с. Проведен анализ влияния мощности дозы на развитие эмбрионов при облучении яиц перепела японского (*Coturnix japonica*) в трех указанных режимах. Обнаружили протекторный эффект флэш/SPLASH-облучения по критериям смертности эмбрионов, массы и длины тела эмбрионов, количества эритроцитов с аномалиями (двуядерные, безъядерные, с микроядрами) в крови эмбрионов и птенцов, скорости перемещений однодневных птенцов [103].

В Объединенном институте ядерных исследований (ОИЯИ, Дубна) пилотные работы по исследованию флэш-эффекта были начаты еще в 2020 г. на пучке действующего ускорителя фазотрон с энергией протонов 660 МэВ и максимальным током 1 мкА. С этой целью был сформирован однородный в сечении протонный пучок с диаметром около 45 мм (по 90%-й изодозе) и мощностью дозы 70 Гр/с. Определение выживаемости культивируемых клеток карциномы легкого человека А549 проводили после облучения на протонном пучке фазотрона ОИЯИ методом «на пролет» в двух режимах (стандартном, при мощности дозы около 0.1 Гр/с, и во флэш-режиме, при мощности дозы 70 Гр/с), был выявлен значимый протекторный флэш-эффект только при больших дозах – 4 и 6 Гр [113]. В настоящее время предусматривается создание инновационного центра для проведения экспериментальных и клинических исследований в области протонной терапии. Пилотной установкой будущего медицинского центра станет протонный медицинский ускоритель MSC-230, который планируется реализовать уже в 2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из анализа литературы видно, что эффект флэш может как снизить токсичность для нормальных тканей, так и повысить эффективность уничтожения опухоли. Тем не менее, сообщалось, что многочисленные исследования предполагают небольшую разницу, отсутствие различий в задержке роста опухоли или даже обратную разницу флэш-терапии по сравнению с облучением с обычной мощностью дозы [32]. Здесь необходимо отметить, что эти исследования могли быть проведены с другими параметрами луча или за пределами тех параметров облучения, которые необходимы для получения значительного флэшэффекта, и подчеркивают тот факт, что критические физические параметры, необходимые для запуска этого биологического эффекта, до сих пор полностью не изучены. В целом данные исследований в настоящее время указывают на три потенциальных механизма повышения вероятности контроля над опухолью при возможности снижения осложнений в нормальных тканях во время флэш-облучения частицами. В частности, щадящие эффекты для нормальных тканей возникают из-за: быстрого истощения кислорода, меньшего поражения ДНК и дифференцированного иммунного ответа. Требуются дальнейшие исследования *in vivo* и *in vitro* ввиду определенной осторожности при клинической интерпретации полученных к настоящему времени результатов: в большинстве таких исследований используется облучение до пика и в пике Брэгга, строго не соответствующее объему опухоли; существуют вопросы к дозиметрии, оксигенации мишени, роли генетического и метаболического фона.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы искренне благодарят заведующего лабораторией медицинской физики ИЯИ РАН д.ф.-м.н. С.В. Акулиничева за ценные консультации по протонному облучению с разной мощностью дозы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась в рамках Государственного задания для ИТЭБ РАН (№ 075-00224-24-00).

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. Hornsey S. and Alper T. Unexpected Dose-rate Effect in the Killing of Mice by Radiation. *Nature*, **210** (5032), 212–213 (1966). DOI: 10.1038/210212a0
- Town C. D. Effect of high dose rates on survival of mammalian cells. *Nature*, **215** (5103), 847–848 (1967). DOI: 10.1038/215847a0
- Field S. B. and Bewley D. K. Effects of dose-rate on the radiation response of rat skin. *Int. J. Radiat. Biol.*, 26 (3), 259–267 (1974).
 DOI: 10.1080/09553007414551221
- Favaudon V., Caplier L., Monceau V., Pouzoulet F., Sayarath M., Fouillade C., Poupon M.-F., Brito I., Hupé P., Bourhis J., Hall J., Fontaine J.-J., and Vozenin M.-C. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci. Translat. Med.*, 6 (245), 245ra93 (2014). DOI: 10.1126/scitranslmed.3008973
- 5. Atkinson J., Bezak E., Le H., and Kempson I. The current status of FLASH particle therapy: a systematic re-

view. *Phys. Engineer. Sci. Med.*, **46** (2), 529–560 (2023). DOI: 10.1007/s13246-023-01266-z

- Liljedahl E., Konradsson E., Gustafsson E., Jonsson K. F., Olofsson J. K., Ceberg C., and Redebrandt H. N. Long-term anti-tumor effects following both conventional radiotherapy and FLASH in fully immunocompetent animals with glioblastoma. *Sci. Rep.*, **12** (1), 12285 (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-16612-6
- Shi X., Yang Y., Zhang W., Wang J., Xiao D., Ren H., Wang T., Gao F., Liu Z., Zhou K., Li P., Zhou Z., Zhang P., Shen X., Liu Y., Zhao J., Wang Z., Liu F., Shao C., Wu D., and Zhang H. FLASH X-ray spares intestinal crypts from pyroptosis initiated by cGAS-STING activation upon radioimmunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119** (43), e2208506119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2208506119
- Cao X., Zhang R., Esipova T. V., Allu S. R., Ashraf R., Rahman M., Gunn J. R., Bruza P., Gladstone D. J., Williams B. B., Swartz H. M., Hoopes P. J., Vinogradov S. A., and Pogue B. W. Quantification of oxygen depletion during flash irradiation *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **111** (1), 240–248 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.03.056
- Kusumoto T., Inaniwa T., Mizushima K., Sato S., Hojo S., Kitamura H., Konishi T., and Kodaira S. Radiation chemical yields of 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid for proton- and carbon-ion beams at ultrahigh dose rates: potential roles in FLASH effects. *Radiat. Res.*, **198** (3), 255–262 (2022). DOI: 10.1667/RADE-21-00.230.1
- Khan S., Bassenne M., Wang J., Manjappa R., Melemenidis S., Breitkreutz D. Y., Maxim P. G., Xing L., Loo B. W., and Pratx G. Multicellular spheroids as *in vitro* models of oxygen depletion during FLASH irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **110** (3), 833–844 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.01.050
- Small K. L., Henthorn N. T., Angal-Kalinin D., Chadwick A. L., Santina E., Aitkenhead A., Kirkby K. J., Smith R. J., Surman M., Jones J., Farabolini W., Corsini R., Gamba D., Gilardi A., Merchant M. J., and Jones R. M. Evaluating very high energy electron RBE from nanodosimetric pBR322 plasmid DNA damage. *Sci. Rep.*, **11** (1), 3341 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-82772-6
- Perstin A., Poirier Y., Sawant A., and Tambasco M. Quantifying the DNA-damaging effects of FLASH irradiation with plasmid DNA. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **113** (2), 437–447 (2022). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2022.01.049
- Tashiro M., Yoshida Y., Oike T., Nakao M., Yusa K., Hirota Y., and Ohno T. First human cell experiments with FLASH carbon ions. *Anticancer Res.*, 42 (5), 2469–2477 (2022). DOI: 10.21873/anticanres.15725
- Tinganelli W., Sokol O., Quartieri M., Puspitasari A., Dokic I., Abdollahi A., Durante M., Haberer T., Debus J., Boscolo D., Voss B., Brons S., Schuy C., Horst F., and Weber U. Ultra-high dose rate (FLASH) carbon ion irradiation: dosimetry and first cell experiments. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **112** (4), 1012– 1022 (2022). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.11.020
- Tessonnier T., Mein S., Walsh D. W. M., Schuhmacher N., Liew H., Cee R., Galonska M., Scheloske S., Schömers C., Weber U., Brons S.,

Debus J., Haberer T., Abdollahi A., Mairani A., and Dokic I. FLASH dose rate helium ion beams: first in vitro investigations. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **111** (4), 1011–1022 (2021).

DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.07.1703

- Bozhenko V. K., Ivanov A. V., Kulinich T. M., Smirnov V. P., Shishkin A. M., and Solodky V. A. Comparison of biological effects of γ-radiation of low and ultra-high dose rate on lymphocytes and cultured human malignant lymphoma cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **166** (6), 785–787 (2019). DOI: 10.1007/s10517-019-04440-0
- Han J., Mei Z., Lu C., Qian J., Liang Y., Sun X., Pan Z., Kong D., Xu S., Liu Z., Gao Y., Qi G., Shou Y., Chen S., Cao Z., Zhao Y. Y., Lin C., Zhao Y. Y., Geng Y., Chen J., Yan X., Ma W., and Yang G. Ultra-high dose rate FLASH irradiation induced radio-resistance of normal fibroblast cells can be enhanced by hypoxia and mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome *c. Front. Cell Develop. Biol.*, 9 (4), 672929 (2021). DOI: 10.3389/fcell.2021.672929
- Guo Z., Buonanno M., Harken A., Zhou G., and Hei T. K. Mitochondrial damage response and fate of normal cells exposed to FLASH irradiation with protons. *Radiat. Res.*, **197** (6), 569–582 (2022). DOI: 10.1667/RADE-21-00181.1
- Buonanno M., Grilj V., and Brenner D.J. Biological effects in normal cells exposed to FLASH dose rate protons. *Radiotherapy and Oncology*, **139** (10), 51–55 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.02.009
- Schmid T. E., Dollinger G., Hable V., Greubel C., Zlobinskaya O., Michalski D., Auer S., Friedl A. A., Schmid E., Molls M., and Röper B. The effectiveness of 20 MeV protons at nanosecond pulse lengths in producing chromosome aberrations in human-hamster hybrid cells. *Radiat. Res.*, **175** (6), 719–727 (2011). DOI: 10.1667/RR2465.1
- Schmid T. E., Dollinger G., Hable V., Greubel C., Zlobinskaya O., Michalski D., Molls M., and Röper B. Relative biological effectiveness of pulsed and continuous 20MeV protons for micronucleus induction in 3D human reconstructed skin tissue. *Radiotherapy and Oncology*, **95** (1), 66–72 (2010). DOI: 10.1016/j.radonc.2010.03.010
- Schmid T. E., Dollinger G., Hauptner A., Hable V., Greubel C., Auer S., Friedl A. A., Molls M., and Röper B. No evidence for a different RBE between pulsed and continuous 20 MeV protons. *Radiat. Res.*, 172 (5), 567–574 (2009). DOI: 10.1667/RR1539.1
- Adrian G., Konradsson E., Lempart M., Bäck S., Ceberg C., and Petersson K. The FLASH effect depends on oxygen concentration. *Br. J. Radiol.*, **93** (1106), 20190702 (2020). DOI: 10.1259/bjr.20190702
- Matsuura T., Egashira Y., Nishio T., Matsumoto Y., Wada M., Koike S., Furusawa Y., Kohno R., Nishioka S., Kameoka S., Tsuchihara K., Kawashima M., and Ogino T. Apparent absence of a proton beam dose rate effect and possible differences in RBE between Bragg peak and plateau. *Med. Phys.*, **37** (10), 5376–5381 (2010). DOI: 10.1118/1.3490086
- Barghouth P. G., Melemenidis S., Montay-Gruel P., Ollivier J., Viswanathan V., Jorge P. G., Soto L. A., Lau B. C., Sadeghi C., Edlabadkar A., Zhang R.,

Ru N., Baulch J. E., Manjappa R., Wang J., Le Bouteiller M., Surucu M., Yu A., Bush K., Skinner L., Maxim P. G., Loo B. W., Limoli C. L., Vozenin M. C., and Frock R. L. FLASH-RT does not affect chromosome translocations and junction structures beyond that of CONV-RT dose-rates. *Radiotherapy and Oncology*, **188** (11), 109906 (2023).

DOI: 10.1016/j.radonc.2023.109906

- Fouillade C., Curras-Alonso S., Giuranno L., Quelennec E., Heinrich S., Bonnet-Boissinot S., Beddok A., Leboucher S., Karakurt H. U., Bohec M., Baulande S., Vooijs M., Verrelle P., Dutreix M., Londoño-Vallejo A., and Favaudon V. FLASH irradiation spares lung progenitor cells and limits the incidence of radio-induced senescence. *Clin. Cancer Res.*, **26** (6), 1497–1506 (2020). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1440
- Dai Y., Liang R., Wang J., Zhang J., Wu D., Zhao R., Liu Z., and Chen F. Fractionated FLASH radiation in xenografted lung tumors induced FLASH effect at a split dose of 2 Gy. *Int. J. Radiat. Biol.*, **99** (10), 1542– 1549 (2023). DOI: 10.1080/09553002.2023.2194403
- Zhang Q., Cascio E., Li C., Yang Q., Gerweck L. E., Huang P., Gottschalk B., Flanz J., and Schuemann J. FLASH investigations using protons: design of delivery system, preclinical setup and confirmation of FLASH effect with protons in animal systems. *Radiat. Res.*, **194** (6), 656–664 (2020). DOI: 10.1667/RADE-20-00068.1
- Levy K., Natarajan S., Wang J., Chow S., Eggold J. T., Loo P. E., Manjappa R., Melemenidis S., Lartey F. M., Schüler E., Skinner L., Rafat M., Ko R., Kim A., Al-Rawi D. H., von Eyben R., Dorigo O., Casey K. M., Graves E. E., Bush K., Yu A. S., Koong A. C., Maxim P. G., Loo B. W., and Rankin E. B. Abdominal FLASH irradiation reduces radiation-induced gastrointestinal toxicity for the treatment of ovarian cancer in mice. *Sci. Rep.*, **10** (1), 21600 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-78017-7
- Velalopoulou A., Karagounis I. V., Cramer G. M., Kim M. M., Skoufos G., Goia D., Hagan S., Verginadis I. I., Shoniyozov K., Chiango J., Cerullo M., Varner K., Yao L., Qin L., Hatzigeorgiou A. G., Minn A. J., Putt M., Lanza M., Assenmacher C.-A. A., Radaelli E., Huck J., Diffenderfer E., Dong L., Metz J., Koumenis C., Cengel K. A., Maity A., and Busch T. M. Flash proton radiotherapy spares normal epithelial and mesenchymal tissues while preserving sarcoma response. *Cancer Res.*, **81** (18), 4808–4821 (2021). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1500
- Chabi S., To Th. H. V., Leavitt R., Poglio S., Jorge P. G., Jaccard M., Petersson K., Petit B., Roméo P.-H. H., Pflumio F., Vozenin M.-C. C., and Uzan B. Ultra-high-dose-rate FLASH and conventional-dose-rate irradiation differentially affect human acute lymphoblastic leukemia and normal hematopoiesis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **109** (3), 819–829 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2020.10.012
- 32. Diffenderfer E. S., Verginadis I. I., Kim M. M., Shoniyozov K., Velalopoulou A., Goia D., Putt M., Hagan S., Avery S., Teo K., Zou W., Lin A., Swisher-McClure S., Koch C., Kennedy A. R., Minn A., Maity A., Busch T. M., Dong L., Koumenis C., Metz J., and Cengel K. A. Design, implementation, and in vivo validation of a novel proton FLASH radia-

tion therapy system. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **106** (2), 440–448 (2020). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2019.10.049

- Montay-Gruel P., Acharya M. M., Jorge P. G., Petit B., Petridis I. G., Fuchs P., Leavitt R., Petersson K., Gondre M., Ollivier J., Moeckli R., Bochud F., Bailat C., Bourhis J., Germond J.-F. F., Limoli C. L., and Vozenin M.-C. C. Hypofractionated FLASH-RT as an effective treatment against glioblastoma that reduces neurocognitive side effects in mice. *Clin. Cancer Res.*, 27 (3), 775–784 (2021). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0894
- 34. Tinganelli W., Weber U., Puspitasari A., Simoniello P., Abdollahi A., Oppermann J., Schuy C., Horst F., Helm A., Fournier C., and Durante M. FLASH with carbon ions: tumor control, normal tissue sparing, and distal metastasis in a mouse osteosarcoma model. *Radiotherapy and Oncology*, **175** (10), 185–190 (2022). DOI: 10.1016/j.radonc.2022.05.003
- Sørensen B. S., Sitarz M. K., Ankjærgaard C., Johansen J. G., Andersen C. E., Kanouta E., Grau C., and Poulsen P. Pencil beam scanning proton FLASH maintains tumor control while normal tissue damage is reduced in a mouse model. *Radiotherapy and Oncology*, **175** (10), 178–184 (2022).
 DOI: 10.1016/j.radonc.2022.05.014
- 36. Smyth L. M. L., Donoghue J. F., Ventura J. A., Livingstone J., Bailey T., Day L. R. J., Crosbie J. C., and Rogers P. A. W. Comparative toxicity of synchrotron and conventional radiation therapy based on total and partial body irradiation in a murine model. *Sci. Rep.*, 8 (1), 12044 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-30543-1
- Almeida A., Godfroid C., Leavitt R. J., Montay-Gruel P., Petit B., Romero J., Ollivier J., Meziani L., Sprengers K., Paisley R., Grilj V., Limoli C. L., Romero P., and Vozenin M.-C. C. Antitumor effect by either FLASH or conventional dose rate irradiation involves equivalent immune responses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **118** (4), 1110–1122 (2023). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2023.10.031
- Eggold J. T., Chow S., Melemenidis S., Wang J., Natarajan S., Loo P. E., Manjappa R., Viswanathan V., Kidd E. A., Engleman E., Dorigo O., Loo B. W., and Rankin E. B. Abdominopelvic FLASH irradiation improves PD-1 immune checkpoint inhibition in preclinical models of ovarian cancer. *Mol. Cancer Therapeut.*, **21** (2), 371–381 (2022). DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0358
- 39. Gao F., Yang Y., Zhu H., Wang J., Xiao D., Zhou Z., Dai T., Zhang Y., Feng G., Li J., Lin B., Xie G., Ke Q., Zhou K., Li P., Shen X., Wang H., Yan L., Lao C., Shan L., Li M., Lu Y., Chen M., Feng S., Zhao J., Wu D. and Du X. First demonstration of the FLASH effect with ultrahigh dose rate high-energy X-rays. *Radiotherapy and Oncology*, **166** (1), 44–50 (2022). DOI: 10.1016/j.radonc.2021.11.004
- 40. Duval K. E. A., Aulwes E., Zhang R., Rahman M., Ashraf M. R., Sloop A., Sunnerberg J., Williams B. B., Cao X., Bruza P., Kheirollah A., Tavakkoli A., Jarvis L. A., Schaner P. E., Swartz H. M., Gladstone D. J., Pogue B. W., and Hoopes P. J. Comparison of tumor control and skin damage in a mouse model after ultrahigh dose rate irradiation and conventional irradiation.

882

Radiat. Res., **200** (3), 223–231 (2023). DOI: 10.1667/RADE-23-00057

- Ruan J. L., Lee C., Wouters S., Tullis I. D. C., Verslegers M., Mysara M., Then C. K., Smart S. C., Hill M. A., Muschel R. J., Giaccia A. J., Vojnovic B., Kiltie A. E., and Petersson K. Irradiation at ultra-high (FLASH) dose rates reduces acute normal tissue toxicity in the mouse gastrointestinal system. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **111** (5), 1250–1261 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.08.004
- 42. Zhang Q., Gerweck L.E., Cascio E., Yang Q., Huang P., Niemierko A., Bertolet A., Nesteruk K. P., McNamara A., and Schuemann J. Proton FLASH effects on mouse skin at different oxygen tensions. *Phys. Med. Biol.*, 68 (5), 055010 (2023). DOI: 10.1088/1361-6560/acb888
- Zhang Q., Gerweck L. E., Cascio E., Gu L., Yang Q., Dong X., Huang P., Bertolet A., Nesteruk K. P., Sung W., McNamara A. L., and Schuemann J. Absence of tissue-sparing effects in partial proton FLASH irradiation in murine intestine. *Cancers*, 15 (8), 2269 (2023). DOI: 10.3390/cancers15082269
- 44. Evans T., Cooley J., Wagner M., Yu T., and Zwart T. Demonstration of the FLASH effect within the spreadout bragg peak after abdominal irradiation of mice. *Int. J. Particle Therapy*, **8** (4), 68–75 (2022). DOI: 10.14338/IJPT-20-00095
- 45. Allen B. D., Alaghband Y., Kramár E. A., Ru N., Petit B., Grilj V., Petronek M. S., Pulliam C. F., Kim R. Y., Doan N. L., Baulch J. E., Wood M. A., Bailat C., Spitz D. R., Vozenin M. C., and Limoli C. L. Elucidating the neurological mechanism of the FLASH effect in juvenile mice exposed to hypofractionated radiotherapy. *Neuro-Oncology*, **25** (5), 927–939 (2023). DOI: 10.1093/neuonc/noac248
- 46. Zhu H., Xie D., Wang Y., Huang R., Chen X., Yang Y., Wang B., Peng Y., Wang J., Xiao D., Wu D., Qian C. N., and Deng X. Comparison of intratumor and local immune response between MVX-ray FLASH and conventional radiotherapies. *Clin. Translat. Rad. Oncol.*, **38** (11), 138–146 (2023). DOI: 10.1016/j.ctro.2022.11.005
- Almeida A., Togno M., Ballesteros-Zebadua P., Franco-Perez J., Geyer R., Schaefer R., Petit B., Grilj V., Meer D., Safai S., Lomax T., Weber D. C., Bailat C., Psoroulas S., and Vozenin M.C. Dosimetric and biologic intercomparison between electron and proton FLASH beams. *Radiotherapy and Oncology*, **190** (1), 109953 (2024). DOI: 10.1016/j.radonc.2023.109953
- Cuitiño M. C., Fleming J. L., Jain S., Cetnar A., Ayan A. S., Woollard J., Manring H., Meng W., McElroy J. P., Blakaj D. M., Gupta N., and Chakravarti A. Comparison of gonadal toxicity of single-fraction ultrahigh dose rate and conventional radiation in mice. *Adv. Radiat. Oncol.*, 8 (4), 101201 (2023). DOI: 10.1016/j.adro.2023.101201
- 49. Mascia A., McCauley S., Speth J., Nunez S. A., Boivin G., Vilalta M., Sharma R. A., Perentesis J. P., and Sertorio M. Impact of multiple beams on the FLASH effect in soft tissue and skin in mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **118** (1), 253–261 (2024). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2023.07.024
- Konradsson E., Liljedahl E., Gustafsson E., Adrian G., Beyer S., Ilaahi S. E., Petersson K., Ceberg C., and

Nittby Redebrandt H. Comparable long-term tumor control for hypofractionated FLASH versus conventional radiation therapy in an immunocompetent rat glioma model. *Adv. Radiat. Oncol.*, **7** (6), 101011 (2022). DOI: 10.1016/j.adro.2022.101011

- Iturri L., Bertho A., Lamirault C., Brisebard E., Juchaux M., Gilbert C., Espenon J., Sébrié C., Jourdain L., de Marzi L., Pouzoulet F., Muret J., Verrelle P., and Prezado Y. Oxygen supplementation in anesthesia can block FLASH effect and anti-tumor immunity in conventional proton therapy. *Commun. Medicine*, 3 (1), 183 (2023). DOI: 10.1038/s43856-023-00411-9
- Iturri L., Bertho A., Lamirault C., Juchaux M., Gilbert C., Espenon J., Sebrie C., Jourdain L., Pouzoulet F., Verrelle P., De Marzi L., and Prezado Y. Proton FLASH radiation therapy and immune infiltration: evaluation in an orthotopic glioma rat model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **116** (3), 655–665 (2023). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2022.12.018
- 53. Karsch L., Pawelke J., Brand M., Hans S., Hideghéty K., Jansen J., Lessmann E., Löck S., Schürer M., Schurig R., Seco J., Szabó E. R., and Beyreuther E. Beam pulse structure and dose rate as determinants for the flash effect observed in zebrafish embryo. *Radiotherapy and Oncology*, **173** (8), 49–54 (2022). DOI: 10.1016/j.radonc.2022.05.025
- 54. Beyreuther E., Brand M., Hans S., Hideghéty K., Karsch L., Leßmann E., Schürer M., Szabó E. R., and Pawelke J. Feasibility of proton FLASH effect tested by zebrafish embryo irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, **139** (10), 46–50 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.024
- 55. Pawelke J., Brand M., Hans S., Hideghéty K., Karsch L., Lessmann E., Löck S., Schürer M., Szabó E. R., and Beyreuther E. Electron dose rate and oxygen depletion protect zebrafish embryos from radiation damage. *Radiotherapy and Oncology*, **158** (5), 7– 12 (2021). DOI: 10.1016/j.radonc.2021.02.003
- 56. Saade G., Bogaerts E., Chiavassa S., Blain G., Delpon G., Evin M., Ghannam Y., Haddad F., Haustermans K., Koumeir C., Macaeva E., Maigne L., Mouchard Q., Servagent N., Sterpin E., Supiot S., and Potiron V. Ultrahigh-dose-rate proton irradiation elicits reduced toxicity in zebrafish embryos. *Adv. Radiat. Oncol.*, 8 (2), 101124 (2023). DOI: 10.1016/j.adro.2022.101124
- 57. Ghannam Y., Chiavassa S., Saade G., Koumeir C., Blain G., Delpon G., Evin M., Haddad F., Maigne L., Mouchard Q., Servagent N., Potiron V., and Supiot S. First evidence of in vivo effect of FLASH radiotherapy with helium ions in zebrafish embryos. *Radiotherapy* and Oncology, **187** (8), 109820 (2023). DOI: 10.1016/j.radonc.2023.109820
- Bley C. R., Wolf F., Jorge P. G., Grilj V., Petridis I., Petiti B., Bohlen T. T., Moeckli R., Limoli C., Bourhis J., Meier V., and Vozenin M.-C. C. Dose- and volume-limiting late toxicity of FLASH radiotherapy in cats with squamous cell carcinoma of the nasal planum and in mini pigs. *Clin. Cancer Res.*, 28 (17), 3814–3823 (2022). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-0262
- Børresen B., Arendt M. L., Konradsson E., Bastholm Jensen K., Bäck S. J., Munck af Rosenschöld P., Ceberg C., and Petersson K. Evaluation of single-fraction

high dose FLASH radiotherapy in a cohort of canine oral cancer patients. *Front. Oncol.*, **13** (9), 1256760 (2023). DOI: 10.3389/fonc.2023.1256760

- Schoenauen L., Stubbe F.-X. X., Van Gestel D., Penninckx S., and Heuskin A.-C. C. *C. elegans*: A potent model for high-throughput screening experiments investigating the FLASH effect. *Clin. Translat. Radiat. Oncol.*, **45** (12), 100712 (2024). DOI: 10.1016/j.ctro.2023.100712
- Bourhis J., Sozzi W. J., Jorge P. G., Gaide O., Bailat C., Duclos F., Patin D., Ozsahin M., Bochud F., Germond J.-F., Moeckli R., and Vozenin M.-C. Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, **139** (10), 18–22 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.019
- Daugherty E. C., Mascia A. E., Sertorio M. G. B., Zhang Y., Lee E., Xiao Z., Speth J., Woo J., McCann C., Russell K., Levine L., Sharma R., Khuntia D., Perentesis J. P., and Breneman J. C. FAST-01: Results of the first-in-human study of proton FLASH radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **114** (3), S4 (2022). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2022.07.2325
- Daugherty E. C., Mascia A., Zhang Y., Lee E., Xiao Z., Sertorio M., Woo J., McCann C., Russell K., Levine L., Sharma R., Khuntia D., Bradley J., Simone II C. B., Perentesis J., and Breneman J. FLASH Radiotherapy for the treatment of symptomatic bone metastases (FAST-01): protocol for the first prospective feasibility study. *JMIR Res. Protocols*, 12, e41812 (2023). DOI: 10.2196/41812
- 64. Spruijt K., Mossahebi S., Lin H., Lee E., Kraus J., Dhabaan A., Poulsen P., Lowe M., Ayan A., Spiessens S., Godart J., and Hoogeman M. Multi-institutional consensus on machine QA for isochronous cyclotron-based systems delivering ultra-high dose rate (FLASH) pencil beam scanning proton therapy in transmission mode. *Med. Phys.*, **51** (2), 786–798 (2023). DOI: 10.1002/mp.16854
- 65. Gregucci F., Spada S., Barcellos-Hoff M. H., Bhardwaj N., Chan Wah Hak C., Fiorentino A., Guzman M. L., Harrington Guha C., Κ., Herrera F. G., Honeychurch J., Hong T., Iturri L., Jaffee E., Karam S. D., Knott S. R. V, Koumenis C., Lyden D., Marciscano A. E., Melcher A., Mondini M., Mondino A., Morris Z. S., Pitroda S., Quezada S. A., Santambrogio L., Shiao S., Stagg J., Telarovic I., Timmerman R., Vozenin M.-C., Weichselbaum R., Welsh J., Wilkins A., Xu C., Zappasodi R., Zou W., Bobard A., Demaria S., Galluzzi L., Deutsch E., and Formenti S. C. Updates on radiotherapy-immunotherapy combinations (Proc. 6th Annu. ImmunoRad Conf.) Oncoimmunology, 12 (1), 2222560 (2023). DOI: 10.1080/2162402X.2023.2222560
- 66. Gupta S., Inman J. L., De Chant J., Obst-Huebl L., Nakamura K., Costello S. M., Marqusee S., Mao J. H., Kunz L., Paisley R., Vozenin M. C., Snijders A. M., and Ralston C. Y. A novel platform for evaluating dose rate effects on oxidative damage to peptides: toward a high-throughput method to characterize the mechanisms underlying the FLASH effect. *Radiat. Res.*, **200** (6), 523–530 (2023). DOI: 10.1667/RADE-23-00131.1
- Beyreuther E., Karsch L., Laschinsky L., Leßmann E., Naumburger D., Oppelt M., Richter C., Schürer M., Woithe J. and Pawelke J. Radiobiological response to

ultra-short pulsed megavoltage electron beams of ultrahigh pulse dose rate. *Int. J. Radiat. Biol.*, **91** (8), 643– 652 (2015). DOI: 10.3109/09553002.2015.1043755

- Cooper C. R., Jones D., Jones G. D., and Petersson K. FLASH irradiation induces lower levels of DNA damage ex vivo, an effect modulated by oxygen tension, dose, and dose rate. *Br. J. Radiol.*, **95** (1133), 20211150 (2022). DOI: 10.1259/bjr.20211150
- Cooper C. R., Jones D. J. L., Jones G. D. D., and Petersson K. Comet assay profiling of FLASH-induced damage: mechanistic insights into the effects of FLASH irradiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 24 (8), 7195 (2023). DOI: 10.3390/ijms24087195
- Tavakkoli A. D., Clark M. A., Kheirollah A., Sloop A. M., Soderholm H. E., Daniel N. J., Petusseau A. F., Huang Y. H., Thomas C. R. Jr., Jarvis L. A., Zhang R., Pogue B. W., Gladstone D. J., and Hoopes P. J. Anesthetic Oxygen Use and Sex Are Critical Factors in the FLASH Sparing Effect. *Adv. Rad. Oncol.*, 9 (6), 101492 (2024). DOI: 10.1016/j.adro.2024.101492
- Gaide O., Herrera F., Jeanneret Sozzi W., Gonçalves Jorge P., Kinj R., Bailat C., Duclos F., Bochud F., Germond J. F., Gondré M., Boelhen T., Schiappacasse L., Ozsahin M., Moeckli R., and Bourhis J. Comparison of ultra-high versus conventional dose rate radiotherapy in a patient with cutaneous lymphoma. *Radiotherapy and Oncology*, **174** (9), 87–91 (2022). DOI: 10.1016/j.radonc.2021.12.045
- Montay-Gruel P., Acharya M. M., Petersson K., Alikhani L., Yakkala C., Allen B. D., Ollivier J., Petit B., Jorge P. G., Syage A. R., Nguyen T. A., Baddour A. A. D., Lu C., Singh P., Moeckli R., Bochud F., Germond J.-F. F., Froidevaux P., Bailat C., Bourhis J., Vozenin M.-C. C., and Limoli C. L. Long-term neurocognitive benefits of FLASH radiotherapy driven by reduced reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116** (22), 10943–10951 (2019). DOI: 10.1073/pnas.1901777116
- Dokic I., Meister S., Bojcevski J., Tessonnier T., Walsh D., Knoll M., Mein S., Tang Z., Vogelbacher L., Rittmueller C., Moustafa M., Krunic D., Brons S., Haberer T., Debus J., Mairani A., and Abdollahi A. Neuroprotective effects of ultra-high dose rate FLASH Bragg peak proton irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **113** (3), 614–623 (2022). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2022.02.020
- 74. Shukla S., Saha T., Rama N., Acharya A., Le T., Bian F., Donovan J., Tan L.A., Vatner R., Kalinichenko V., Mascia A., Perentesis J. P., and Kalin T. V. Ultrahigh dose-rate proton FLASH improves tumor control. *Radiotherapy and Oncology*, **186** (9), 109741 (2023). DOI: 10.1016/j.radonc.2023.109741
- 75. Rudigkeit S., Schmid T. E., Dombrowsky A. C., Stolz J., Bartzsch S., Chen C. B., Matejka N., Sammer M., Bergmaier A., Dollinger G., and Reindl J. Proton-FLASH: effects of ultra-high dose rate irradiation on an in-vivo mouse ear model. *Sci. Rep.*, **14** (1), 1418 (2024). DOI: 10.1038/s41598-024-51951-6
- 76. Yin L., Masumi U., Ota K., Sforza D. M., Miles D., Rezace M., Wong J. W., Jia X., and Li H. Feasibility of synchrotron-based ultra-high dose rate (UHDR) proton irradiation with pencil beam scanning for FLASH research. *Cancers*, **16** (1), 221 (2024). DOI: 10.3390/cancers16010221

- 77. Yang G., Lu C., Mei Z., Sun X., Han J., Qian J., Liang Y., Pan Z., Kong D., Xu S., Liu Z., Gao Y., Qi G., Shou Y., Chen S., Cao Z., Zhao Y. Y., Lin C., Zhao Y. Y., Geng Y., Ma W., and Yan X. Association of cancer stem cell radio-resistance under ultra-high dose rate FLASH irradiation with lysosome-mediated autophagy. *Front. Cell Develop. Biol.*, **9** (4), 672693 (2021). DOI: 10.3389/fcell.2021.672693
- Liu G., Zhao L., Li X., Zhang S., Dai S., Lu X., and Ding X. A novel ultrahigh-dose-rate proton therapy technology: spot-scanning proton arc therapy + FLASH (SPLASH). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 117 (3), 730–737 (2023). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2023.05.012
- 79. Blain G., Vandenborre J., Villoing D., Fiegel V., Fois G. R., Haddad F., Koumeir C., Maigne L., Métivier V., Poirier F., Potiron V., Supiot S., Servagent N., Delpon G., and Chiavassa S. Proton irradiations at ultra-high dose rate vs. conventional dose rate: strong impact on hydrogen peroxide yield. *Radiat. Res.*, **198** (3), 318–324 (2022). DOI: 10.1667/RADE-22-00021.1
- Metzkes-Ng J., Brack F. E., Kroll F., Bernert C., Bock S., Bodenstein E., Brand M., Cowan T. E., Gebhardt R., Hans S., Helbig U., Horst F., Jansen J., Kraft S. D., Krause M., Leßmann E., Löck S., Pawelke J., Püschel T., Reimold M., Rehwald M., Richter C., Schlenvoigt H. P., Schramm U., Schürer M., Seco J., Szabó E. R., Umlandt M. E. P., Zeil K., Ziegler T., and Beyreuther E. The Dresden platform is a research hub for ultra-high dose rate radiobiology. *Sci. Rep.*, **13** (1), 20611 (2023). DOI: 10.1038/s41598-023-46873-8
- Labarbe R., Hotoiu L., Barbier J., and Favaudon V. A physicochemical model of reaction kinetics supports peroxyl radical recombination as the main determinant of the FLASH effect. *Radiotherapy and Oncology*, 153 (12), 303–310 (2020).
 DOL 10.1016 (ir redene 2020.06, 001)
 - DOI: 10.1016/j.radonc.2020.06.001
- 82. Spitz D. R., Buettner G. R., Petronek M. S., St-Aubin J. J., Flynn R. T., Waldron T. J., and Limoli C. L. An integrated physico-chemical approach for explaining the differential impact of FLASH versus conventional dose rate irradiation on cancer and normal tissue responses. *Radiotherapy and Oncology*, **139** (10), 23–27 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.03.028
- Bertho A., Iturri L., and Prezado Y. Radiation-induced immune response in novel radiotherapy approaches FLASH and spatially fractionated radiotherapies. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **376**, 37–68 (2023). DOI: 10.1016/bs.ircmb.2022.11.005
- 84. Daniels M. and Wigg E. Oxygen as a primary species in radiolysis of water. *Science (New York)*, **153** (3743), 1533–1534 (1966).
 DOI: 10.1126/science.153.3743.1533
- Buxton G. V., Greenstock C. L., Helman W. P., and Ross A. B. Critical-review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen-atoms and hydroxyl radicals (·OH/·O⁻) in aqueous-solution. *J. Phys. Chem. Refer. Data*, **17** (2), 513–886 (1988). DOI: 10.1063/1.555805
- Pastina B. and LaVerne J. A. Effect of molecular hydrogen on hydrogen peroxide in water radiolysis. *J. Phys. Chem. A*, **105** (40), 9316–9322 (2001). DOI: 10.1021/jp012245j

 Lennicke C. and Cochemé H. M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol. Cell*, **81** (18), 3691–3707 (2021). DOI: 10.1016/j.molcel.2021.08.018

- Hu S. and Shao C. Research progress of radiation induced bystander and abscopal effects in normal tissue. *Rad. Med. Protection*, 1 (2), 69–74 (2020). DOI: 10.1016/j.radmp.2020.04.001
- Lai Y., Jia X., and Chi Y. Modeling the effect of oxygen on the chemical stage of water radiolysis using GPUbased microscopic Monte Carlo simulations, with an application in FLASH radiotherapy. *Phys. Med. Biol.*, 66 (2), 25004 (2021). DOI: 10.1088/1361-6560/abc93b
- Domnanich K. A. and Severin G. W. A model for radiolysis in a flowing-water target during high-intensity proton irradiation. *ACS Omega*, 7 (29), 25860–25873 (2022). DOI: 10.1021/acsomega.2c03540
- Pimblott S. M. and LaVerne J. A. Stochastic simulation of the electron radiolysis of water and aqueous solutions. *J. Phys. Chem. A*, **101** (33), 5828–5838 (1997). DOI: 10.1021/jp970637d
- Jansen J., Knoll J., Beyreuther E., Pawelke J., Skuza R., Hanley R., Brons S., Pagliari F., and Seco J. Does FLASH deplete oxygen? Experimental evaluation for photons, protons, and carbon ions. *Med. Phys.*, 48 (7), 3982–3990 (2021). DOI: 10.1002/mp.14917
- Meesungnoen J. and Jay-Gerin J.-P. High-LET ion radiolysis of water: oxygen production in tracks. *Radiat. Res.*, **171** (3), 379–386 (2009). DOI: 10.1667/RR1468.1
- 94. Jay-Gerin J.-P. P. Ultra-high dose-rate (FLASH) radiotherapy: Generation of early, transient, strongly acidic spikes in the irradiated tumor environment. *Cancer/Radiothérapie*, **24** (4), 332–334 (2020). DOI: 10.1016/j.canrad.2019.11.004
- 95. Mladenova V., Mladenov E., Stuschke M., and Iliakis G. DNA damage clustering after ionizing radiation and consequences in the processing of chromatin breaks. *Molecules*, **27** (5), (2022). DOI: 10.3390/molecules27051540
- 96. Hada M. and Sutherland B. M. Spectrum of complex DNA damages depends on the incident radiation. *Radiat. Res.*, **165** (2), 223–230 (2006). DOI: 10.1667/RR3498.1
- 97. Hada M. and Georgakilas A. G. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. J. Radiat. Res., 49 (3), 203–210 (2008). DOI: 10.1269/jrr.07123
- Goodarzi A. A. and Jeggo P. A. Irradiation induced foci (IRIF) as a biomarker for radiosensitivity. *Mutation Res.* 736 (1–2), 39–47 (2012). DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.05.017
- 99. Auer S., Hable V., Greubel C., Drexler G. A., Schmid T. E., Belka C., Dollinger G., and Friedl A. A. Survival of tumor cells after proton irradiation with ultra-high dose rates. *Radiat. Oncol.*, 6 (1), 139 (2011). DOI: 10.1186/1748-717X-6-139
- 100.Beddok A., Fouillade C., Quelennec E., and Favaudon V. OC-0030: *In vitro* study of FLASH vs. conventional dose-rate irradiation: Cell viability and DNA damage repair. *Radiotherapy and Oncology*, **123** (S1), S9–S10 (2017). DOI: 10.1016/S0167-8140(17)30474-7

- 101. Adrian G., Konradsson E., Beyer S., Wittrup A., Butterworth K. T., McMahon S. J., Ghita M., Petersson K., and Ceberg C. Cancer cells can exhibit a sparing FLASH effect at low doses under normoxic *in vitro*-conditions. *Front. Oncol.*, **11** (7), 686142 (2021). DOI: 10.3389/fonc.2021.686142
- 102.Kim Y.-E., Gwak S.-H., Hong B.-J., Oh J.-M., Choi H.-S., Kim M. S., Oh D., Lartey F. M., Rafat M., Schüler E., Kim H.-S., von Eyben R., Weissman I. L., Koch C. J., Maxim P. G., Loo Jr. B. W., and Ahn G.-O. Effects of Ultra-high doserate FLASH irradiation on the tumor microenvironment in lewis lung carcinoma: role of myosin light chain. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **109** (5), 1440–1453 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2020.11.012
- 103.Akulinichev S. V., Glukhov S. I., Gavrilov Y. K., Kokontsev D. A., Kuznetsova E. A., Martynova V. V., and Yakovlev I. A. The Flash Mode of Proton Irradiation in the Bragg Peak Partly Spares the Embryogenesis of the Quail. *BioRxiv*, 2024.01.27.577528 (2024). DOI: 10.1101/2024.01.27.577528
- 104.Jiao Y., Cao F., and Liu H. Radiation-induced Cell Death and Its Mechanisms. *Health Phys.*, **123** (5), 376– 386 (2022). DOI: 10.1097/HP.000000000001601
- 105.Park W., Wei S., Kim B.-S., Kim B., Bae S.-J., Chae Y. C., Ryu D., and Ha K.-T. Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Exp. Mol. Med.*, 55 (8), 1573–1594 (2023).
 DOI: 10.1038/s12276-023-01078-x
- 106.Akulinichev S. V., Gavrilov Y. K., Glukhov S. I., Ivanov A. V., Kokontsev D. A., Kulinich T. M., Kuznetsova E. A., Martynova V. V., and Yakovlev I. A. Analysis of Cell Response to Ultrahigh Dose-Rate Proton Irradiation. *Bull. Russ. Acad. Sci.: Physics*, **87** (8), 1221–1225 (2023). DOI: 10.3103/S1062873823702830
- 107. Paganetti H. A review on lymphocyte radiosensitivity and its impact on radiotherapy. *Front. Oncol.*, **13** (8), 1201500 (2023). DOI: 10.3389/fonc.2023.1201500

- 108.Kanike V., Meesungnoen J., and Jay-Gerin J.-P. P. Acid spike effect in spurs/tracks of the low/high linear energy transfer radiolysis of water: potential implications for radiobiology. *RSC Advances*, 5 (54), 43361– 43370 (2015). DOI: 10.1039/c5ra07173a
- 109.Bock F. J. and Tait S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 21 (2), 85–100 (2020).
 DOI: 10.1038/s41580-019-0173-8
- 110. Tuomela K., Mukherjee D., Ambrose A. R., Harikrishnan A., Mole H., Hurlstone A., Onfelt B., Honeychurch J., and Davis D. M. Radiotherapy transiently reduces the sensitivity of cancer cells to lymphocyte cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119** (3), e2111900119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2111900119
- 111. Кулинич Т. М., Крастелев Е. Г., Быков Ю. А., Смирнов В. П., Шишкин А. М., Иванов А. В. и Боженко В. К. Исследование уровня двунитевых разрывов ДНК и механизмов клеточной гибели при воздействии на клетки рака легкого и меланомы фотонного излучения сверхвысокой мощности. *Вестн. РГМУ*, № 5, 76–82 (2018). DOI: 10.24075/vrgmu.2018.066
- 112. Akulinichev S. V., Vasiliev V. N., Gavrilov Y. K., Kokontsev D. A., Kravchuk L. V., Martynova V. V., and Yakovlev I. A. Possibilities of Proton FLASH Therapy on the Accelerator at the Russian Academy of Sciences' Institute for Nuclear Research. *Bull. Russ. Acad. Sci.: Physics*, **84** (11), 1325–1329 (2020). DOI: 10.3103/S1062873820110039
- 113. Рзянина А. В., Мицын Г. В., Агапов А. В., Грицкова Е. А., Углова С. С., Гаевский В. Н., Шипулин К. Н. и Хасенова И. Исследование выживаемости опухолевых клеток линии А549 при облучении протонным пучком во флэш- и стандартном режимах (Препринт ОИЯИ, Дубна, 2023). http://www1.jinr.ru/Preprints/2023/31(P19-2023-31).pdf.

Molecular Mechanisms of FLASH Effect in Radiobiology

S.I. Glukhov* and E.A. Kuznetsova*

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

The use of ultra-high dose-rate ionizing radiation, termed FLASH irradiation (\geq 40 Gy/s), contributes to healthy tissue sparing while maintaining tumor control compared to conventional dose rate irradiation. This review summarizes current knowledge dedicated to studies of tumor and normal cell lines, animals including tumor-bearing ones irradiated in conventional and FLASH dose rate irradiation modes. As a comparison, data on FLASH irradiation with photons, electrons, protons, helium and carbon ions are also presented. The biophysical, molecular biological and immunological aspects of FLASH effect which are essential for understanding the radiation-induced processes in cells and tissues in order to improve radiotherapy of tumors are discussed.

Keywords: FLASH radiation therapy, ultra-high dose rate, proton and photon therapy, DNA damage, apoptosis, biological mechanisms

= БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ ==

УДК 577.3

РЕЗУЛЬТАТЫ ФЛЭШ-ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ *in vivo* ПРОТОНАМИ ВЫСОКОЙ ЭНЕРГИИ

© 2024 г. А.Е. Шемяков^{*, **, #}, А.Р. Дюкина^{*}, С.И. Заичкина^{*}, А.В. Агапов^{***}, Г.В. Мицын^{***}, К.Н. Шипулин^{***}

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия **Физико-технический центр Физического института РАН, ул. Мира, 1Н, Протвино Московской области, 142280, Россия ***Объединенный институт ядерных исследований, ул. Жолио-Кюри, 6, Дубна Московской области, 141980, Россия #E-mail: alshemyakov@yandex.ru Поступила в редакцию 15.03.2024 г. После доработки 22.08.2024 г. Принята к публикации 23.08.2024 г.

Исследовано действие высокоэнергетического (660 МэВ) протонного облучения на ускорителе фазотрон во флэш-режиме (80 Гр/с) по сравнению со стандартной мощностью протонного воздействия 3.0 Гр/мин. При облучении в двух режимах в дозах 1.0 и 1.5 Гр оценивали индукцию цитогенетических повреждений в клетках костного мозга и состояние лимфоидных органов (тимус и селезенка), в дозах 7.0 и 8.0 Гр анализировали выживаемость при тотальном облучении мышей *in vivo*, а в дозах 40 и 60 Гр определяли скорость роста модельной опухоли при облучении *ex vivo*. Показано, что облучение животных во флэш-режиме в дозе 1.5 Гр защищает пролиферативную активность селезенки, а также приводит к снижению цитогенетических повреждений в эритроцитах костного мозга по микроядерному тесту по сравнению со стандартным режимом облучения в дозе 1.5 Гр, т.е. наблюдается более мягкое воздействие дозы флэш-режима. Однако облучение мышей во флэш-режиме в больших дозах (7.0 и 8.0 Гр) приводит к более ранней гибели животных по сравнению со стандартным режимом облучения. Только после флэш-облучения суспензии асцитной карциномы Эрлиха в дозе 40 Гр был сформирован опухолевый узел с дальнейшим ростом, во всех остальных группах опухоль не сформировалась.

Ключевые слова: протонное облучение, флэш-эффект, микроядра, асцитная карцинома Эрлиха, выживаемость, мыши.

DOI: 10.31857/S0006302924040197, EDN: NFERGZ

За последние несколько десятилетий произошло значительное улучшение качества лучевой терапии благодаря новым разработкам и технологиям, а также совершенствованию вычислительной техники. Одной из новых технологий стала протонная терапия. Данный вид дистанционной лучевой терапии с каждым годом становится доступнее для использования во многих странах мира. Одновременно с развитием и распространением этой технологии ученые и инженеры работают в поисках наиболее оптимальных условий для повышения ее эффективности, а также для снижения затрат на эксплуатацию дорогостоящего оборудования — протонных ускорителей. Одним из таких направлений стало исследование

доставки доз в режиме высокой мощности [1]. Возлействие на биологический объект высокоинтенсивных пучков протонов за сверхкороткий промежуток времени (длительностью до 100 мс) и следующие за этим биохимические процессы вызывают так называемый флэш-эффект. В последние голы использование сверхвысоких мошностей дозы интенсивно исследовалось как подход к снижению радиационного воздействия на здоровые ткани при сохранении контроля над опухолью [2, 3]. Чаще всего этот эффект можно наблюдать при мошности дозы более 50 Гр/с. В качестве объяснения наблюдаемого щадящего воздействия на здоровые ткани преобладает гипотеза истощения кислорода [4]. Облучение сверхвысокими мощностями дозы вызывает локальную нехватку кислорода, что приводит к острому перио-

Сокращения: АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха, ПХЭ – полихроматофильные эритроциты, МЯ – микроядра.



Рис. 1. Определение геометрических размеров и однородности дозы поля, сформированного протонным пучком, при помощи радиохромной пленки ЕВТ3.

ду гипоксии в облученной ткани и, как следствие, к кратковременной радиационной резистентности. Оксигенация тканей in vivo осуществляется посредством кровотока, который также транспортирует иммунные клетки и является важным медиатором иммунного ответа in vivo. Из-за гораздо более короткого времени воздействия при флэш-облучении повреждается значительно меньшее количество крови по сравнению с обычными мощностями дозы. В последствии меньшее количество циркулирующих иммунных клеток подвергается воздействию радиации. Это хорошо согласуется с данными о том, что флэш-облучение индуцирует меньше провоспалительных цитокинов и улучшает инфильтрацию Т-клеток в облученных опухолях [5, 6], можно сделать вывод, что иммунная система является частью флэш-эффекта. Как следствие, объем облученной крови может играть важную роль в механизмах флэш-эффекта in vivo. Целью настоящей работы было исследование действия высокоэнергетического протонного облучения во флэшрежиме (80 Гр/с) в дозах 1 и 1.5 Гр на индукцию цитогенетических повреждений в костном мозге и состояние лимфоидных органов, в дозах 7 и 8 Гр на выживаемость при тотальном облучении мышей *in vivo* и в дозах 40 и 60 Гр на скорость роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) после облучения клеток ex vivo. Контролем служило облучение пучками протонов в тех же дозах, но при мощности 3 Гр/мин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Облучение животных проводили в лаборатории ядерных проблем ОИЯИ (Дубна, Москов-

ская область) на специальном стенде для радиационных исследований ускорителя фазотрон. Воздействие на мышей пучками протонов с энергией 660 МэВ осуществляли в двух режимах – флэш и стандарт. Мощность дозы при облучении в режиме флэш составляла 80 Гр/с, а для контрольной группы мощность была снижена до стандартной терапевтической - 3 Гр/мин. Линейная передача энергии протонов с энергией 660 МэВ составляла около 0.4 кэВ/мкм. Контроль отпущенной дозы осуществляли сотрудники лаборатории ядерных проблем ОИЯИ при помощи специализированных ионизационных камер и дозиметрической пленки (ЕВТ3, США). Сформированное дозовое поле представляло собой окружность с полем диаметром 4 см на уровне 95%-й изодозы. На рис. 1 представлен профиль пучка протонов на радиохромной пленке и обработка данного пятна специальными программными средствами. Детальное описание методики формирования пучка и дозового контроля представлено в работе [7].

Все манипуляции с животными соответствовали нормативно-правовым актам о порядке экспериментальной работы с использованием животных [8]. Эксперименты проводили на ненаркотизированных двухмесячных самцах белых нелинейных мышей закрытой популяции SHK (массой 24–28 г), которые содержались в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. Облучение проводили по одному животному в специальных перфорированных контейнерах тотально на все тело. На рис. 2 представлена фотография расположения животного на стенде для проведения экспериментов. Для исследования цитогенетиче-



Рис. 2. Расположение животного в контейнере при облучении на стенде для радиационных исследований. Стрелкой обозначено направление пучка протонов.

ских повреждений облучение пучком протонов проводили в дозах 1.0 и 1.5 Гр. В каждой группе было не менее 5 животных. Через 28 ч после облучения животных выводили из эксперимента методом декапитации и производили забор органов и тканей. Критерием уровня цитогенетических повреждений служил процент полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) в костном мозге бедренной кости мышей. Микроядерный тест широко используется в качестве наиболее анализа in vivo как одна ИЗ чувствительных и надежных методик для оценки индукции хромосомных аберраций [9, 10]. У этих



Рис. 3. Расположение пробирок с суспензией асцитной карциномы Эрлиха при облучении на стенде для радиационных исследований.

селезенки, как отношение абсолютного веса органа к среднему весу животного в группе. Для исследования влияния мощности протонного облучения на выживаемость, были использованы дозы 7 и 8 Гр. В течение 40 суток после воздействия ежедневно вели контроль числа павших животных, по которым строили кривые выживаемости. По данным кривых оценивали динамику гибели мышей от облучения. Дополнительной тест-системой служила оценка воздействия протонов на опухолевые клетки. За 2 ч до облучения клетки АКЭ выделяли из мышей-опухоленосителей. Опухолевые клетки ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl до концентрации 20.10⁶/мл и помещали в пробирки типа «Эппендорф» объемом 1.5 мл. Облучение проводили при аналогичных условиях облучения животных в двух режимах в дозах 40 и 60 Гр. Данная методика была ранее использована при облучении АКЭ протонами в пике Брэгга в диапазоне доз от 30 до 150 Гр [11]. На рис. 3 представлена фотография размещения пробирок с клетками АКЭ в специальном креплении на стенде для проведения экспериментов. Сразу после облучения суспензию АКЭ в количестве 2 млн клеток в 0.1 мл NaCl внутримышечно вводили в заднюю лапу здоровых необлученных животных для последующего анализа частоты появления опухолевого узла и динамики роста опухоли. Объем опухолевого образования оценивали при помощи электронного штангенциркуля в трех взаимо-перпендикулярных направлениях в течение 43 суток после инокуляции.

же животных определяли индекс массы тимуса и



Рис. 4. Количество полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) в клетках костного мозга мышей, облученных протонами с различной мощностью воздействия в дозах 1.0 и 1.5 Гр (* – p < 0.05 – статистически значимые отличия относительно стандартного режима).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 4 представлены данные по измерению количества ПХЭ с МЯ в костном мозге мышей, облученных протонами в дозах 1.0 и 1.5 Гр при разной величине мощности дозы. В группе мышей, облученных в дозе 1.0 Гр, как при стандартном, так и во флэш-режиме, количество цитогенетических повреждений было одинаковым $(2.70 \pm 0.56\% \text{ и } 2.32 \pm 0.74\%$ соответственно). При облучении в дозе 1.5 Гр в режиме высокой мощности количество ПХЭ с МЯ возрастало незначительно $(3.73 \pm 0.60\%)$, в отличие от группы животных, облученных в стандартном режиме, где уро-

вень повреждений возрос более чем в 2 раза (до $6.20 \pm 1.04\%$) по сравнению с группой 1.0 Гр. При сопоставлении полученных значений с группой 1.5 Гр, облученных во флэш-режиме, наблюдаются статистически значимые различия (p < 0.05). Уровни цитогенетических повреждений при облучении протонами в стандартном режиме в дозах 1.0 и 1.5 Гр соответствуют аналогичным, полученным нами ранее, при облучении протонным пучком, но в модифицированном пике Брэгга [12]. В случае с высокоинтенсивным воздействием в дозе 1.5 Гр при мощности 80 Гр/с наблюдается щадящий эффект, который наблюдается в ряде работ, использующих различные источники ионизирующего излучения [13, 14].

Одновременно с оценкой цитогенетических повреждений в костном мозге мышей определяли относительную массу лимфоидных органов. Тимус и селезенка наряду с костным мозгом являются кроветворными органами с активно пролиферирующей тканью, т.е. обладают высокой радиочувствительностью. Они одними из первых реагируют на различные экзогенные факторы. При анализе клеточности органов методом оценки индекса массы селезенки и тимуса (рис. 5) наблюдалось значительное снижение пролиферативной активности клеток селезенки во всех облученных группах по сравнению с необлученными животными. По индексу массы селезенки не замечены различия в группах, облученных в дозе 1.0 Гр независимо от мощности подведенной дозы. Статистически достоверные различия наблюдались при облучении в дозе 1.5 Гр во флэшрежиме по сравнению со стандартным режимом. При анализе клеточности тимуса по сравнению с необлученными животными наблюдалось умеренное снижение пролиферативной активности



Рис. 5. Индекс массы селезенки (а) и тимуса (б) мышей, облученных протонами с различной мощностью воздействия в дозах 1.0 и 1.5 Гр. * - p < 0.05 - статистически значимые отличия относительно необлученного контроля; ** - p < 0.05 - статистически значимые отличия относительно необлученного контроля; ** - p < 0.05 - статистически значимые отличия относительно стандартной мощности.



Рис. 6. Выживаемость мышей, облученных протонами с различной мощностью воздействия в дозах 7 и 8 Гр.

во всех облученных группах в сравнении с необлученными животными, значимые различия от контроля наблюдались только в дозе 1.5 Гр при обоих режимах доставки дозы. Большой разброс данных не позволил определить различия между облученными животными по данному критерию.

Несмотря на более щадящее воздействие флэш-облучения по критерию клеточности селезенки и образованию микроядер в костном мозге животных, при проведении тотального облучения животных в большей, сублетальной дозе 7 и 8 Гр было обнаружено снижение выживаемости животных по сравнению со стандартным протонным облучением. На рис. 6 представлен график гибели животных в течении 43 суток после облучения в двух режимах. Однократное воздействие ионизирующего излучения на все тело млекопитающих приводит к развитию сложного набора симптомов, возникновение, характер и тяжесть которых зависят как от общей дозы радиации, так и от качества излучения. Известно, что гемопоэтический синдром возникает при дозах <10 Гр; это проявляется истощением гемопоэтических стволовых клеток и, в конечном итоге, истощением зрелых гемопоэтических и иммунных клеток. Несмотря на растущий интерес к облучению биологических объектов во флэш-режиме, литературных данных, описывающих воздействие данной методики на выживаемость целого организма, крайне мало. В работе [15] было исследовано воздействие летальной дозы протонного облучения с мощностью 100 Гр/с на выживаемость эмбрионов рыбок данио. Авторами не было выявлено значимого влияния мощности дозы протонов на выживаемость и другие показатели эмбрионов. Но при частичном флэш-облучении брюшной полости мышей протонами в дозе 16 Гр в работе [16] показана более высокая общая выжи-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

ваемость через 21 сутки после воздействия по сравнению со стандартной мощностью. При увеличении дозы до 19 и 22 Гр, независимо от мощности дозы, все животные погибли через 12 суток после облучения. Вопрос определения механизма гибели животных при воздействии высокоинтенсивного протонного излучения остается актуальным и требует дальнейших исследований.

При исследовании более высоких доз протонного воздействия были облучены эппендорфы с суспензией АКЭ в дозе 40 и 60 Гр в двух режимах. После инокуляции облученных клеток ex vivo здоровым мышам появление опухолевого узла было отмечено только в группе облученных во флэшрежиме клеток в дозе 40 Гр. В данной группе имела место задержка появления опухолевых узлов, которая составила 7 суток. Однако после этого опухоли были отмечены у 80% животных, а последующая динамика роста образования не отличалась от контрольной, необлученной группы (рис. 7). Это может свидетельствовать о не полной гибели клеток АКЭ после облучения во флэш-режиме в дозе 40 Гр. В остальных облученных группах опухолевый узел не был обнаружен на протяжении всего времени наблюдения. Таким образом, эффект повышенной чувствительности опухолевых клеток к воздействию протонов сверхвысокой мощности не наблюдался. Причиной этому может служить нахождение клеток в виде суспензии в питательной среде в момент облучения, а не в условиях плотного узла внутри организма. При такой постановке эксперимента может иметь место эффект локальной нехватки кислорода, что согласуется с основной причиной возникновения защитного флэш-эффекта – кратковременное гипоксическое состояние. При такой методике исключено воздействие на кровоток и иммунную систему организма, ко-



Рис. 7. Динамика роста солидной формы АКЭ у мышей после инокуляции не облученных и облученных протонами клеток *ex vivo* в дозе 40 Гр во флэш-режиме.

торые тоже являются частью эффекта флэш. Полученные данные будут в будущем учтены при флэш-облучении опухолевого узла непосредственно в лапе животного для определения эффективности данного вида лучевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показаны результаты облучения биологических объектов во флэш-режиме пучком протонов высокой энергии. По результатам сравнительного исследования трех независимых тест-систем было показано биологическое воздействие данного излучения на клетки кроветворной системы, определена выживаемость при тотальном облучении в летальной дозе и исследована динамика роста опухолевого узла при облучение опухолевых клеток в терапевтических дозах *ех vivo* с последующей инокуляцией животным.

При тотальном облучении мышей на фазотроне протонами с энергией 660 МэВ во флэш-режиме 80 Гр/с в диапазоне средних и высоких доз были выявлены существенные различия в динамике индукции цитогенетического ответа клетками костного мозга и патофизиологическом действии на лимфоидные органы по сравнению с действием стандартного режима облучения. Флэш-режим приводит к меньшему угнетению пролиферативной активности селезенки, а также вызывает меньше повреждений в эритроцитах костного мозга по микроядерному тесту при облучении животных в дозе 1.5 Гр. Стоит отметить, что при лучевой терапии опухолей в клинике стандартная терапевтическая доза за одну фракцию составляет 2.0 Гр, а дозу на уровне 1.0–1.5 Гр получают здоровые ткани вблизи опухолевого очага. Снижение вероятности повреждения здоровых тканей при разрушении опухолевого узла является залогом успешного лечения и отсутствия вторичных лучевых эффектов у пациента.

Флэш облучение суспензии опухолевых клеток в дозе 40 Гр оказалось недостаточным для полной гибели опухолевых клеток, в отличие от облучения в стандартном режиме 3 Гр/мин. Как было сказано, данная модель не может однозначно рассматриваться как модель опухоли, так как клетки были облучены в виде суспензии вне организма. С точки зрения эффективности лечения опухоли, необходимо проведение работ по облучению опухолевого узла непосредственно в организме животного, что не входило в данную программу исследований ввиду сложности проведения таких процедур. Полученные данные позволяют оценить дозовую нагрузку на разные органы и ткани системы кроветворения при облучении животных средними и большими дозами протонов. Несмотря на то, что в лучевой терапии используются пучки протонов меньшей энергии для облучения мишеней в области пика Брэгга, результаты данного исследования явным образом показывают решающее влияние мощности подведенной дозы на биологический эффект по всем проведенным тестам. Для полноты исследования и для оценки применимости данной методики в клинической практике требуется продолжить работы по изучению воздействия режима высокой мощности и в области пика Брэгга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00224-24-03.

893

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции проводили согласно нормативно-правовым актам о порядке экспериментальной работы с использованием животных [8], план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 23 от 05.03.2022 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Diffenderfer E., Verginadis I., Kim M., Shoniyozov K., Velalopoulou A., Goia D., Putt M., Hagan S., Avery S., Teo K., Zou W., Lin A., Swisher-McClure S., Koch C., Kennedy A. R., Minn A., Maity A., Busch T. M., Dong L., Koumenis C., Metz J., and Cengel K. A. Design, implementation, and *in vivo* validation of a novel proton flash radiation therapy system. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **106** (2), 440–448 (2020). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2019.10.049
- Favaudon V., Caplier L., Monceau V., Pouzoulet F., Sayarath M., Fouillade C., Poupon M. F., Brito I., Hupé P., Bourhis J., Hall J., Fontaine J. J., and Vozenin M. C. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci. Transl. Med.*, 6 (245), 245ra93 (2014). DOI: 10.1126/scitranslmed.3008973
- Soto L., Casey K., Wang J., Blaney A., Manjappa R., Breitkreutz D., Skinner L., Dutt S., Ko R., Bush K., Yu A., Melemenidis S., Strober S., Englemann E., Maxim P., Graves E., and Loo B. FLASH irradiation results in reduced severe skin toxicity compared to conventional-dose-rate irradiation. *Radiat. Res.*, **194** (6), 618–624 (2020). DOI: 10.1667/RADE-20-00090
- Spitz D., Buettner G., Petronek M., St-Aubin J., Flynn R., Waldron T., and Limoli C. An integrated physico-chemical approach for explaining the differential impact of FLASH versus conventional dose rate irradiation on cancer and normal tissue responses. *Radiother. Oncol.*, **139**, 23–27 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.03.028
- Simmons D., Lartey F., Schüler E., Rafat M., King G., Kim A., Ko R., Semaan S., Gonzalez S., Jenkins M., Pradhan P., Shih Z., Wang J., von Eyben R., Graves E., Maxim P., Longo F., and Loo B. Jr. Reduced cognitive deficits after FLASH irradiation of whole mouse brain are associated with less hippocampal dendritic spine loss and neuroinflammation. *Radiother. Oncol.*, 139, 4–10 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.006
- Rama N., Saha T., Shukla S., Goda C., Milewski D., Mascia A., Vatner R., Sengupta D., Katsis A., Abel E., Girdhani S., Miyazaki M., Rodriguez A., Ku A.,

Dua R., Parry R., and Kalin T. Improved tumor control through t-cell infiltration modulated by ultra-high dose rate proton flash using a clinical pencil beam scanning proton system. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **105**, S164–S165 (2019).

DOI: 10.1016/j.ijrobp.2019.06.187

- Агапов А. В., Грицкова Е. А., Густов С. А., Мицын Г. В., Молоканов А. Г., Хасенова И., Швидкий С. В. и Шипулин К. Н. Формирование высокоинтенсивного пучка протонов для исследования флэш-эффекта в лучевой терапии. *Медицинская физика*, 4, 29–39 (2023). DOI: 10.52775/1810-200X-2023-100-4-29-39
- Директива 2010/63/еи Европейского парламента и Совета Европейского союза. URL.: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_ 201063_rus.pdf (дата обращения: 12.03.2024 г.).
- Krupina K., Goginashvili A., and Cleveland D. Causes and consequences of micronuclei. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **70**, 91–99 (2021). DOI: 10.1016/j.ceb.2021.01.004.
- Hayashi M. The micronucleus test most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes and Environ.*, 38, 18 (2016). DOI: 10.1186/s41021-016-0044-x
- Балакин В., Розанова О., Смирнова Е., Белякова Т., Стрельникова Н., Смирнов А. и Шемяков А. Индукция роста солидной формы асцитной карциномы эрлиха у мышей после облучения протонами опухолевых клеток *ex vivo. Докл. РАН. Науки о жизни.* 511 (1), 360–364 (2023). DOI: 10.31857/S2686738923600152
- Балакин В., Розанова О., Смирнова Е., Белякова Т., Шемяков А., Заичкина С., Сорокина С. и Дюкина А. Действие низких и средних доз тонкого сканирующего пучка протонов на органы кроветворения при тотальном облучении мышей. Докл. РАН. Науки о жизни. 494 (1), 458–462 (2020). DOI: 10.31857/S2686738920050042.
- Lin B., Gao F., Yang Y., Wu D., Zhang Y., Feng G., Dai T., and Du X. FLASH radiotherapy: history and future. *Front. Oncol.*, **11**, 644400 (2021)ιο DOI: 10.3389/fonc.2021.644400.
- Hughes J. and Parsons J. FLASH radiotherapy: current knowledge and future insights using proton-beam therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 6492 (2020). DOI: 10.3390/ijms21186492.
- Beyreuther E., Brand M., Hans S., Hideghety K., Karsch L., Lebmann E., Schurer M., Szabo E., and Pawelke J. Feasibility of proton FLASH effect tested by zebrafish embryo irradiation. *Radiother. Oncol.*, 139, 46–50 (2019). DOI: 10.1016/j.radonc.2019.06.024.
- 16. Zhang Q., Cascio E., Li C., Yang Q., Gerweck L., Huang P., Gottschalk B., Flanz J., and Schuemann J. FLASH investigations using protons: design of delivery system, preclinical setup and confirmation of FLASH effect with protons in animal systems. *Radiat. Res.*, **194** (6), 656–664 (2020). DOI: 10.1667/RADE-20-00068.1.

Results of FLASH Irradiation of Mice in vivo with High-Energy Protons

A.E. Shemyakov^{*, **}, A.R. Dyukina^{*}, S.I. Zaichkina^{*}, A.V. Agapov^{***}, G.V. Mitsyn^{***}, and K.N. Shipulin^{***}

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

**Physical-Technical Center of the Physical Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Mira 1N, Protvino, Moscow Region, 142280

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

The FLASH effect of high-energy (660 MeV) proton irradiation using the Phasotron accelerator with the capacity of delivering dose rates of 80 Gy/s has been studied and compared to the effect after exposure to proton radiation at a conventional dose rate of 3 Gy/min. After FLASH and conventional dose-rate irradiation with doses of 1.0 and 1.5 Gy, the induction of cytogenetic damage to bone marrow cells and the state of lymphoid organs (thymus and spleen) were estimated; at doses of 7.0 and 8.0 Gy, the survival rate after total irradiation of mice *in vivo* was analyzed; and at doses of 40 and 60 Gy, the tumor growth rate was determined after irradiation *ex vivo*. It has been shown that irradiation of animals using the FLASH mode at a dose of 1.5 Gy protects the proliferative activity of the spleen and also leads to a decrease in cytogenetic injuries in bone marrow erythrocytes, based on the micronucleus test, as compared to the conventional irradiation at a dose of 1.5 Gy; thus, the FLASH effect has lower toxicity compared to conventional radiation. However, irradiation of mice, the FLASH effect which delivers high doses (7.0 and 8.0 Gy) of radiation, leads to earlier death of animals compared to those exposed to conventional radiation. Only after FLASH irradiation of a suspension of Ehrlich ascites carcinoma at a dose of 40 Gy, a tumor node with further growth was formed; no tumors were formed in all other groups.

Keywords: proton irradiation, FLASH effect, micronuclei, Ehrlich ascites carcinoma, survival rate, mice

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 577.3

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ С ЭНЕРГИЕЙ 90–170 МэВ НА ОРГАНЫ КРОВЕТВОРЕНИЯ ПРИ ТОТАЛЬНОМ ОБЛУЧЕНИИ МЫШЕЙ ТОНКИМ СКАНИРУЮЩИМ ПУЧКОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛИНЕЙНОЙ ПОТЕРИ ЭНЕРГИИ ЧАСТИЦ

© 2024 г. О.М. Розанова^{*, #}, Т.А. Белякова^{*}, Е.Н. Смирнова^{*}, С.С. Сорокина^{*}, А.Р. Дюкина^{*}, А.Е. Шемяков^{*, **}, Н.С. Стрельникова^{**}

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия **Филиал «Физико-технический центр» Физического института им. П.Н. Лебедева РАН, ул. Мира, 1Н, Протвино Московской области, 142281, Россия #E-mail: rozanova.iteb@gmail.com

Поступила в редакцию 14.03.2024 г. После доработки 05.06.2024 г. Принята к публикации 19.06.2024 г.

Исследовано действие протонного излучения при тотальном облучении мышей до пика и в пике Брэгга в диапазоне доз 0.1–1.5 Гр на индукцию цитогенетических повреждений в костном мозге, продукцию активных форм кислорода в цельной крови, состояние тимуса и селезенки в зависимости от линейной потери энергии. Обнаружено, что выход полихроматофильных эритроцитов с микроядрами при всех дозах протонного излучения в пике Брэгга с линейной потерей энергии 2.5 кэВ/мкм был близок к уровню линейной потери энергии с микроядрами для соответствующих доз рентгеновского излучения с линейной потерей энергии 2.0 кэВ/мкм, а при облучении до пика Брэгга с линейной потерей энергии 0.7 кэВ/мкм уровень цитогенетических повреждений был значительно ниже. Коэффициент относительной биологической эффективности, рассчитанный по выходу линейной потери энергии с микроядрами для протонов в пике Брэгга, равнялся 1.15, а до пика – 0.63. Выявлены органоспецифические различия в закономерностях патофизиологического действия в зависимости от величины дозы и линейной потери энергии протонов на тимус, селезенку мышей и состояние антиоксидантной системы клеток крови.

Ключевые слова: протоны, линейная потеря энергии, микроядра, тимус, селезенка, АФК, мыши.

DOI: 10.31857/S0006302924040207, EDN: NFCVUR

Актуальность исследования особенностей действия протонного излучения (ПИ) в настоящее время по-прежнему остается высокой. Применение протонов для радиотерапии обусловлено специфическим распределением поглощенной дозы, описываемым кривой Брэгга, при прохождении через биологическую ткань: относительная низкая энергия частиц на входе, затем на заранее определенной глубине наличие пика Брэгга – максимального энерговыделения в конце пробега частицы, то есть непосредственно в опухоли, а затем, после пика, резкое падение энергии до нуля, что позволяет не повреждать здоровые ткани за опухолью [1]. В мире и нашей стране активно развиваются центры протонной терапии (ПТ), в которых при лечении как наиболее распространенных онкологических заболеваний (рак молочной железы и простаты) [2, 3], так и редких, радиорезистентных, с высокой степенью рецидивирования (рак мозга) [4], используют современную технологию сканирования тонким пучком протонов по заданному объему мишени. Метод основывается на сложных системах планирования облучения и множественных магнитах, которые перемещают остронаправленный пучок протонов вдоль вертикальной и горизонтальной осей, и в процессе движения его интенсивность модулируется. Такой способ доставки дозы позволяет облучать большие поля с субмиллиметровой точностью, улучшает 3D-конформацию дозы и существенно снижает дозы нейтро-

Сокращения: ПИ – протонное излучение, ПТ – протонная терапия, ОБЭ – относительная биологическая эффективность, АФК – активные формы кислорода, ЛПЭ – линейная потеря энергии, РИ – рентгеновское излучение, ПХЭ – полихроматофильные эритроциты.

нов, что позволяет уменьшить интегральную лучевую нагрузку на тело пациента по сравнению с другими методами ПТ и современными методами фотонной лучевой терапии, значительно уменьшая риск постлучевых осложнений и развития рецидивов [5]. Следует подчеркнуть, что за счет возможности высокоточного облучения протонами даже маленького объема мишени и отсутствия частиц после пика Брэгга, в отличие от ионов углерода и нейтронов, даже небольшое увеличение значения относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов дает существенное преимущество для терапии. Кроме того, в связи с появлением в нашей стране нескольких новых центров ПТ, созданием протонных томографов возникла проблема оценки лучевых нагрузок на персонал этих центров, а также сотрудников предприятий, работающих со смешанными полями излучений, что будет способствовать безопасному внедрению новых технологий и развитию промышленной медицины.

Помимо медицинского применения другой причиной для исследования действия высокоэнергетических ускоренных частиц является решение задач космической радиобиологии, связанных с увеличением длительности и дальности космических полетов, которые требуют корректировки оценки биологического действия ускоренных частиц высоких энергий и поиск мер радиационной защиты экипажей, а также радиобиологического обоснования для преодоления радиационного барьера, обусловленного галактическим космическим излучением, которое на 95% состоит из протонов с энергией около 100 МэВ [6–8].

Наиболее значимый для практики объем данных о действии протонов и уточнения значений ОБЭ накапливается в центрах ПТ по критериям эффективности лечения разных видов опухолей. Использование этих данных для понимания закономерностей действия протонов на здоровые и опухолевые ткани пока ограничивается большим индивидуальным разбросом между пациентами, небольшими выборками однотипных случаев, а также различием в технических конструкциях и физических характеристиках терапевтических установок [9]. Несмотря на то, что во всем мире с помощью ПТ пролечено уже около 350000 человек (https://www.ptcog.site/index.php/patient-statistics), а Международной комиссией по радиационным единицам и измерениям для применения в клиниках для ПТ рекомендована величина ОБЭ, равная 1.1, исследования по уточнению значения ОБЭ протонов продолжаются, поскольку фиксированное значение ОБЭ ставится под сомнение с позиции оценки безопасности пациентов, так как если доза в опухоли слишком низкая, то риск рецидива увеличивается, а если завышена, то возрастает вероятность возникновения негативных эффектов [10].

В настоящее время недостаточно известно о биологических эффектах действия протонов с энергией около 100 МэВ до пика и в пике Брэгга на клетки костного мозга. органы иммунной системы и продукцию активных форм кислорода (АФК) при тотальном облучении животных низкими (до 0.5 Гр) и средними дозами (до 2 Гр). В ряде исследований было продемонстрировано, что величина ОБЭ протонов, которая высчитывается относительно лействия фотонных (гаммаили рентгеновского) излучений, находится в диапазоне 1.1–1.8 в зависимости от линейной потери энергии частиц (ЛПЭ), дозы, чувствительности объекта, условий облучения, сроков регистрации эффектов и критериев оценки [11, 12]. Эти значения ОБЭ протонов основаны, в основном, на результатах экспериментов по выживаемости культивируемых нормальных и опухолевых клеток при облучении in vitro с помощью методик, которые требуют применения высоких доз однократного облучения порядка 2–30 Гр, или с помощью более чувствительной оценки хромосомных повреждений в культивируемых клетках in vitro. условия облучения которых не соответствуют концентрациям кислорода в тканях, распределению по клеточному циклу, влиянию микроокружения и другим сложным процессам взаимодействия систем и органов целого организма [13]. Для того чтобы понять, как первичные молекулярные и клеточные повреждения реализуются через индукцию специфических и общих каскадных событий в тканевые и организменные ответы, необходимы исследования при облучении ПИ животных.

В ряде работ показано, что хотя регистрируемые биологические эффекты гамма- и рентгеновского излучения (РИ), относительно которых сравнивают действие протонов и вычисляют величину ОБЭ, очень близки, однако реализация их происходит за счет специфических процессов: начиная со способа взаимодействия частиц с живым веществом и передачи энергии до качества и локализации на хромосоме первичных повреждений ДНК, активации определенных регуляторных каскадов, приводящих к формированию конечного показателя [14]. Поскольку сейчас уже достаточно подробно исследованы первичные ключевые молекулярные мишени и механизмы, на которые влияют высокоэнергетические частицы [15], то для биологической характеристики пучков в условиях облучения животных при низких и терапевтических дозах целесообразно использовать методы, которые бы отражали состояние наиболее чувствительных органов и тканей, таких как костный мозг, тимус, селезенка, кровь в те временные сроки, когда регистрируются повреждения генома как стволовых клеток, так и



Рис. 1. Расположение мышей во время облучения на различных участках кривой Брэгга: (П1) – позиция облучения до пика Брэгга, (П2) – позиция облучения в пике Брэгга.

пролиферирующих, имеющие критическое значение для таких процессов, как мутагенез, канцерогенез и преждевременное старение [16].

Таким образом, целью работы было исследование действия протонного излучения, сформированного по технологии тонкого сканирующего пучка, до пика и в пике Брэгга относительно рентгеновского излучения в диапазоне доз 0.1— 1.5 Гр на индукцию цитогенетических повреждений в костном мозге, продукцию АФК в цельной крови, вес тимуса и селезенки при тотальном облучении мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 8–9-недельных самцах аутбредных нелинейных мышей колонии SHK с массой тела 31–35 г, полученных из питомника животных «Столбовая» НЦ ФМБА, которых разводили и содержали в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН (Пущино, Московская обл.) при комнатной температуре, естественном световом дне и свободном доступе к пище и воде [17]. Мышей содержали в полипропиленовых клетках по 10 особей. Все процедуры проводили в соответствии с нормативно-правовыми актами, касающимися экспериментов на животных и гуманного обращения с животными [18].

Перед облучением мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией ксилазин/золетиловой смеси 0.7/3.4 мг/кг (Interchemie Werken. BV, Нидерланды, Virbac Sante Animale, Франция). В каждом эксперименте был контроль, учитывающий транспортировку, наркотизацию и имитацию облучения животных. В группах на каждую экспериментальную точку было не менее 5 мышей и проведено 2–3 независимых эксперимента.

Мышей облучали тотально до пика и в пике Брэгга в дозах 0.1, 0.5, 1.0 Г и 1.5 Гр на протонном синхротроне в ЦКП «Прометеус» ФТЦ ФИАН (Протвино, Московская обл.) с применением технологии сканирования пучком с одного направления. Для формирования требуемых параметров облучения фокусировка пучка осуществлялась с помошью квадрупольных линз, а отклонение пучка по горизонтали и вертикали – двумя поворотными магнитами. В процессе облучения с применением технологии тонкого сканирующего пучка происходит отклонение протонов с разной энергией на заданный угол и постепенно «закрашивается» весь облучаемый объем пучками частиц с модулируемой интенсивностью. Угол отклонения, интенсивность и энергия протонов рассчитываются в специальной программе планирования методом Монте-Карло.

Для точного позиционирования во время облучения мышей на специальной платформе располагали в индивидуальном быстросъемном, хорошо вентилируемом, пластиковом контейнере размером 80×40×50 мм с толщиной стенки 1 мм. Расположение мышей по направлению пучка протонов при облучении в разных областях кривой Брэгга представлено на рис. 1. Животных располагали правой стороной тела перпендикулярно к оси пучка на соответствующих расстояниях от выпускного окна ускорителя. При облучении в модифицированном пике Брэгга для смещения в диапазон энергий протонов более 70 МэВ перед контейнером с животным располагался водный фантом толщиной 60 мм, что позволяло получить более однородное дозовое распределение в теле животного с хорошим градиентом доз на границах мишени. С помощью трехмерной программы планирования по томограмме мыши определяли облучаемый объем (тело животного), который равнялся

65.4 см³. Расчет дозы осуществляли в программе планирования, разработанной для дозового планирования курсов облучения пациентов с опухолями, которая входит в комплекс ПТ «Прометеус». Равномерность дозового распределения с максимальным и минимальным отклонением дозы от заданного значения составляло не более 5%. Облучение проводили в импульсном режиме с длительностью импульса 200 мс (1 импульс в 2 с). При облучении в модифицированном пике Брэгга мощность дозы составляла 0.1–1.0 Гр/мин (число частиц $1.28 \cdot 10^9 - 1.97 \cdot 10^{10}$) в зависимости от дозы, а энергия частиц на выходе из ускорителя составляла 90–116 МэВ. Оценочное среднее значение ЛПЭ составляло 2.5 ± 0.7 кэВ/мкм.

Для облучения мышей до пика Брэгга было сформировано однородное дозовое поле прямоугольной формы размером 40×70 мм. Энергия частиц в данном случае составляла 170 МэВ, что соответствует ЛПЭ на плато 0.70 ± 0.04 кэВ/мкм, при мощности дозы 0.1-0.9 Гр/мин (число частиц $3.25 \cdot 10^9 - 5.00 \cdot 10^{10}$). Контроль дозы проводили клиническим дозиметром на основе алмазного детектора (ИФТП, Россия) и дозиметрической пленкой (ЕВТ2, США), которая позволяет измерить дозу протонного излучения в диапазоне 0.01-40 Гр.

Для определения коэффициента ОБЭ контрольные группы мышей были облучены РИ на установке РУТ (200 кВ, 2 кэВ/мкм, 1 Гр/мин; ЦКП «Источники излучения» ИБК РАН, Пущино, Московская обл.). Облучение мышей РИ, которое является фотонным, осуществлялось равномерно по всему телу в тех же дозах и условиях (анестезия, транспортировка к источникам облучения), что и при ПИ.

Через 28 ч после облучения мышей выводили из эксперимента методом декапитации и одновременно проводили забор клеток крови, костного мозга, тимуса и селезенки по общепринятым методикам. Период в 28 ч был выбран на основе наших предыдущих результатов для регистрации максимального уровня хромосомных повреждений в эритроцитах костного мозга с учетом длительности стадий эритропоэза и радиационной задержки клеточного цикла [19]. Цитогенетические препараты клеток костного мозга готовились по стандартной методике [20] с некоторыми модификациями. Критерием уровня цитогенетических повреждений служил процент полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами в костном мозге. На каждую экспериментальную точку использовали не менее 5 мышей и анализировали не менее 3000 ПХЭ с каждого препарата. Тимус и селезенка наряду с костным мозгом являются важными кроветворными органами с активно пролиферирующей тканью и характеризуются высокой радиочувствительностью. Индекс

массы тимуса и селезенки определяли по отношению величины средней массы органа к величине средней живой массы животного соответствующих групп. Уровень продукции АФК в цельной крови мышей измеряли методом люминол-зависимой, зимозан-индуцированной хемилюминесценции с помощью 12-канального прибора СНЕМІLUM-12. Определяли значения светоплощади под кривой при спонтанной (S_{сп}) и индуцированной хемилюминесценции (S_{инл}), а также индекс активации, который рассчитывали как отношение S_{инд}/S_{сп}, который характеризует усихемилюминесценции. Достоверность ление различий между выборками оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента в случае распределения, близкого к нормальному, и с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни для распределения, отличающегося от нормального. Вероятность ошибки *р* < 0.05 считали достаточной для вывода о статистической значимости различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод регистрации хромосомных повреждений в эритроцитах костного мозга при облучении низкими дозами протонов является высокочувствительным и позволяет судить о чувствительности облученных стволовых клеток костного мозга, поскольку через 28 ч в результате эритропоэза их повреждения анализируются в дифференцированных клетках на этапе выхода в кровяное русло.

При определении уровня цитогенетического повреждения в ПХЭ костного мозга мышей было обнаружено (рис. 2), что уровни ПХЭ с микроядрами при всех дозах ПИ в пике Брэгга были близки к таковым при действии соответствующих доз РИ, а при облучении до пика Брэгга уровень цитогенетических повреждений был значительно ниже. Дозовые зависимости % ПХЭ с микроядрами в клетках костного мозга мышей при облучении как РИ, так и протонами, описывались линейной аппроксимацией, и с помощью регрессионного и корреляционного анализов получены следующие уравнения «дозаэффект»: для протонов до пика Брэгга – y = 0.28 ++ 2.75x; в пике Брэгга - y = 0.88 + 3.82x; для РИ y = 0.67 + 3.63x, где y - % ПХЭ с микроядрами, *х* – доза облучения, Гр. Ранее нами на культурах клеток млекопитающих, растениях и мышах при исследовании низких доз гамма-излучения был показан нелинейный сложный характер дозовых зависимостей, которые характеризовались участками радиационно-индуцированной гиперчувствительности и радиорезистентности [21, 22]. При действии низких доз протонов при облучении культивируемых клеток



Рис. 2. Дозовые зависимости выхода полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге мышей при облучении до пика и в пике Брэгга пучком протонов и рентгеновским излучением.

рядом исследователей тоже показаны нелинейные закономерности [23], но при используемых условиях облучения мышей мы этого не наблюдали. Дискуссия по поводу различий в механизмах индукции и формирования повреждений хромосом в диапазоне малых доз протонов относительно эффектов фотонных излучений продолжается [24].

Коэффициент ОБЭ для протонов в пике Брэгга с ЛПЭ ~2.5 кэВ/мкм, вычисленный по равноэффективным дозам, равнялся 1.15. Данная величина близка к значениям, определенным в этом же диапазоне доз для протонных пучков других энергий и конфигураций, полученных по тесту выживаемости и клоногенной способности на культурах нормальных и опухолевых клеток, а также по уровню различных повреждений ДНК [25, 26]. В работе [27] при облучении в стационарной стадии клеток китайского хомячка V-79 и фибросаркомы B14-150 в диапазоне доз 2-10 Гр по тесту клоногенной активности ОБЭ сканирующего пучка протонов на установке «Прометеус» с одного или трех направлений составляла 1.0 и не зависела от способа доставки дозы в мишень. Полученное нами значение ОБЭ отражает раннюю радиочувствительность стволовых клеток костного мозга, одного из важнейших органов кроветворной и иммунной систем, обладающим огромным репопуляционным потенциалом [8]. В большинстве цитируемых работ ОБЭ протонов вычислялось относительно гамма-излучения с низкими значениями ЛПЭ = 0.35-0.70 кэВ/мкм, а в нашей работе используется жесткое РИ с $Л\Pi \Theta = 2 \ \kappa \Theta B / M \kappa M$, у которого собственное значение ОБЭ по отношению к у-излучению ⁶⁰Со равно 1.1–1.2 [28]. Учитывая это обстоятельство, ОБЭ исследуемого нами ПИ в пике Брэгга может составлять около 1.3, что свидетельствует о высоком каче-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

стве режима доставки дозы в мишень, и за счет высокоточного локализованного облучения, по-видимому, позволит значительно повысить противоопухолевую эффективность пучка.

Величина ОБЭ протонов по критерию микроядер в ПХЭ при облучении до пика Брэгга с ЛПЭ ~0.7 кэВ/мкм, вычисленная также по равноэффективным дозам, равнялась 0.63, что соответствует большинству результатов, полученных при облучении in vitro клеточных культур при других дозах схожих по физическим характеристикам пучков протонов [29]. Облучение объектов *in vivo* до пика Брэгга в исследуемых нами дозах моделирует радиационные условия, которые возможны при активности галактического космического излучения [6], а также нагрузку на здоровые ткани, расположенные перед глубоко локализованными опухолями. В ряде случаев в зависимости от типа, размера, глубины и локализации опухолей в клиниках при ПТ с использованием как технологии сканирования пучком, так и при облучении пассивным пучком с помощью коллиматоров, используют облучение до пика Брэгга. Определенное нами ОБЭ может учитываться при корректировке расчета клинической дозы облучения. Ранее нами по критерию 30-суточной выживаемости при облучении мышей этим же пучком протонов в сублетальных и летальных дозах в диапазоне 4.5-15 Гр до и в пике Брэгга были определены более низкие значения ОБЭ, равные 0.83 и 0.94, характеризующие отсроченную реализацию ответов всех чувствительных к облучению органов, обладающих быстро делящимися клетками, прежде всего, костного мозга и желудочно-кишечного тракта [30]. Полученные в ходе настоящей работы результаты демонстрируют еще раз зависимость величины ОБЭ от уровня доз, времени и критериев регистрации поврежде-



Рис. 3. Индексы массы тимуса мышей после облучения пучком протонов до- и в пике Брэгга в диапазоне доз 0.1-1.5 Гр: * – статистически значимые отличия относительно необлученного контроля (p < 0.05), & – статистически значимые отличия при облучении протонами в пике относительно облучения до пика Брэгга и рентгеновским излучением (p < 0.05).

ний. Ранее на других ускорителях с использованием пассивно-рассеянных пучков протонов разных энергий на животных были получены противоречивые данные о связи ЛПЭ с ОБЭ в отношении отдаленных последствий облучения [31]. В экспериментах на культурах и тканях млекопитающих при оценке краткосрочных эффектов протонов при аналогичных дозах было определено, что в низком диапазоне ЛПЭ 0.3-10 кэВ/мкм величина ОБЭ протонов ниже или близка к единице, и при двух-трехкратном увеличении ЛПЭ не наблюдается роста ОБЭ [32], в отличие от ионов углерода и нейтронов, которые применяются в радиотерапии, и ЛПЭ которых значительно выше. Таким образом, в настояшем исследовании ЛПЭ протонов до пика Брэгга по сравнению с облучением в пике в 3.5 раза ниже, а ОБЭ по критерию повреждений хромосом меньше в 2 раза, что указывает на зависимость ОБЭ от ЛПЭ в этом режиме облучения и при регистрации через 28 ч после облучения. По критерию выживаемости мышей ОБЭ не зависело от ЛПЭ частиц, что указывает на то, что при действии низких и средних доз наблюдаются другие закономерности.

На рис. 3 представлены результаты определения индексов массы тимусов мышей, облученных до пика и в пике Брэгга в исследуемом диапазоне доз. Обнаружено, что при действии протонов в пике Брэгга уменьшение индекса массы тимуса начиналось при дозе 0.5 Гр в отличие от вариантов, облученных протонами до пика Брэгга или РИ, в которых снижение массы органа регистрировалось только при дозе 1.5 Гр. Это указывает на большее повреждающее действие протонов на тимусы по сравнению с костным мозгом, при том, что значения ЛПЭ протонов в пике Брэгга ненамного выше, чем у РИ. При сравнении эффектов РИ и протонов до пика Брэгга оказалось, что протоны со значительно низкой ЛПЭ (0.7 кэВ/мкм) вызывали такое же снижение индекса массы тимуса, что и РИ (ЛПЭ = 2 кэВ/мкм), что свидетельствует о специфическом действии протонов на гетерогенную клеточную популяцию тимуса. Снижение веса тимуса является чувствительным и показательным методом при определении ОБЭ излучений, в том числе и протонов, что было показано в работе [33].

Как видно из результатов, представленных на рис. 4, изменения в индексе массы селезенки наблюдаются уже при облучении протонами в дозе 0.1 Гр как до пика, так и в пике Брэгга, в то время как при действии РИ снижение индекса органа наблюдается, начиная с дозы 0.5 Гр, то есть также наблюдалась более высокая биологическая эффективность протонов при действии на эти органы, причем клетки селезенки были более радиочувствительными по сравнению с тимусом. Выявленные различия реакций органов могут являться результатом перераспределения клеток, обладающих разной радиочувствительностью и пролиферативно-дифференцировочным потенциалом между тканями. В работе [34] было показано, что при облучении мышей ионами железа с ЛПЭ = 148.2 кэВ/мкм в дозах 0.1, 0.5 и 2 Гр на 4-есутки наблюдалось зависимое от дозы снижение массы тимуса и селезенки. При этом выраженная атрофия тимуса наблюдалась уже при дозе 0.5 Гр, а селезенки – только при дозе 2 Гр. Кроме этого, при дозе 2 Гр в селезенке снижалось число лимфоцитов и гранулоцитов, но не моноцит-макрофагов. В некоторых работах показана разная зависимость атрофии этих лимфоидных органов от дозы при



Рис. 4. Индексы массы селезенки мышей после облучения пучком протонов до и в пике Брэгга в диапазоне доз 0.1-1.5 Гр: * – статистически значимые отличия относительно необлученного контроля (p < 0.05), & – статистически значимые отличия при облучении протонами в пике относительно облучения до пика Брэгга и рентгеновским излучением (p < 0.05).

действии гамма-лучей и протонов [35]. Вероятно, существует несколько факторов, влияющих на радиационно-индуцированное снижение массы лимфоидных органов, включая клеточную гибель, изменения в транспортировке лимфоцитов и обезвоживание тканей. В работе [16] при гистологическом и иммунохимическом исследовании тимуса. селезенки и костного мозга при тотальном облучении мышей равноэквивалентными дозами гаммаизлучения и протонов показано, что эти виды излучения запускают клеточную гибель в органоспецифической манере; протоны индуцируют больше повреждений ДНК, а экспрессия генов в селезенке имеет уникальные паттерны в отличие от других органов. Индукция апоптоза также сильно варьировала в зависимости от дозы и ткани, а клеточная гибель в костном мозге была значительно ниже у облученных протонами животных.

Известно, что действие радиации на клетки индуцирует острый оксидативный стресс, который характеризуется повышенным уровнем АФК, что является основной причиной повреждения критических структур и молекул в клетке. Эти уровни регистрируются сразу или в течение первых часов после облучения в средних нелетальных дозах. При исследовании спонтанной продукции АФК клетками крови мышей в отдаленные сроки (через 28 ч) после облучения протонами, когда регистрировались цитогенетические повреждения в костном мозге, при всех дозах не было обнаружено различий в уровнях индукции АФК в зависимости от ЛПЭ протонов, так же и мышей, облученных этими же дозами РИ. Уровни АФК при облучении были близки с таковым у необлученного контроля (рис. 5). Однако при расчете индекса активации, который характеризует усиление хе-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

милюминесценции, у мышей, облученных протонами в пике Брэгга в дозе 0.1 Гр, этот показатель увеличивался в 2.5 раза, в дозе 0.5 Гр – в 4.3 раза, а при 1 Гр – в 3.2 раза относительно необлученного контроля и мышей после облучения РИ (рис. 6). При облучении протонами до пика Брэгга или РИ такое усиление хемилюминесценции не наблюдалось.

Выявленные особенности указывают на стимуляцию резервных возможностей нейтрофилов к генерации АФК при действии низких доз протонов в пике Брэгга, что свидетельствует о повышенном напряжении антиоксидантной системы. Реакция клеток крови на облучение протонами в этом диапазоне доз по сравнению с фотонами свидетельствует о резком различии в работе антиоксидантной системы, что еще раз свидетельствует о специфике действия частиц по сравнению с РИ в зависимости от дозы. В работе [36] после облучения в пике Брэгга протонами с энергией 250 МэВ в более высоких дозах в 1–10 Гр на культуре предшественников нервных клеток показано, что уровень АФК увеличивается в 3 раза быстрее на 1 Гр дозы к 6 и 24 ч после облучения протонами по сравнению с РИ. Во многих работах продемонстрировано, что в ранние сроки после облучения РИ и протонами при облучении высокими дозами на фоне повышения уровней АФК регистрируется увеличение скорости апоптоза, количества двунитевых разрывов ДНК и экспрессии генов, определяющих радиочувствительность [29, 37]. Полученные нами данные указывают на специфическое участие антиоксидантной системы в формировании таких отдаленных биологических эффектов, как повреждения хромосом, при облучении мышей протонами в пике Брэг-



Рис. 5. Уровень спонтанной продукции АФК клетками крови мышей через 28 ч после облучения протонами до и в пике Брэгга и рентгеновским излучением в диапазоне доз 0.1–1.5 Гр.

га, начиная с очень малых доз облучения в отличие от РИ. Другой характер зависимости индекса активации от величины дозы наблюдался при облучении мышей ПИ до пика Брэгга: уровни этого показателя не отличались от необлученного контроля и вариантов, облученных всеми дозами РИ. Можно предположить, что динамика индукции АФК клетками крови при действии ПИ имеет сложный характер и затрагивает разные пути компенсации радикалов и активации внеклеточных и внутриклеточных АФК, которые зависят как от дозы, так и ЛПЭ протонов.

Таким образом, при тотальном облучении мышей с использованием нового способа доставки дозы с помощью сканирования тонким пучком протонов с разными значениями ЛПЭ в диапазоне низких и средних доз были определены величины ОБЭ относительно РИ по критерию цитогенетических нарушений в эритроцитах костного мозга, равные 0.63 и 1.15. Выявлены органоспецифические различия в закономерностях патофизиологического действия на тимус и селезенку животных и состояния антиоксидантной системы клеток крови в зависимости от величины дозы и ЛПЭ протонов. Полученные результаты позволяют оценить дозовую нагрузку на критические органы и ткани системы кроветворения при облучении животных малыми и терапевтическими дозами высокоэнергетических протонов и оптимизировать с учетом рассчитанных значений ОБЭ планируемую дозу облучения при ПТ, скорректировать вклад ПИ в радиационную нагрузку



Рис. 6. Индекс активации хемилюминесценции в цельной крови мышей при облучении протонами до- и в пике Брэгга и рентгеновским излучением: * - статистически значимые отличия относительно необлученного контроля, & - статистически значимые отличия после облучения протонами в пике Брэгга относительно облучения до пика Брэгга и рентгеновским излучением (p < 0.05).

при космических полетах, создать радиобиологическое обоснование для расчета нагрузок для персонала центров ПТ и сотрудников предприятий, работающих со смешанными полями излучений.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках фундаментальных научных исследований по теме Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00224-24-03 при частичной финансовой поддержке за счет договора НИР № 09/22 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

План экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биобезопасности и биоэтике (протокол № 11 от 08.02.2023 г.), все процедуры проводились в соответствии с нормативно-правовыми актами, касающимися экспериментов на животных и гуманного обращения с животными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wu Y. Y. and Fan K. H. Proton therapy for prostate cancer: current state and future perspectives. *Br. J. Radiol.*, **95** (1131), 20210670 (2022). DOI: 10.1259/bir.20210670
- Mutter R. W., Choi J. I., Jimenez R. B., Kirova Y. M., Fagundes M., Haffty B. G., Amos R. A., Bradley J. A., Chen P. Y., Ding X., Carr A. M., Taylor L. M., Pankuch M., Vega R. B. M., Ho A. Y., Nyström P. W., McGee L. A., Urbanic J. J., Cahlon O., Maduro J. H., and MacDonald S. M. Proton therapy for breast cancer: a consensus statement from the particle therapy cooperative group breast cancer subcommittee. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **111** (2), 337–359 (2021). DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.05.110
- Gordon K. B., Smyk D. I., and Gulidov I. A. Proton therapy in head and neck cancer treatment: state of the problem and development prospects (review). *Sovrem. Tekhnologii Med.*, **13** (4), 70–80 (2021). DOI: 10.17691/stm2021.13.4.08
- Schippers J. M. and Lomax A. J. Emerging technologies in proton therapy. *Acta Oncol.*, **50** (6), 838–850 (2011). DOI: 10.3109/0284186X.2011.582513
- Mohan R. and Grosshans D. Proton therapy present and future. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **109**, 26–44 (2017). DOI: 10.1016/j.addr.2016.11.006
- Rithidech K. N., Honikel L. M., Reungpatthanaphong P., Tungjai M., Golightly M., and Whorton E. B. Effects of 100MeV protons delivered at 0.5 or 1cGy/min on the *in vivo* induction of early and delayed chromo-

somal damage. *Mutat. Res.*, **756** (1–2), 127–140 (2013). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.06.001

- Ушаков И. Б. Космос. Радиация. Человек (Радиационный барьер в межпланетных полетах) (Научная книга, М., 2021).
- Chang J., Feng W., Wang Y., Luo Y., Allen A. R., Koturbash I., Turner J., Stewart B., Raber J., Hauer-Jensen M., Zhou D., and Shao L. Whole-body proton irradiation causes long-term damage to hematopoietic stem cells in mice. *Radiation research*, **183** (2), 240–248 (2015). DOI: 10.1667/RR13887.1
- 9. Skelly A., Brodt E., and Schwartz N. *Proton beam therapy* – *re-review. Final evidence report* (WA – Health Technology Assessment, 2019), p. 301.
- Sørensen B. S., Pawelke J., Bauer J., Burnet N. G., Dasu A., Høyer M., Karger C. P., Krause M., Schwarz M., Underwood T. S. A., Wagenaar D., Whitfield G. A., and Lühr A. Does the uncertainty in relative biological effectiveness affect patient treatment in proton therapy? *Radiotherapy and Oncology*, **163**, 177–184 (2021). DOI: 10.1016/j.radonc.2021.08.016
- Paganetti H., Blakely E., Carabe-Fernandez A., Carlson D. J., Das I. J., Dong L., Grosshans D., Held K. D., Mohan R., Moiseenko V., Niemierko A., Stewart R. D., and Willers H. Report of the AAPM TG-256 on the relative biological effectiveness of proton beams in radiation therapy. *Med. Physics*, 46 (3), 53–78 (2019). DOI: 10.1002/mp.13390
- Lühr A., von Neubeck C., Krause M., and Troost E. G. C. Relative biological effectiveness in proton beam therapy – Current knowledge and future challenges. *Clin. Translat. Rad. Oncol.*, 9, 35–41 (2018). DOI: 10.1016/j.ctro.2018.01.006
- Bao C., Sun Y., Dong Y., Le Z., Lin L. C., Kong L., and Lu J. J. The relative biological effectiveness of proton and carbon ion beams in photon-sensitive and resistant nasopharyngeal cancer cells. *Translat. Cancer Res.*, 7 (1), 170–179 (2018). DOI:10.21037/tcr.2018.01.25
- Deycmar S., Faccin E., Kazimova T., Knobel P. A., Telarovic I., Tschanz F., Waller V., Winkler R., Yong C., Zingariello D., and Pruschy M. The relative biological effectiveness of proton irradiation in dependence of DNA damage repair. *Br. J. Radiol.*, **93** (1107), 20190494 (2020). DOI:10.1259/bjr.20190494
- Tang F. R. and Loke W. K. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, **91** (1), 13–27 (2015). DOI:10.3109/09553002.2014.937510
- Finnberg N., Wambi C., Ware J. H., Kennedy A. R., and El-Deiry W. S. Gamma-radiation triggers a unique gene expression profile associated with cell death compared to proton radiation in mice *in vivo. Cancer Biol. Therapy*, 7 (12), 2023–2033 (2008). DOI:10.4161/cbt.7.12.7417
- 17. Smith J. A., van den Broek F. A., Martorell J. C., Hackbarth H., Ruksenas O., and Zeller W. FELASA working

group on ethical evaluation of animal experiments, principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of a FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Lab. Animals*, **41** (2), 143–160 (2007).

- 18. Директива 2010/63/еи Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях (Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, СПб, 2012).
- Zaichkina S. I., Kondakova N. V., Rozanova O. M., Aptikaeva G. F., Akhmadieva A. Kh., Sakharova V. V., Ripa N. V., Kolkhir V. K., Sokol'skaya T. A., Rebrov L. B., and Bykov V. A. Radioprotector properties of biologically active substances in the range of medium and small radiation doses studied by means of the cytogenetic micronuclear test. *Pharmaceut. Chem. J.*, **38**, 405–410 (2004).

DOI: 10.1023/B: PHAC.0000048900.86428.70

- 20. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31** (1), 9–15 (1975). DOI: 10.1016/0165-1161(75)90058-8
- Zaichkina S. I., Klokov D. Iu., Rozanova O. M., Aptikaeva G. F., and Akhmadieva A. Kh. Deĭstvie malykh doz gamma-radiatsii na tsitogeneticheskoe povrezhdenie v polikhromatofil'nykh éritrotsitakh kostnogo mozga mysheĭ *in vivo* [Action of low doses of gamma-radiation on cytogenetic damage in polychromatophilic erythrocytes of bone marrow in mice *in vivo*]. *Genetika*, **34** (7), 1013–1016 (1998).
- Osipov A. N., Klokov D. Y., Elakov A. L., Rozanova O. M., Zaichkina S. I., Aptikaeva G. F., and Akhmadieva A. Kh. Comparison *in vivo* study of genotoxic action of high-versus very low dose-rate gamma-irradiation. *Nonlinearity in biology, toxicology, medicine*, 2 (3), 223–232 (2004). DOI:10.1080/15401420490507521
- Cherubini R., De Nadal V., and Gerardi S. Hyper-radiosensitivity and induced radioresistance and bystander effects in rodent and human cells as a function of radiation quality. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 166 (1–4), 137–141 (2015). DOI:10.1093/rpd/ncv294
- Heuskin A. C., Michiels C., and Lucas S. Low dose hypersensitivity following in vitro cell irradiation with charged particles: Is the mechanism the same as with X-ray radiation? *Int. J. Radiat. Biol.*, **90** (1), 81–89 (2014). DOI:10.3109/09553002.2013.835503
- 25. Tommansino F. and Durante M. Proton radiobiology. *Cancers*, 7, 353–381 (2015).
- Calugaru V., Nauraye C., Noël G., Giocanti N., Favaudon V., and Mégnin-Chanet F. Radiobiological characterization of two therapeutic proton beams with different initial energy spectra used at the Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **81** (4), 1136–1143 (2011). DOI:10.1016/j.ijrobp.2010.09.003
- Koryakina E., Troshina M., Potetnya V., Koryakin S., Baykuzina R., and Golovanova O. Biological efficiency of a scanning proton beam under different irradiation modes *in vitro*. In: *Abstr. Book of Eighth Int. Conf. on Radiation in Various Fields of Research* (Virtual conference, 2020), p. 125.

- Spadinger I, and Palcic B. The relative biological effectiveness of ⁶⁰Co gamma-rays, 55 kVp X-rays, 250 kVp X-rays, and 11 MeV electrons at low doses. *Int. J. Radiat. Biol.*, **61** (3), 345–353 (1992). DOI:10.1080/09553009214551031
- 29. Иванов А. А., Бычкова Т. М., Никитенко О. В. и Ушаков И. Б. Радиобиологические эффекты протонов. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*, **64** (3), 19–31 (2019). DOI: 10.12737/article_5cf2306a3b26d6.36140627
- Balakin V. E., Rozanova O. M., Smirnova E. N., Belyakova T. A., Shemyakov A. E., and Strelnikova N. S. Assessment of the relative biological efficiency of pencil beam scanning of protons in mice *in vivo*. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **499** (1), 215–219 (2021). DOI: 10.1134/S1607672921040037
- Биофизические основы действия космической радиации и излучений ускорителей, под ред. Жуковской Н. Е. и Черножуковой Е. М. (Проблемы космической биологии, т. 60) (Наука, Л., 1989).
- 32. Бекетов Е. Е., Исаева Е. В., Наседкина Н. В., Соловьев А. Н., Голованова О. Ю., Ульяненко Л. Н., Малахов Е. П., Кисель А. А., Ульяненко С. Е., Шегай П. В., Иванов С. А. и Каприн А. Д. Равномерность биологической дозы в распределенном пике Брэгга терапевтической установки со сканирующим пучком протонов. Вопросы онкологии, 65 (4), 532–536 (2019).
- 33. Feola J. M., Hwang H. N., Beach J. L., and Maruyam Y. Relative biological effectiveness of 252Cf radiation as estimated by thymus weight loss. *J. Radiat. Res.*, **26** (1), 140–149 (1985). DOI: 10.1269/jrr.26.140
- 34. Gridley D. S., Pecaut M. J., and Nelson G. A. Totalbody irradiation with high-LET particles: acute and chronic effects on the immune system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **282** (3), 677–688 (2002). DOI: 10.1152/ajpregu.00435.2001
- 35. Шалгимбаева Г. С., Жетписбаева Х. С., Адрисова К. С., Жетписбаев Б. А. и Куанышева А. Г. Алимбаева А. А. Отдаленные эффекты малой дозы гамма-излучения на лимфоидные органы иммуногенеза. *Наука и здравоохранение*, **4**, 46-48 (2014).
- 36. Giedzinski E., Rola R., Fike J. R., and Limoli C. L. Efficient production of reactive oxygen species in neural precursor cells afterL exposure to 250 MeV protons. *Radiat. Res.*, **164** (4, Pt 2), 540–544 (2005). DOI: 10.1667/rr3369.1
- Narang H., Kumar A., Bhat N., Pandey B. N., and Ghosh A. Effect of proton and gamma irradiation on human lung carcinoma cells: Gene expression, cell cycle, cell death, epithelial-mesenchymal transition and cancer-stem cell trait as biological end points. *Mutation Res.*, **780**, 35–46 (2015). DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2015.07.006

904

Features of the Effects of Exposure to 90–170 MeV Proton Radiation on the Blood-Forming Organs in Mice under Total Irradiation with Proton Pencil Scanning Beam Depending on the Linear Energy Transfer of Particles

O.M. Rozanova*, T.A. Belyakova*, E.N. Smirnova*, S.S. Sorokina*, A.R. Dyukina*, A.E. Shemyakov^{*, **}, and N.S. Strelnikova**

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

**Branch "Physical-Technical Center" of P.N. Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Mira 1N, Protvino, Moscow Region, 142281 Russia

The effects on induction of cytogenetic damage to mouse bone marrow, generation of reactive oxygen species by whole blood cells, and on the thymus and spleen from exposure of mice to total-body proton radiation before and at the Bragg peak with a dose deposition of 0.1-1.5 Gy were investigated depending on the linear rate of energy loss. It was found that the level of polychromatophilic erythrocytes with micronuclei at all doses of proton radiation at the Bragg peak with the linear energy transfer 2.5 keV/µm was close to that of polychromatophilic erythrocytes with micronuclei for the corresponding doses of X-ray radiation with the linear rate of energy loss 2.0 keV/µm, and the level of cytogenetic damage induced by exposure to proton radiation up to the Bragg peak with the linear energy transfer 0.7 keV/µm was significantly lower. The coefficient of the relative biological effectiveness of proton irradiation calculated from the linear energy transfer by estimating micronuclei frequency at and before the Bragg peak was 1.15 and 0.63, respectively. Organ-specific differences in the patterns of pathophysiological effects on the thymus, spleen of mice and the state of the antioxidant system of blood cells depending on the linear energy transfer of protons were revealed by varying radiation doses.

Keywords: protons, linear energy transfer, micronuclei, thymus, spleen, ROS, mice
— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 615.322; 616.5-001.37; 612.791

ПРОНИКНОВЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ ЧЕРЕЗ КОЖУ, ПОВРЕЖДЕННУЮ УКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ

© 2024 г. В.С. Шубина^{*, #}, Ю.В. Шаталин^{*}

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

[#]E-mail: shubinavictoria@yandex.ru Поступила в редакцию 12.03.2024 г. После доработки 12.03.2024 г. Принята к публикации 03.07.2024 г.

Ранее мы показали, что производные таксифолина – пентаглутарат таксифолина и конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой – улучшают механические свойства материалов, полученных на основе коллагена. В процессе деградации таких материалов в окружающую среду высвобождаются биологически-активные полифенолы. Для оценки проникновения полифенолов через поврежденную кожу было использовано два подхода. В случае пентаглутарата таксифолина и таксифолина (использовали для сравнения) в структуру полифенола была введена флуоресцентная метка. В случае конъюгата получали флуоресцентный аналог. Было показано, что нанесение полифенольных соединений на поврежденный участок кожи приводит к формированию на его поверхности флуоресцирующего слоя. Было обнаружено, что флуоресцентные производные таксифолина и пентаглутарата таксифолина накапливаются в волосяных фолликулах. В случае таксифолина флуоресценция наблюдалась в более глубоких слоях дермы, чем в случае пентаглутарата таксифолина, свидетельствуя о лучшем проникновении таксифолина. Флуоресцентный аналог накапливался в придатках кожи в меньшей степени, чем другие соединения. Таким образом, полученные данные говорят о накоплении полифенолов в волосяных фолликулах, из которых они могут постепенно высвобождаться в окружающую ткань. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что биологически активные полифенолы способны оказывать пролонгированное действие при местном применении. Это может иметь важное значение при лечении ожогов, в частности, при лечении ожогов II степени, при которых неповрежденными остаются многие деривативы кожи.

Ключевые слова: полифенолы, проникновение через кожу, флуоресценция, волосяные фолликулы.

DOI: 10.31857/S0006302924040217, EDN: NFBMVJ

По данным Всемирной организации здравоохранения, ожоги занимают четвертое место по частоте среди прочих травм [1]. Согласно данным Росстата, в России в 2022 г. зарегистрировано до 203900 случаев химических и термических ожогов [2]. Около трети пациентов с ожоговыми травмами направляется на лечение в специализированные стационарные отделения, большая часть пациентов проходит лечение в амбулаторных условиях [3]. Материалы на основе биополимеров животного происхождения (фибрин, фиброин, гиалуроновая кислота, спидроин и др.) получили широкое распространение для лечения ран. Среди таких биополимеров наибольшее практическое применение в медицине нашел коллаген [3–6]. Коллаген является основным структурным белком соединительной ткани. Он продуцирует-

ся фибробластами и вовлечен во все фазы регенерации ткани. Коллаген биосовместим с тканями организма реципиента, биоразлагаем, нетоксичен, обладает низкой иммуногенностью [6, 7]. На его основе могут быть получены различные структуры (гели, губки, пленки). Тем не менее, проводятся постоянные исследования, направленные на получение новых материалов на основе данного биополимера. Многие из них нацелены на преодоление высокой скорости биодеграматериалов, полученных на основе дации коллагена, ведется постоянный поиск агентов, позволяющих стабилизировать структуру коллагеновых материалов [8–10]. Кроме того, коллагеновая матрица рассматривается как средство локальной доставки биологически активных веществ [11-13]. В частности, интерес представляет включение в состав коллагеновой матрицы антикоагулянтов, гликозаминогликанов, антисептиков, антибиотиков, стимуляторов регенерации

Сокращения: DfTf – конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой, TfG5 – пентаглутарат таксифолина.

и пр. [6, 14–20]. Для улучшения механических свойств материалов на основе коллагена полипептидные цепи данного биополимера сшивают. Существует несколько способов сшивки коллагена: физический, химический и ферментативный. Достоинства и недостатки данных способов подробно рассмотрены в следующих работах [8, 10, 21]. Можно отметить следующее. Преимуществом физических и ферментативных способов сшивки является получение нетоксичных материалов с повышенной устойчивостью к деградации. Однако, по сравнению с химическим способом, сшивка биополимеров с помощью данных методов является наименее эффективной. Химический способ позволяет получать материалы с более высокой степенью сшивки и равномерным распределением сшивок внутри материала [8]. Важно отметить, что свойства получаемых материалов зависят от используемого кросс-сшиваюшего агента [8, 22]. В некоторых случаях природа кросс-сшивающего агента также определяет и негативные свойства материалов. В частности, введение кросс-сшивающего агента в структуру материала может приводить к формированию токсичных продуктов при деградации материада (в организме). Примером такого кросс-сшивающего агента является глутаральдегид, один из первых агентов, используемых для сшивки коллагеновых цепей [15, 23–25]. Помимо этого, кросссшивающий агент может приводить к формированию структуры материала, которая является неблагоприятной для прикрепления, распластывания и миграции клеток. В качестве примера можно привести 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид/N-гидроксисукцинимид (EDC/ NHS). Данный агент сшивает полипептидные цепи коллагена непосредственно между собой. Сшивка формируется в результате реакции конденсации между карбоксильными группами глутаминовой/аспарагиновой кислот и амино-группами лизина (полипептидных цепей). Использование ланного кросс-сшивающего агента позволяет получать биосовместимые и нетоксичные материалы с улучшенными механическими свойствами. Однако формирование сшивки за счет карбоксильных групп глутаминовой кислоты полипептида приводит к нарушению взаимодействие клеток с поверхностью материала, снижению их прикрепления и миграции [26]. Таким образом, на сегодняшний день продолжаются исследования, направленные на поиск новых кросс-сшивающих агентов, позволяющих получать материалы с новыми уникальными свойствами. Особый интерес представляют природные нетоксичные кросс-сшивающие агенты [8], в частности, полифенолы [27-31]. Данные, представленные в литературе, свидетельствуют о том, что полифенолы стабилизируют структуру коллагена и улучшают механические свойства материа-

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

лов, полученных на основе данного биополимера [27, 32, 33]. В основе такой стабилизации могут лежать как межмолекулярные взаимодействия [29, 34], так и ковалентные связи полипептид-полифенол [24, 29, 35–38]. В качестве перспективных полифенольных кросс-сшивающих агентов рассматривают процианидины [35, 39], теафлавины [40], дубильную кислоту [9, 30, 41] и др. [31]. Следует также отметить, что полифенолы сами по себе могут формировать различные материалы/структуры и представляют огромный интерес в качестве основы для создания новых биомедицинских материалов [29, 41, 42]. Кроме того, существуют данные, согласно которым флавоноиды [43-45] и их производные [46, 47], а также материалы, включающие в свой состав полифенольные соединения [18, 19, 48], способствуют лучшему заживлению ран, что также является весомым аргументом в пользу использования данных соединений для создания новых материалов для регенеративной медицины.

Ранее нами было показано, что включение в состав коллагеновых материалов производных таксифолина, конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой (DfTf) и пентаглутарата таксифолина (TfG5) (рис. 1) приводит к уменьшению скорости деградации материалов по сравнению с нативным коллагеном [49-51]. Полученные материалы являются нетоксичными [50]. Фибробласты NIH/3T3 прикрепляются к поверхности полученных материалов и распластываются на поверхности материала, содержащего TfG5. Была показана миграция клеток через полученные материалы. Интересно, что увеличение доли DfTf в материале приводит к ингибированию миграции клеток через материал, тогда как увеличение доли TfG5 в материале, напротив, приводит к значительному увеличению миграции клеток через него [50]. В целом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что материалы, полученные на основе коллагена и производных таксифолина, могут представлять интерес для регенеративной медицины, в том числе для разработки материалов, обеспечивающих направленную регенерашию тканей.

Важным также является то, что в процессе деградации материалов в окружающую среду высвобождается биологически-активный полифенол [49–55]. Ранее нами было показано, что производные таксифолина, в частности коньюгаты таксифолина с карбонильными соединениями, усиливают регенерационные процессы после химического ожога кожи, индуцированного уксусной кислотой [56, 57]. В связи с вышесказанным представлялось интересным оценить проникновение полифенолов в области повреждения. Так как для стабилизации коллагеновых материалов использовали биологически-активные DfTf и TfG5, целью настоящей работы являлась оценка



Рис. 1. Структуры полифенольных соединений: Tf – таксифолин, DfTf – конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой, TfG5 – пентаглутарат таксифолина.

проникновения данных полифенолов через кожу, поврежденную уксусной кислотой. Для сравнения также оценивали проникновение исходного флавоноида, таксифолина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение флуоресцентных аналогов полифенолов. Получение и характеристика конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой и пентаглутарата таксифолина подробно описаны в работах [52, 53, 54] и [49, 51] соответственно. Для оценки проникновения полифенолов в области повреждения было использовано два подхода. Первый подход основан на введении в структуру соединений флуоресцентной метки (для таксифолина и TfG5). Второй — на получении флуоресцентного аналога полифенола (для DfTf).

Введение флуоресцентной метки в структуру таксифолина. Для введения флуорофора в структуру полифенола использовали N-метилизатоевый ангидрид. Кратко, в 5 мл безводного тетрагидрофурана растворяли 304 мг (1 ммоль) таксифолина, 195 мг (1.1 ммоль) N-метилизатоевого ангидрида и 2 мг (0.05 ммоль) NaOH. Смесь перемешивали при нагревании в течение 5 ч. После охлаждения смесь вливали в 100 мл холодной дистилированной воды. Далее продукт N-метилантранилат таксифолина (Rf = 0.741, бензол : ацетон : этанол – 8 : 2 : 1) отфильтровывали и сушили под вакуумом. Флуоресцентные свойства продукта реакции: $\lambda_{ex} = 356$ нм; $\lambda_{em} = 438$ нм.

Введение флуоресцентной метки в структуру *TfG5*. TfG5 подвергали частичному гидролизу до тетраглутарата таксифолина [58] после чего получали смешанный глутарат/антранилат таксифолина. Кратко, 200 мг (0.23 ммоль) пентаглутарата таксифолина растворяли в 10 мл водного раствора серной кислоты (10%) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Далее раствор нейтрализовали карбонатом натрия и экстрагировали продукт бензолом. Экстракт упаривали под вакуумом, осушали над Р₂О₅ и перерастворяли в 5 мл ТГФ. Затем к смеси добавляли 44.5 мг (1.1 ммоль) N-метилизатоевого ангидрида и 2 мг (0.05 ммоль) NaOH. Смесь перемешивали при нагревании в течение 5 ч. После охлаждения смесь вливали в 100 мл холодной дистилированной воды. Далее смешанный N-метилантранилат/глутарат таксифолина (Rf = 0.584, бензол : ацетон : этанол – 8 : 2 : 1) отфильтровывали и промывали холодным водно-спиртовым (80 : 20) раствором. Флуоресцентные свойства продукта реакции: $\lambda_{ex} = 362 \text{ HM}; \lambda_{em} = 435 \text{ HM}.$



Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии поперечных срезов поврежденных участков кожи крыс в контроле и после нанесения флуоресцентных производных полифенолов: (а, б) — контроль, обработка водно-спиртовым раствором; (в, г) — обработка флуоресцентным производным таксифолина; (д, е, и, к) — обработка флуоресцентным производным таксифолина; (д, е, и, к) — обработка флуоресцентным производным DfTf; (ж, з, л, м) — обработка флуоресцентным производным производным TfG5; (а, в, д, ж, и, л, м) — флуоресцентные микрофотографии срезов; (б, г, е, з, к) — микрофотографии срезов, окрашенных азуром и эозином. Маркером обозначена область повреждения с отсутствующим эпидермисом. Масштабный отрезок — 100 мкм.

Получение флуоресцентного аналога DfTf. Флуоресцентный аналог DfTf был получен в результате дегидратации полифенола с последующей циклизацией [59]. Кратко, 100 мг DfTf растворяли в 1 мл охлажденной концентрированной серной кислоты. Смесь перемешивали при нагревании (120°С) в течение одного часа. После охлаждения смесь вливали в 50 мл холодной дистилированной воды. Выпавший продукт (Rf = 0.750, бензол : ацетон : : этанол – 8 : 2 : 1) промывали холодным диэтиловым эфиром и сушили под вакуумом. Флуоресцентные свойства продукта реакции: $\lambda_{ex} = 344$ нм; $\lambda_{em} = 408$ нм.

Оценка проникновения полифенолов через кожу, поврежденную уксусной кислотой. Исследование проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250—300 г. За сутки до эксперимента у всех животных удаляли волосяной покров на участке спины размером 20 см². Для получения химического ожога к коже спины, лишенной волосяного покрова, на 40 с прикладывали марлевый тампон, смоченный ледяной уксусной кислотой (площадь воздействия — 1 см²). Все манипуляции над животными производили под эфирным наркозом.

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

Обработку раневой поверхности исследуемыми препаратами проводили дважды: первый раз спустя 1 ч после нанесения ожога, второй раз – спустя 24 ч после нанесения ожога. Забор образцов проводили спустя один час после последней обработки. В качестве контрольных использовали крыс, раневую поверхность которых обрабатывали водно-спиртовым раствором, используемым для растворения флуоресцентных производных полифенольных соединений. Забор образцов проводили спустя один час после последней обработки. Образцы ткани заключали в среду для замораживания Tissue-Tek O.C.T. и помещали в жидкий азот на 2 мин. После чего образцы хранили при температуре -80°С. Блоки ткани резали на серийные срезы толщиной 10 мкм при -18°C. Срезы приклеивали к предметному стеклу и изучали с помощью флуоресцентной станции Eclipse Ті-Е (Nikon, Япония). Для световой микроскопии срезы окрашивали смесью азура и эозина [56, 57].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что нанесение полифенольных соединений на поврежденный участок кожи при-



Рис. 3. Относительная интенсивность флуоресценции в различных участках поперечных срезов кожи крыс: Tf – таксифолин, DfTf – конъюгат таксифолина с глиоксалевой кислотой, TfG5 – пентаглутарат таксифолина.

водит к формированию на его поверхности флуоресцирующего слоя (рис. 2). Наибольшей интенсивностью флуоресценции обладает слой. образованный после обработки раны модифицированным TfG5 (рис. 2), что свидетельствует о высокой концентрации исследуемого полифенола в данной области. Слой, формирующийся после обработки модифицированным таксифолином. также обладает сильной флуоресценцией (рис. 2). Однако неравномерный характер распределения наводит на мысль о переходе полифенола из поверхностного слоя в более глубокие области дермы. Наименьшая интенсивность флуонаблюдается ресценции лля слоя. сформированного после обработки раны производным DfTf. При этом наиболее интенсивная флуоресценция слоя наблюдается в поврежденной области, где все еще обнаруживается эпидермис (рис. 2). На участках кожи, где эпидермис выявить не удается, покрывающий рану слой практически не флуоресцирует (данные не представлены). Это может быть связано с тем, что в таких областях раны (с разрушенным эпидермисом) флуоресцирующее соединение легче проникает вглубь дермы, распределяясь в ее слоях, в результате чего уменьшается концентрация флуоресцирующего соединения и, как следствие, возможность его обнаружения без применения специальных методов анализа. Другой причиной могут служить различные взаимодействия и химические превращения флуоресцентного соединения, в результате которых образуются соединения, не обладающие флуоресценцией. Кроме того, наблюдается проникновение флуоресцентных производных полифенолов в волосяные фолликулы, что указывает на трансфолликулярный транспорт данных соединений (рис. 2). В случае таксифолина флуоресценция наблюдается в более глубоких слоях дермы по сравнению с TfG5 (рис. 2), свидетельствуя о его лучшем проникновении в кожу. Флуоресцентный аналог DfTf накапливался в придатках кожи в меньшей степени, чем другие соединения (рис. 2). На рис. 3 представлена относительная интенсивность флуоресценции в различных участках поперечных срезов кожи крыс.

Таким образом, данные свидетельствуют о том, что после обработки поврежденного участка кожи исследуемыми соединениями на поверхности раны формируется слой, из которого возможно дальнейшее проникновение полифенолов в глубокие слои дермы. Кроме того, выявлено проникновение полифенолов в волосяные фолликулы, что указывает на трансфолликулярный транспорт данных соединений. Наиболее глубокое проникновение было отмечено для модифицированного таксифолина. Следует отметить, что ассоциация волосяных фолликуллов с сальными железами, стволовыми клетками, близость капилляров и пр. делает волосяные фолликулы удобной мишенью для введения лекарственных препаратов [60, 61]. Кроме того, волосяные фолликулы рассматриваются как резервуары, из которых соединение высвобождается постепенно. оказывая пролонгированное действие [60, 61]. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что биологически-активные полифенолы способны оказывать пролонгированное действие при местном применении. Это может иметь важное значение при лечении ожогов, в частности, при лечении ожогов II степени (по МКБ-10), при которых неповрежденными остаются многие деривативы кожи [3].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00149).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование на лабораторных животных проводили в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных, используемых в экспериментальных и других целях (Страсбург, 1986 г), и принципами Хельсинкской декларации (2000 г). Все протоколы выполнены в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС для экспериментов на животных и одобрены Комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (протокол № 22/2023 от 15 февраля 2023 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Peck M., Molnar J., and Swart D. A global plan for burn prevention and care. *Bull. World Health Organ.*, 87, 802–803 (2009). DOI: 10.2471/BLT.08.059733
- 2. Здравоохранение в России. Статистический сборник (Росстат, М., 2019).
- Будкевич Л. И., Мирзоян Г. В., Габитов Р. Б., Бразоль М. А., Салистый П. В., Чикинев Ю. В., Шмырин А. А. и Глуткин А. В. Биопластический коллагеновый материал «Коллост» при лечении ожоговой травмы. Современные технологии в медицине, 12 (1), 92 (2020). DOI: 10.17691/stm2020.12.1.12
- Chattopadhyay S. and Raines R. T. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, **101** (8), 821–833 (2014). DOI: 10.1002/bip.22486
- Ермолов А. С., Смирнов С. В., Карасев Н. А., Курилин Б. Л., Кислухина Е. В., Киселевская-Бабинина И. В. и Васильев В. А. Анализ основных показателей работы московского городского ожогового центра после модернизации. Журн. им. Н.В. Склифосовского «*Неотложная медицинская помощь»*, № 1, 60–62 (2016).
- Файзуллин А. Л., Шехтер А. Б., Истранов Л. П., Истранова Е. В., Руденко Т. Г., Гуллер А. Е., Абоянц Р. К., Тимашев П. С. и Бутнару Д. В. Биорезорбируемые коллагеновые материалы в хирургии:

50 лет успеха. Сеченовский вестник, **11** (1), 59 (2020).

- Liu R., Dai L., Si C., and Zeng Z. Antibacterial and hemostatic hydrogel via nanocomposite from cellulose nanofibers. *Carbohydr. Polym.*, **195**, 63–70 (2018). DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.085
- Gu L., Shan T., Ma Y., Tay F.R., and Niu L. Novel biomedical applications of crosslinked collagen. *Trends Biotechnol.* 37, 464–491 (2019). DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.10.007
- Нащекина Ю. А., Луконина О. А. и Михайлова Н. А. Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность применения в регенеративной медицине. *Цитология*, **62** (7), 459 (2020).
- Adamiak K. and Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking: review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 161, 550–560 (2020).
 DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075
- Chak V., Kumar D., and Visht S. A review on collagen based drug delivery systems. *Int. J. Pharm. Teach. Pract.*, 4, 811 (2013).
- Hwang J., Sullivan M. O., and Kiick K. L. Targeted drug delivery via the use of ECM-mimetic materials. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 8, 69 (2020). DOI: 10.3389/fbioe.2020.00069
- Terzopoulou Z., Michopoulou A., Palamidi A., Koliakou E., and Bikiaris D. Preparation and evaluation of collagen-based patches as curcumin carriers. *Polymers*, 12, 2393 (2020). DOI: 10.3390/polym12102393
- Shekhter A. B., Rudenko T. G., Istranov L. P., Guller A. E., Borodulin R. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating skin wound healing. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **78**, 8–18 (2015). DOI: 10.1016/j.ejps.2015.06.002.
- Adhirajan N., Shanmugasundaram N., Shanmuganathan S., and Babu M. Collagen-based wound dressing for doxycycline delivery: in-vivo evaluation in an infected excisional wound model in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61, 1617–1623 (2010). DOI: 10.1211/jpp.61.12.0005.
- 16. Jana P., Mitra T., Selvaraj T. K. R., Gnanamani A., and Kundu P. P. Preparation of guar gum scaffold film grafted with ethylenediamine and fish scale collagen, cross-linked with ceftazidime for wound healing application. *Carbohydr. Polym.*, **153**, 573–581 (2016). DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.07.053
- Simões D., Miguel S. P., Ribeiro M. P., Coutinho P., Mendonça A. G., and Correia I. J. Recent advances on antimicrobial wound dressing: a review. *Eur. J. Pharm.*

Biopharm., **127**, 130–141 (2018). DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.02.022

- Gomathi K., Gopinath D., Rafiuddin Ahmed M., and Jayakumar R. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. *Biomaterials*, 24, 2767–2772 (2003).
 DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00059-0
- Gopinath D., Ahmed M. R., Gomathi K., Chitra K., Sehgal P. K., and Jayakumar R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, 25, 1911–1917 (2004). DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00625-2
- Kim H., Kawazoe T., Han D.-W., Matsumara K., Suzuki S., Tsutsumi S., and Hyon S.-H. Enhanced wound healing by an epigallocatechin gallate-incorporated collagen sponge in diabetic mice: wound healing by EGCG-incorporated collagen sponge. *Wound Repair Regen.*, 16, 714–720 (2008).
 DOI: 10.1111/j.1524-475X.2008.00422.x
- Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Baharvand H., and Daemi H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 678–688 (2018). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184
- Huang G. P., Shanmugasundaram S., Masih P., Pandya D., Amara S., Collins G., and Arinzeh T. L. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds: an investigation of common crosslinking agents. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 103, 762–771 (2015). DOI: 10.1002/jbm.a.35222
- Gough J. E., Scotchford C. A., and Downes S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.*, 61, 121–130 (2002). DOI: 10.1002/jbm.10145
- Reddy N., Reddy R., and Jiang Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol.*, **33**, 362–369 (2015). DOI:10.1016/j.tibtech.2015.03.008
- Wang X., Ma B., and Chang J. Preparation of decellularized vascular matrix by co-crosslinking of procyanidins and glutaraldehyde. *Biomed. Mater. Eng.*, 26, 19– 30 (2015). DOI: 10.3233/BME-151548
- 26. Bax D. V., Davidenko N., Gullberg D., Hamaia S. W., Farndale R. W., Best S. M., and Cameron R. E. Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds. *Acta Biomater.*, **49**, 218–234 (2017). DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.059
- 27. Shavandi A., Bekhit A. E.-D. A., Saeedi P., Izadifar Z., Bekhit A. A., and Khademhosseini A. Polyphenol uses

in biomaterials engineering. *Biomaterials*, **167**, 91–106 (2018). DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.018

- Manjari M. S., Aaron K. P., Muralidharan C., and Rose C. Highly biocompatible novel polyphenol crosslinked collagen scaffold for potential tissue engineering applications. *React. Funct. Polym.*, **153**, 104630 (2020). DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104630
- Zhang X., Li Z., Yang P., Duan G., Liu X., Gu Z., and Li Y. Polyphenol scaffolds in tissue engineering. *Mater. Horiz.*, 8 (1), 145–167 (2021). DOI: 10.1039/D0MH01317J
- Kaczmarek B. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials a minireview. *Materials*, 13 (14), 3224 (2020). DOI: 10.3390/ma13143224
- Kaczmarek B. and Mazur O. Collagen-based materials modified by phenolic acids – a review. *Materials*, 13 (16), 3641 (2020). DOI:10.3390/ma13163641
- Schlebusch H. and Kern D. Stabilization of collagen by polyphenols. *J. Vasc. Res.*, **9** (3–6), 248–256 (1972). DOI: 10.1159/000157937
- 33. Тараховский Ю. С., Селезнева И. И., Васильева Н. А., Егорочкин М. А. и Ким Ю. А. Ускорение фибриллообразования и температурная стабилизация фибрилл коллагена в присутствии таксифолина (дигидрокверцетина). Бюл. эксперим. биологии и медицины, 144 (12), 640–643 (2007). DOI: 10.1007/s10517-007-0433-z
- Madhan B., Subramanian V., Rao J. R., Nair B. U., and Ramasami T. Stabilization of collagen using plant polyphenol: role of catechin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 37 (1–2), 47–53 (2005). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2005.08.005
- Han B., Jaurequi J., Tang B. W., and Nimni M. E. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 65 (1), 118–124 (2003). DOI: 10.1002/jbm.a.10460
- Greco K. V., Francis L., Huang H., Ploeg R., Boccaccini A. R., and Ansari T. Is Quercetin an alternative natural crosslinking agent to genipin for long-term dermal scaffolds implantation? *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **12** (3), e1716–e1724 (2018). DOI: 10.1002/term.2338
- He L., Mu C., Shi J., Zhang Q., Shi B., and Lin W. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 48 (2), 354–359 (2011). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.12.012
- Pinheiro A., Cooley A., Liao J., Prabhu R., and Elder S. Comparison of natural crosslinking agents for the stabilization of xenogenic articular cartilage. *J. Orthop. Res.*, 34 (6), 1037–1046 (2016). DOI: 10.1002/jor.23121
- Liu Y. and Wang Y. Proanthocyanidins' efficacy in stabilizing dentin collagen against enzymatic degradation: MALDI-TOF and FTIR analyses. J. Dent., 41 (6), 535–542 (2013). DOI: 10.1016/j.jdent.2013.03.007

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

912

- Liu H., Guo J., Wang R., and Wang Y. Theaflavins as a novel cross-linker quickly stabilize demineralized dentin collagen against degradation. *Sci. Rep.*, **11** (1), 19699 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-99186-z
- Chen C., Yang H., Yang X., and Ma Q. Tannic acid: a crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: a review. *RSC Adv.*, **12** (13), 7689–7711 (2022). DOI: 10.1039/D1RA07657D
- Li Z., Chen Z., Chen H., Chen K., Tao W., Ouyang X., Mei L., and Zeng X. Polyphenol-based hydrogels: pyramid evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design. *Bioact. Mater.*, 17, 49–70 (2022). DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.01.038
- 43. Shevelev A. B., La Porta N., Isakova E. P., Martens S., Biryukova Y. K., Belous A. S., Sivokhin D. A., Trubnikova E. V., Zylkova M. V., Belyakova A. V., Smirnova M. S., and Deryabina Yu. I. *In vivo* antimicrobial and wound-healing activity of resveratrol, dihydroquercetin, and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. *Pathogens*, **9** (4), 296 (2020). DOI: 10.3390/pathogens9040296
- 44. Carvalho M. T. B., Araújo-Filho H. G., Barreto A. S., Quintans-Júnior L. J., Quintans J. S. S., and Barreto R. S. S. Wound healing properties of flavonoids: a systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine*, **90**, 153636 (2021). DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153636
- 45. Nguyen V.-L., Truong C.-T., Nguyen B. C. Q., Vo T.-N. V., Dao T.-T., Nguyen V.-D., Trinh D.-T. T., Huynh H. K., and Bui C.-B. Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from calophyllum inophyllum linn. *PLos One*, **12** (10), e0185674 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0185674
- Bhaskar Rao A. and Ernala P., Deepthi Seelam S., Vennapusa H., Sistla R., Kuncha M., Surekha Mullapudi V., Rao Yerramilli S. Wound healing: a new perspective on glucosylated tetrahydrocurcumin. *Drug Des. Devel. Ther.*, 9, 3579–3588 (2015). DOI: 10.2147/DDDT.S85041
- Yeh C.-J., Chen C.-C., Leu Y.-L., Lin M.-W., Chiu M.-M., and Wang S.-H. The effects of artocarpin on wound healing: in vitro and in vivo studies. *Sci. Rep.*, 7 (1), 15599 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-15876-7
- Ang L., Darwis Y., Koh R., Gah Leong K., Yew M., Por L., and Yam M. Wound healing property of curcuminoids as a microcapsule-incorporated cream. *Pharmaceutics*, **11** (5), 205 (2019). DOI: 10.3390/pharmaceutics11050205
- Шаталин Ю. В. и Шубина В. С. Материал на основе коллагена и таксифолина. Биофизика, 60 (3), 583–588 (2015).
- Shatalin Yu. V., Kobyakov M. I., and Shubina V. S. Modulation of adhesion and migration of NIH/3T3 cells in collagen materials by taxifolin derivatives. *Bio*-

chem. Mosc. Suppl. Ser. Membr. Cell Biol., **17**, S85–S93 (2023). DOI: 10.1134/S1990747823070048

- 51. Шаталин Ю. В. и Шубина В. С. Железосвязывающая и железовосстанавливающая способность материала, полученного на основе коллагена и таксифолина (дигидрокверцетина), в физиологических и патофизиологических условиях. Хим.фармацевтич. журн., 53 (2), 52–56 (2019). DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-2-52-56
- Shubina V. S. and Shatalin Y. V. Antioxidant and ironchelating properties of taxifolin and its condensation product with glyoxylic acid. *J. Food Sci. Technol.*, 54 (6), 1467–1475 (2017). DOI: 10.1007/s13197-017-2573-0
- 53. Shubina V. S., Kozina V. I., and Shatalin Y. V. Comparison of antioxidant properties of a conjugate of taxifolin with glyoxylic acid and selected flavonoids. *Antioxidants*, **10**, 1262 (2021). DOI: 10.3390/antiox10081262
- 54. Shubina V. S., Kozina V. I., and Shatalin Y. V. A comparative study of the inhibitory effect of some flavonoids and a conjugate of taxifolin with glyoxylic acid on the oxidative burst of neutrophils. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 15068 (2023). DOI: 10.3390/ijms242015068
- 55. Шубина В. С., Кобякова М. И. и Шаталин Ю. В. Влияние таксифолина, конъюгата таксифолина с глиоксалевой кислотой и нарингенина на функциональную активность нейтрофилов. *Биофизика*, 68 (5), 941–948 (2023).
- 56. Шубина В. С. и Шаталин Ю. В. Влияние липосомных препаратов на основе комплексов таксифолина с металлами переменной валентности на регенерацию кожи при химическом ожоге. *Цитология*, 54 (3), 251–260 (2012).
- Шубина В. С. и Шаталин Ю. В. Регенерация кожи после химического ожога в присутствии препаратов на основе производных таксифолина. *Клеточные технологии в биологии и медицине*, **3**, 160–166 (2012).
- Kiehlmann E. Preparation and partial deacetylation of dihydroquercetin acetates. Org. Prep. Proced. Int., 31 (1), 87–97 (1999). DOI: 10.1080/00304949909355676
- Park M. K., Shim J. J., and Ra C. S. Efficient cyclization of substituted diphenols: application to the synthesis of sulforhodamine B. *Clean Technol.*, **21** (2), 102–107 (2015). DOI: 10.7464/KSCT.2015.21.2.102
- Blume-Peytavi U., and Vogt A. Human Hair Follicle: Reservoir Function and Selective Targeting: Human Hair Follicle. *Br. J. Dermatol.*, 165, 13–17 (2011). DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10572.x
- Patzelt A. and Lademann J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **10** (6), 787–797 (2013). DOI: 10.1517/17425247.2013.776038

Penetration of Polyphenols through Acetic Acid-Damaged Skin

V.S. Shubina* and Yu.V. Shatalin*

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

Our previous research has shown that derivatives of taxifolin, pentaglutarate of taxifolin and a conjugate of taxifolin with glyoxalic acid improve the mechanical properties of the collagen-based materials. During the degradation process of these materials, the biologically active polyphenols are released into the surrounding medium. To evaluate the penetration of polyphenols through burn-injured skin, two approaches were used. In case of pentaglutarate of taxifolin and taxifolin (they were used for comparison), polyphenols were labeled by fluorescent probe. In case of a conjugate, the fluorescent analogue was obtained. It was shown that the application of polyphenols on the damaged area of skin leads to the formation of fluorescent layer on its surface. It was found that hair follicles accumulate fluorescent derivatives of taxifolin and pentaglutarate of taxifolin, the fluorescence was observed in the deeper skin layers than that recorded for pentaglutarate of taxifolin, suggesting that taxifolin penetrate the skin more effectively. The fluorescent analogue accumulation in skin appendages showed lower values than that of other compounds. Thus, the data obtained demonstrate that polyphenols accumulate in hair follicles, from which they can be gradually released into the surrounding tissue. On the whole, our findings suggest that biologically active polyphenols are able to exert prolonged effects when they are used for topical application. This may be important while treating burns, especially second-degree burns, in which many skin appendages remain intact.

Keywords: polyphenols, skin penetration, fluorescence, hair follicles

— БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ —

УДК 577.35; 57.045

ЭФФЕКТ СИНХРОНИЗАЦИИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ЧЕЛОВЕКА С ВАРИАЦИЯМИ ГЕОМАГНИТНОГО ПОЛЯ: СУЩЕСТВУЮТ ЛИ ВЫДЕЛЕННЫЕ ЧАСТОТЫ?

© 2024 г. Т.А. Зенченко^{*, **, #}, Н.И. Хорсева^{***}, А.А. Станкевич^{*}

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия **Институт космических исследований РАН, Профсоюзная ул., 84/32, Москва, 117997, Россия ***Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия #E-mail: zench@mail.ru Поступила в редакцию 08.02.2024 г. После доработки 15.06.2024 г.

После доработки 15.06.2024 г. Принята к публикации 19.06.2024 г.

Продолжено исследование феноменологии эффекта синхронизации колебаний сердечного ритма человека в покое с вариациями геомагнитного поля в диапазоне периодов 3-40 мин. В течение 2012-2023 гг. проведено 508 экспериментов (длительностью 100-120 мин каждый) по мониторингу минутных показателей сердечного ритма у трех практически здоровых женщин (55, 45 и 30 лет). Индивидуальные экспериментальные выборки составили 328, 113 и 67 записей соответственно. Показано, что для каждого из трех волонтеров примерно в 60% экспериментов вейвлет-спектр значений сердечного ритма оказывается очень близким со спектром синхронных вариаций хотя бы одной из горизонтальных компонент геомагнитного поля (*X* или *Y*). Также внутри исследованного частотного диапазона 3-40 мин выявлено три субдиапазона, в которых степень синхронности возникновения колебаний является максимальной: 3.5 мин, 10-12 мин и 33-36 мин. Можно сделать вывод, что, по-видимому, эффект биогеосинхронизации реализуется не равномерно по всему диапазону 3-40 мин, а преимущественно в данных субдиапазонах.

Ключевые слова: солнечно-биосферные связи, биоритмология, синхронизация ритмов, вариации геомагнитного поля, магниточувствительность, сердечный ритм.

DOI: 10.31857/S0006302924040221, EDN: NEXGFJ

Система «Солнце—геосфера—биосфера» является очень сложным для изучения объектом в силу многочисленности и нелинейности существующих в ней внутренних связей. Даже изучение какой-то отдельной подсистемы (например. «солнечная активность — климат»[1], «шумановские резонансы — грозы — глобальные вариации температуры» [2], «электромагнитные поля атмосферы — сейсмическая активность» [3] и др. требовали соединенных усилий больших групп исследователей различных специальностей.

Столь же комплексной и междисциплинарной научной проблемой является система связей «геосфера—биосфера», поскольку практически все перечисленные выше физические факторы не только взаимосвязаны, но и влияют тем или

иным образом на биологические объекты (в частности, и на человека). В одних случаях это влияние носит угрожающий характер, как в случае волн жары или холода ([4-6] и списки литературы в этих работах) или глобальных возмущений геомагнитного поля (ГМП) ([7-11] и списки литературы в этих работах). В других случаях влияние внешних факторов проявляется как изменение функционального состояния человека без срыва организма в заболевание или внезапную смерть [12]. Имеются свидетельства о возможной биотропной роли инфразвука [13, 14], шумановских резонансов [15-17], электромагнитных полей крайне низкой частоты [18, 19], вторичной компоненты космических лучей, галактических и солнечных [20-23], динамики глобальных течений океана [24] и др.

Множество уже выявленных геосферно-биосферных связей различного временного масштаба от минут до десятилетий является существенно

Сокращения: ГМП – геомагнитное поле, HR – частота сердечных сокращений (Heart Rate), ЭКГ – электрокардиограмма.

неполным, что не позволяет в настоящий момент построить более-менее рабочую феноменологическую картину. В то же время изучение данной системы является очень актуальной задачей не только с точки зрения углубления фундаментальных представлений об окружающей среде, но и для решения прикладных задач защиты здоровья человека: при работе в экстремальных условиях высоких широт или высокогорья, для оценки состояния операторов процессов непрерывного цикла, для защиты космонавтов при межпланетных перелетах, для профилактики заболеваемости и т.д.

Существует мнение, что при решении данной научной проблемы единственно надежными и информативными являются результаты лабораторных экспериментов, поскольку только в них можно контролируемо изучать возможные биохимические и биофизические механизмы, лежащие в основе формирования биологического ответа на действие природных факторов низкой интенсивности. Такой подход действительно позволил экспериментально доказать принципиальную возможность влияния крайне слабых магнитных полей, близких к природным, на живые организмы [25-29], отдельные органы и биологические ткани [30-32] или даже биомолекулы [33]. С другой стороны, достигнуть в лабораторном эксперименте точного воспроизведения наблюдаемых гелиобиологических эффектов пока не удается, возможно еще и потому, что, как сказано выше, мы пока не имеем четкого и экспериментально обоснованного представления о том, какое именно сочетание внешних факторов и с какими характеристиками обеспечивает наблюдаемые в природе эффекты.

Поэтому проведение длительных натурных наблюдений с последующим анализом возможного вклада различных внешних факторов, от уровня солнечной активности до интенсивности нейтронных потоков в приземном слое, остается важным методом изучения солнечно-биосферных связей.

Одним из традиционных подходов в этом направлении является анализ сходства частотноамплитудных параметров биологической и гелиогеофизической ритмики на разных временных масштабах, от десятилетий до суток [8–10, 25, 26, 34–36]. Этот подход в свое время позволил выявить более сложные формы реакции биосферы на действие факторов космической погоды, чем простая формула «действие–эффект», а именно, амплитудную и частотную модуляцию ритмических биологических процессов гелио- и геофизическими ритмами, т.е. их синхронизацию.

В последние два десятилетия данный подход был применен в значительно более высокочастотном, а именно, в герцовом диапазоне, включающем частоты первых мод шумановских резонансов (8–14 Гц) и геомагнитных пульсаций РС1 (Pulsation Continuous, 0.5–2.0 Гц) [13, 15, 17, 37– 41]. В частности, было обнаружено сопряжение активности мозговых процессов и интенсивности основной моды шумановского резонанса (8 Гц) [38, 41], а также колебаний параметров сердечного ритма у здоровых людей и частоты основной моды внешнего электромагнитного фона в диапазоне частот от 0.8 до 2.5 Гц [17]. Однако, к сожалению, эти исследования эффекта синхронизации в герцовом диапазоне не получили дальнейшего развития в плане детализации феноменологии эффекта: стабильности воспроизведения, возможной зависимости от времени суток, уровня геомагнитной активности, фазы солнечного цикла, анамнестических данных испытуемых, а также множества других параметров, о которых известно, что они влияют на степень выраженности гелиобиологических эффектов [21, 42-44].

Ранее нами было обнаружено [45], что при сопоставлении временных рядов значений частоты сердечных сокращений (Heart Rate, HR) и синхронных им рядов вариаций Х- и Z-компонент вектора ГМП, примерно в 60% экспериментов наблюдается статистически значимая корреляция (p < 0.05) между значениями биологического ряда и хотя бы одного из геофизических. Спектральный анализ данных рядов (Фурье, вейвлет, периодограммный) показывал, что спектры рядов HR различаются в разных экспериментах, однако в значительном числе случаев они оказываются очень близкими к спектрам синхронных им рядов вариаций вектора ГМП, причем не только по представленным основным частотам, но и по фазам колебаний.

Этот эффект наблюдался как в продольном эксперименте (серии из 30 последовательных экспериментов, проведенных на одном и том же волонтере в Москве (Россия)), так и в поперечном, т.е. при измерениях в группе из 27 здоровых волонтеров [45]. Он был обнаружен в условиях различных широт (Архангельск, Сыктывкар, Москва, Крым, София) [37, 46–48], а также в спокойных геомагнитных условиях и во время магнитных бурь различной интенсивности [47].

Таким образом, использованный нами метод полутора-двухчасового мониторинга электрокардиограммы (ЭКГ) человека в покое, неинвазивный и достаточно малозатратный, позволил проводить многократные измерения в различной геофизической обстановке у испытуемых различного возраста и состояния здоровья. За счет своей

Волонтер	Возраст	Ν	$Q_x > 0.4, \%$	$Q_y > 0.4, \%$	Q_x или $Q_y > 0.4, \%$
А	55	328	41	43	58
В	45	113	42	38	59
С	30	67	33	45	57

Таблица 1. Возраст волонтеров и количество проведенных ими регистраций

простоты он позволяет набирать со временем практически неограниченные базы результатов измерений и на их основе постепенно выявлять различные феноменологические особенности эффекта биогеосинхронизации в диапазоне периодов 3–40 мин, а также в будущем адаптировать его на другие диапазоны частот. С другой стороны, этот метод дает возможность проверки различных гипотез о возможной природе физиологического механизма (или механизмов), обусловливающего формирование реакции организма на действие ритмического внешнего фактора и подстройку частоты физиологического процесса (процессов) под внешний ритмодатчик.

Однако для дальнейшего поиска возможных биофизических механизмов необходимо было понять, проявляется ли наблюдаемый нами эффект биогеосинхронизации в диапазоне 3–40 мин в равной мере на всех частотах данного диапазона или существуют выделенные частоты? Целью данной работы стало получение ответа на данный вопрос.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Чтобы максимально исключить погрешности, вносимые в эксперимент индивидуальной вариабельностью эффекта магниточувствительности, отмечаемой многими авторами [17, 39, 40, 45], нами был выбран дизайн эксперимента с длительными многолетними наблюдениями трех практически здоровых женщин, постоянных жителей средних широт России. Измерения проводились всеми волонтерами на протяжении 2012–2023 гг. в разных географических локациях (Ленинградская обл., Московская обл., София (Болгария)).

Для регистрации ЭКГ-сигнала и его обработки использовали технические и программные средства, разработанные ООО «Медицинские компьютерные системы» (Зеленоград, Россия): выносной блок для регистрации ЭКГ-сигнала «KARDI-2» и пакет прикладных программ «CardiVar». Регистрацию ЭКГ-сигнала в четырех отведениях проводили в положении лежа, в состоянии бодрствования после 10-минутной адаптации. Полученные временные ряды RRинтервалов были преобразованы во временные

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

ряды ежеминутных значений HR длительностью D = 100 - 120 точек (мин) каждый.

Возраст волонтеров на момент начала проведения наблюдений и количество регистраций, проведенных каждым из них, указаны в табл. 1. Согласно данным медицинских осмотров, волонтеры не имели хронических заболеваний, в том числе заболеваний сердечно-сосудистой системы, а также вредных привычек.

В качестве геофизических показателей были выбраны одноминутные значения горизонтальных компонент X и Y вектора ГМП по данным геомагнитных станций, расположенных на наименьшем расстоянии от каждого из пунктов проведения измерений. Для Московской области (55°45' N/ 37°36' E) были использованы данные геофизической станции Борок (BOXX, 58.070 N, 38.230 E), для Ленинградской области (59°57' N/30°19' E) – станции Нурмиярви (NUR, 60.500 N, 24.600 E), для Софии (42°40' N/23°20' E) – станции Панагюриште (PAG, 42.50 N, 24.20 E). Данные были получены из сети INTERMAGNET (International Real-time Magnetic Observatory Network, (https://intermagnet.org/).

Нами были выбраны для сравнения значения вариаций именно горизонтальных компонент вектора ГМП, поскольку они слабо изменяются с увеличением расстояния до точки измерения, что было отдельно проверено [46]. В отличие от них ежеминутные вариации вертикальной составляющей (Z) в значительной степени зависят от подстилающей поверхности в точке проведения измерений. Следовательно, при достаточно значительном расстоянии от места проведения биологических измерений до геофизической станции (какие имели место в некоторых экспериментах данного исследования) использование данных по динамике Z-компоненты и, как следствие, полному вектору ГМП, является, на наш взгляд, неправомерным. В то же время ранее в работах, где точки проведения биологических наблюдений находились в непосредственной близости от геомагнитных станций, были включены в рассмотрение вариации и вертикальной компоненты вектора ГМП, и полного вектора [37, 45].

Алгоритм анализа данных. Расчеты проводили в программной среде MATLAB R2018 посредством встроенных функций и специально разработанных приложений.

Для исключения линейных трендов и низкочастотных колебаний каждый исследуемый отрезок ряда на предварительном этапе был отфильтрован посредством полосового фильтра с окном Блэкмана–Харриса и со значениями нижней и верхней частот среза соответственно $F_1 = 0.02-$ 0.08 и $F_r = 0.9995$ от частоты Найквиста. Критерием выбора нижней границы фильтра F_1 в каждом конкретном случае было требование, чтобы максимальные амплитуды частот в диапазонах 5–20 и 20-40 мин были примерно одинаковыми.

Алгоритм анализа, основанный на сочетании методов кросс-корреляционного и вейвлет-анализа, подробно описан в работе [47].

Для каждого эксперимента i = 1, ..., N, ряды значений HR, а также X- и Y-компонент ГМП были преобразованы согласно следующему алгоритму.

1. Вычислены матрицы вейвлет-коэффициентов $W(h)_i$, $W(x)_i$, $W(y)_i$, отражающих значения спектральной плотности, размером W (50 × D_i значений), где 50 — количество тестируемых периодов в диапазоне от 1 до 50 мин, D_i — длительность *i*-го эксперимента в минутах (рис. 1в,г). Была использована комплексная функция вейвлетпреобразования Морле:

$$\varphi(t) = \frac{1}{\sqrt{\pi B}} \exp\left(j2\pi Ct - \frac{t^2}{B}\right).$$

2. Для полученных матриц вычисляли среднее значение спектральной плотности представленных периодов (посредством усреднения значений по каждой строке 1, ..., 50). В результате были получены векторы $[\mathbf{h}]_i$, $[\mathbf{x}]_i$, $[\mathbf{y}]_i$ размерности 1×50 (рис. 1д,е), отражающие интенсивность каждого из периодов соответственно в рядах HR, X и Yi-го эксперимента.

3. В качестве численного показателя, характеризующего степень сходства/различия набора периодов, представленных в вейвлет-спектрах для пары рядов HR-Y, было использовано скалярное произведение векторов $[\mathbf{h}]_i$ и $[\mathbf{y}]_i$, нормированное на их длину: $Qy_i = (h_i, y_i)/|h_i| \times |y_i|$.

Вычисление величины Q_y было выполнено в пространстве размерности не 50 (полная размерность векторов [**h**] и [**y**]), а в пространстве размерности m = 32 (для номеров строк j = 16, ..., 47), что соответствует диапазону периодов T = 7, ...,40 мин. Такое исключение самых малых (T = 3, ..., 6.7 мин) и самых больших периодов (T = 40, ..., 50 мин) при вычислении параметра Q было сделано, потому что в этих диапазонах наблюдается снижение мощности спектра независимо от установленных границ полосового фильтра. Поэтому их включение в расчет величины Qприводило бы к снижению чувствительности данного численного показателя к совпадению/несовпадению положения пиков внутри диапазона 7—40 мин. Полностью аналогичным образом был вычислен параметр Q_x сходства вейвлет-спектров W(HR) и W(X).

По математическому смыслу значение параметра Q_y эквивалентно косинусу угла между векторами [**h**] и [**y**] или коэффициенту корреляции между ними. Однако соседние значения этих векторов не являются независимыми, потому к ним не применимы стандартные алгоритмы оценки уровня статистической значимости. Поэтому граница значений параметров Q_x и Q_y , при которых два вектора считались «сонаправленными», а соответствующие им спектры — сходными, была выбрана эмпирически на уровне $Q \ge 0.4$.

4. Из полученных массивов значений векторов $[\mathbf{h}]_i$, i = 1, ..., N была сформирована матрица результатов G(HR) размером $50 \times N$, где каждая *i*-я строка — вектор значений $[\mathbf{h}]_i$ *i*-го эксперимента, а каждый *j*-й столбец — последовательность амплитуд периода с номером *j* по всем *N* экспериментам. Аналогичные матрицы G(X) и G(Y) были сформированы из векторов $[\mathbf{x}]_i$ и $[\mathbf{y}]_i$ (i = 1, ..., N) соответственно.

Для каждого j (j = 1, ..., 50) вычисляем коэффициенты корреляции Спирмена $R_s(j)$ между i-ми (i = 1, ..., N) значениями в столбцах с номером j в матрицах G(HR) и G(X). Данный коэффициент корреляции показывает, в какой мере периоды одной величины появляются синхронно во временных рядах HR и каждого из компонент вектора ГМП.

Поскольку между последовательными экспериментами проходило не менее часа, можно считать каждый случай записи ЭКГ независимым от соседних. Следовательно, для оценки синхронности появления определенного периода в последовательности экспериментов в данном случае допустимо использовать традиционный критерий оценки уровня статистической значимости коэффициента корреляции с уровнем p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 приведены значения возраста волонтеров на момент начала измерений, число выполненных записей сердечного ритма, а также относительного числа случаев наблюдений для каждого из волонтеров, в которых вейвлет-спектры



Рис. 1. Пример преобразования временного ряда HR и соответствующей ему компоненты ГМП *X*: (а) – наложенные исходные временные ряды HR волонтера Б и ГМП *X* по станции Борок (BOXX); (б) – ряды из рис. 1а после применения полосового частотного фильтра; (в) – вейвлет-спектр ряда HR; (г) – вейвлет-спектр ряда BOXX; (д) – вектор [**h**]; (е) – вектор [**x**]. Эксперимент 11.06.2013 г.

ряда HR оказались близки к спектрам рядов векторов X и Y ГМП при пороговом значении $Q_f = 0.4$.

Согласно критерию ҳ-квадрат, проценты случаев синхронности по каждой из компонент ГМП

не имеют статистически значимых отличий между волонтерами.

Количество данных наблюдений для волонтеров А и Б позволяет разделить их экспериментальные выборки на несколько частей и оценить



Рис. 2. Процентная доля статистически значимых случаев сходства спектров временных рядов HR и синхронных им рядов вариаций компонент *X* и *Y* вектора ГМП в различные интервалы времени наблюдений: (а) – для волонтера A, (б) – для волонтера Б.

изменения процента числа случаев со временем. На рис. 2а показан процент случаев синхронности для волонтера А в разные интервалы проведения измерений (4 интервала, 2012–2014 гг., 2020 г., 2021 г., 2022 г.), на рис. 26 – аналогичное распределение для волонтера Б (2 интервала, 2012–2017 гг. и 2023 г.).

Если сравнивать на каждом рисунке столбики одного цвета, можно увидеть, что для обоих волонтеров наблюдается тенденция возрастания вероятности наблюдения синхронности со временем, как по каждой из компонент ГМП отдельно, так и по их совокупности (синхронность хотя бы с одной из компонент ГМП). Однако во всех парных сравнениях увеличение доли случаев является статистически незначимым (p > 0.05).

Анализ периодов. Для каждого волонтера были сформированы матрицы коэффициентов G(HR), G(X), G(Y) размерами $50 \times N$, содержащих величины амплитуд периодов в рядах HR, X и Y по полной выборке экспериментов (N = 328 для волонтера A, N = 113 для волонтера Б и N = 67 для волонтера C). Значение коэффициента корреляции между столбцами с одинаковыми номерами в парах матриц G(HR) - G(X) (аналогично G(HR) - G(Y)) показывает вероятность одновременного присутствия периода с данным номером в рядах HR и X (HR и Y).

На рис. 3а—в показаны результаты корреляционного анализа матриц G(HR) - G(X) (синяя линия) и G(HR)-G(Y) (зеленая линия) в выборках результатов волонтеров A (рис. 3а), Б (рис. 3б) и С (рис. 3в). Красный пунктир указывает уровень статистической значимости p = 0.05 с учетом размера каждой конкретной экспериментальной выборки.

Из сравнения рисунков За-в можно видеть, что устойчиво выше 5%-го уровня статистической значимости во всех трех случаях наблюдают-



Рис. 3. Коэффициенты корреляции R_s между значениями амплитуд одинаковых по величине периодов в полных экспериментальных выборках: (а) — для волонтера A, (б) — для волонтера Б, (в) — для волонтера C. Пояснения в тексте.



Рис. 4. Коэффициенты корреляции *R*_s между значениями амплитуд одинаковых по величине периодов в трех последовательных непересекающихся экспериментальных выборках для волонтера А.

ся периоды нескольких, довольно узких субдиапазонов:

8.3–13.0 мин (максимум – 10.3 мин); в случае волонтеров А и С он проявляется для обеих компонент вектора ГМП, в случае волонтера Б – для *X*-компоненты;

2) группа периодов в диапазоне 25–40 мин; для волонтеров А и Б – по обеим компонентам вектора ГМП, в случае волонтера С – по *Y*-компоненте;

 период 3–5 мин присутствуют на всех трех распределениях, однако его статистическая значимость во всех случаях лишь незначительно превышает порог p = 0.05. Есть вероятность, что невысокая значимость обусловлена отчасти снижением усредненной спектральной мощности как для биологического, так и для геофизического ряда в этом диапазоне (3–7 мин);

4) также для волонтеров Б и С наблюдается статистически значимый период 15.3–18.2 мин. На рис. За у него нет точных аналогов, присутствует только небольшой пик, соответствующий 22 мин.

Чтобы уточнить степень устойчивости наблюдаемых периодов, разобьем множество экспериментов волонтера A на 3 непересекающихся равных отрезка общей выборки (рис. 4).

В целом статистически значимые периоды наблюдаются во всех трех выборках и примерно в одних и тех же диапазонах, совпадающих с максимумами на рис. 3. При этом наиболее устойчивым, присутствующим на всех трех отрезках, является период в районе 10 мин, хотя границы несколько различаются на разных рисунках. Периоды в 30–40 мин оказываются статистически значимыми в двух выборках (рис. 4а,в). Остальные диапазоны сильно варьируют.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Избранный нами в данном исследовании дизайн длительных многократных наблюдений на примере ограниченного числа волонтеров обладает рядом достоинств и недостатков. К достоинствам можно отнести, в первую очередь, возможность изучить особенности проявления эффекта синхронизации, исключив фактор межиндивидуальных различий магниточувствительности у разных людей. Кроме того, нам удалось экспериментально обосновать отдельные методические моменты проведения таких наблюдений, например, показать, что длительность каждого измерения в диапазоне 100-120 мин является оптимальной с точки зрения баланса точности выявляемых периодов и накапливаемой усталости испытуемого. Также выбранное нами положение испытуемого в процессе проведения измерений (состояние покоя, но не сна) обеспечивает, на наш взгляд, наилучшее устранение возможных внешних и внутренних неконтролируемых помех по сравнению с другими возможными способами измерений, таких как длительный мониторинг в процессе повседневной жизни и измерения во сне.

К недостаткам метода следует отнести, во-первых, ограниченность по времени каждого измерения (не более 120 мин, поскольку далее неподвижное положение испытуемого приводит к постепенному возрастанию у него уровня стресса), что не позволяет в будущем расширить анализи-

руемый диапазон в сторону более низких частот, во-вторых — отсутствие достаточных оснований для автоматического распространения полученных результатов на других лиц, не принимавших участия в эксперименте. Для верификации результатов необходимо большее число испытуемых разного возраста, пола и медицинского статуса.

Полученные нами зависимости степени выраженности эффекта от возраста волонтеров указывают на то, что в нашем случае она проявляется крайне слабо: несмотря на большие размеры индивидуальных экспериментальных выборок, мы получили статистически неразличимые уровни выраженности эффекта у трех волонтеров, а также у волонтеров А и Б в разные интервалы времени наблюдений.

Мы получили результат, указывающий, что не все периоды из исследованного частотного диапазона в равной степени вовлечены в процесс подстройки ритма сердца под ритм колебаний вектора ГМП. У всех троих волонтеров наиболее воспроизводимо синхронизация проявляется в диапазоне периодов колебаний 8—13 мин (с максимумом для периода, близкого к 10 мин). Колебания данной частоты присутствуют в сердечном ритме именно в тех сериях наблюдений, когда данный период наблюдается в спектре компонент ГМП.

Полученные нами результаты укладываются в следующую гипотетическую схему развития процесса синхронизации:

 а) в спектре ГМП возникают устойчивые колебания с периодом, близким к 10 мин (из диапазона 8–13 мин);

б) эти колебания провоцируют в организме человека «захват ритма» и, возможно, увеличение амплитуды колебаний некоторого физиологического процесса (например, нейромедиаторный, электролитный, гуморальный или иной природы), который имеет период собственных колебаний в этом диапазоне и который (в свою очередь) может влиять на сердечную ритмику;

с) данный физиологический процесс начинает оказывать больший вклад в формирование сердечной ритмики, в результате чего период колебаний около 10 мин проявляется и в спектре сердечного ритма.

Ранее мы предположили, что наблюдаемое сходство спектров сердечного ритма и вариаций вектора ГМП в диапазоне периодов 3—40 мин может быть просто следствием существования синхронизации в динамике более высокочастотных процессов (с характерными частотами порядка 1 Гц), о которых сообщалось в работах [17, 38–40]. В пользу этого предположения говорит, во-первых, то, что именно в этом диапазоне (ежесекундные значения бит-ту-бит с максимально допустимым сдвигом на 50 с) находили синхронизацию сердечного ритма и ГМП [39]. Во-вторых, это косвенно подтверждается результатами работы [37], где чем более сдвигали левую границу фильтра в сторону высоких частот, исключая из временных рядов низкочастотные компоненты спектра, тем для большего количества испытуемых обнаруживалась корреляция параметров ВСР с вариациями вектора ГМП. Все вместе эти факты говорят о целесообразности в дальнейшем увеличения частоты дискретизации данных в наших экспериментах и сдвиге границ исследуемого диапазона в сторону более коротких периодов.

В то же время существование выделенных устойчивых периодов, для которых эффект синхронизации выражен в большей степени, чем для соседних, противоречит этому предположению и скорее указывает на существование некоторого самостоятельного процесса, имеющего характерную частоту (или частоты) в данных субдиапазонах.

Из литературы известно, что довольно часто резонансные колебания геомагнитных пульсаций Pc5 регистрируются на устойчивых дискретных частотах: 1.3 мГц (12.8 мин), 1.9 мГц (8.7 мин), 2.6 мГц (6.4 мин) и 3.4 мГц (4.9 мин) (см., например, работы [49, 50]). Необходимо отметить, что первые два из указанных значений близки к границам диапазона 1, наблюдаемого нами в колебаниях показателя HR (рис. 3), а последний из перечисленных – к значению диапазона 3.

С другой стороны, физиологические процессы, обусловливающие синхронизацию, могут быть связаны с вегетативной и центральной нервной системой, деятельностью баро- и хеморецепторов, дыхательной и эндокринной регуляцией [51]. Известно, что барорефлекс и прямое взаимодействие парасимпатической и симпатической систем регуляции определяют пропорции низкочастотных и высокочастотных составляющих в спектре колебаний ВСР [52]. Включенность механизма барорефлекса в формирование биологического ответа на действие вариаций ГМП обсуждается в работах [37, 53].

Дыхательные ритмы человека в покое [54, 55] содержат периоды 1, 2.5, 4, 10, 20, 40 мин и 2.5 ч. В спектрах ежеминутных значений стабильных метаболитов оксида азота NOx наблюдались периоды 7, 13 и 25–30 мин, и они были близки как к периодам сердечного ритма, так и к периодам спектров синхронных им вариаций вектора ГМП [48].

Все перечисленные процессы могут быть потенциальными участниками формирования фи-

зиологического ответа на вариации ГМП, что требует дальнейшего исследования.

Изучение феноменологии эффекта синхронизации (зависимость от состояния окружающей среды, анамнестических данных и текущего функционального состояния человека) актуально не только с фундаментальной биофизической точки зрения, но и с медицинской. В данном исследовании принимали участие здоровые люди, организм которых обладает хорошими адаптационными резервами, и реакция на вариации вектора ГМП не выводило их сердечный ритм за пределы физиологической нормы. Однако для лиц с некоторыми нарушениями сердечно-сосудистой системы, такими, как нестабильность функции синусового узла, наличие внешнего фактора, влияющего на генерацию сердечного импульса, может представлять опасность. Такой внешний фактор потенциально может увеличивать риск возникновения миграции сердечного водителя ритма, эпизодов нарушений ритма по типу экстрасистолии, особенно политопной (из нескольких отделов миокарда), пароксизмальной тахикардии и иных состояний, которые могут существенно повлиять на сократительную функцию сердечной мышцы. У лиц с длительным стажем сердечных заболеваний (артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность) значительные вариации вектора ГМП могут оказаться причиной для возникновения таких угрожающих жизни состояний как фибрилляция и трепетание отделов сердца.

БЛАГОДАРНОСТИ

Результаты, представленные в этой статье, были получены с использованием геофизических данных, собранных обсерваториями Sodankyla, Nurmijarvi, Borok, Kiev, Panagjurishte и Surlari. Авторы благодарят Meteopoлогический институт Финляндии (Finnish Meteorological Institute), геофизическую обсерваторию «Борок» и Геофизический институт Болгарской Академии наук (Geophysical Institute of Bulgarian Academy of Science) за предоставленные данные и их деятельность в рамках проекта INTERMAGNET по распространению высоких стандартов геофизических наблюдений (www.intermagnet.org).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00224-24-03 и Государственного задания ИКИ РАН, тема «Плазма».

БИОФИЗИКА том 69 № 4 2024

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено без риска для здоровья людей с соблюдением всех принципов гуманности и этических норм (Хельсинкская декларация WMA, 2013 г.) и одобрено Комитетом по биоэтике ИТЭБ РАН (протокол № 06/2012 от 01.06.2012 г.). Было получено информированное согласие каждого волонтера на участие в данном исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gray L. J., Beer J., Geller M., Haigh J. D., Lockwood M., Matthes K., Cubasch U., Fleitmann D., Harrison G., Hood L., Luterbacher J., Meehl G. A., Shindell D., van Geel B., and White W. Solar influences on climate. *Rev. Geophys.*, 48 (4), (2010). DOI: 10.1029/2009rg000282
- 2. Price C. ELF electromagnetic waves from lightning: The Schumann resonances. *Atmosphere*, **116** (7), (2016). DOI: 10.3390/atmos7090116
- Anagnostopoulos G., Spyroglou I., Rigas A., Preka-Papadema P., Mavromichalaki H., and Kiosses I. The sun as a significant agent provoking earthquakes. *Eur. Phys. J. Spéc. Top.*, 230, 287–333 (2021). DOI: 10.1140/epjst/e2020-000266-2
- Turner L. R., Barnett A. G., Connell D., and Tong S. Ambient temperature and cardiorespiratory morbidity: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*, 23 (4), 594–606 (2012). www.jstor.org/stable/23214303
- Kenney W. L., Craighead D. H., and Alexander L. M. Heat waves, aging, and human cardiovascular health. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 46 (10), 1891–1899 (2014). DOI: 10.1249/MSS.00000000000325
- Patrakeeva V. P. and Basova E. E. Effects of low temperatures on the formation of adaptive reactions: a review. *Int. J. Biomed.*, 8 (2), 95–101 (2018). DOI: 10.21103/Article8(2)_RA1
- Palmer S. J., Rycroft M. J., and Cermack M. Solar and geomagnetic activity, extremely low frequency magnetic and electric fields and human health at the Earth's surface. *Surv. Geophys.*, 27, 557–595 (2006). DOI: 10.1007/s1071 2-006-9010-7
- Бреус Т. К., Бинги В. Н. и Петрукович А. А. Магнитный фактор солнечно-земных связей и его влияние на человека: физические проблемы и перспективы. *Успехи физ. наук*, **186** (5), 568–576 (2016).
- Cornelissen G., Tarquini R., Perfetto F., Otsuka K., Gigolashvili M., and Halberg F. Investigation of solar about 5-month cycle in human circulating melatonin: Signature of weather in extraterrestrial space? *Sun Geosph.*, 4, 55–59 (2009).
- Cornelissen G., Halberg F., Sothern R. B., Hillman D. C., and Siegelova J. Blood pressure, heart rate and melatonin cycles synchronization with the season, earth magnetism and solar flares. *Scr. Med.*, 83, 16–32 (2010).

- Zenchenko T. A. and Breus T. K. The possible effect of space weather factors on various physiological systems of the human organism. *Atmosphere*, **12**, 346 (2021). DOI: 10.3390/atmos12030346
- Андронова Т. И., Деряпа Н. Р. и Соломатин А. П. Гелиометеотропные реакции здорового и больного человека (Медицина, Л., 1982).
- Колесник А. Г., Побаченко С. В. и Соловьев А. В. Оценка сопряженности показателей ЭЭГ мозга с параметрами фоновых инфразвуковых колебаний давления по данным мониторинговых исследований. *Геофизические процессы и биосфера*, **12** (1), 70– 80 (2013).
- 14. Горго Ю. П. и Дидык Л. А. Особенности влияния сверхнизкочастотных колебаний атмосферного давления на сердечную деятельность и умственные нагрузки человека. В сб. *Тез. междисциплинар. семинара «Биологические эффекты солнечной активности»* (Пущино, 2004), сс. 28–29.
- Cherry N. Schumann resonances, a plausible biophysical mechanism for the human health effects of Solar. *Natural Hazards*, 26, 279–331 (2002). DOI: 10.1023/A:1015637127504
- Cifra M., Apollonio F., Liberti M., García-Sánchez T., and Mir L. M. Possible molecular and cellular mechanisms at the basis of atmospheric electromagnetic field bioeffects. *Int. J. Biometeorol.*, 65, 59–67 (2020). DOI: 10.1007/s00484-020-01885-1
- Колесник А. Г., Бородин А. С., Колесник С. А. и Побаченко С. В. Резонансный механизм солнечно-земных связей. Изв. высших учебных заведений. Физика, 46 (8), 23–30 (2003).
- Птицына Н. Г., Виллорези Дж., Дорман И., Юччи Н. и Тясто М. И. Естественные и техногенные низкочастотные магнитные поля как факторы потенциально опасные для здоровья (обзор). *Успехи физ. наук*, **168** (7), 768–791 (1998).
- Anagnostopoulos G., Basta M., Vgontzas A., Rigas A., Vassiliadis V., Baloyannis S., and Koutsomitros T. Differential effects of earthquakes on patients with bipolar disorder versus schizophrenia: Findings from Crete, Greece, 2008–2010. *Psychiatriki*, **30**, 193–203 (2019) DOI: 10.22365/jpsych.2019.303.193
- Белишева Н. К., Жиров В. К. и Вашенюк Э.В. Реакции растения maranta leuconeura «fascinator» на солнечные протонные события, связанные с наземным увеличением нейтронного счета. В сб. Тез. междисциплинар. семинара «Биологические эффекты солнечной активности» (Пущино, 2004), с. 45.
- Papailiou M.-C., Ioannidou S., Tezari A., and Mavromichalaki H. Geomagnetic and cosmic ray activity effect on heart rate during the solar cycle 24. *Atmosphere*, 15 (2), 158 (2024) DOI: 10.3390/atmos15020158
- 22. Dorman L. I., Iucci N., Ptitsyna N. G., and Villoresi G. Cosmic rays as indicator of space weather influence on frequency of infract myocardial, brain

strokes, car and train accidents. In Proc. 27th Int. Cosmic Ray Conf. (Hamburg, Germany, 2001), p. 3511.

- Papailiou M., Mavromichalaki H., Kudela K., Setetiarova J., Dimitrova S., and Giannaropoulou E. The effect of cosmic ray intensity variations and geomagnetic disturbances on the physiological state of aviators. *Astrophys. Space Sci. Trans.*, 7, 373–377 (2011). DOI: 10.5194/astra-7-373-2011
- Vencloviene J., Tamosiunas A., Radisauskas R., Luksiene D., Vaiciulis V., Bernotiene G., and Bobak M. The influence of the North Atlantic Oscillation index on arterial blood pressure. *J. Hypertens.*, 37, 513–521 (2019). DOI: 10.1097/hjh.000000000001929
- 25. Владимирский Б. М., Волынский А. М., Виноградов С. А., Бродовская З. И., Темурьянц Н. А., Ачкасова Ю. Н., Розенберг В. Д. и Челкова Ж. Д. Экспериментальное исследование влияния электромагнитных полей сверхнизкой частоты на теплокровных животных и микроорганизмы. В кн. Влияние солнечной активности на атмосферу и биосферу Земли (Наука, М., 1971), сс. 224–233.
- Темурьянц Н. А., Макеев В. Б. и Малигина В. Ш. Влияние слабых магнитных полей ультранизких частот на инфрадианную ритмику симпатоадреналовой системы крыс. Биофизика, 37 (4), 551–553 (1992).
- Pishchalnikov R. Y., Gurfinkel Y. I., Sarimov R. M., Vasin A. L., Sasonko M. L., Matveeva T. A., Binhi V. N., and Baranov M. V. Cardiovascular response as a marker of environmental stress caused by variations in geomagnetic field and local weather. *Biomed. Signal. Process. Control*, **51**, 401–410 (2019). DOI: 10.1016/j.bspc.2019.03.005
- 28. Крылов В. В., Осипова Е. А., Панкова Н. А., Таликина М. Г., Чеботарева Ю. В., Изюмов Ю. Г., Батракова А. А. и Непомнящих В. А. Влияние временного смещения суточной геомагнитной вариации на эмбрионы плотвы *rutilus rutilus* 1. Сравнение с эффектами имитации геомагнитных бурь. *Биофизика*, **62** (4), 825–832 (2017).
- Белова Н. А. и Леднев В. В. Активация и ингибирование гравитропической реакции растений с помощью слабых комбинированных магнитных полей. Биофизика, 45 (6), 1102–1107 (2000).
- Агаджанян Н. А. и Власова И. Г. Влияние инфранизкочастотного магнитного поля на ритмику нервных клеток и их устойчивость к гипоксии. Биофизика, 37 (4), 681–689 (1992).
- Темурьянц Н. А. Влияние слабых электромагнитных полей сверхнизкой частоты на морфологию и некоторые показатели метаболизма лейкоцитов периферической крови. Дис. ... канд. мед. наук (Симферополь, 1972).
- Elhalel G., Price C., Fixler D. and Shainberg A. Cardioprotection from stress conditions by weak magnetic fields in the Schumann resonance band. *Sci. Rep.*, 9, 1645 (2019). DOI: 10.1038/s41598-018-36341-z

- 33. Цимбалюк О. В. и Мартынюк В. С. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на вызванную К⁺-деполяризацией и ацетилхолином сократительную активность интестинальных гладких мышц. Физика живого, **19** (1), 20–24 (2011).
- 34. Cornelissen G., Halberg F., Gheonjian L., Paatashvili T., Faraone P., Watanabe Y., Otsuka K., Sothern R. B., Breus T., Baevsky R., et al. Schwabe's ~10.5- and Hale's ~21-year cycles in human pathology and physiology. In *Long- and Short-Term Variability in Sun's History and Global Change*, Ed. by W. Schröder (Bremen, Germany, 2000), pp. 79–88.
- 35. Halberg F., Cornelissen G., Otsuka K., Watanabe Y., Katinas G. S., Burioka N., Delyukov A., Gorgo Y., Zhao Z., Weydahl A., Sothern R. B., Siegelova J., Fiser B., Dusek J., Syutkina E. V., Perfetto F., Tarquini R., Singh Rh. B., Rhees B., Lofstrom D., Lofstrom P., Johnson P. W., and Schwartzkopff O. Cross-spectrally coherent ~10.5- and 21-year biological and physical cycles, magnetic storms and myocardial infarctions. *Neuroendocrinol. Lett.*, **21** (3), 233–258 (2000).
- Бреус Т. К. и Рапопорт С. И. Магнитные бури медико-биологические и геофизические аспекты (Советский спорт, М., 2003).
- Poskotinova L., Krivonogova E., Demin D., and Zenchenko T. Differences in the sensitivity of the baroreflex of heart rate regulation to local geomagnetic field variations in normotensive and hypertensive humans. *Life*, **12**, 1102 (2022). DOI: 10.3390/life12071102
- Побаченко С. В., Колесник А. Г., Бородин А. С. и Калюжин В. В. Сопряженность параметров энцефалограммы мозга человека и электромагнитных полей шумановского резонатора по данным мониторинговых исследований. Биофизика, 51 (3), 534– 538 (2006).
- 39. Timofejeva I., McCraty R., Atkinson M., Joffe R., Vainoras A., Alabdulgader A., and Ragulskis M. Identification of a group's physiological synchronization with Earth's magnetic field. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14 (9), 998 (2017). DOI: 10.3390/ijerph14090998
- Alabdulgader A., McCraty R., Atkinson M., Dobyns Y., Stolc V., and Ragulskis M. Long-term study of heart rate variability responses to changes in the solar and geomagnetic environment. *Sci. Rep.*, 8 (1), 2663 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-20932-x
- 41. Максимов А. Л., Волков А. И., Савинцева А. А., Шабанов Г. А., Лебедев Ю. А. и Рыбченко А. А. О резонансном взаимодействии шумановских биосферных частот и ритмов головного мозга человека. В сб. *Тезисы VI Международного Конгресса* «Слабые и сверхслабые поля и излучения» (Санкт-Петербург, 2012), с. 168. waw biophys ru (orschive/congress2012/proc. p168. pdf.

www.biophys.ru/archive/congress2012/proc-p168.pdf

 Бреус Т. К., Гурфинкель Ю. И., Зенченко Т. А. и Ожередов В.А. Сравнительный анализ чувствительности различных показателей сосудистого тонуса к метеорологическим и геомагнитным факторам. *Геофизические процессы и биосфера*, **9** (2), 23–36 (2010). DOI: 10.1134/S0001433810080050

- 43. Крылов В. В., Осипова Е. А., Панкова Н. А., Таликина М. Г., Чеботарева Ю. В., Изюмов Ю. Г., Батракова А. А. и Непомнящих В. А. Влияние временного смещения суточной геомагнитной вариации на эмбрионы плотвы *rutilus rutilus* 1. Сравнение с эффектами имитации геомагнитных бурь. *Биофизика*, **62** (4), 825–832 (2017).
- Зенченко Т. А. и Бреус Т. К. Возможные причины нестабильности воспроизведения гелиобиологических результатов. Физика биологии и медицины, 1, 4–25 (2023). DOI: 10.7256/2730-0560.2023.1.39903
- 45. Зенченко Т. А., Медведева А. А., Хорсева Н. И. и Бреус Т. К. Синхронизация показателей сердечного ритма человека и вариаций геомагнитного поля в диапазоне частот 0.5–3 мГц. Геофизические процессы и биосфера, 12 (4), 73–84 (2013).
- 46. Зенченко Т. А., Йорданова М., Поскотинова Л. В., Медведева А. А., Аленикова А. Э. и Хорсева Н. И. Синхронизации сердечного ритма человека с геомагнитными пульсациями РС5 на разных широтах. Биофизика, 59 (6), 1186–1194 (2014).
- Zenchenko T. A., Khorseva N. I., and Breus T. K. Long-Term Study of the Synchronization Effect between Geomagnetic Field Variations and Minute-Scale Heart-Rate Oscillations in Healthy People. *Atmosphere*, 15, 134 (2024). DOI: 10.3390/atmos15010134
- 48. Зенченко Т. А., Медведева А. А., Потолицина Н. Н., Паршукова О. И. и Бойко Е. Р. Соотношение динамики минутных колебаний пульса и биохимических показателей крови здоровых лиц с геомагнитными пульсациями Рс5-6. Биофизика, 60 (2), 385–394 (2015).
- Samson J. C., Harrold B. G., Ruohoniemi J. M., Greenwald R. A., and Walker A. D. M. Field line resonances associated with MHD waveguides in the magnetosphere. *Geophys. Res. Lett.*, **19**, 19441–19444 (1992). DOI: 10.1029/92GL00116
- Ziesolleck C. W. S. and McDiarmid D. R. Statistical survey of auroral latitude Pc5 spectral and polarization characteristics. *J. Geophys. Res.*, **100** (10), 19299–19312 (1995). DOI: 10.1029/95JA00434
- Shaffer F. and Ginsberg J. P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Front. Public Health*, 5, 258 (2017). DOI: 10.3389/fpubh.2017.00258
- 52. Shaffer F., McCraty R., and Zerr C. A healthy heart is not a metronome: An integrative review of the heart's anatomy and heart rate variability. *Front. Psychol.*, **5**, 1040 (2014). DOI: 10.3389/fpsyg.2014.01040
- Gmitrov J. Baroreceptor stimulation enhanced nitric oxide vasodilator responsiveness, a new aspect of baroreflex physiology. *Microvasc. Res.*, 98, 139–144 (2015). DOI: 10.1016/j.mvr.2014.11.004
- 54. Goodman L., Alexander D. M., Fleming D. G. Oscillatory behavior of respiratory gas exchange in resting

man. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **13** (2), 57–64 (1966). DOI: 10.1109/tbme.1966.4502407

55. Usuda N., Shirakawa K., Hatano K., Abe M., Yunoki T., and Yano T. Coherence between oscillations in the cardiorespiratory system and tissue oxygen index in muscle recovering from intensive exercise in humans. *Physiol. Int.*, **106** (3), 261–271 (2019). DOI: 10.1556/2060.106.2019.25

The Effect of Synchronizing the Human Heart Rhythm with Geomagnetic Field Variations: Are There Distinguished Frequencies?

T.A. Zenchenko*, **, N.I. Khorseva***, and A.A. Stankevich*

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

**Institute of Space Research, Russian Academy of Sciences, Profsoyuznaya ul. 84/32, Moscow, 117997 Russia

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

Ongoing research continues to explore the phenomenology of the effect of synchronization between oscillations of a human resting heart rate and variations of the geomagnetic field in the period range 3-40 minutes. A total of 508 experiments have been conducted for the period 2012-2023 (each experiment lasted 100-120 minutes) to monitor the minute indicators of heart rate for three healthy women (55, 45, and 30 years old). 328, 113, and 67 measurements were made, respectively. The results indicate that, for each of these three volunteers, approximately 60% of the experiments yielded a wavelet spectrum of heart rate values that closely resembled the spectrum of synchronous variations of at least one of the horizontal components of the geomagnetic field (X or Y). Additionally, within the investigated frequency range of 3-40 minutes, three subbands were identified and in these sub-bands, the degree of synchrony of oscillations was maximal: 3.5 minutes, 10-12 minutes and 33-36 minutes. It can be concluded that the effect of biogeosynchronization is not uniformly implemented over the entire range from 3 to 40 minutes, but it is mainly evident in these sub-bands.

Keywords: solar-biosphere connections, biorhythmology, rhythm synchronization, geomagnetic field variations, magnetic sensitivity, heart rate

— ДИСКУССИИ ——

УДК 577.3

РОЛЬ БИОФИЗИКИ В СОВРЕМЕННЫХ НАУКАХ О ЖИЗНИ

© 2024 г. Г.Р. Иваницкий*, #

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, ул. Институтская, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия [#]E-mail: ivanitsky@iteb.ru Поступила в редакцию 20.03.2024 г. После доработки 15.07.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

Приведен перечень обзоров автора и дано их краткое изложение. В них показано влияние биофизики на развитие наук о жизни. Биофизика, как системная наука, широко использует методы математического моделирования. Результаты моделирования важны как для теоретического развития биологии, так и развития прикладных наук — биомедицины, геронтологии, биобезопасности и робототехники.

Ключевые слова: биофизика; парадоксы определения живой материи, медицинской нормы, динамической устойчивости жизнедеятельности, нейродегенеративных заболеваний.

DOI: 10.31857/S0006302924040237, EDN: NENSUF

Единственный способ определить границы возможного — выйти за эти границы.

За последние годы, в связи с успехами генетики, протеомики и метаболики, роль биофизики в современных науках о жизни претерпела существенные изменения. Цель данной статьи — обозначить эти изменения как в теоретическом, так и в прикладном аспектах, и дать перечень обзорных работ, в которых подробнее рассмотрен современный вклад биофизики в развитие прикладных наук о жизни.

РОЛЬ БИОФИЗИКИ В ТЕОРЕТИЧЕСКОМ РАЗВИТИИ НАУК О ЖИЗНИ

По многочисленным ссылкам на статью «XXI век: что такое жизнь с позиции физики» [1], которая была опубликована мною почти 15 лет назад, становится очевидным, что эта тема не потеряла своей актуальности. Главная идея той работы заключалась в том, что какой бы отдельный признак, используемый для описания *живых систем* мы ни взяли, — неизбежно найдем его в системах, которые принято считать *неживыми*. Ниже приведена табл. 1 из той работы.

Все попытки исследователей найти какой-либо один абсолютный, характерный признак живого к успеху не привели [2, 3]. Почему это произошло? На этот вопрос дан ответ в работах [4, 5]. Артур Кларк (1917—2008), писатель-фантаст и футуролог

В живых системах не обнаруживается никаких свойств, которыми не обладали бы неживые объекты. Задача определения жизни и механизма ее возникновения с точки зрения физики является некорректной обратной задачей, поэтому она разрешима только в терминах вероятности или договоренности между исследователями. Биофизика требует фактов и основана на операционном методе. Наше желание дать точное определение жизни и живого — это не более чем «игра ума» с сильным антропоцентрическим акцентом. Отсюда и возникает множество определений живой материи. Так было и так будет, пока человечество не столкнется с другими вариантами «развитой жизни» на другой физической основе, если эти варианты действительно существуют не только в умах фантастов, но и в реальности.

На вопросы, поставленные в работе [1], мне удалось ответить в ряде публикаций [6–13]. Но по-прежнему нет ответа на главный вопрос: «Чем отличается живое от неживого?».

Более 45 лет назад мы написали книгу «Математическая биофизика клетки» [14], в которой изложили описание жизнедеятельности клетки на трех разных математических языках: биохимическом языке, на физическом языке автоволновых процессов и на языке геометрии — стереологии,

Таблица 1. Признаки живой и неживой материи

N⁰	Признаки живой материи	Признаки неживой материи
1	Живые организмы характеризуются упорядоченной иерархической структурой	Все объекты неживой природа отвечают этому же условию и устроены по иерархическому принципу: элементарные частицы → атомы → молекулы → макромолекулы и т.д.
2	Живые организмы являются <i>открытыми системами</i> и получают энергию из окружающей среды, используя ее для поддержания своей высокой упорядоченности	Смерчи, тайфуны, ветер, молнии черпают энергию Солнца; вулканы, землетрясения, подвижка материков черпают энергию из недр Земли. Таким образом, открытость живых систем — не специфический признак живого
3	Способность <i>реагировать на</i> <i>внешнее воздействие</i> (рецепция) — универсальное свойство всех живых систем	Намагничивание, электризация, свечение, поляризация, деформация, инерция, перемещение, разрушение и т.д. — это также ответы неживых объектов на внешние воздействия
4	Способность запоминать информацию о предыдущих состояниях и адаптироваться к изменению внешних условий	Ответная реакция объектов неживой природы обычно также направлена на "нейтрализацию" внешнего воздействия. Ответная реакция неживого объекта — это стремление сохранить свое исходное состояние (принцип Ле-Шателье, принцип Ленца, инерция Ньютона). Существуют проявления в неживых объектах и элементов памяти, например, магнитный гистерезис
5	Живые организмы изменяются и усложняются	Объекты в астрофизике (образование газо-пылевых облаков → туманностей → галактик), в геофизике (образование горячего ядра планет → сравнительно холодной мантии поверхности планет → тектонических плит → материков и океанов), в химии (преобразование субстратов в продукты) также демонстрируют эволюционное изменение и усложнение
6	Все живое размножается	Коацерватные капли органических веществ могут расти и делиться. Из растворов солей растут кристаллы. Кусочек, отломившийся от растущего кристалла, становится зародышем для роста подобного кристалла. Черные курильщики и белые столбы на дне океана также размножаются
7	Живое способно к саморегуляции и регенерации повреждений	Устойчивые вихри, торнадо, ячейки Релея–Бенара — саморегулирующиеся системы. Ледяная сосулька после разрушения восстанавливается снова. Кристаллы способны к регенерации дефектов (дислокаций). Следовательно, сам факт саморегуляции и регенерации не может служить отличием живого от неживого
8	Живые объекты осуществляют обмен веществ с окружающей средой с целью размножения и экспансии	Все реакции окисления обладают этим свойством, например, горение. Преобразование энергии — это свойство всей природы, а не специфическое свойство живых систем
9	Живые объекты обладают направленной подвижностью	Этим свойством обладают ферромагнитные частицы в магнитном поле, ионы в электрическом поле, броуновские частицы в тепловом поле, частицы, имеющие массу, в гравитационном поле и т.д.
10	Живым объектам свойственна неравновесность состояния	Дожди, снегопады, лавины, водопады и т.п. — это все также неравновесные состояния

РОЛЬ БИОФИЗИКИ В СОВРЕМЕННЫХ НАУКАХ

Таблица 2.	Высказывания	классиков о	системном	подходе
------------	--------------	-------------	-----------	---------

Автор	Цитата	Источник
Иоганн Вольфганг фон Гёте (1749—1832), немецкий поэт и ученый-энциклопедист	«Гармония целого делает каждое живое существо тем, что оно есть; и человек является человеком как в силу формы и характера своей верхней челюсти, так и в силу формы и характера маленького пальца на ноге. Всякое создание – только тон и оттенок единой великой гармонии, которую следует изучать как нечто целое; в противном случае любая деталь становится мертвой буквой»	[15]
Джеффри Викерс (1894— 1982), английский писатель и пропагандист системного подхода в изучении простых и сложных систем в природе и обществе	«Мы привыкли считать вещи существующими независимо от их функций: автомобиль остается автомобилем и в гараже, и в пути. Это неверно. Автомобиль, как и атом, может быть описан только в категориях действия, и это в равной степени справедливо для организма или организации. Мы должны задавать вопрос: «Как сохраняется данное единство?» Любое целое есть не механическая сумма отдельных частей, а совокупность различного рода деятельностей, поэтому представляет собой — в той или иной мере — часть более крупного целого»	[16]
Эрвин Чаргафф (1905— 2002), американский биохимик	«Понятно, что размышлять о природе вообще или даже о живой природе вообще — не занятие для ученого. Это дело поэта, философа, пророка. Должно быть разделение труда. Но излишняя дробность представления о природе зачастую приводит к его полному исчезновению, делает мир похожим на Шалтая-Болтая, которого не удалось собрать. Такой мир может стать непознаваемым по мере того, как от него будут отламывать — «для более тщательного изучения» — кусочки все мельче и мельче. Не имея крепкого стержня, мы кидаемся в крайности. И чудесный, красочный ковер распускается по ниточкам; одну за другой нити вытаскивают, разрывают, изучают; в конце концов, узор забывается, и восстановить его невозможно»	[17]

описывающей трехмерное наполнение внутреннего объема живых систем разнообразными трехмерными структурами на водной основе, работающими на основе законов классической механики. При этом наглядно продемонстрировали, что каждый из этих языков описания процессов высвечивает лишь определенную сторону жизнедеятельности клетки. Однако описание работы внутри клетки в единое целое удалось объединить лишь частично.

Это подтвердило догадку исследователей XIX и XX веков, что гармония целого наблюдается только в целом. В качестве примера приведем три цитаты разных периодов развития системной науки (табл. 2).

Следовательно, понять работу живой системы (с учетом современных данных) можно лишь в терминах динамики внутри цикла (рис. 1), а любая макросистема как целое есть не просто



Рис. 1. Циклическая система формирования клеток живого организма в онтогенезе.



Рис. 2. Схема внешних воздействий, влияющих на нарушение устойчивости биосистем, и практический выход в случае успеха создания общей теории устойчивости живых систем.

механическая сумма отдельных частей, а совокупность различного рода деятельностей, и представляет собой часть еще более крупного целого.

Как объединить в имитационной модели различные уровни, чтобы понять их совместное функционирование? Пока ответ на этот вопрос для живых систем остается частично открытым. Намечены лишь два пути решения этой проблемы.

Возможно, дальнейшее развитие теории струн [18] или кросс-диффузионных взаимодействий автоволн с подвижностью (с адвекцией) [19, 20] позволит решить эту задачу в общем виде. Желательно продолжать работать в этих двух направлениях с надеждой на успех. Оппоненты могут возразить, что развитие такого обобщенного, системного подхода - чисто философская метафизическая задача, далекая от практического приложения, и не стоит на это тратить время. Однако это не так. На рис. 2 показаны наборы частных биофизических задач, на которые, в случае успешного их объединения, можно было бы взглянуть с новой неожиданной стороны, поскольку все они имеют практический выход в разнообразные современные биофизические технологии.

Все живое и неживое, окружающее нас, встроено в нашу Вселенную. Физические законы нашей Вселенной основаны на ее фундаментальных физических постоянных (гравитационная постоянная, постоянная Планка, скорость света в вакууме, масса покоя электрона, постоянная Больцмана, постоянная Авогадро и т.д.). Таких постоянных более 30. Поскольку все живое возникло, эволюционировало и существует в одной и той же Вселенной вместе с неживой природой, то оно не мо-

жет не подчиняться одним и тем же ее законам. Живое собрано из тех же элементов периодической таблицы Д.И. Менделеева, что и неживое. Отличие живого от неживого состоит только в том, что живое, сформировавшись из ограниченного разнообразия элементов таблицы Менделеева, обменяло это ограничение на расширение кинетического использования разнообразия физических законов Природы. Это позволило живому существенно повысить пространственно-временную скорость адаптации к изменениям внешней среды, управлять скоростью комбинаторных обменных операций при температурах порядка 300 К между разнообразием химических образований и, тем самым, продлить время своего существования [4]. Следовательно, в живом не может существовать какоголибо одного признака, который не проявил бы себя в неживых системах. Неживое плавно переходит в живое. Проведение линии раздела живого от неживого - это семантическая проблема, основанная на отборе признаков классификации путем договоренности между исследователями [21].

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БИОФИЗИКИ НА ПРИМЕРЕ РАЗВИТИЯ БИОМЕДИЦИНЫ

Биофизика играет особую роль в развитии биомедицины. Пример: что есть *норма* для человека? Обычно *норма* — это то, что присуще большинству (более половины) людей без видимых аномалий, и выглядит она как средний показатель. Однако «усреднение» порождает немало казусов и проблем. Несмотря на грандиозный успех в развитии современных методов диагностики и фармакологии, во многих ситуациях медицину продолжают оценивать не как науку, а как искусство врача.

Во-первых, чрезмерная и неизбежная специализация врачей противоречит принципу системного подхода к конкретному пациенту, поэтому продолжаются споры вокруг необходимости восстановления статуса «семейного врача». Однако появляется финансовая проблема. Платная медицина и страховки полностью не могут решить проблему «семейного врача». В Интернете можно найти множество жалоб на различные способы обирания страдающих недугами пациентов. Например: «лечил ухо, а от применения дорогих рекомендованных лекарств получил аллергию, от которой избавился с большим трудом спустя много месяцев».

Во-вторых, врачебные ошибки существовали и будут существовать во всех странах [22, 23]. Диагностика и методы лечения по-прежнему основываются на интуиции врача-терапевта, оценивающего симптоматику того или иного заболевания.

В-третьих, разные фармпрепараты, производимые фирмами во всем мире, обладают наряду со специфическим воздействием и побочными эффектами и требуют учета индивидуальных особенностей организма. Это не только вина фирм, а еще и специфика организации сложных биосистем. Общей теории самоорганизующихся биосистем, далеких от равновесия, пока еще не существует [7].

В-четвертых, появление парадоксов связано с самим человеческим организмом. Норма диктуется не только заложенными в прошлом генетическими различиями (филогенезом) между различными людьми, но и состоянием и развитием внешней и внутренней среды их организмов в онтогенезе. Особый интерес к вопросу о влиянии центральной нервной системы (психики) на различные физиологические и патологические процессы в человеческом организме возник у врачей и исследователей в начале XX века [24]. Тогда и появился термин – ятрогенные заболевания (иногда в русском языке используется его написание как иатрогенные заболевания) от др. греч. ίατρός – врач + $\gamma \epsilon \nu \epsilon \dot{\alpha}$ – рождение. К ним относятся и такие заболевания, которые вызваны побочным действием принимаемых лекарств.

В-пятых, сегодня понятие *ятрогенные заболевания* требует расширения. Сюда нужно включить влияние средств массовой информации. Поскольку как сам врач, так и пациент иногда становятся жертвой телевизионной рекламы, назойливо расхваливающей нечто универсальное, которое мгновенно спасет больного от недуга, например, различные БАДы или обработанная каким-либо способом простая вода (например, омагниченная). Однако временное улучшение самочувствия от таких квазилекарств — это обычный эффект *плацебо* [25]. Тем не менее и эффект плацебо изучен недостаточно и весьма индивидуален. Порядка 50% пациентов избавляются от симптомов заболеваний самостоятельно. Спонтанная ремиссия — это не экзотика, а экспериментальный факт. Статистика еще в начале XX века способствовала появлению крылатого выражения: «лечить надо не болезнь, а больного». Другими словами, надо не только исправлять работу конкретного органа, но и способствовать организму самому найти динамическое равновесие с внешней средой и своими органами [26].

Проблем, которые требуется решать для здоровья нации, очень много – это качество воздуха. воды и питания; состояние экологии; озеленение мегаполисов. Большая плотность населения дает благодатную почву для пандемий. Рост скоростей перемещения населения по планете открывает возможность широкого обмена инфекциями при недостаточным контроле на границах за состоянием здоровья приезжающих. Наконец, гиподинамия и ожирение значительной части населения, в частности, детей, которые большое время проводят за компьютерными играми, также существенно понижают продолжительность жизни. Лля решения демографических проблем требуется системный подход, в основе которого лежат не только финансовые соображения, но и весовые значения факторов, влияющих на повышение здоровья населения страны. Сегодня отечественная медицина медленно, но целенаправленно приступает к системному решению этих проблем.

Несмотря на пандемии, продолжительность жизни населения в развитых странах растет. Результат этого роста привел к тому, что нейродегенеративные заболевания (рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др.) становятся одной из существенных причин инвалидности и смерти. В медицине их часто объединяют единым термином сенильная деменция (от лат. senilis – «старческий», dementia – «безумие»). Масштаб возникающих при этом проблем оценивается существенными финансовыми затратами. Ежегодное содержание одного человека с подобными заболеваниями (особенно с болезнью Альцгеймера или рассеянным склерозом), например, оценивалось в США в 2018 г. более чем в 30 000 долларов. Если не удастся остановить рост распространения подобных болезней, то к 2050 г. приблизительно 135 миллионов человек будут их носителями. При этом прогнозируемые расходы на содержание больных во всем мире составят более 4 трлн долларов США в год по ценам 2018 г. [27].

Однако проблема состоит не только в финансовых затратах. Трагедия в том, что существенное ухудшение работы мозга, переходящее в полную потерю памяти, часто происходит, когда у человека состояние большинства органов находится близким к возрастной норме. Нейродегенератив-

ные заболевания — это не болезнь тела. Прежде всего, это болезнь головного мозга, т.е. потеря заболевшим собственного «Я», потеря того, что определяет его *личность*. Социальная трагедия состоит в том, что родственники годами страдают, наблюдая, как близкий и любимый ими человек постепенно деградирует. У него возникает безразличие к окружающим его людям, он не узнает даже близких родственников, совершает алогичные поступки, постепенно теряет дар речи, медленно приближаясь к смерти. Другими словами, болезнь одного человека может оказывать существенное психическое влияние на многих других окружающих его людей, подрывая тем самым их здоровье.

Предполагается, что разработка лекарственного препарата хотя бы для торможения возникновения болезни Альцгеймера займет в среднем 13 лет и будет стоить более 5.5 миллиардов долларов США (в ценах 2018 г.). По состоянию на начало 2018 г. перечислены 112 исследований различной направленности по выяснению механизмов возникновения этих болезней [11, 28]. Если бы удалось к 2025 г. получить какое-либо средство, которое задержало бы рост числа заболевших хотя бы на 5 лет, то количество людей, страдающих подобными заболеваниями, уменьшилось бы к 2050 г. в 2 раза [11]. К сожалению, пока такой результат недостижим. Причина – недостаток знаний о механизмах возникновения нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альшгеймера.

Экспериментальные модели заболевания либо изучаются на животных, либо в клиниках на уже пострадавших от заболевания пациентах, когда заболевание у них проявило себя в полную силу. С одной стороны, остается открытым вопрос: можно ли достоверно выяснить механизм возникновения нейродегенеративных заболеваний человека путем моделирования заболевания на мышах и крысах? С другой стороны, в клиниках, как правило, сталкиваются с необратимой патологией мозга у людей. При этом необходимо ретроспективно, основываясь на симптомах уже присутствующих у пациента, выяснить какие причины привели к заболеванию. Другими словами, требуется решить некорректную обратную задачу физики — по следствию определить причины. Понятно, что, имея сумму симптомов заболевания, однозначно определить истинный вклад той или иной причины в их появление очень сложно. Возникающая неопределенность связана и с тем, что причины и следствия оказываются смешенными. Предполагая аддитивность причин заболевания, один и тот же результат можно получить из набора разных слагаемых.

По мере усложнения задач современной биомедицины надежды возлагаются на системные подходы. Следует учитывать отличия в подходах к решению задачи по выяснению механизма возникновения нейродегенеративных заболеваний клиницистами, нейрофизиологами и биофизиками. Нейрофизиолог обычно отвечает на вопрос: что представляет собою изучаемая система? Клиницист акцентирует внимание на вопросе — как применить результаты нейрофизиологов на практике? Биофизик ставит вопросы иначе — как меняется при заболевании динамическая картина функционирования биосистем на всех иерархических уровнях ее организации в пространстве и во времени? Когда и почему достигается предел выполнения ее своих функций?

По мере усложнения задач современной биомедицины особое значение приобретает анализ, который основан на математическом описании связей между явлениями и их компьютерным имитационным моделированием. Это есть дополнительный продуктивный путь к достижению цели, одновременно позволяющей в случае успеха обнаружить весь спектр практических приложений, важных как для биомедицины, так и для других смежных областей приложения наукоемких технологий, например, для биобезопасности и геронтологии. Подробнее смотри в работе [11].

О ЗАДАЧАХ, НЕ РЕШЕННЫХ БИОФИЗИКАМИ, И ОТСУТСТВИИ ИЗМЕРИТЕЛЬНОГО ОБОРУДОВАНИЯ С ТРЕБУЕМОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ

Главная причина — недостаточное развитие биофизического приборостроения. Математические имитационные биофизические модели являются существенным и важным дополнением к экспериментам с животными. Достоинством математического моделирования является вскрытие неопределенностей и тем самым выбор кратчайшего пути к поставленной цели. Но достоверность математических результатов можно проверить, лишь имея набор экспериментального материала.

Как показали результаты математического моделирования на уровне подсистем в триаде отображения {*внешняя среда* → *мозг* → *органы тела*}, именно среднее звено — мозг — является главным звеном, управляющим устойчивостью автоволновых взаимодействий внутри организма в целом [11].

Кора мозга в циклическом взаимодействии с телом через подкорковые структуры управляет частотой работы сердца, частотой дыхания и другими органами, что обеспечивает формирование набора волновых паттернов, отвечающих компромиссу в поиске устойчивости между изменениями внешней среды, тела и мозга. Развитая новая кора отличает человека от животного, поэтому эксперименты на животных в ряде случаев не приводят к успеху в желании получить эффективный способ борьбы, например, с нейродегенеративными заболеваниями человека. Новая кора каждого человека индивидуальна, поскольку она отличается от других определяемых в основном генетикой образований организма. В коре содержится память о накопленном жизненном опыте и приобретенных навыках работы с получаемой информацией. Новая кора не только отличает нас от животных, но ее наполнение отличает одного человека от другого. Память реализуется набором управляемых связей между паттернами, формируемыми нейронными кластерами [29, 30].

Вмешательство в организм и работу коры мозга извне, чтобы помочь мозгу восстановиться, происходит, к сожалению, пока вслепую и может привести к успеху лишь с вероятностью p = 1/n, где *n* – количество разнообразных ситуаций. Если $n \to \infty$, то вероятность $p \to 0$. Необходимо изучить динамику смены информационных паттернов разной формы, т.е. иметь метод их регистрации и распознавания во времени и в пространстве на одном и том же мозге, которому предстоит лечение. Процессы, которые идут на клеточном уровне в нейронных сетях и в их межклеточном пространстве, во времени происходят в миллисекундном диапазоне, а в пространстве – в диапазоне нанометров. Арсенал необходимых экспериментальных методов для наблюдения и распознавания формы их автоволн в пространстве и во времени, к сожалению, пока отсутствует. Чувствительности всех существующих методов исследования мозга не хватает (по крайней мере на порядок), чтобы однозначно обеспечить контроль внешних терапевтических воздействий.

Позитронно-эмиссионная томография имеет невысокое временное разрешение (порядка 10 с). Этого недостаточно, чтобы различать динамику паттернов и распознавать их форму. Электроэнцефалография достигает временного разрешения до 2 мкс, но имеет низкое пространственное разрешение. В результате мы наблюдаем взаимодействие нейронных групп лишь интегрально. Волновой паттерн размазывается по пространству и его границы и переходы практически не наблюдаются. Вживление микроэлектродов повысило бы пространственное разрешение, но этот метод инвазивный, и использовать его на человеке нельзя. Наконец, функциональная магнитно-резонансная томография позволяет регистрировать изменение потребления кислорода, а, следовательно, скорость метаболических процессов. Ее пространственное разрешение порядка 1 мм, а временное – порядка 2 с, и этого также недостаточно. Большие надежды возлагаются на развитие нейрофотоники. Формально временное разрешение этого метода неограниченно, а пространственное разрешение определяется длиной волны используемого света. Однако методы нейрофотоники также являются инвазивными с вытекающими отсюда недостатками и неопределенностью получаемых результатов. Наконец, высокочувствительные методы матричного тепловидения позволяют исследовать работу термодинамических процессов в мозге, но они могут работать лишь на открытом мозге во время хирургических операций [31].

Вывод очевиден — будущее биомедицины существенно зависит от развития биофизического приборостроения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы, изложенные в статье, выполнены в рамках Государственного задания № 075-00224-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иваницкий Г. Р. XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики. *Успехи физ. наук*, **180**, 337–369 (2010). DOI: 10.3367/UFNr.0180.201004a.0337
- Кляцкин В. И. В стохастических динамических системах могут образовываться пространственные структуры, благодаря событиям, происходящим с вероятностью, стремящейся к нулю (Комментарий к статье Г.Р. Иваницкого «ХХІ век: что такое жизнь с точки зрения физики»). Успехи физ. наук, 182, 1235–1237 (2012). DOI: 10.3367/UFNr.0182.201211k.1235
- Смолович А. М. Гипотеза о физической природе феномена жизни (к дискуссии по статье Г.Р. Иваницкого «XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики»). Биофизика, 66 (5), 1018–1021 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050227
- Иваницкий Г. Р. Память о прошлом дает льготы в процессах выживания и размножения (Ответ на комментарий В.И. Кляцкина к статье «XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики»). Успехи физ. наук, 182, 1238–1244 (2012). DOI: 10.3367/UFNr.0182.2012111.1238
- 5. Иваницкий Г. Р. Почему не прекращаются дискуссии на тему: что такое жизнь с точки зрения физики (Ответ на статью А.М. Смоловича «Гипотеза о физической природе феномена жизни») Биофизика, 66 (5), 1022–1029 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921050239
- 6. Иваницкий Г. Р. Виражи закономерностей. Правило БИО стержень науки (Наука, М., 2011).

- 7. Иваницкий Г. Р. Самоорганизующаяся динамическая устойчивость биосистем, далеких от равновесия. Успехи физ. наук, 187, 757-784 (2017). DOI: 10.3367/UFNr.2016.08.037871
- 8. Цыганов М. А., Бикташев В. Н. и Иваницкий Г. Р. Отрицательная рефрактерность в возбудимых системах с кроссдиффузией. Биофизика, 54 (4), 704-709 (2009).
- 9. Иваницкий Г. Р., Деев А. А. и Цыганов М. А. Ритмы жизни биологических и социальных систем. Вестн. РАН, 81 (11), 1008-1020 (2011).
- 10. Иваницкий Г. Р. Робот и человек. Где находится предел их сходства? Успехи физ. наук, 188, 965-991 (2018). DOI: 10.3367/UFNr.2018.03.03830
- 11. Иваницкий Г. Р. и Морозов А. А. Объект исследования — стареюший мозг. Успехи физ. начк. 190 (11), 1165–1188 (2020). DOI: 10.3367/UFNr.2020.06.038791
- 12. Иваницкий Г. Р., Деев А. А. и Хижняк Е. П. Может ли существовать долговременная структурно-динамическая память воды? Успехи физ. наук, 184 43-74 (2014).

DOI: 10.3367/UFNr.0184.201401b.0043

- 13. Иваницкий Г. Р. Люди-Х, обладающие необычным взаимодействием рецепторных систем, конструируют внутри себя мир новых образов (к 140летию со дня рождения академика П.П. Лазарева). Успехи физ. наук, 189, 759-784 (2019). DOI: 10.3367/UFNr.2019.01.038524
- 14. Иваницкий Г. Р., Кринский В. И. и Сельков Е. Е. Математическая биофизика клетки (Наука, М., (1978).
- 15. Гёте И. В. Избранные философские произведения (Наука, М., 1964).
- 16. Vickers G. Control, Stability and Choice. General Systems, 11, 1-8 (1957).
- 17. Чарграфф Э. Горячка разума. Химия и жизнь, № 5, 63 (1978).
- 18. Морозов А. Ю. Теория струн что это такое? Успехи физ. наук, 162 (8), 83-175 (1992).
- 19. Zemskov E. P., Kassner K., Tsyganov M. A., and Hauser M. J. B. Wavy fronts in reaction-diffusion systems

with cross-advection. Eur. Phys. J. B, 72, 457-465 (2009). DOI: 10.1140/epjb/e2009-00370-5

- 20. Zemskov E. P., Tsyganov M. A., Ivanitsky G. R., and Horsthemke W. Solitary pulses and periodic wave trains in a bistable FitzHugh-Nagumo model with cross diffusion and cross advection. Phys. Rev. E. 105, 014207 (2022). DOI: 10.1103/PhysRevE.105.014207
- 21. Биологическая номенклатура (Мир, М., 1980).
- 22. Эльштейн Н. В. Современный взгляд на врачебные ошибки. Терапевтич. архив, № 8, 88-92 (2005).
- 23. Бобров О. Е. Врачебная ошибка или профессиональное невежество? Мифы, иллюзии, реальность. Лекарь, № 1-2, 6-12 (2008).
- 24. Лурия Р. А. Внутренняя картина болезней и иатрогенные заболевания (Биомедгиз, М.-Л., 1935).
- 25. Иваницкий Г. Р., Деев А. А. и Хижняк Е. П. Может ли существовать долговременная структурно-динамическая память воды? Успехи физ. наук, 184 (1), 43-74 (2014). DOI: 10.3367/UFNr.0184.201401b.0043
- 26. Иваницкий Г. Р., Деев А. А. и Хижняк Е. П. К вопросу о парадоксальных ситуациях, возникающих при гидроцефалии. Биофизика, 63 (2), 412-416 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918020136
- 27. Cummings J., Lee G., Ritter A., and Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline. Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv., 4 (1), 195-214 (2018). DOI: 10.1016/j.trci.2018.03.009
- 28. Cummings J., Ritter A, and Zhong K. Clinical trials for disease-modifying therapies in alzheimer's disease: a primer, lessons learned, and a blueprint for the future. J. Alzheimers Dis., 64 (s1), S3–S22 (2018). DOI: 10.3233/JAD-179901
- 29. Иваницкий Г. Р. Неопределенности сравнения человека и андроидного робота. Успехи физ. наук, 193, 872-901 (2023). DOI: 10.3367/UFNr.2022.12.039299
- 30. Иваницкий Г. Р. Биофизика мозга. Реальность и модели (РАН, М., 2023).
- 31. Иваницкий Г. Р. Современное матричное тепловидение в биомедицине. Успехи физ. наук, 176, 1293-1320 (2006). DOI: 10.3367/UFNr.0176.200612d.1293

The Role of Biophysics in Modern Life Sciences

G.R. Ivanitskii*

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

This paper provides a list of reviews written by the author and brief overviews of those reviews. In these works, it was shown how biophysics has an effect on the development of life sciences. Biophysics, as systems science, widely uses mathematical modeling methods. The modeling results are important both for the theoretical development of biology and the development of applied sciences such as biomedicine, gerontology, biosafety and robotics.

Keywords: biophysics, paradoxes of the definition of living matter, medical norms, dynamic stability of life, neurodegenerative diseases