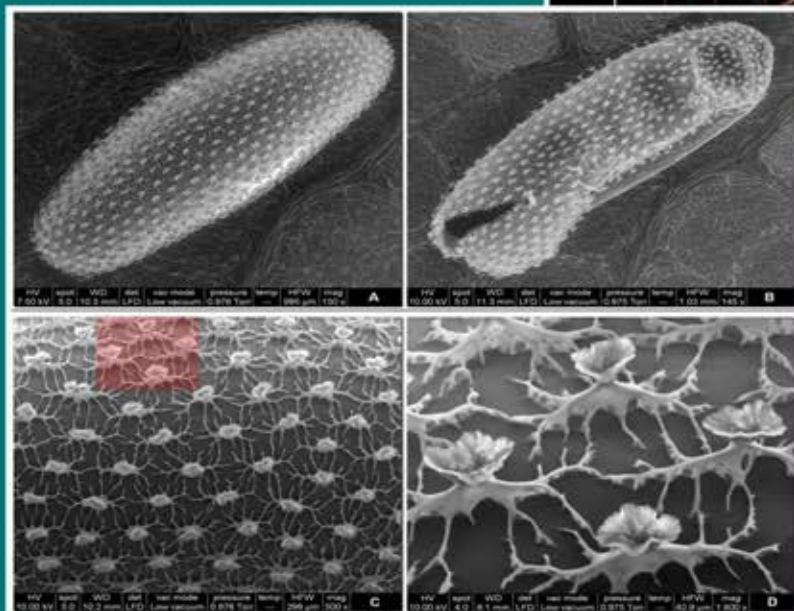
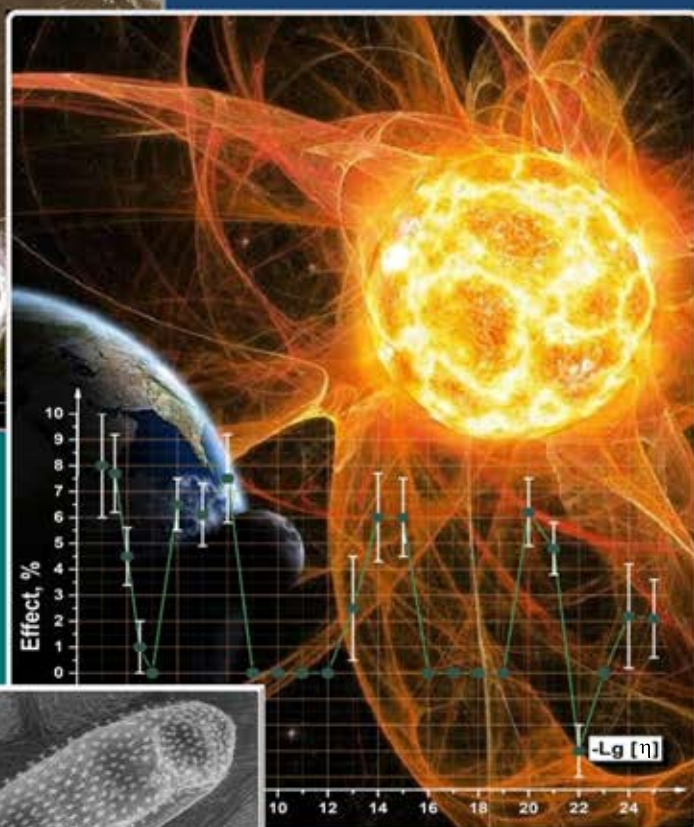


# VI Съезд биофизиков и России

## Сборник научных трудов

## Том. 1



КУБАНСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ

16 - 21.09.2019 (г. Сочи)

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК РАН  
СЕКЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ РАН  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ КОМИТЕТ РОССИЙСКИХ БИОФИЗИКОВ  
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. М.В.ЛОМОНОСОВА  
КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РАН  
ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЙ ФИЗИКИ РАН  
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РАН  
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ РАН  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А. ЭНГЕЛЬГАРДА РАН  
ООО «ВОДОРОДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ» (Г.КРАСНОДАР)

<b>Организационный комитет:</b>	Рубин А.Б., член-корр. РАН - <b>председатель</b> Иваницкий Г.Р., член-корр. РАН - <b>зам. председателя</b> Фесенко Е.Е., член-корр. РАН - <b>зам. председателя</b> Ризниченко Г.Ю., проф., д.ф.-м.н. - <b>зам. председателя</b> Барышев М.Г., проф., д.б.н. - <b>зам. председателя</b> Дроздов А.В., к.ф.-м.н. - <b>зам. председателя</b> Анашкина А.А., к.ф.-м.н. - <b>ответственный секретарь</b>  Аллахвердиев Сулейман Ифхан оглы, д.б.н. Артюхов В.Г., проф., д.б.н. Белецкий И.П., проф., д.б.н. Белова Н.А., д.б.н. Вихлянцев И.М., д.б.н. Владимиров Ю.А., академик РАН Воденеев В.А., д.б.н. Волотовский И.Д., академик РАН Гительзон И.И., академик РАН Григорьев А.И., академик РАН Гурский Г.В., чл.-корр. РАН Гусев Н.Б., чл.-корр. РАН Дегерменджи А.Г., академик РАН	Есипова Н.Г., к.ф.-м.н. Кирпичников М.П., академик РАН Колчанов Н.А., академик РАН Комаров В.М., проф., д.б.н. Кочетков С.Н., чл.-корр. РАН Курочкин В.Е., д.т.н. Макаров А.А., академик РАН Макеев В.Ю., член-корр. РАН Моренков О.С., д.б.н. Нечипуренко Д.Ю., к.ф.-м.н. Никольский Н.Н., академик РАН Островский М.А., академик РАН Розанов А.Ю., академик РАН Скулачев В.П., академик РАН Твердислов В.А., проф., д.ф.-м.н. Ткачук В.А., академик РАН Туманян В.Г., проф., д.ф.-м.н. Устинин М.Н., д.ф.-м.н. Фрисман Е.Я., чл.-корр. РАН Цыганков А.А., д.б.н. Шувалов В.А., академик РАН
<b>Программный комитет:</b>	Рубин А.Б., член-корр. РАН - <b>председатель</b> Есипова Н.Г., к.ф.-м.н. - <b>зам. председателя</b>  Атауллаханов Ф.И., член-корр. РАН Браже А.Р., к.б.н. Браже Н.А., к.б.н. Ванин А.Ф., проф., д.ф.-м.н. Василевский Ю.В., проф., д.ф.-м.н. Габитов А.Г., академик РАН Галль Л.Н., д.ф.-м.н. Зинченко В.П., д.ф.-м.н. Красавин Е.А., член-корр. РАН Крицкий М.С., проф., д.б.н. Лахно В.Д., д.ф.-м.н. Макеев В.Ю., член-корр. РАН Максимов Г.В., проф., д.б.н. Намиот В.А., проф., д.ф.-м.н.	Николаев Е.Н., член-корр. РАН Петрушанко И.Ю., к.ф.-м.н. Плюснина Т.Ю., к.ф.-м.н. Ризниченко Г.Ю., проф., д.ф.-м.н. Рошупкин Д.И., проф., д.б.н. Соболев А.С., проф., д.б.н. Тихонов А.Н., д.ф.-м.н. Туманян В.Г., проф., д.ф.-м.н. Узденский А.Б., профессор, д.б.н. Фесенко Е.Е., чл.-корр. РАН Финкельштейн А.В., чл.-корр. РАН Хрущев С.С., к.б.н. Черенкевич С.Н., академик РАН Шайтан К.В., проф., д.ф.-м.н. Яковенко Л.В., д.ф.-м.н. Яхно В.Г., проф., д.ф.-м.н.
<b>Локальный организационный комитет (КубГУ):</b>	Барышев М.Г., профессор РАН, д.б.н. - <b>председатель</b> Джимак С.С., к.б.н. - <b>зам. председателя</b> Елкина А.А. - <b>ответственный секретарь</b>	Ильченко Г.П., к.ф.-м.н. Копытов Г.Ф., д.ф.-м.н., профессор Петриев И.С., к.т.н. Текуцкая Е.Е., к.х.н. Шашков Д.И., преподаватель

Сдано в набор 26.07.2019. Подписано печать 25.08.2019

Формат 60×84/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman

Отпечатано с готового оригинал макета в ООО Полиграфическое объединение «Плехановец»

Фотографии на обложку взяты с разрешения компании Thermo Fisher Scientific с сайта: [www.fei.com](http://www.fei.com)

Научные труды VI Съезда биофизиков России опубликованы при финансовой поддержке

Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-20089)

Тираж 600 экз.

DOI: 10.31429/SbR6.2019.001  
ISBN 978-5-8209-1644-1



**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ VI СЪЕЗДА БИОФИЗИКОВ  
РОССИИ: в 2 томах, том 1 – Краснодар: Полиграфическое  
объединение «Плехановец», 2019**

Представлены материалы VI Съезда биофизиков России. Основные направления Съезда: механизмы действия физико-химических факторов на биологические системы; медицинская биофизика; фотобиология и биофотоника; структура и динамика белков и их комплексов; структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов; биофизика клетки; мембранные процессы; биологическая подвижность; молекулярные моторы; механизмы трансформации энергии; биофизика одиночных молекул; нанобиотехнологии; нейродинамика и нейробиология; биофизическое образование.

Сборник предназначен для биофизиков, биохимиков, молекулярных биологов, специалистов, работающих в различных областях физико-химической биологии. Он может быть также полезен для студентов и аспирантов, специализирующихся в данной отрасли знаний.

Ответственные редакторы: чл.-корр. РАН А.Б. Рубин, проф. Г.Ю. Ризниченко, А.А. Анашкина

Проведение VI Съезда биофизиков России поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-04-20089)



The materials of the VI Congress of Biophysicists of Russia are presented. The main directions of the Congress: mechanisms of action of physico-chemical factors on biological systems; medical biophysics; photobiology and biophotonics; structure and dynamics of proteins and their complexes; structure and dynamics of nucleic acids and their complexes; cell biophysics; membrane processes; biological mobility; molecular motors; energy transformation mechanisms; biophysics of single molecules; nanobiotechnology; neurodynamics and neurobiology; biophysical education.

The collection is intended for biophysicists, biochemists, molecular biologists, specialists working in various fields of physical and chemical biology. It can also be useful for undergraduate and postgraduate students specializing in this area of knowledge.

Responsible editors: Corr. RAS A.B. Rubin, prof. G.Yu. Rznichenko, A.A. Anashkina

The VI Congress of Russian Biophysicists was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 19-04-20089).

**Партнеры VI Съезда биофизиков России:**



**Кубанский государственный университет  
2019**

# **Пленарные доклады**



**ДАЛЬНИЙ ТРАНСПОРТ И МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ПЕРЕНОС ФОТОМЕТАБОЛИТОВ У ХАРОВОЙ ВОДОРОСЛИ**

**LONG-DISTANCE TRANSPORT AND INTERCELLULAR MOVEMENT OF PHOTOMETABOLITES IN CHARACEAN ALGA**

*Бulyчев А.А., Алова А.В., Крупенина Н.А., Рубин А.Б.*

Кафедра биофизики, биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва,  
E-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Дальний транспорт играет крайне важную роль в жизни растений, обеспечивая доставку ассимилятов к растущим клеткам и передачу сигнальных веществ. В многоклеточной системе транспорт включает две стадии: внутриклеточный перенос в цитоплазме и межклеточное движение через плазмодесмы – цитоплазматические тужи, соединяющие клетки по узким отверстиям в клеточных стенках. Дальний внутриклеточный транспорт удобно исследовать на клетках междоузлий водоросли *Chara*, используя микроскопию модулированной флуоресценции хлорофилла в сочетании с локальным освещением клетки в стороне от места измерения. Таким способом выявлена фотоиндукция и установлены свойства дальних взаимодействий между неподвижными хлоропластами в кортикальном слое цитоплазмы [1]. Показано, что метаболическая сигнализация между пространственно разобщенными хлоропластами ярко выражена в участках клетки, где активен  $H^+$ -насос плазмалеммы, и сильно ослаблена в зонах с высокой проводимостью плазматической мембраны для  $H^+$  или  $OH^-$  (в области наружных щелочных зон). Распространение волны флуоресценции хлорофилла в ответ на удаленное локальное освещение проявлялось также в течение 1–2 мин после выключения фонового освещения. Антимицин А (ингибитор переноса электронов от ферредоксина на пластохинон) ингибировал передачу сигналов в темновых условиях, не нарушая сигнализацию на фоновом свете [2]. Используемый подход применен для анализа трансклеточного переноса метаболитов, экспортируемых освещенными пластидами в подвижную цитоплазму. Данный метод изучения плазмодесм оригинален и не инвазивен, поскольку не требует загрузки флуоресцентных зондов, а за перемещением фотометаболитов наблюдают в естественных условиях, когда градиенты концентрации транспортируемых агентов создаются в ходе физиологических процессов в интактной клетке. В опытах с препаратами двух контактирующих интернодальных клеток определено время прохождения фотометаболитов через плазмодесмы, и найден коэффициент диффузии проникающих веществ внутри плазмодесм [3]. Показано, что трансклеточная фоторегуляция активности хлоропластов обратимо нарушается при снижении гидростатического давления в клетках. В докладе будут представлены результаты изучения роли течения цитоплазмы и плазмодесм во внутриклеточной и межклеточной метаболической сигнализации.

1. Bulychev A.A., Komarova A.V. Photoregulation of photosystem II activity mediated by cytoplasmic streaming in *Chara* and its relation to pH bands // Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics 2017, Vol. 1858, Pp. 386–395.
2. Bulychev A.A., Rybina A.A. Long-range interactions of *Chara* chloroplasts are sensitive to plasma-membrane  $H^+$  flows and comprise separate photo- and dark-operated pathways // Protoplasma 2018, Vol. 255, Pp. 1621–1634.
3. Bulychev A.A. Cyclosis-mediated intercellular transmission of photosynthetic metabolites in *Chara* revealed with chlorophyll microfluorometry // Protoplasma 2019, Vol. 256, Pp. 815–826.

## СИНХРОННОЕ МНОГОКАНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМНОГО ОТКЛИКА ОРГАНИЗМА ЛЮДЕЙ, ПОДВЕРГНУТЫХ ВНЕШНИМ ИНТЕРВЕНТНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

### SYNCHRONOUS MULTIMODAL INVESTIGATION OF A HUMAN ORGANISM'S SYSTEMIC RESPONSE TO DIFFERENT EXTERNAL INTERVENTIONS

*Вайнер Б.Г.*

Институт физики полупроводников им. А.В.Ржанова СО РАН, г. Новосибирск, E-mail: boris-stmt@yandex.ru  
Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Представлена новая методология и полученные с ее помощью результаты исследования биооткликов организма людей в ответ на внешние провоцирующие физические воздействия. Измеряемые показатели регистрируются в реальном масштабе времени синхронно по многочисленным (около 10) каналам данных разной физической природы, количественно отражающих: циркуляцию в периферических сосудах, динамику и нюансы профиля внешнего дыхания, кардиоритм и его вариабельность, особенности прохождения пульсовой волны по лучевой артерии, температуру ядра организма, артериальное давление в режимах нагнетания и сброса воздуха в манжете и др. С целью вариации алгоритмов обследования и параметров воздействия создан оригинальный автоматизированный аппаратно-программный измерительный комплекс с необходимым вспомогательным оборудованием. Значимую роль в нем играет использование инфракрасной термографии нового поколения [1], с помощью которой выявляются не только особенности циркуляции, но и динамика легочного дыхания путем применения оригинального подхода SEIRT [2], предложенного автором доклада.

Все физиологические исследования проведены в условиях внешних интервентных диагностических воздействий на организм (функциональных проб), которыми служили: кратковременная приостановка кровообращения в конечности, гипоксия при задержке дыхания, принудительная стабилизация частоты дыхания с использованием метронома, локальное температурное воздействие на поверхностные ткани и др. Для создания искусственной окклюзии сосудов конечности с получением возможности многократного воспроизводимого повторения и вариации режимов компрессии разработана и применена оригинальная автоматизированная система подачи воздуха в манжету, описанная в [3]. Многократность однотипных воздействий при реализации разнообразных по природе тестов позволяет сравнивать системные отклики организма на первую, вторую и последующие интервенции. Изучение качественной и количественной взаимосвязи синхронно полученных биосигналов и исследование динамики адаптации организма к однотипному провоцирующему воздействию дает важный материал для последующего биомедицинского и биофизического анализа. Предполагается, что такой методологический прием окажется уместным при выявлении скрытого резерва компенсаторных возможностей организма людей.

Тестовые измерения с синхронным использованием тепловидения и других средств биомедицинской диагностики выполнены на практически здоровых волонтерах, выразивших согласие на участие в данных исследованиях. С помощью развитой методологии обнаружены физиологические явления, представляющие интерес для дальнейшего детального изучения. В качестве примера на рис. 1 изображена зависимость скорости пульсовой волны в лучевой артерии от давления воздуха в тонометрической манжете.

Показано, что синхронные многоканальные автоматизированные исследования с применением интервентных воздействий на организм и с совместным анализом полученных биоданных являются высокоинформативной технологией в современной биофизике.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области (грант № 18-44-540040).

1. Vainer B.G. Up-to-date thermal imaging systems in the multichannel automated measurements // In 2018 14th Intern. Scientific-Techn. Conf. Actual Problems of Electronic Instrument Engineering (APEIE) (Novosibirsk, October 2-6, 2018). Proceedings. Vol. 1. Part 2. Papers in English. Novosibirsk: NSTU, IEEE, 334-338.
2. Vainer B.G. A novel high-resolution method for the respiration rate and breathing waveforms remote monitoring // Ann Biomed Eng. 2018. Vol. 46. P. 960-971.
3. Вайнер Б.Г., Настовьяк А.Е., Эминов Э.А. Автоматизированная система подачи газа для физических и биомедицинских исследований // Тр. XIV Межд. научно-техн. конф. АПЭП-2018, г. Новосибирск, 2-6 октября 2018 г. // Новосибирск: НГТУ, IEEE, 2018. Т. 5. С. 61-67.

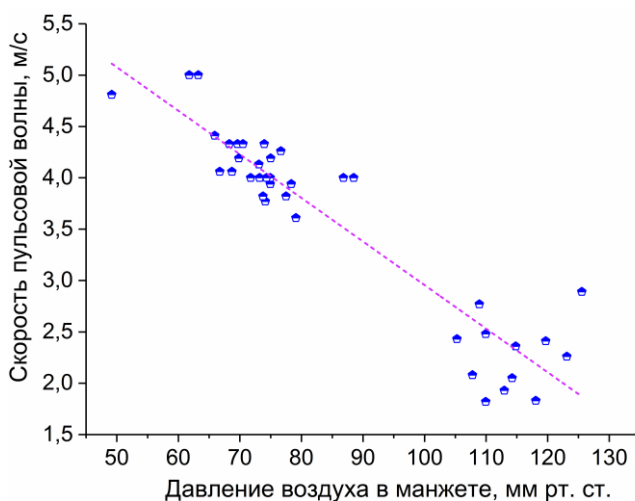


Рис. 1. Зависимость скорости пульсовой волны в лучевой артерии от давления воздуха в манжете

**NO СЕГОДНЯ В БИОФИЗИКЕ И БИМЕДИЦИНЕ****NO TODAY IN BIOPHYSICS AND BIOMEDICINE****А.Ф. Ванин**Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова, Российская Академия Наук;  
Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет

В настоящее время установлено, что простейшее химическое соединение – монооксид азота (NO) непрерывно ферментативным путём синтезируется практически во всех живых организмах, функционируя в них в качестве одного из универсальных регуляторов разнообразных биохимических и физиологических процессов. В организме животных и человека этот агент участвует в работе сердечно-сосудистой системы, в функционировании центральной и вегетативной нервной системы, в моче-половой системе, в работе желудочно-кишечного тракта и т.д. и т.д., практически во всех физиологических отправлениях животных и человека. Поскольку это так, то возникает иллюзия, что регулируя извне уровень NO в организме человека и животных можно достаточно легко влиять на состояние их здоровья и решать тем самым разнообразные медицинские и ветеринарные проблемы. В действительности, оказалось, что сделать это не так просто, и основная причина этого состоит, по моему мнению, в свободно-радикальной природе молекул NO. Дело в том, что эти молекулы как свободные радикалы легко вступают в реакцию диспропорционирования, в результате которой происходит взаимное окисление-восстановление этих молекул с их переходом в ион нитрозония ( $\text{NO}^+$ ) и ион нитроксила ( $\text{NO}^-$ ). В результате гидролиза при сохранении нейтральных значений pH первый в водной среде превращается в анион нитрита, а второй – в воду и закись азота ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Тем самым реализуется своеобразный суицид молекул NO – их убыль. Для предотвращения этого Природа прибегает к услугам двухвалентного железа, поступающего из так называемого пула лабильного (слабо-связанного) железа, и тиол-содержащим, образующих с молекулами NO в соответствии со схемой 1 парамагнитные ЭПР-детектируемые динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами:

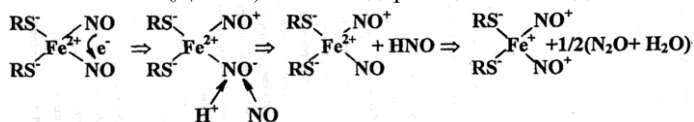


Схема 1

Согласно этой схеме, процесс диспропорционирования двух молекул NO обеспечивается их связыванием с ионом  $\text{Fe}^{2+}$  с последующим удалением из комплекса приторированного иона нитроксила (молекулы нитроксила) и включением в освободившееся место в комплексе другой молекулы NO. В результате возникает парамагнитный моноядерный ДНКЖ (М-ДНКЖ), одна из резонансных структур которого описывается как  $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)(\text{NO})]$ . Сохранение одного из нитрозильных лигандов в комплексе в форме иона нитрозония обеспечивается переносом электронной плотности с атомов тиоловой серы на этот лиганд, приводящей к нейтрализации положительного заряда на этом лиганде и тем самым блокаде его взаимодействия с ионом гидроксила (блокаде гидролиза иона нитрозония). Тем не менее, при установлении химического равновесия между М-ДНКЖ и составляющими его компонентами, в соответствии со схемой 2 при выходе тиол-содержащих лигандов, этот лиганд снова превращается в ион нитрозония, связывающийся (вместо иона гидроксила) с одним из тиол-содержащих лигандов с образованием стабильного S-нитрозотиола ( $\text{RS}-\text{NO}$ ):

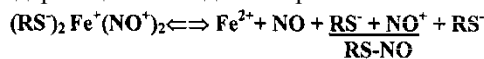


Схема 2

Таким образом, включение NO в живых организмах в ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами обеспечивает его стабилизацию и деронирование и последующий перенос к мишеням его биологического действия. При этом в соответствии со схемой 2, ДНКЖ выступают не только как доноры нейтральных молекул NO, но и ионов нитрозония, связывающихся соответственно с нем- и тиол-содержащими белками кленкток и тканей.

В настоящее время есть все основания полагать, что именно эти комплексы – причём как моноядерные, так и биядерные ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами выступают в качестве основной «рабочей форме» системы эндогенного NO, обеспечивающей его функционирование в организме животных и человека.

Таким образом эти комплексы, легко синтезируемые химическим путём, могут и уже стали основой для создания лекарств, способных регулировать уровень NO и его ионизированной формы ( $\text{NO}^+$ ) в организме животных и человека. Уже установлено, что уже созданные препараты, содержащие в качестве активных компонентов ДНКЖ с глутатионом, оказывают эффективное, дозо-зависимое гипотензивное действие на человека, причём длящееся несколько часов при однократном введении препарата. Такого же рода препараты способны резко ускорять заживление кожных ран, подавлять агрегацию тромбоцитов (тромбообразование), повышать эластичность эритроцитов и тем самым улучшать микроциркуляцию. Наконец, полностью подавлять развитие незлокачественных эндометриоидных опухолей у животных с экспериментальным эндометриозом и даже подавлять развитие перевивных злокачественных опухолей, производных рака простаты человека.

**Вывод: Наиболее успешным в использовании NO в биомедицине представляется использование в качестве его доноров ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами.**

**НОВАЯ АФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДЛЯ ОДНОШАГОВОГО ВЫДЕЛЕНИЯ СЛОЖНЫХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В БОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВАХ И С ВЫСОКОЙ ЧИСТОТОЙ****A NOVEL AFFINITY CHROMATOGRAPHY IN A ONE-STEP PURIFICATION OF COMPLEX AND THERAPEUTIC PROTEINS WITH HIGH YIELD AND PURITY***Васильев Д.Г.<sup>1,2</sup>*<sup>1</sup>Университет Алабамы в Бирмингеме, Бирмингем, США (dmitry@uab.edu)<sup>2</sup>TriAltus Bioscience LLC, Бирмингем, США

Наработка и очистка белков является первым и одним из наиболее критических этапов многочисленных биологических исследований. От успеха в выделении белков зависят такие бурно развивающиеся направления, как протеомика, интерактомика и разработка новых лекарств. Такие области, как структурные исследования и фармацевтическая индустрия накладывают дополнительные требования на этот процесс – он должен удовлетворять ННН-правилу (High yield; High purity; High activity), то есть, белок надо получать в больших количествах, с высокими чистотой и биологической активностью. Более того, сейчас наблюдается тенденция к замещению многих лекарств, основанных на низкомолекулярных соединениях, рекомбинантными белками для лечения инфекционных и генетических заболеваний. Уже в настоящее время количество белковых препаратов составляет примерно 30% от всего рынка лекарств, а к 2022-му году их доля по прогнозам должна достичь 50%.

На данный момент разработано множество подходов к наращиванию и выделению белков. Более того, за несколько последних лет резко возросло количество компаний, которые специализируются на производстве очищенных белков для медицины и научных исследований. Тем не менее, состояние этой области остаётся далеко не идеальным. С одной стороны, достаточно часто проблемы возникают в бактериальной (*E. coli*) экспрессионной системе, которая сейчас является основной, благодаря её простоте, дешевизне и возможности экспрессировать рекомбинантные белки в количествах на порядок выше, чем в альтернативных системах. Однако, «чужие» для бактерии белки часто оказываются токсичными или продуцируются в нерастворимой форме, что, либо сильно осложняет последующее выделение, либо делает его вообще невозможным. К последним, в частности, относится большинство человеческих белков из разряда лекарственных препаратов. С другой стороны, практика показывает, что высокую очистку большинства научно- и терапевтически-важных белков невозможно достичь за один шаг. В среднем требуется около 4-х хроматографических шагов, причём универсального подхода не существует. Протокол для выделения приходится отрабатывать индивидуально для каждого конкретного белка. Как результат, промышленная очистка белка достигает 70-80% от общей себестоимости «белкового» лекарственного препарата, в то время как на «научном» рынке всего за 10-20  $\mu\text{g}$  белка приходится платить несколько сотен долларов. В научных же лабораториях, время, затрачиваемое на поиск и отладку протокола для экспрессии и выделения белков, зачастую может занимать до 50% времени, необходимого для завершения всего научного проекта, а в некоторых случаях попытки и вообще заканчиваются неудачей. Таким образом, значение универсального метода, позволяющего выделение белков с различными характеристиками за один шаг и удовлетворяющего ННН-правилу, сложно переоценить.

Мы разработали новый подход к выделению белков на основе комплекса из двух небольших белков, которые связываются с ультравысокой афинностью ( $K_d \sim 10^{-14} - 10^{-17}$  М) - нуклеазный домен колицина E7 (CE7; MW = 16 кДа) и его ингибитор, иммунный белок 7 (Im7; MW = 10 кДа)<sup>1</sup>. Основная сложность в создании афинной системы состояла в том, что CE7 нуклеаза высоко-токсична для клеток. Однако, тот факт, что ингибитор связывается в стороне от активного центра нуклеазы, позволил нам смоделировать её каталитически-неактивный вариант (CL7), который, при этом, целиком сохраняет афинность к ингибитору. В конечной CL7/Im7 афинной системе, Im7 химически пришит на агарозную основу, а CL7 используется, как таг на выделяемом белке. Система высоко-специфична, нечувствительна к высокой соли и другим реагентам, критичным для очистки белков, и позволяет связать от 30 до 35  $\text{mg}$  белка на 1 ml активированной агарозы. Главное преимущество CL7/Im7 подхода состоит в том, что он позволяет очищать белки с разными характеристиками (много-субъединичные, ДНК/РНК связывающие, мембранные, токсичные) за один шаг, в большой степени универсально и с чистотой от 95% и выше<sup>1-4</sup>. Сравнительный анализ показывает, что CL7/Im7 система даёт 10-500-кратный выигрыш в продуктивности очистки по сравнению со стандартными подходами. Стоит отметить и то, что CL7 таг во многих случаях существенно повышает растворимость и уровень экспрессии белков. В докладе будут рассмотрены детали CL7/Im7 технологии и её применение к выделению ряда сложных и терапевтически важных белков.

CL7/Im7 технология запатентована Университетом Алабамы в Бирмингеме (UAB) и коммерчески распространяется компанией TriAltus Bioscience (<https://trialtusbioscience.com/>). Взаимовыгодное сотрудничество на академической основе также представляет интерес. Проект спонсируется UAB и компанией TriAltus.

1. Vassylyeva et al. // PNAS. 2017. Vol. 114. P. E5138.
2. Zhang et al. // PNAS. 2017. Vol. 114. P. E7949.
3. Qiao et al. // Prot. Expression & Purification. Vol. 157. P. 17.
4. Li et al. // Molecules. Vol. 24. P. 1483.
5. Qiao et al. // Communication Biol. Vol. 3. P. 161.



**КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛОФЕРМЕНТОВ С ЛИПИДАМИ МЕМБРАН, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ПРОГРАММИРУЕМУЮ СМЕРТЬ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ****METAL-ENZYME/MEMBRANE LIPID COMPLEXES RESPONSIBLE FOR PROGRAMMED CELL DEATH IN HUMANS AND ANIMALS***Владимиров Ю.А.<sup>1,2,3</sup>, Владимиров Г.К.<sup>1,2,3</sup>, Тимофеев В.И.<sup>2</sup>*<sup>1</sup>Кафедра медицинской биофизики, ФФМ, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва. yuvlad@mail.ru<sup>2</sup>Институт Кристаллографии им В.А. Шубникова, РАН, Москва, tostars@mail.ru<sup>3</sup>Лаборатория Навигационной редокс-липидомики, ИРМ, Сеченовский университет, ura-vladimirov@yandex.ru

Биологическая смерть клеток апоптоз, нетоз, эритроптоз, ферроптоз и другие – важнейшее событие, определяющее дифференцировку и самообновление тканей организма, возникновение болезней пожилого возраста, и, наконец, старение и смерть человека и других многоклеточных организмов. Сравнительно недавно было обнаружено, что начальные и терминальные стадии основных видов биологической смерти клеток обусловлены пероксидацией фосфолипидов митохондриальных или цитоплазматической мембран, и/или мембран эндоплазматического ретикулума. Катализ реакций перекисного окисления липидов во всех изученных случаях осуществляется ионами железа, связанного с низкомолекулярными лигандами, либо входящего в состав гема металлопротеинов (апоптоз), либо связанного аминокислотными остатками в белковой глобуле (ферроптоз). В связи с важностью проблемы управления смертью клеток для самых различных областей клинической медицины, появилось большое число работ, посвященных строению комплексов металлопротеинов с фосфолипидами и изучению механизма химических реакций, приводящих к образованию липидных перекисей. Противоречивость полученных данных сопоставима лишь с их изобилием. Основная причина заключается в том, что методы биохимии, включая методы геномики и протеомики, чрезвычайно эффективные в других случаях и потому весьма популярные, не позволяют сами по себе непосредственно изучать ни молекулярную структуру сложных белково-липидных комплексов, ни механизма протекания реакций, в которых участвуют нестабильные промежуточные продукты, включая свободные радикалы, которые как-раз и являются главными игроками в реакциях липидной пероксидации в биологических мембранах [1].

Мы исследовали размеры и химический состав комплексов цитохрома *c* с фосфолипидом митохондрий кардиолипином методами малоуглового рентгеновского рассеяния и спектрофотометрического титрования [2], размеры растворов комплекса в водной среде и в неполярных растворителях – методом динамического рассеяния света [3], изменение конформации цитохрома *c* при образовании его комплекса с кардиолипином и другими анионными липидами – методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии и образование свободных радикалов липидов при реакциях каталитического окисления липидов кислородом воздуха или гидропероксидами водорода и органических соединений – методом активированной кинетической хемилюминесценции. Механизм взаимодействия цитохрома *c* с гидрофобной поверхностью и с монослоем кардиолипина мы изучили методом Ленгмюровских пленок. Мы показали, что

- 1) Комплекс цитохрома *c* с кардиолипином представляет собой наносферы диаметром около 12 или 8 нм, в зависимости от условий окружающей среды, включая pH. В центре наносферы содержатся одна молекула цитохрома *c*, которая окружена монослоем кардиолипина. Соотношение липид/белок было равно для этих наносфер, соответственно, 50-60 и 11-13 молекул липида на молекулу белка.
- 2) В водном растворе цитохром *c* представляет собой компактную глобулу диаметром около 4 нм, внутри наносферы – расплавленную глобулу диаметром немногим больше 5 нм. Глобула гидрофобна и может быть получена в неполярном растворителе. В мембране митохондрий глобула, по всей вероятности, растворена в липидном слое мембраны.
- 3) Описанные наносферы (Цит-КЛ) обладают способностью катализировать реакции образования липопероксильных радикалов (LOO<sup>•</sup>) в циклической реакции, аналогичной реакциям, катализируемым другими пероксидазами, растительными и животными, что мы показали путем измерения кинетики хемилюминесценции, активированной изохинолизиновыми кумаринами С-525 и С-334 либо люминолом, и последующим математическим моделированием кинетики реакций с использованием специальной программы *KineticAnalyzer*.
- 4) При добавлении к митохондриальным мембранам Цит-КЛ также катализирует липидную пероксидацию по такому же механизму.
- 5) При добавлении к культуре раковых клеток, как исходных, так и с выработанной резистентностью к противораковым препаратам, цит-КЛ вызывал апоптоз в раковых клетках и их гибель, что позволяет надеяться на перспективность противораковых препаратов, созданных на основе природных металлоферментов и анионных липидов или их аналогов.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-14-00244.

- 1) Владимиров, Ю. А. & Арчаков, А. И. (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, Наука, Москва.
- 2) Vladimirov, Y. A., Nol', Y. T. & Volkov, V. V. (2011) Protein–lipid nanoparticles that determine whether cells will live or die, *Crystallography Reports*. 56, 553-559.
- 3) Vladimirov, G. K., Vikulina, A. S., Volodkin, D. & Vladimirov, Y. A. (2018) Structure of the complex of cytochrome *c* with cardiolipin in non-polar environment, *Chem Phys Lipids*. 214, 35-45.

**ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ РАСТЕНИЙ: МЕХАНИЗМЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ**  
**ELECTRICAL SIGNALS IN PLANTS: NATURE AND PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE**

*Воденеев В.А.*

ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, E-mail: v.vodeneev@mail.ru

У растений имеет место распространение электрических сигналов при действии локальных стимулов различной природы и интенсивности. Электрические сигналы растений включают типичный для различных живых организмов потенциал действия (ПД), а также специфичные электрические сигналы – переменный потенциал (ВП) и системный потенциал (СП). ПД и ВП представляют переходную деполяризацию клеток, в то время как СП представляет собой распространяющуюся волну гиперполяризации. Механизм генерации ПД имеет комплексную природу и связан как с пассивными потоками ионов, возникающими вследствие активации каналов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ), так и с временным снижением активности электрогенного насоса –  $\text{H}^+$ -АТФазы плазматических мембран. Механизм генерации ВП имеет качественное сходство с таковым для ПД. В то же время имеются значительные различия в параметрах потенциала действия и переменного потенциала, к числу которых, в первую очередь, относится большая длительность ВП. Такие различия обусловлены инициацией изменений мембранного потенциала при генерации электрических реакций. Генерация ПД связана с активацией потенциал-зависимых кальциевых каналов, а генерация ВП с активацией лиганд-управляемых (согласно другой гипотезе – механочувствительных) кальциевых каналов. Это обуславливает различную динамику уровня кальция в клетках, что, в свою очередь, ведет к различиям в динамике изменения активности анионных каналов и  $\text{H}^+$ -АТФазы, поскольку работа обоих типов транспортеров находится под контролем ионов кальция. Механизм генерации системного потенциала на сегодняшний день изучен недостаточно.

Распространение электрических сигналов происходит преимущественно по проводящим пучкам, при этом передачу ПД связывают с клетками пучковой паренхимы и ситовидных элементов. Электрический механизм распространения ПД у растений, в целом, сходен с таковым для ПД в нервных волокнах. Однако, сложная структура проводящих путей растений не позволяет однозначно выделить определенный тип клеток, ответственных за распространение ПД. Теоретический анализ позволяет предположить, что распространение ПД связано с кооперацией симпласта паренхимных клеток и ситовидных элементов. При этом в клетках симпласта происходит первичная генерация ПД, а ситовидные элементы служат основным электрическим каналом, связывающим различные участки симпласта. Еще более дискуссионным является вопрос о механизмах распространения другого типа электрического сигнала – ВП. Исторически раздельно существовавшие электрическая, химическая и гидравлическая гипотезы распространения ВП сегодня сменяются представлениями о комплексном характере этого типа сигнала.

Распространение электрических сигналов вызывает функциональные изменения в нераздраженных частях растения. В число таких функциональных ответов входят изменения в экспрессии генов, активности фотосинтеза, транспирации, дыхания, изменения содержания АТФ и др. Развитие функционального ответа, по-видимому, обусловлено концентрационными сдвигами (в первую очередь  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{H}^+$ ), сопровождающими генерацию электрических сигналов. Можно полагать, что динамика концентраций сигнальных ионов обуславливает специфику развития функционального ответа, имеющую место при действии различных раздражителей. Это говорит о том, что электрические сигналы у растений могут выполнять не только сигнальную, но также и информационную функцию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (проект № 6.3199.2017/ПЧ) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-01141\_А).

**МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. ОТ БИОФИЗИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ**  
**ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ДО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ ДЛЯ**  
**ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**MESENCHYMAL STEM CELLS. FROM BIOPHYSICAL MECHANISMS OF FUNCTIONING**  
**TO APPLICATION IN REGENERATIVE MEDICINE TO TREAT THE DISEASES**

*Волотовский И.Д.*

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, volotovski@yahoo.com

В последние десятилетия мезенхимальные стволовые клетки (МСК) заняли одно из центральных мест в области клеточной биологии, клеточной биофизики и регенеративной медицины благодаря их чрезвычайно высокой биологической и терапевтической активности, возможности размножения данных клеток *in vitro* и использования затем накопленной клеточной биомассы в клинической практике для лечения разнообразных заболеваний. В докладе рассматриваются ключевые критерии жизнеспособности МСК в культуре и биофизические механизмы, обеспечивающие их активное морфофункциональное состояние, к которым относятся поддержание высокой пролиферативной активности, способности (МСК) продуцировать широкий

набор биологически активных соединений, благодаря которым клетки оказывают противовоспалительное, иммуномодулирующее, ангиогенное и др. действия, а также дифференцироваться в соматические клетки по нескольким направлениям. Функциональная активность МСК находится под контролем генетических и эпигенетических механизмов. Находясь в обычных условиях в так называемой нише, МСК вступают в интенсивные межмолекулярные и межклеточные взаимодействия с соседними клетками, реагируя на физико-химические условия микроокружения (рН, ионный состав, O<sub>2</sub>, биологически активные соединения, включая метаболиты функционирования клеток и др.), что в целом позволяет МСК оптимизировать протекание внутриклеточных процессов, лежащих в основе их жизнедеятельности. Дотех пор пока МСК не вступили на путь специализированной дифференцировки, они синтезируют различные биологически активные белковые факторы (порядка 200). Однако в ходе дифференцировки экспрессия многих факторов блокируется и кроме небольшого числа синтезированных клетками факторов в регуляцию включаются эпигенетические механизмы, осуществляемые через метилирование-деметиляцию особых последовательностей (CG-островки) промоторных участков ключевых генов, перестройки хромосом и модификацию процессинга целевых генов с участием микроРНК. Понимание механизмов функционирования МСК открыло перспективу использования этих клеток в клинической практике при лечении разнообразных заболеваний человека в рамках регенеративной медицины. При Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси создан Республиканский научно-медицинский центр «Клеточные технологии», в котором разработано и внедрено в практику три клеточные технологии лечения трофических язв нижних конечностей с использованием МСК и смеси МСК с фибробластами, а также пародонтитов легкой формы, завершаются проекты по разработке клеточных технологий лечения дегенеративных заболеваний роговицы глаза, стрессорного недержания мочи у женщин, ожогов и возрастных изменений кожных покровов. Каждая разработка клеточной технологии лечения включала две стадии, доклиническую и клиническую. Результаты исследований оформляются в виде инструкции на метод лечения, которая утверждается Минздравом РБ и позволяет использовать разработку в лечебных учреждениях страны. Во всех случаях установлено, что МСК проявляют высокую терапевтическую активность. В настоящее время начаты проекты по лечению недержания мочи у мужчин после удаления предстательной железы и бесплодия у женщин.

## **ФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ СЛАБЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ С ЖИВОЙ КЛЕТКОЙ. ЭКСПЕРИМЕНТЫ И ТЕОРИЯ**

### **PHYSICAL PROCESSES IN THE INTERACTION OF WEAK ELECTROMAGNETIC FIELDS WITH LIVE CELL. EXPERIMENTS AND THEORY**

*Л.Н. Галль*

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия, [Ingall@yandex.ru](mailto:Ingall@yandex.ru)

Проблемы, связанные с изучением и пониманием действия электромагнитных полей (ЭМП) на живые организмы, в настоящее время приобретают глобальный характер, поскольку из-за активного заполнения околоземного пространства техногенными электромагнитными полями биота Земли оказалась полностью погруженной в эту электромагнитную среду. С биологической точки зрения это означает, что множество людей постоянно испытывает воздействие ЭМП широкого диапазона частот, поскольку носит при себе их источники, причем достаточно большой мощности. Это воздействие долго не признавалось значимым, и только в 1995 году ВОЗ ввело понятие «глобальное электромагнитное загрязнение окружающей среды», включившее эту проблему в перечень экологических проблем, приоритетных для человечества, и исследования в этом направлении приобрели научный статус. Однако все теоретические и экспериментальные исследования действия ЭМП ведутся на физической основе «тепловой модели», не отражающей действительную модель их действия на живые организмы. Результатом этого является несовпадение результатов теоретических исследований с экспериментальными данными для действия всего диапазона сверхслабых ЭМП на живые системы.

Ситуация существенно изменяется, если в рассмотрение ввести представление об элементарных физических процессах, в которых, как было ранее показано, действие электромагнитных полей нетепловых мощностей можно рассматривать как процессы резонансных взаимодействий квантов ЭМП разных частотных диапазонов с биополимерами, молекулярно-водными и водными комплексами клеток живого организма [1]. Эти элементарные процессы далее запускают цепи вторичных химических реакций, приводящих, в результате, к макроскопическим биологическим откликам в живых организмах. По своему эффекту действие квантов ЭМП разделяется на три области: разрушающую-ионизирующую ( $\nu \geq 10^{15}-10^{20}$  Гц); фотохимическую, преимущественно синтезирующую, ( $10^{14} < \nu < 10^{15}$  Гц) и регуляторную ( $\nu < 10^{14}$  Гц). В первых двух областях результат действия зависит, в первую очередь, от энергии квантов  $E = h\nu$ , где  $h$  — постоянная Планка. Он достаточно хорошо изучен и состоит в том, что по мере уменьшения  $E$  действие ЭМП изменяется от разрушения структуры биополимеров до активации химических реакций в молекулярных комплексах клеток. Для третьей области предлагается модель, теоретическая часть которой основана на «солитоне Давыдова» [2], т.е. на свойстве биополимеров живого организма преобразовывать поток неспецифической внешней энергии

(химической, тепловой, механической, электромагнитной) в поток солитонов, специфичных для данного биополимера и являющихся частью поля внутренней среды организма. Эта модель подтверждается многочисленными экспериментами как по прямому преобразованию энергии биополимерами и живыми тканями, так и по интенсивному действию биологических объектов друг на друга, особенно – в стадии активного роста. На основе модели и проведенных экспериментов можно полагать, что в области малых энергий квантов ЭМП их участие в физиологических процессах живого организма определяется последовательностью следующих процессов: 1 - возбуждением квантами внешних ЭМП коллективных колебаний одного из участков биополимерно-водных структур; 2 - самолокализацией колебательной энергии на осцилляторе биополимера в виде солитона; 3 - участием солитона в каком-либо из внутриклеточных молекулярных процессов; 4 - развитием нелинейного отклика на этот процесс; 5 - развитием макроскопического отклика биологической системы или биологического организма.

В качестве экспериментального примера будут сделан очень краткий обзор (перечисление) работ по взаимному влиянию друг на друга живых организмов, а также более подробно рассмотрены две работы. Первая – работа Г.Карери с соавторами [3], впервые экспериментально показавшими образование солитона при облучении первичной модели лазерным лучом. После этой работы теоретическая модель Давыдова обрела мировое признание, а образующийся при преобразовании энергии солитон стал именоваться «солитон Давыдова». Вторая - комплекс работ А.Кокая с соавторами [4], впервые экспериментально показавшими специфический для биополимера характер преобразованных солитонов, поток которых излучается облученной первичной биологической мишенью.

1. Л.Н.Галль и Н.Р.Галль. Механизм межмолекулярной передачи энергии и восприятия сверхслабых воздействий химическими и биологическими системами. // Биофизика, 2009, т.54, №3, с.563-574.
2. А.С.Давыдов. Солитоны в биологических системах. Киев. Наукова думка, 1986, 282с.
3. Careri G, Buontempo U, Galluzzi F, Scott A.C., Gratton E, Shyamsunder E. Spectroscopic evidence for Davydov-like solitons in acetanilide. // Phys. Rev., B30, p.4689-4702, (1984).
4. Кокая А.А., Козяков В.П., Мухина И.В. Специфичность действия ЭМП, преобразованного различными биоструктурами. // Вестн. Росс. ВМА., 2012; (40): 163–68.

## БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ МОРСКИХ ЭКОСИСТЕМ BIOLUMINESCENT ANALYSIS OF MARINE ECOSYSTEMS

*Гительзон И.И.*

Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск  
jigitelson@gmail.com

Характерной особенностью морских экосистем является биолюминесценция – способность излучать в оптическом диапазоне частот, обеспеченная генетически регулируемым синтезом специфических ферментов (люцифераз) и их субстратов (люциферин) у многих видов морских организмов от бактерий и беспозвоночных до рыб.

Сконструировано семейство приборов – биолюминометров, позволяющих регистрировать биолюминесцентные сигналы от поверхности до максимальных океанских глубин в режимах зондирования и на ходу судна.

Дано первое описание биолюминесцентного поля Мирового океана, и основных закономерностей его проявления.

Предлагается использовать биофизический мониторинг биолюминесценции морских экосистем, прежде всего планктонных, для слежения за их состоянием и on-line регистрации антропогенного воздействия на них.

1. Clarke G.L., Bachus R.H. Measurements of light penetration in relation to vertical migration and records of luminescence in deep-sea Animals. Deep-Sea Res. 1956, vol.4, p.1-14
2. Boden V.P., Kamra E. Records of Bioluminescence of Ocean. Pacif.Sci. 1957, vol.11, p.445-469
3. Ч. Дарвин. Дневник изысканий по естественной истории и геологии стран, посещенных во время кругосветного плавания корабля Ее Величества "Бигль" под командой капитана королевского флота Фиц Роя М-Л Биомедгиз 1935 с. 142-143
4. Beebe W. Preliminary list of Bermuda deep-sea fish. Zoologica, 1937 Vol.22, p197-206
5. Harvey E.N. Bioluminescence New-York, Academic Press, 1952 pp.649
6. Биолюминесценция в океане. И.И. Гительзон Л. А. Левин Р.Н. Утюшев О.А. Черепанов Ю.В. Чугунов. С-Петербург, Гидрометеиздат, 1992, 283 с.



## КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОЦЕССОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА KINETIC ASPECTS OF BLOOD COAGULATION AND FIBRINOLYSIS

*Гурия Г.Т.*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» МЗ РФ, Москва, [guria@blood.ru](mailto:guria@blood.ru)

Как известно, кровь в пределах физиологической нормы находится в метастабильном состоянии, то есть, являясь жидкой, она способна при определенных условиях свертываться – переходить в запolyмеризованное состояние. Такого рода переходы могут иметь место как вне системы кровообращения, так и внутри неё. При этом смена агрегатного состояния крови может стимулироваться не только за счёт поступления в кровоток через сосудистую стенку веществ из прилегающих к сосуду тканей [1], но и благодаря увеличению сверхкритического уровня сдвиговых напряжений в движущейся крови. Величина сдвиговых напряжений широко варьирует в артериальных сосудах, однако, она достигает закритических значений лишь в аномально суженных – стенозированных артериях. Местоположение таких участков артерий в системе кровообращения человека удается установить ангиографическими методами, а также методами магнитно-резонансной или ультразвуковой диагностики. Фактически сильно стенозированные участки артерий выступают в качестве «очагов объемной активации» тромбоцитов в кровотоке. Дальнейшее распространение по системе кровообращения тромбоцитов, активированных в сдвиговых потоках, приводит в конечном итоге к тромбированию дистально расположенных сосудов. В связи с чем, исследование механизмов гидродинамической активации тромбоцитов представляет большой интерес. В докладе подробно обсуждается роль конформационных изменений макромолекулярных комплексов, состоящих из факторов фон Виллебранда, обусловленных сдвиговыми напряжениями [2]. Демонстрируется как полученные в ходе рассмотрения скейлинговые закономерности могут использоваться для оценки персонализированных рисков внутрисосудистого тромбообразования и фибринолиза [3].

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №19-11-00260).

1. Rukhlenko O.S. et al. Mathematical modeling of intravascular blood coagulation under wall shear stress // PloS one, 2015, Vol. 10, N. 7, P. e0134028.
2. Zlobina K.E., Guria G.T. Platelet activation risk index as a prognostic thrombosis indicator // Scientific reports, 2016, Vol. 6, P. 30508.
3. Ivlev D.A. et al. Control of fibrinolytic drug injection via real-time ultrasonic monitoring of blood coagulation // PloS one, 2019, Vol. 14, N. 2, P. e0211646.

---

## ДНК - БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ АГЕНТОВ

### PROTEIN - DNA COMPLEXES AS TARGETS FOR DESIGN OF NEW TYPES OF ANTIVIRAL DRUGS

*Гурский Г.В., Моисеева Е.Д., Бажулина Н.П., Лепехина С.Ю., Суровая А.Н., Андропова В.Л.<sup>1</sup>,  
Никитин А. М., Гурский Я.Г.<sup>2</sup>, Гроховский С.Л., Галегов Г.А.<sup>1</sup>*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва E-mail: [gursky@eimb.ru](mailto:gursky@eimb.ru)

<sup>1</sup> Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения, Москва

<sup>2</sup> Кардиологический научно-производственный комплекс, Москва

Мишенью для противовирусного действия димерных производных антибиотика нетропсина являются комплексы, образуемые хеликазой UL9 вируса простого герпеса типа 1 с началом репликации вирусной ДНК: два сайта OriS и один сайт OriL. В настоящее время установлено, что бис-нетропсины подавляют инициацию репликации ДНК вирусов герпеса типа 1 и 2, вируса осповакцины, а также влияют на инициацию репликации плюс-нити ДНК ВИЧ-1(1-3).

Согласно данным ДНКазного футпринтинга бис-нетропсины избирательно связываются с А+Т-кластером в начале репликации OriS вируса простого герпеса типа 1. Они повышают температуру плавления А+Т-кластера и ингибируют вызванное тепловыми флуктуациями раскрытие А+Т-пар оснований, которое необходимо для инициации процесса раскручивания ДНК хеликазой UL9 и вирусным белком ICP8. Согласно с результатами измерений эффективности резонансного переноса энергии (метод FRET) между флуоресцентными зондами, присоединенными ковалентно к 3'- и 5'- концам олигонуклеотида, соответствующего верхней или нижней нитям минимального дуплекса OriS, связывание хеликазы UL9 с OriS сопровождается конформационными изменениями, которые соответствуют образованию структуры Холлидея, включающей специфические связывающие места I и II для хеликазы в OriS и А+Т-кластер между ними.

Связывающие места I и II являются обратными повторами. Это открывает возможность для миграции точки кроссовера в специфической структуре Холлидея в присутствии АТФ. Белок связывается с модельными 3-х и 4-х нитевыми структурами, которые образуются в растворе при отжиге неспецифических олигонуклеотидов. Он связывается менее прочно с линейной двутяжевой и однотожевой ДНК. Если один из двуспиральных участков в структуре Холлидея содержит однотожевый “хвост” (20 нт) на 3'-конце, то хеликаза UL9 в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  (10 мМ) и АТФ (5 мМ) катализирует процесс диссоциации структуры Холлидея на два частичных дуплекса, каждый из которых содержит олигонуклеотид с неспаренными нуклеотидами (20 нт) на 3'-конце. Белок образует три типа комплекса с модельной структурой Холлидея. Комплексы 1 и 2 соответствуют связыванию одного и двух димеров белка на олигомер ДНК и обнаруживают сходство со связыванием одного и двух тетрамеров белка RuvA *E. coli* со структурой Холлидея в “открытой” форме. Что касается третьего типа комплекса хеликазы UL9, то он образуется в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  и соответствует связыванию UL9 со структурой Холлидея в компактной “стэкинг” Х-форме. Мы обнаружили, что в присутствии вирусного белка ICP8 при температуре 40 °С наблюдается локальное разделение цепей ДНК. Структура Холлидея является важной промежуточной формой для образования расплетенной петли в начале репликации.

Наши результаты показывают, что возможно создание двух типов ингибиторов процесса инициации репликации, один из которых включает низкомолекулярные лиганды – бис-нетропсины и их аналоги, которые связываются избирательно с А+Т-кластером в OriS и стабилизируют OriS в форме линейного дуплекса. Вторая группа ингибиторов инициации репликации вирусной ДНК включает соединения, которые связываются со структурой Холлидея в “открытой” форме и подавляют миграцию точки кроссовера и АТФ-зависимый процессинг структуры Холлидея.

Работа поддержана Программой Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и грантом РФФИ № 18-04-01376.

1. Andronova V.L. et al. Antiviral and Cytotoxic Activity of Netropsin Derivatives in Vero Cells Infected with Vaccinia Virus and Herpes Simplex Virus Type 1 // Doklady Biochem. Biophys. 2008. Vol. 422. P. 296-301.
2. Bazhulina N.P. et al. Complex of the herpes simplex virus type1 origin-binding protein UL9 with DNA as a platform for the design of a new type of antiviral drugs // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. Vol. 32. P. 1456-1473.
3. Moiseeva E.D. et al. Targeting Holliday junctions by origin DNA binding protein of Herpes simplex virus type 1 // J. Biomol. Struct. Dyn. 2017. Vol. 35 P. 704-723.

## НОВЫЕ ЭФФЕКТЫ МАЛОРАЗМЕРНЫХ МОДЕЛЕЙ СИСТЕМЫ «БИОСФЕРА-КЛИМАТ»

## NEW EFFECTS OF SMALL DIMENSION MODELS OF THE SYSTEM «BIOSPHERE-CLIMATE»

*Дегерменджи А.Г.*

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, [ibr@ibr.ru](mailto:ibr@ibr.ru)

Экстраполяция наблюдаемых трендов глобальных параметров в будущее указывает на возможность существенных изменений параметров биосферы и климата Земли [1]. В частности, темпы увеличения концентрации углерода в атмосфере являются беспрецедентными за последние 20 тыс. лет. Глобальная средняя температура земной поверхности с 1860 г. повысилась на 0,8°C, в то время как за последние 10 000 лет со времён последнего ледникового периода температура Земли повысилась всего на 5°C (скорость увеличения температуры выросла на порядок). Оценка темпов, масштабов и степени необратимости этих изменений представляет собой, без сомнения, одну из актуальнейших задач, стоящих перед современной наукой. Кроме того, ни в последние 420 тыс. лет, ни, вероятно (с надёжностью 66-90%), в течении последние 20 млн. лет концентрация CO<sub>2</sub> не была столь высокой, как на сегодняшний момент [1].

**Глобальный уровень.** Исходная малоразмерная модель системы биосфера-климат (СБК) включает интегрированное описание в трех поясных кластерах Земли динамики содержания форм углерода в наземной экосистеме (растения и почва), океане и атмосфере при разных сценариях сжигания топлив и с учетом парникового механизма изменения климата [2]. Показана малая биологическая роль океана в сезонной планетарной динамике CO<sub>2</sub> за счет быстрых скоростей в экологической океанической системе «автотроф-гетеротроф». Установлен принципиально новый эффект, вызванный положительной обратной связью: существование «даты необратимости», после которой остановка сжигания топлив не прекращает потепление климата за счет дополнительного окисления почвенной органики и эмиссии CO<sub>2</sub>. Получены аналитические и численные оценки этой даты.

Расширенная модель СБК учитывает выделение CO<sub>2</sub> и CH<sub>4</sub> из почвенной органики зоны вечной мерзлоты. Представлены основные пути потока углерода по метановой ветви его превращений. Учтен вклад метана в глобальный парниковый эффект. Оценена также возможность положительной обратной связи локального повышения температуры на скорость процессов выделения углерода (саморазогрев почв). В силу установленной важности почв на баланс CO<sub>2</sub> создан новый класс математического описания динамики

почвенной органики в координатах «уровень гумификации – глубина слоя» Получены оценки вклада зоны вечной мерзлоты и метановой ветви круговорота углерода в глобальную динамику для различных значений параметров СБК модели, находящихся внутри интервалов оценок.

**Региональный уровень.** Построена математическая модель тундровых экосистем Арктики и Сибири. Ее цель — предсказать будущее поведение тундровых экосистем, обусловленное глобальным изменением климата. Модель описывает основные процессы в системе (фотосинтез тундровой фитомассы, аэробное и анаэробное дыхание, влияние освещенности, температуры и водного баланса) и включает физико-химическую подмодель, описывающую динамику замерзания-таяния вечной мерзлоты, а также блок, описывающий выделение метана и углекислого газа из тундровых и лесотундровых почв вечной мерзлоты. Разработана и создана герметичная вегетационная камера (минизкосистема), в которой возможно поддерживать температуру, влажность и освещенность, приближенные к климатическим условиям северных широт в весенне-летний периоды. Проведены эксперименты, направленные на изучение реакции экспериментальной искусственной экосистемы «фототрофное звено – корнеобитаемый субстрат» на повышение температуры воздуха и почвы на 2<sup>0</sup>С в течение весенне-летнего периода в тундровой зоне, оцениваемой по интенсивности выделения или поглощения CO<sub>2</sub>. Показано, что такое повышение может привести к серьезному сдвигу в балансе выделения и поглощения CO<sub>2</sub> в экосистеме – от в целом близкого к нулевому до стабильного выделения CO<sub>2</sub> с интенсивностью 25 ppm/час на вегетационную камеру. При этом ведущую роль, вероятно, играют процессы разложения органических остатков в почвенном слое, подверженном оттаиванию в летний период.

Предложен метод баланса пограничного слоя для определения потока CO<sub>2</sub> (NEE), использующий точечную модель для концентраций углекислого газа в атмосфере и измеренные на высотных вышках профили концентраций CO<sub>2</sub> в атмосфере. Этим методом найдены оценки среднегодового потока углерода в пяти регионах умеренных широт северного полушария. Показано, что регион вокруг станции высотной (300 м) мачты «Зотино» (Красноярский край) является накопителем углерода до 180 гС/(м<sup>2</sup> \*месяц) в среднем по году. Дополнительно еще два независимых метода (прямой экспериментальный и расчет по модели подстилающей поверхности) подтверждают этот результат. Сопоставлен вклад новых тепличных компонент в потепление климата по региональным и глобальным малоразмерным моделям.

В целом взаимодействие глобальной малоразмерной и региональных математических моделей создает фундамент как для понимания основных механизмов изменения климата, так и для последствий его изменения.

1. IPCC, Special Report, 2018, <https://www.ipcc.ch/sr15>
2. Bartsev S.I., Degermendzhi A.G., Sarangova A.B. Stability of the Biosphere and Sustainable Development: A Challenge to Biospherics // Journal of Siberian Federal University. Biology, 2017, V. 10 (2), P. 134-152.

## ДИНАМИКА МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ВОДЕ

## DYNAMICS OF INTERMOLECULAR INTERACTIONS IN WATER

*Дроздов А.В.*

Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, E-mail: da@biophys.ru

Согласно двухструктурным моделям [1], вода имеет локальные различия структуры с постоянной динамикой взаимных переходов. Предполагается, что именно динамика этих взаимных переходов в воде отвечает за многие биологические явления, в том числе за биоритмы.

Биоритм – это периодическое изменение характера и интенсивности биологических процессов и явлений. Выяснение природы биоритмов, механизма их формирования и поддержания является актуальной задачей современной науки о живом. Общепринятой теории функционирования «биологических часов» не существует. В научных кругах в основном обсуждаются три основных молекулярно-биохимических гипотезы: 1) автоколебания биохимических процессов, 2) генетическая регуляция и 3) автоколебания мембранной проницаемости.

Ранее в работе [2] при исследовании физико-химических свойств воды было выявлено, что изменения физических характеристик воды подчиняются определенным закономерностям. Во всех экспериментах, независимо от используемого метода молекулярно-структурного анализа (ИК-спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, кондуктометрия, СВЧ-радиометрия, ЯМР в магнитном поле Земли и др.), наблюдались близкие по значению и хорошо воспроизводимые периоды колебаний измеряемых величин. Значения этих периодов составляют: 1–3; 5–9; 10–13; 14–18; 20–28; 30–39; 41–55 и ~ 60 мин.

Для того чтобы в молекулярной системе наблюдался колебательный суммарный эффект внутри- и межмолекулярных преобразований, необходима синхронизация квантовых переходов между различными состояниями молекул. Прежде всего, необходимо добиться, чтобы внутримолекулярные превращения совершались во всех молекулах среды (или большей ее части) одновременно, синфазно. Квантовые переходы в молекулах должны быть в достаточно высокой степени когерентны. С другой стороны, для проявления эффекта

периодичности нужен резонанс между состояниями, отвечающими основным уровням энергии, что в реальных условиях маловероятно, поскольку все уровни системы находятся в возбужденном состоянии. Однако эффект периодичности может наблюдаться и при резонансе возбужденных уровней, но для этого необходимо постоянное внешнее воздействие.

Возможно, именно на это указывают полученные нами результаты измерения физических свойств воды. На рис. 1 представлена характерная динамика интегральной интенсивности ЯМР сигнала в магнитном поле Земли. Полученные результаты свидетельствуют о том, что процессы взаимных переходов между локальными структурными неоднородностями в воде – упорядочены или точнее квазипериодичны.

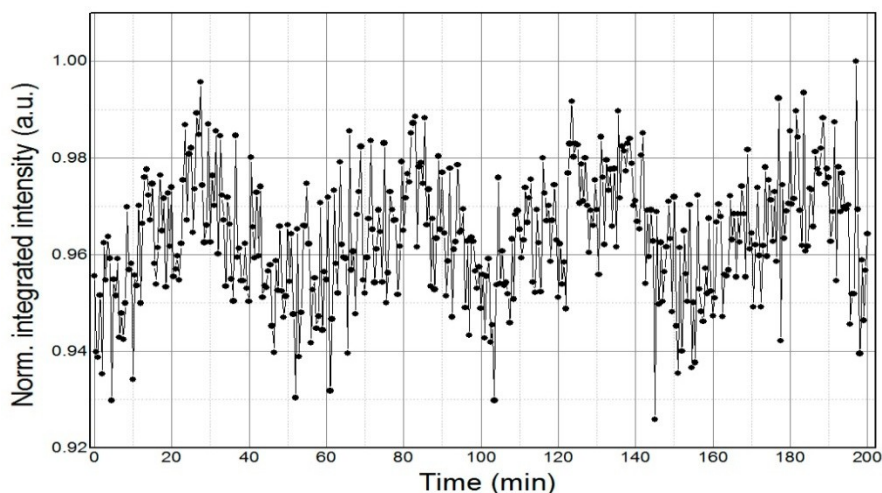


Рис. 1. Динамика интегральной интенсивности ЯМР сигнала в магнитном поле Земли [2].

В эволюционном плане именно космофизическая ритмика может выступать как ведущий синхронизирующий фактор биологических процессов. К настоящему времени известны периоды солнечных пульсаций в минутном диапазоне: ~12 мин, ~17 мин, ~27 мин, ~32 мин, ~45 мин, ~57 мин [3]. Обнаруженные в работе [2] периоды в изменениях физико-химических свойств воды, периоды биологической активности целостного организма [4-6], а так же хорошая сопоставимость этих значений с ритмами космической погоды [3], с нашей точки зрения, является указанием на важную роль воды в передаче сигналов физической природы биологическим объектам.

С нашей точки зрения, одним из важных факторов, в том числе определяющим формирование в водосодержащих жидкостях устойчивых колебательных процессов, является взаимодействие молекул воды с внешними электромагнитными полями и излучениями. Так в частности, наличие в составе воды молекул с магнитными моментами (*орто*-молекулы) может быть причиной изменения параметров межмолекулярного взаимодействия в переменных и постоянных магнитных полях.

Полученные результаты позволяют выдвинуть предположение, что в основе биоритмов может лежать как периодичность физико-химических процессов, определяемая колебательной природой межмолекулярных взаимодействий в воде, так и изменениями проницаемости клеточных мембран за счет изменения соотношения *орто*-/*пара*-молекул, приводящее к изменению физических свойств внутриклеточной воды.

Подводя итог вышесказанному, можно предположить, что космофизические факторы (влияющие на магнитное поле Земли и его вариации) могут быть причиной синхронизации работы живых клеток любого биологического организма. Действие магнитного поля, проникающего непосредственно на уровень каждой клетки, может быть направлено на любой из магнитных моментов, присутствующих в биологической системе (спин электрона свободного радикала, ядерный магнитный момент, орбитальный магнитный момент, магнитный момент *орто*-молекул воды и т.п.). Эти магнитные моменты становятся своего рода «антеннами» внутри биологических объектов, которые могут воспринимать управляющее воздействие от внешних электромагнитных полей [7].

1. Самойлов О.Я./ Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов. М. АН СССР, 1957.
2. Дроздов А.В., Нагорская Т.П., Биофизика 59 (6) 1195 (2014) [www.biophys.ru/archive/h2o-00034.pdf](http://www.biophys.ru/archive/h2o-00034.pdf)
3. Владимирский Б.М., Конрадов А.А., Ученые записки Таврического национального университета, серия «Биология, химия» 20 (59), № 1, 92 (2007).
4. Зенченко Т.А., Медведева А.А., Хорсева Н.И. и др. Геофизические процессы и биосфера т.12, № 4, 73 (2013), [www.biophys.ru/archive/rhythm-00001.pdf](http://www.biophys.ru/archive/rhythm-00001.pdf)
5. Зенченко Т.А., Медведева А.А., Поскотинова Л.В. и др. Биофизика 59 (6) 1186 (2014), [www.biophys.ru/archive/rhythm-00002.pdf](http://www.biophys.ru/archive/rhythm-00002.pdf)
6. Дроздов А.В., Нагорская Т.П., Биофизика 60 (2) 316 (2015) <http://www.biophys.ru/archive/rhythm-00005.pdf>
7. Дроздов А.В., Нагорская Т.П., Масюкевич С.В., и др., Биофизика Т. 55, вып. 4, 740 (2010), [www.biophys.ru/archive/lednev2010/drozdv.pdf](http://www.biophys.ru/archive/lednev2010/drozdv.pdf)



**ПУТЕШЕСТВИЯ В «АНОМАЛЬНЫЕ ЗОНЫ» КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ.****TRAVEL TO THE "ANOMALOUS ZONES" OF THE CELL WITH THE HELP OF COMPUTATIONAL BIOPHYSICS.***Ефремов Р.Г.<sup>1-2</sup>*<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва  
(r-efremov@yandex.ru)<sup>2</sup>НИУ Высшая школа экономики, Москва

Появившиеся в распоряжении исследователей модели пространственной структуры высокого разрешения сложных надмолекулярных белок-мембранных и др. систем, наряду с результатами их атомистического компьютерного моделирования, выявили существование целого ряда своеобразных «аномальных зон» в таких объектах. В настоящей работе на основании результатов вычислительных экспериментов проведен анализ физико-химических и динамических свойств молекулярных систем в указанных областях. Показано, что свойства последних могут кардинально отличаться от обычно наблюдаемых макроскопических средних значений. Их характерными чертами являются замкнутые (не сообщающиеся с внешней средой) объемы нанометрового масштаба с необычным поверхностным распределением гидрофобных и др. свойств; крайне гетерогенное пространственное распределение плотности и неброуновская диффузия воды и/или липидов; важная роль стохастических явлений атомарного масштаба, способных вызывать макроскопические процессы (открытие/закрывание канала и пр.). Яркими примерами подобных «зон» служат трансмембранные поровые домены некоторых ионных / водных каналов, область ацильных цепей липидного бислоя клеточных мембран и внутренний объем т.н. белок/РНК-богатых клеточные «капель». В качестве изучаемых объектов выбраны мембранный сенсор температуры – тетрамерный ионный канал TRPV1 - и ряд гидратированных липидных бислоев различного состава. На основании проведенных расчетов молекулярной динамики указанных систем сделан вывод о том, что, созданные природой и присущие физиологически активным состояниям клетки, эти объекты по ряду характеристик сходны с искусственными нано-системами, например, нанотрубками и пр. Детальный анализ структуры, динамического поведения и других параметров рассматриваемых «аномальных зон» возможен при использовании современных методов структурной биологии высокого разрешения и биофизического вычислительного эксперимента. Понимание на молекулярном уровне физических процессов в таких «областях скупенности», особенностей их структурной организации и работы в клетке позволит лучше понять фундаментальную роль локальных явлений в подобных компартментах, создать на их основе новые наноматериалы с необычными свойствами.

Работа поддержана Российским научным фондом (18-14-00375) и Российским фондом фундаментальных исследований (19-04-00350).

**КОДИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ИМПУЛЬСАМИ МЕДЛЕННОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ IN VITRO****ENCODING OF NEURONAL ELECTRICAL ACTIVITY BY THE PULSE OF SLOW DEPOLARIZATION IN VITRO***Зинченко В.П.<sup>1</sup>, Теплов И.Ю.<sup>1</sup>, Долгачева Л.П.<sup>1</sup>, Тулеуханов С.Т.<sup>2,\*</sup>*<sup>1</sup> Институт клеточной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия. vpz@mail.ru<sup>2</sup> Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, Алматы, Казахстан, sultan.tuleuhanov@kaznu.kz

Спонтанная синхронная активность (ССА) нейронов мозга наблюдается в развивающейся центральной нервной системе в различных разделах мозга. ССА сопровождается пачечной активностью и синхронными импульсами  $Ca^{2+}$ . Деполяризация, вызванная медленными кальциевыми каналами является фактором кодирующим сигнал электрической активности нейрона. В работе исследованы закономерности изменений частоты и амплитуды потенциалов действия (ПД) в зависимости от параметров  $Ca^{2+}$ -импульса медленной деполяризации в нейронах гиппокампа в культуре. Используя флуоресцентный анализ изображения для регистрации концентрации  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) и петч-кламп для регистрации мембранного потенциала мы показали, что деполяризация, вызванная ингибиторами ГАМК(A)-рецепторов, приводит к изменению режима ССА нейронов. При этом тоническая генерация ПД с частотой 2-3 Гц без изменения  $[Ca^{2+}]_i$  прерывается пачечной активностью, которая сопровождается импульсами медленной деполяризации и  $[Ca^{2+}]_i$ . Ингибитор кальциевых каналов Т-типа, ML218, подавляет этот процесс. В режиме фиксации напряжения деполяризационный сдвиг увеличивал частоту и уменьшал амплитуду ПД в пачке пропорционально степени деполяризации. При достижении уровня деполяризации выше  $-17 \pm 2$  мВ электрическая активность нейронов подавлялась сразу

после первого импульса ПД, обнаруживая полную инактивацию  $\text{Na}^+$ -каналов и невозможность реактивации  $\text{Na}^+$ -канала при этих потенциалах. Величина постгиперполяризации при этом составляла -30 мВ, что можно считать критическим средним потенциалом реполяризации  $\text{Na}^+$ -каналов. На переднем фронте импульса медленной деполяризации частота ПД может либо возрастать, либо уменьшаться, в зависимости от того, какая фаза роста попадает на область генерации ПД (threshold). Если аппроксимировать передний фронт импульса медленной деполяризации S-образной кривой, то при попадании потенциала возбуждения на начальный участок кривой, соответствующий возрастанию производной, наблюдается рост частоты ПД, а при попадании на конечный участок S-образной кривой, соответствующий уменьшению производной, наблюдается уменьшение частоты ПД. Причем, чем выше скорость деполяризации, тем выше частота генерации ПД. В то же время, при увеличении деполяризации, амплитуда ПД уменьшается благодаря инактивации части натриевых каналов. Если амплитуда импульса медленной деполяризации превышала потенциал реактивации  $\text{Na}^+$  каналов, то генерация ПД прекращалась. Однако увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , происходящее в это время, активировало кальций-зависимые  $\text{K}^+$ -каналы, что приводило к медленному уменьшению амплитуды деполяризации, реактивации  $\text{Na}^+$ -каналов, и постепенному увеличению амплитуды ПД. Частота ПД, генерируемая на заднем фронте импульса медленной деполяризации, уменьшалась до 3-4 Гц за счет уменьшения входящего/деполяризующего тока и появления быстрых осцилляций кальциевого потенциала (микрочаек ПД). Благодаря быстрой активации деполяризующего  $\text{Ca}^{2+}$ -канала только один ПД успевает генерироваться на переднем фронте микрочапки. Амплитуда микрочапки постоянна и равна максимальной амплитуде импульса медленной деполяризации. Вследствие этого генерация ПД в максимуме микрочапки подавляется благодаря инактивации  $\text{Na}^+$  каналов. Частота ПД в этом случае совпадает с частотой активации кальциевого канала и составляет 3-4 Hz. Терминация пачки ПД происходит благодаря увеличению  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{K}^+$  каналов, и инактивации потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$  каналов. В результате этих процессов мембрана гиперполяризуется более чем на 10 мВ ниже критического потенциала, что приводит к подавлению генерации ПД, активации HCN-подобных каналов и реактивации натриевых и потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$  каналов. Активность HCN-подобных каналов при гиперполяризации увеличивается, мембрана медленно деполяризуется, и потенциал достигает критического значения, при котором начинается тоническая генерация ПД. Кальциевый канал открывается несколько позже и генерирует  $\text{Ca}^{2+}$ -потенциал и увеличивает  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Таким образом, кальциевые каналы, определяющие импульс медленной деполяризации, контролируют частоту и амплитуду ПД во время ССА, регулируя условия активации и инактивации  $\text{Na}^+$  каналов. Индивидуальная форма  $\text{Ca}^{2+}$ -импульса нейронов, отражающая индивидуальные различия в экспрессии белков  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем, представляет широкие возможности для кодирования электрической активности нейронов и реализации преимущественных путей передачи определенной информации.

Некоторые детали этой работы опубликованы: Teplov I.Yu., Tuleukhanov S.T., Zinchenko V.P. Regulation of action potential frequency and amplitude by T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel during spontaneous synchronous activity of hippocampal neurons// Biophysics, 2018, Vol. 63, No. 4, pp. 566–575.

## РОБОТ И ЧЕЛОВЕК. ГДЕ НАХОДИТСЯ ПРЕДЕЛ ИХ СХОДСТВА?

### THE ROBOT AND THE HUMAN. WHERE'S THEIR SIMILARITY LIMIT?

*Г.Р. Иваницкий*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН.  
142290, Московская обл. Пущино, Институтская ул. 3, Российская Федерация  
E-mail: ivanitsky@iteb.ru

Всё, что можно описать математически, можно реализовать в виде алгоритма. Возникает вопрос: существуют ли такие биопроцессы, информация о которых не поддается сжатию? Краткий ответ: да, существуют. Их реализация в системах искусственного интеллекта ограничивается, с одной стороны, большими затратами характерного времени, с другой, — возникновением неопределенностей. Показано, что основная цель робота и человека — обеспечить динамическую устойчивость в условиях изменения внешней среды. Человеческий мозг по сравнению с компьютерным "мозгом" робота имеет многоуровневую иерархическую организацию, в которой обработка информации происходит на всех уровнях — от квантового до социального. Человек сам ставит цель, совершенствуя виртуальную модель, которая синтезируется его мозгом. Мозг человека может работать на основе одновременного использования как классической детерминированной логики, так и диалектической вероятностной логики. В искусственном интеллекте робота не должна формироваться собственная цель. Это и есть ограничивающий сходство между роботами и человеком. Программисты в искусственный интеллект роботов должны закладывать лишь алгоритмы, способствующие оптимальному выбору пути к достижению той цели, которую поставил Человек — создатель робота. Постановка цели всегда должно сохраняться за человеком и он несет ответственность за её постановку. Логично предположить, что создание креативных андроидных роботов — это опасный этап антропогенного

преобразования внешней среды. В случае ошибки он может быть и последним в судьбе человечества. У Робота, самостоятельно формирующего цель, поскольку он «мыслит» другими категориями, может появиться любая "мысль", вплоть до случайного или намеренного уничтожения своего создателя.

1. Иваницкий Г.Р. Робот и Человек. Где находится предел их сходства? // Успехи физических наук. 188 965—991 (2018); Ivanitskii G.R. The robot and the human. Where's their similarity limit? // Physics-Uspekh 61 871 (2018).

---

## **ГЕНЕТИКА, БИОИНФОРМАТИКА, СИСТЕМНАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ БИОЛОГИЯ** **GENETICS, BIOINFORMATICS, SYSTEMS COMPUTER BIOLOGY**

*Колчанов Н.А.*

*Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,  
kol@bionet.nsc.ru*

В последнее десятилетие в мировой генетике происходит информационный взрыв. По имеющимся оценкам к 2025 году объем геномных данных в области фундаментальной биологии, биомедицины, биотехнологии, агробиотехнологии превысит в несколько раз объем данных в астрономии и социальных сетях. Необходимость быстрого и глубокого анализа больших генетических данных для решения научных и практических задач в области живых систем привела к широкому использованию методов биоинформатики, системной компьютерной биологии, искусственного интеллекта и машинного обучения. В докладе рассмотрено применение этих подходов к решению таких задач, как: (а) интеграция, анализ и интерпретация геномных, транскриптомных, протеомных, метаболомных данных; (б) идентификация сайтов связывания транскрипционных факторов в регуляторных районах генов, оценка влияния мутаций в этих регуляторных районах на экспрессию генов; (в) реконструкция генных сетей, выявление молекулярно-генетических механизмов формирования патологий, поиск генов, вносящих максимальный вклад в формирование целевых фенотипических (клинических) признаков, контролируемых генными сетями и на этой основе - предсказание наиболее перспективных мишеней для терапии заболеваний; (г) изучение реконструкция генетических механизмов регуляции морфогенеза растений, (д) анализ особенностей молекулярной эволюции генных сетей и молекулярно-генетических систем и (е) компьютерный дизайн экспериментов по созданию штаммов – суперпродуцентов биотехнологически значимых продуктов.

Благодарности: В.А. Иванисенко, М.П. Пономаренко, И.В. Чадаевой, Н.А. Алемасову, В.Г. Левицкому, В.В. Мироновой, Т.В. Иванисенко, Н.В. Иванисенко, С.А. Лашину.

---

## **ФОТОНИКА И БИОФОТОНИКА СИНГЛЕТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА** **PHOTONICS AND BIOPHOTONICS OF SINGLET MOLECULAR OXYGEN**

*Красновский А.А.*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп. 33, к.2, РФ  
e-mail: phoal@mail.ru.*

Фотоника и биофотоника молекул кислорода является бурно развивающейся областью знаний, которая находится на пересечении нескольких наук от квантовой механики и спектроскопии, до химии, фотохимии, экспериментальной биологии и медицины. Основателем фотоники  $O_2$  является петербургский естествоиспытатель Н.Г. Егоров, который в 80-е годы XIX столетия доказал, что самые яркие темнокрасные Фраунгофферовы линии (при 688 и 762 нм) в спектре поглощения атмосферы принадлежат молекулярному кислороду. Это открытие стало началом детального исследования спектроскопии молекулярного кислорода в атмосфере, при высоком давлении, а также в сжиженном и твердом состояниях, что, в свою очередь, привело к расшифровке его электронной структуры. В частности, было показано, что основное состояние молекулы кислорода является триплетным, выявлены низколежащие возбужденные синглетные состояния, показано, что фотоника кислорода основана на электронных переходах между этими состояниями в мономерных и димерных молекулах кислорода (Малликен, 1928 г.). Хотя все эти переходы квантово-механически запрещены и поэтому мало интенсивны, тем не менее, абсорбционные полосы кислорода обнаруживаются в УФ, видимой, красной и ИК областях. Кроме того, молекулы кислорода излучают флуоресценцию и фосфоресценцию, способны акцептировать энергию от соответствующих доноров и передавать энергию соответствующим акцепторам. Работы Каутски в 1933-1939 гг. и Теренина в 1943-1944 гг. обосновали механизмы фотосенсибилизированного красителями образования синглетного кислорода в газовой фазе. Фут и др. в 1964 г., используя ловушки

синглетного кислорода, доказал, что тот же механизм работает в растворах и определяет фотодинамическое действие красителей. Открытие фотосенсибилизированной люминесценции синглетного кислорода (СК) в пигментных растворах закрепило эту точку зрения [1]. Ее измерение стало основным методом биофотоники кислорода. В докладе предполагается кратко рассмотреть развитие следующих проектов: (1) спектральные и кинетические параметры фосфоресценции СК в органических, водных и биологических системах; (2) квантовый выход и радиационное время жизни СК в растворах и клетках; (3) фотолюминесценция сенсибилизированная двумя молекулами СК (димоли и SOSDF); (4) исследование абсорбционных свойств молекулярного кислорода, основанное на его прямом лазерном возбуждении. Основное содержание этих проектов изложено в обзорных статьях автора [2-4] и в цитированных в них экспериментальных исследованиях. В настоящее время представления биофотоники O<sub>2</sub> служат основой для понимания широкого круга фундаментальных проблем фотобиологии и фотомедицины, а также для прикладных задач фото- и лазерной терапии.

1. Красновский А.А. /Биофизика, 1976, Т. 21, С.748-749.
2. Krasnovsky A.A. / Biophysics, 2004, V. 49, 289-306.
3. Krasnovsky A.A. /In: Photodynamic therapy at the cellular level. A.B. Uzdensky, editor, 2007, P. 17-62, Research Signpost, Trivandrum-695 023, Kerala, India.
5. Krasnovsky A.A. / J. Photochem. Photobiol.: A: Chem. 2008, V. 196, P. 210-218.
6. Красновский А.А. / В монографии: “Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии”, ред. А.И. Григорьев и Ю.А. Владимиров, 2015, Т. 1, С.173-217, Макс Пресс, Москва.
7. Krasnovsky A. A, Kozlov A. S., Laser photochemistry of oxygen. Journal of Biomedical Photonics & Engineering, 2017, 3 (1), 010302 (1 – 10).
8. Krasnovsky A.A., J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, 2018. V. 354, з. 11-24.
9. Krasnovsky A.A., Benditkis A. S, and Kozlov A. S. Biochemistry (Moscow), 2019, Vol. 84, No. 2, pp. 153-163.

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОНАНОЭЛЕКТРОНИКИ

## THEORETICAL BASES OF BIONANO ELECTRONICS

*В.Д.Лахно*

Федеральный исследовательский центр Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН  
(ИМПБ РАН - филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН), г. Пущино, lak@impb.ru

Доклад посвящён современным проблемам бионанoeлектроники и её возможным приложениям. Продемонстрировано, что конструирование будущих бионанoeлектронных устройств может быть основано на использовании молекулы ДНК и её проводящих свойств. В докладе рассмотрены также свойства ДНК как наличие зонной структуры, электронных блоховских осцилляций, поляронных состояний в ДНК, движение полярона в полинуклеотидной цепочке в электрическом поле, температурная зависимость электронной и дырочной подвижности в PolyG/PolyC цепочках, индуцированный температурой распад поляронных состояний, электронные и дырочные фазовые переходы и электронная теплоёмкость.

Работы выполнены при поддержке РФФ, проект № 16-11-10163.

## САМООРГАНИЗАЦИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ СИЛЬНО РАЗБАВЛЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ.

## SELF-ORGANIZATION AND EVOLUTION OF HIGHLY DILUTED AQUEOUS SOLUTIONS.

*Лобышев В.И.*

*Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова. Ленинские горы 1/2, Москва, 1199910*

Ранее нами было показано, что растворы дипептидов при малых концентрациях (менее 10<sup>-6</sup> М) склонны к самоорганизации с образованием мезочастиц размером порядка 100 нм [1]. Эти частицы ведут себя подобно кристаллофосфорам и характеризуются резким увеличением интенсивности флюоресценции. Аналогичное проявление люминесцентных характеристик было обнаружено в растворах хлористого натрия при последовательных разбавлениях, сопровождавшихся интенсивным встряхиванием (потенцированием) [2, 3]. При концентрации соли в области 10<sup>-12</sup> – 10<sup>-13</sup> М наблюдается максимум интенсивности флюоресценции. Параллельно была исследована спонтанная двигательная активность пресноводных одноклеточных организмов *Spirostoma ambiguum* где была впервые показана высоко значимая корреляция ( $|r| = 0,93$ ) между результатами реакции живых организмов и оптическими характеристиками соответствующих растворов [3], что говорит о том, что для биологического эффекта важна не только концентрация раствора, но и способ его приготовления. Позднее методом NTA (nanoparticle tracking analysis) мы обнаружили в этой области концентраций хлористого

натрия наличие мезочастиц размером 96 – 115 нм в количестве  $3 \pm 2 \cdot 10^8$  частиц/мл. Показано также, что люминесцентные характеристики разбавленных водных растворов испытывают спонтанные долговременные переходные процессы, причем в начальном, далеком от равновесия состоянии, водный раствор оказывается весьма чувствительным к слабым воздействиям электромагнитной природы [4, 5].

В продолжение этих работ проведено исследование комплексных электрических характеристик сильно разбавленных растворов диклофенака в диапазоне частот 20 Гц – 10 МГц с помощью прецизионного анализатора импеданса WK 65120 BD1 (Wayne Kerr Electronics) в кювете с коаксиальными цилиндрическими электродами из титана [6]. Широкий диапазон частот позволил отделить объемные свойства раствора от поляризационных явлений, связанных с особенностями диффузии ионов в двойном электрическом слое вблизи металлических электродов. Зарегистрирована немонотонная зависимость электропроводности сильно разбавленных водных растворов диклофенака от концентрации при последовательных сотенных разбавлениях, сопровождающихся активным встряхиванием. Немонотонная зависимость наблюдается также при дальнейшем разбавлении растворов по этой технологии, в которых понятие концентрации исходного вещества теряет смысл и можно говорить лишь о паттернах измеряемых параметров от степени разбавления. Электропроводность образцов эволюционирует в течение длительного времени хранения образцов в закрытых флаконах из стекла в темных коробках при комнатных условиях, причем электропроводность увеличивается, а экстремумы становятся более контрастными. Диэлектрическая проницаемость при этом на частотах 100 кГц – 3 МГц остается практически постоянной (с точностью 0.2%). Релаксационных процессов и инкремента диэлектрической проницаемости в растворах не наблюдается. На низких частотах 1 кГц – 20 Гц емкость значительно возрастает, особенно с ростом электропроводности раствора, но это связано с особенностями диффузионного процесса на границе раздела раствор – электрод и непосредственного отношения к объемным свойствам раствора не имеет.

Исследована также электропроводность воды I класса с удельным сопротивлением 18, 2 МОм\*см. В открытом тефлоновом сосуде величина удельного сопротивления уменьшается вдвое за 20 минут и продолжает уменьшаться длительное время за счет растворения углекислого газа, содержащегося в воздухе. Электропроводность свежей воды в полностью заполненных, закрытых стеклянных пробирках повышается с 1 мкСм/см до 2 мкСм/см за 1 час и далее сохраняется в течение 120 ч. Это является наглядным подтверждением того, что используемая в экспериментах вода всегда является раствором.

1. Лобышев В.И., Рыжиков Б.Д., Шихлинская Р.Э., Т.Н.Мазурова. Собственная люминесценция воды и сильно разбавленных растворов дипептидов // Биофизика, 1994, т.39, вып.4, с.565-570.
2. Lobyshev V.I., Tomkevitch M.S. Luminescence Study of Homeopathic Remedies // “Optical Diagnostics and Sensing of Biological Fluids and Glucose and Cholesterol Monitoring”, A.V. Priezzev, G.L. Cote, editors, Proc. of SPIE, v.4263, 2001, pp. 59-64.
3. Лобышев В.И., Томкевич М.С., Петрушанко И.Ю. Экспериментальное исследование потенцированных водных растворов // Биофизика, 2005, т.50, вып.3, с. 464-469.
4. Лобышев В.И., Рыжиков Б.Д., Шихлинская Р.Э. Спонтанные и индуцированные внешними электромагнитными полями долговременные переходные процессы в разбавленных водных растворах глицилтриптофана и воде // Биофизика т.43, 1998, с.710-716.
5. Lobyshev V.I. Long scale evolution of luminescent properties of water and glycytryptophan solutions, influence of UV irradiation. // “Optical Diagnostics of Biological Fluids IV”, A.V.Priezzev, Toshimitsu Asakura, editors, Proc. of SPIE, v.3599, 1999, pp.52-57.
6. Lobyshev V.I. Dielectric Characteristics of Highly Diluted Aqueous Diclofenac Solutions in the Frequency Range of 20 Hz to 10 MHz // Physics of Wave Phenomena, 2019, Vol. 27, No. 2, pp. 119–127.

## **БИОФИЗИКА ДНК-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ ВАРИАНТОВ В ГЕНОМАХ ПОЗВОНОЧНЫХ**

### **BIOPHYSICS OF DNA-PROTEIN INTERACTION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF REGULATORY VARIANTS IN THE DENOMIC GENOMA**

*Всеволод Ю. Макеев, Иван В. Кулаковский, Илья Е. Воронцов, Иван С. Евшин, Руслан Н. Шарипов, Алла Д. Федорова, Евгений И. Румынский, Юлия А. Медведева, Дмитрий Пензар, В.Б. Бажич, Ф.А. Колпаков*

Институт общей генетики им. Вавилова РАН, 119991, ГСП-1, Губкина 3, Москва, Россия  
 Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, 119991, ГСП-1, Вавилова 32, Москва, Россия  
 Московский физико-технический институт, Московский физико-технический институт, Институтский пер.  
 Долгопрудный, 9, Московская область, 141700, Россия

Недавние достижения демонстрируют, что во многих случаях регуляторные варианты влияют на развитие организма и развитие многих распространенных заболеваний, включая рак и аутоиммунные расстройства. Регуляция работы генов на уровне транскрипции контролируется главным образом за счет



доступности хроматина и связывания факторов транскрипции, причем последние отвечают за точное распознавание последовательностей генома. Изобильные данные о взаимодействиях ДНК-белок впервые позволяют приблизиться к исчерпывающему перечню мотивов связывания, возможно, распознаваемых человеческими факторами транскрипции. Разработанный нами ресурс HOCOMOCO включает в себя ряд сервисов, предназначенных для практического анализа в области генетики и системной биологии. В частности, специфическое связывание типов клеток с транскрипционными факторами может быть оценено путем объединения мотивов последовательности с результатами анализов доступности хроматина, такими как эксперименты DNaseI-Seq или ATAC-Seq. Подходы машинного обучения могут быть использованы для решения проблемы нормализации данных в каждом конкретном типе клеток.

---

## **БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ RED BLOOD CELLS BIOPHYSICAL PROPERTIES IN NORME AND PATHOLOGY**

*Максимов Г.В.*

ФГАОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, ул. Ленинские горы 1 стр. 12, 119892, [gmaxsimov@mail.ru](mailto:gmaxsimov@mail.ru)

Исследование молекулярно-клеточных свойств эритроцита, выполняющих кислород-транспортную функцию (КТФ) в организме, является важной задачей биофизики. Известно, что эритроциты осуществляют обмен газов между альвеолярным воздухом и кровью, а также участвуют в вазодилатации сосудов, обратимо связывая молекулы оксида азота. На сродство гемоглобина к кислороду оказывают влияние ряд внеклеточных факторов таких, как рН, температура, а диффузия молекул кислорода и оксида азота через плазматическую мембрану эритроцита зависит от упорядоченности жирнокислотных хвостов липидов мембраны и состояния цитоскелета эритроцит. Нами доказано, что способность гемоглобина связывать и сбрасывать молекулы O<sub>2</sub> и NO зависит от структурной организации примембранной и цитоплазматической фракций гемоглобина, а также локального заряда глобиновых цепей и способности молекул гемоглобина образовывать ассоциаты. Мы установили, что чрезмерный синтез факторов роста (ИФР-1) и пуринергических соединений (АТФ) формирует изменение КТФ организма за счет активации специфических рецепторов к АТФ и ИФР-1. В докладе обсуждаются новые данные по исследованию изменения конформации гемопорфирина гемоглобина, свойства цитоплазмы, цитоскелета и мембраны эритроцитов в присутствии АТФ и ИФР-1 в крови в норме и при патологии.

---

## **НЕЛИНЕЙНЫЙ АНАЛИЗ ВРЕМЕННЫХ РЯДОВ И ГИБРИДНЫЕ МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ, НЕПОСРЕДСТВЕННО ВКЛЮЧАЮЩИЕ ДАННЫЕ МОНИТОРИНГА ЭКОСИСТЕМ, КАК ПУТЬ ЗА ПРЕДЕЛЫ РЕДУКЦИОНИЗМА**

### **NONLINEAR TIME SERIES ANALYSIS AND HYBRID MATHEMATICAL MODEL DIRECTLY INCORPORATING THE ECOSYSTEM MONITORING DATA AS A WAY BEYOND THE REDUCTIONISM**

*Медвинский А.Б.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, [alexander\\_medvinsky@yahoo.com](mailto:alexander_medvinsky@yahoo.com)

Предлагается подход, предполагающий прямое включение данных мониторинга природных экосистем в математические модели популяционной динамики, с целью численного анализа влияния среды обитания на процессы, которые существенно влияют на наблюдаемые изменения популяционного обилия, реализуемого даже в тех случаях, когда характеристики таких процессов непосредственно в ходе мониторинга не измеряются. В качестве примера даются численные оценки кросс-корреляционной энтропии Шеннона как характеристики сопряжённости колебаний скорости пополнения популяций фитопланктона Нарочанских озёр с вариациями экзогенных факторов: температуры воды и концентрации растворённых в воде биогенов.

Работа поддержана грантом РФФИ №17-04-00048.

**ФЕМТОСЕКУНДНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СВЕРХБЫСТРЫХ ПЕРВИЧНЫХ РЕАКЦИЙ В  
БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ: ФОТОСИСТЕМА 1 И РЕТИНАЛЬ СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ**  
**FEMTOSECOND SPECTROSCOPY OF ULTRAFAST PRIMARY REACTIONS IN  
BIOLOGICAL SYSTEMS: PHOTOSYSTEM 1 AND RETINAL CONTAINING PROTEINS**

**Надточенко В.А.<sup>1</sup>, Черепанов Д.А.<sup>1</sup>, Шелаев И.В.<sup>1</sup>, Гостев Ф.Е.<sup>1</sup>, Айбуш А.А.<sup>1</sup>, Семенов А.Ю.<sup>2</sup>, Мамедов М.Д.<sup>2</sup>, Смитиенко О.А.<sup>3</sup>, Фельдман Т.Б.<sup>3</sup>, Островский М.А.<sup>3</sup> Шувалов В.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, г. Москва, nadtochenko@chph.ras.ru

<sup>2</sup>Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, МГУ, Москва, info@mail.bio.msu.ru

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН), г. Москва, ibcp@sky.chph.ras.ru

В докладе сообщается о современных достижениях фемтосекундной лазерной спектроскопии в исследовании двух сверхбыстрых биологических процессах – в процессе первичного разделения зарядов в фотосистеме 1 природного фотосинтеза и в процессе первичных стадий изомеризации ретиналя в родопсине. Обсуждаются особенности экспериментов фемтосекундной лазерной спектроскопии и проблема интерпретации экспериментальных данных. В докладе будут рассмотрены данные полученные для пигмент-белковых комплексов фотосистемы 1 выделенных из *Synechocystis sp. PCC 6803*, *Spirulina* and *T. elongates*. Будет дан сравнительный анализ данных о первичных стадиях изомеризации ретиналя в зрительном родопсине, бактериородопсине и Na<sup>+</sup>-родопсине.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований No. 17-00-00209.

**СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ПРИНЦИПАЛЬНОЕ РАЗЛИЧИЕ МЕЖДУ ИСКУССТВЕННЫМ И  
ЕСТЕСТВЕННЫМ ИНТЕЛЛЕКТОМ?**

**WHETHER THERE IS THE BASIC DISTINCTION BETWEEN ARTIFICIAL AND NATURAL  
INTELLIGENCE?**

**Намиот В.А.**

Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В.Скобельцына Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва, vnamiot@gmail.com

Прежде всего, следует отметить, что самое очевидное различие между искусственным и естественным интеллектом, которое сразу же бросается в глаза (искусственный интеллект реализуется в настоящее время в электронных вычислительных устройствах, например, компьютерах или нейросетях, в то время как естественный интеллект является атрибутом биологических систем) само по себе не является принципиальным. Устройства, о которых можно сказать, что они вроде бы демонстрируют наличие интеллекта, могут быть изготовлены из самых разных материалов, включая биологические. Это не имеет особого значения в том случае, если в основе их функционирования лежат одни и те же принципы работы. Поэтому, чтобы ответить на вопрос, поставленный в заглавии, нужно в первую очередь разобраться с тем, может ли компьютерное устройство, хотя бы в принципе, моделировать происходящее в биосистемах.

Любая кибернетическая система, в том числе и такая, о которой говорят, что она способна "обучаться", работает на основе заложенного в неё алгоритма. Существует, по крайней мере, несколько математически строгих определений понятия "алгоритм", причём в матлогике доказывается, что все эти определения эквивалентны друг другу. На практике, при доказательстве теорем, очень удобным является определение алгоритма, данное А. Тьюрингом. Это определение использует понятие так называемой "универсальной машины Тьюринга", которая, при соответствующей введённой в неё программе, оказывается в состоянии моделировать работу любого другого логического устройства.

Потребность в математически строгом определении алгоритма чаще всего возникает даже не тогда, когда нужно сконструировать какой-то алгоритм, а тогда, когда нужно доказать, что в принципе не может существовать алгоритма, способного решить поставленную задачу. Наиболее известным примером такого рода является теорема об "останове", то есть о том, что в принципе не может существовать алгоритма, способного определить, остановится ли хоть когда-нибудь "универсальная машина Тьюринга", реализующая какую-либо программу, или же будет вычислять результат "вечно".

Если бы удалось установить, что естественный интеллект в состоянии решить такую задачу, для которой можно доказать, что алгоритма, способного её решить, не может существовать в принципе, то это означало бы, что между естественным интеллектом и моделирующим его поведение искусственным интеллектом существует принципиальное различие. И это различие в принципе невозможно убрать никакими программными ухищрениями...

Но поскольку мы не знаем, как “в действительности” функционирует естественный интеллект, мы оказываемся не в состоянии определить его возможности только на основе теоретических соображений. Экспериментальные же подходы также не могут дать материала для сколько-нибудь надёжных утверждений, и тоже уязвимы для критики...

Тем не менее, если естественный интеллект возник и сохранился в ходе эволюции, то можно утверждать, что он важен для выживания самых разных видов. В тоже время можно привести ряд аргументов, позволяющих утверждать, что интеллект, основанный только на алгоритмах, не мог бы способствовать выживанию. Это хоть и не доказывает утверждение о том, что искусственный и естественный интеллекты в принципе не эквивалентны друг другу, но делают такую гипотезу достаточно убедительной.

## **ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМА МЕМБРАННОСВЯЗАННЫХ БЕЛКОВ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ НАРУШЕНИЯ СТРУКТУРНОЙ ЦЕЛОСТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ**

### **ALTERED PROTEOME OF MEMBRANE-BOUND PROTEINS AS A POSSIBLE MECHANISM OF THE DISTURBANCE OF ERYTHROCYTE INTEGRITY IN HYPOXIC CONDITIONS**

*Орлов С.Н.<sup>1</sup>, Сидоренко С.В.<sup>1</sup>, Лунева О.Г.<sup>1</sup>, Максимов Г.В.<sup>1</sup>, Зиганшин Р. Х.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

Не смотря на ряд исследований, проведённых в последние три десятилетия, молекулярные механизмы выброса АТФ из эритроцитов в ответ на снижение парциального давления кислорода остаются мало изученными. В самом деле, эритроциты млекопитающих лишены внутриклеточных мембранных структур, а потому не могут осуществлять выброс АТФ, опосредованный эндоплазматическим ретикуломом, хорошо изученным на примере других типов клеток. Сравнительно недавно нами было установлено, что в эритроцитах человека выброс АТФ, инициируемый гипоксией, сопровождается высвобождением гемоглобина. В этой связи мы предположили, что выход АТФ из эритроцитов, по крайней мере частично, обусловлен нарушением целостности плазматической мембраны [1,2].

Используя метод безметочного определения содержания белков, мы сравнили относительное содержание 1159 белков теней эритроцитов, полученных при нормоксии и гипоксии в 3 независимых экспериментах. Среди белков, чьё содержание в образцах, полученных в условиях гипоксии, увеличивается в 1.5-3 раза, мы обнаружили все идентифицированные субъединицы гемоглобина и супероксидизмутазу. Анализ посттрансляционных модификаций всех мембранносвязанных белков показал, что окислительным модификациям в большей мере подвержены белки в контрольных образцах (NEG) по сравнению с тенями эритроцитов, подвергнутых гипоксии (HEG).

Исследования последних лет показали, что белки группы Cullin образуют молекулярный каркас, который выполняет решающую роль в посттрансляционной модификации белков посредством их убиквитинилирования. У млекопитающих семейство куллины образовано 8 белками (CUL1-CUL7 и PARC), которые характеризуются наличием одноименного домена. В свою очередь, белки CUL1-CUL7 образуют субъединичные комплексы с группой E3 лигазы, состоящей более чем из 200 белков (Cullin-RING E3 ubiquitinligase complexes, CRL). Эти комплексы переносят убиквитин на белки как метку для их последующей деградации на протеосомах. Анализ данных, полученных с помощью базы данных KEGG, показывает, что большинство белков этого комплекса присутствуют в контрольных образцах и отсутствуют в тенях, полученных из эритроцитов, подвергнутых 20-мин гипоксии. Эти данные позволяют предположить, что в условиях нормоксии этот комплекс ассоциирован с мембраной эритроцитов, осуществляя убиквитинилирование мембранных белков, нарушенных в результате продукции АФК.

Другим участником этого процесса могут быть кислород-чувствительные протеазы, вовлеченные в деградацию белков мембранного цитоскелета, включая белок 3, белок 4.1 и гликофорин-С. В условиях гипоксии деоксигемоглобин связывается с цитоплазматическим доменом белка полосы 3, что приводит к высвобождению из мембраны комплекса Cullin-Rbx E3 и нарушению деградации мембранных белков, подвергнутых посттрансляционной модификации. Результатом всех этих изменений структурной организации мембранносвязанных белков является нарушение структурной целостности эритроцитов, приводящее к синхронному высвобождению АТФ и гемоглобина, зарегистрированном в наших экспериментах. В дальнейших экспериментах мы планируем проверить эту гипотезу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (16-15-10026) и РФФИ (18-04-00063).

1. Sikora J, Orlov SN, Furuya K, R. Grygorczyk, R Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes, *Blood*, 2014; 124: 2150–2157

2. O. G. Luneva OG et al, *Cell. Physiol. Biochem.*, 2016; 39:81-88

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТНОЙ И РЕЦЕПТОРНОЙ ФУНКЦИИ Na,K-АТФазы****MOLECULAR MECHANISMS OF REDOX REGULATION OF Na,K-ATPase TRANSPORT AND RECEPTOR FUNCTIONS**

*Петрушанко И.Ю.<sup>1</sup>, Митькевич В.А.<sup>1</sup>, Анашкина А.А.<sup>1</sup>, Лакунина В.А.<sup>1</sup>, Полуэктов Ю.М.<sup>1</sup>, Зиганишин Р.Х.<sup>3</sup>, Климанова Е.А.<sup>1,2</sup>, Дергоусова Е. А.<sup>1,2</sup>, Богданова А.Ю.<sup>1,4</sup>, Лопина О.Д.<sup>1,2</sup>, Макаров А.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991, E-mail: irina-pva@mail.ru

<sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, 117997

<sup>4</sup>Институт ветеринарной физиологии и Цюрихский центр интегративной физиологии человека (ZINP),

Цюрихский университет, Цюрих, Швейцария

Na,K-АТФаза создает трансмембранный градиент ионов натрия и калия, необходимый для жизнедеятельности всех клеток животных, а также является рецептором для кардиотонических стероидов, регулирующих пролиферацию и апоптоз клеток. Активность Na,K-АТФазы чувствительна к редокс-статусу клеток. Транспортная и гидролитическая активность фермента максимальна при физиологической концентрации кислорода, снижаясь как при гипоксии, так и гипероксии, а также при падении или возрастании внутриклеточного глутатиона. Соотношение восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона определяет тиоловый редокс-статус клетки и изменяется при гипоксии, окислительном стрессе и многих патологиях. Нарушение функционирования Na,K-АТФазы при ряде патологий связано именно с изменением редокс-статуса клеток. Нами было обнаружено, что одной из основных причин редокс-чувствительности Na,K-АТФазы является глутатионилирование  $\alpha$ -субъединицы фермента [1]. Инкубация Na,K-АТФазы с GSSG, индуцирующая глутатионилирование  $\alpha$ -субъединицы, приводит к развивающемуся во времени дозозависимому ингибированию вплоть до полной инактивации фермента. Причиной ингибирования является нарушение связывания АТФ вследствие глутатионилирования регуляторных остатков цистеина. Возрастание уровня глутатионилирования  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы является одной из основных причин ингибирования фермента при гипоксии, что было показано нами на изолированном сердце крысы, фибробластах мышцы (SC1) и клетках эмбриональной почки человека (HEK293). Методом масс-спектрометрии было установлено, что регуляторному глутатионилированию подвергаются остатки Cys 244 в актуаторном домене и Cys 454, 458, 459 в нуклеотид связывающем домене белка. С помощью точечного мутагенеза было обнаружено, что фермент, у которого Cys 244 заменен на аланин, в отличие от дикого типа, не ингибируется GSSG и становится нечувствителен к гипоксии [2]. Клетки, экспрессирующие  $\alpha 1$ -субъединицу Na,K-АТФазы с заменами Cys244Ala или Cys244-454-458-459Ala, хуже выживают в условиях гипоксии. Таким образом, глутатионилирование  $\alpha$ -субъединицы Na,K-АТФазы, ингибирующее фермент, играет важную роль в адаптации клеток к условиям гипоксии и позволяет предотвратить истощение клеток по АТФ. В частности, инкубация клеток с производными глутатиона, индуцирующая глутатионилирование тканеспецифичной  $\alpha 2$ -субъединицы, позволяет увеличить продолжительность нормальной сократимости кардиомиоцитов в условиях гипоксии.

Было обнаружено, что глутатионилирование влияет не только на активность, но и на рецепторную функцию Na,K-АТФазы. В условиях гипоксии, индуцирующей глутатионилирование  $\alpha$ -субъединицы, рецепторная функция Na,K-АТФазы к кардиотоническим стероидам изменяется. На клетках фибробластов мышцы SC1 и клетках эмбриональной почки человека HEK293 показано, что, в отличие от нормальных условий, инкубация клеток с убаином в условиях гипоксии не приводит к активации Src-киназы, находящейся в комплексе с Na,K-АТФазой. В клетках, экспрессирующих Na,K-АТФазу с заменой Cys454-458-459Ala, не наблюдается активации Src-киназы в ответ на убаин и нарушается кислородная-чувствительность рецепторной функции Na,K-АТФазы [2]. Таким образом, данные остатки цистеина важны для реализации рецепторной функции и ее регуляции при гипоксии. Нами охарактеризованы параметры прямого взаимодействия Src-киназы и Na,K-АТФазы и показано, что глутатионилирование Cys 458 и 459 предотвращает ингибирующее связывание Src с нуклеотид связывающим доменом Na,K-АТФазы, приводя, таким образом, к изменению рецепторной функции в условиях гипоксии.

Установлено, что эффективность глутатионилирования зависит от конформации фермента, что обусловлено различной доступностью остатков цистеина. Наибольшая эффективность глутатионилирования наблюдается у фермента, находящегося в E1 конформации, в E2 конформации она снижается, а в E2P конформации становится минимальной. С другой стороны глутатионилирование влияет на конформацию фермента и изменяет его чувствительность к трипсинолизу. Таким образом, глутатионилирование может быть вовлечено в регуляцию связывания Na,K-АТФазы с лигандами и белками-партнерами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00374).

1. Petrushanko, I.Y. et al. S-glutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic  $\alpha$  subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity// J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287, pp. 32195-32205.
2. Petrushanko, I.Y. et al. Cysteine residues 244 and 458-459 within the catalytic subunit of Na,K-ATPase control the enzyme's hydrolytic and signaling function under hypoxic conditions// Redox biology. 2017. Vol. 13, pp. 310-319.

## БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

## BIOPHYSICAL METHODS IN ENVIRONMENTAL STUDIES

*Погосян С.И.*

Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, pogosyan@biophys.msu.ru

Множественность и разнообразие факторов, формирующих окружающую среду, вынуждают искать интегральные характеристики состояния среды. Такой интегральной характеристикой, способной отразить экологическое состояние среды, может быть биотестирование и/или биоиндикация, которые показывают, как чувствует себя организм или сообщество организмов в данных условиях.

Одним из наиболее удачных методов биотестирования среды, способных дать интегральную оценку токсичности, следует признать тестирование среды при помощи биолюминесцирующих бактерий. Люминесцентные бактерии сочетают в себе различные типы чувствительных структур, подверженных повреждению (клеточная мембрана, метаболические реакции, генетический аппарат). Поэтому на биолюминесцентную реакцию могут оказывать влияние токсические вещества разной природы и механизмов действия. Таким образом, чрезвычайно широкий круг токсинов способен снижать интенсивность свечения бактерий.

Пресные и морские воды представляются важнейшими объектами, требующими проведения экологического мониторинга. Наиболее подходящим на роль объекта, отражающего состояние водной среды, является фитопланктон. Обилие фитопланктона и показатели его продукции являются основными в оценке экологического состояния акваторий.

В настоящее время разработаны и широко используются флуориметрические методы оценки состояния фотосинтетического аппарата фитопланктона. Созданы приборы, позволяющие проводить измерения в пробах воды, в непрерывном потоке воды и зондировать толщу воды до глубины 200 м. Разработаны лидары (лазерные дистанционные флуорометры) для определения состояния фитопланктона при сканировании поверхностных вод с береговых вышек и с судов по их ходу. Эти методы позволяют с высокой точностью в режиме реального времени проводить детальные обследования акватории.

На обширных акваториях информация об обилии фитопланктона может быть получено со спутников из космоса. Для этого используют фотоснимки поверхности Земли в разных областях спектра и по сопоставлению спектральной яркости (коэффициентам отражения) судят о спектральных свойствах объектов. Таким образом, по цветовым характеристикам воды удается определить содержание ХЛ в составе фитопланктона в верхнем слое вод. В настоящее время можно систематически получать карты распределения ХЛ любых акваторий. Такие съемки не способны давать информацию о функциональном состоянии фитопланктона. Они могут давать значительные ошибки в определении обилия фитопланктона из-за атмосферных помех, но в сочетании с несколькими опорными пунктами, на которых проводится определение содержания фитопланктона с высокой точностью (автоматическими станциями на платформах или буйах), могут обеспечить получение чрезвычайно ценной информации о распределении фитопланктона на обширных акваториях. Автоматические станции на платформах или буйах могут быть оснащены датчиками облученности (освещенности), температуры, скоростей водных потоков, солености, мутности, рН и концентрации ряда биогенных элементов.

Определять первичную продукцию в море можно комплексом спектральных методов по спектрам подводной облученности и параметрам флуоресценции хлорофилла. Измеряемая при этом эффективность утилизации квантов света в процессах фотосинтеза позволяет прогнозировать возможные изменения первичной продукции фитопланктонного сообщества в краткосрочной перспективе. Предлагаемый подход дает возможность проводить *in situ* измерение первичной продукции при помощи подводного зонда автоматически в режиме реального времени. Экспериментальное определение первичной продукции фитопланктона *in situ* может быть выполнено в непрерывном режиме в выбранном слое воды. Определять первичную продукцию в море можно комплексом спектральных методов по параметрам флуоресценции хлорофилла и спектрам подводной облученности. Первичная продукция измеряется по количеству усвоенных в фотосинтезе квантов света на единицу площади в выбранном слое воды. Она равна количеству поглощенных фотосинтетическим аппаратом водорослей квантов света умноженному на эффективность их утилизации в процессах фотосинтеза, которая определяется флуориметрическим методом.

Совокупность перечисленных способов контроля дает возможность получения принципиально новой, углубленной информации об экологическом состоянии прибрежных вод. Таким образом, система экологического мониторинга обширных акваторий шельфа для определения текущего состояния прибрежных вод и надежного прогноза его изменения должна базироваться на принципах биоиндикации фитопланктона, быть многоуровневой.

## ОТ МОЛЕКУЛЫ К ЛЕКАРСТВУ: МЕДИЦИНСКАЯ БИОИНФОРМАТИКА IN SILICO FROM MOLECULE TO DRUG: MEDICAL BIOINFORMATICS IN SILICO

**Поройков В.В.**

Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, vladimir.poroikov@ibmc.msk.ru

Исследования взаимодействия химических соединений (ХС) с биологическими объектами проводят с использованием понятий и методических подходов, разработанных в ряде научных областей, включая физику, химию, биологию, медицину и др. Благодаря наличию биологической активности, ХС может применяться в качестве реагента для изучения функционирования биологических систем в норме и при патологиях либо в качестве лекарства для нормализации патологического процесса при различных заболеваниях. С другой стороны, биологическая активность химического соединения может стать причиной проявления побочных или токсических эффектов, что станет препятствием для его практического применения [1]

Спектр биологической активности химического соединения – это множество видов биологической активности, которые отражают результат взаимодействия ХС с различными биологическими объектами [2]. Поскольку исчерпывающая экспериментальная оценка всех видов биологической активности ХС нереальна, целесообразно использование методов биоинформатики для прогнозирования множества видов биологической активности, что позволяет определить наиболее перспективные направления для тестирования фармакологического действия конкретных веществ и отсеять потенциально опасные молекулы на ранних стадиях исследований.

Развитие высокопроизводительных методов биомедицинских исследований привело к накоплению огромных массивов экспериментальных данных, получивших название “Big Data”. Традиционно для хранения и обработки этих данных применяются методы биоинформатики. Сегодня медицинская биоинформатика перестает быть всего лишь «поставщиком» математических методов и компьютерных программ для анализа данных. Это – мультидисциплинарная область науки, интегрирующая разнородные химические, биологические и медицинские данные с целью извлечения из них полезной информации и генерации новых знаний. Сравнительное рассмотрение в биологических образцах в норме и при различных заболеваниях геномных, транскриптомных, протеомных, метаболомных и других экспериментальных данных дает возможность идентифицировать биомаркеры, которые могут быть использованы для повышения качества диагностики, а также фармакологические мишени, воздействие на которые может привести к нормализации патологических процессов. Анализ ассоциаций между характеристиками фармакологических веществ, молекулярных мишеней, регуляторных сигнальных и метаболических сетей, модуляции процессов транскрипции и трансляции, ингибирования белок-белковых взаимодействий создает фундаментальную основу для уточнения патофизиологических механизмов возникновения заболеваний на молекулярном, клеточном, органно-тканевом и организменном уровнях организации биологических систем, и установления наиболее эффективных направлений для их профилактики и терапии.

В докладе будет представлено современное состояние проблемы оценки *in silico* биологической активности многих миллионов лекарственно-подобных соединений и отбора среди них веществ, обладающих требуемым фармакологическим действием, на основе которых могут быть разработаны более эффективные и безопасные лекарственные препараты. Будут приведены примеры экспериментального подтверждения предсказанных с помощью созданной нами программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) ранее не известных видов биологической активности у природных соединений [3], открытия новых активаторов ионных каналов TRPC6 с нейропротекторным действием [4], установления новых свойств у разрешенных к медицинскому применению лекарственных препаратов [5]. На примере изучения большой виртуальной библиотеки органических соединений SAVI (Synthetically Accessible Virtual Inventory) мы проанализируем возможности и ограничения применения компьютерных методов для поиска новых веществ, обладающих антиретровирусной активностью [6].

Будут также рассмотрены разработанные нами свободно-доступные в Интернете веб-ресурсы для прогнозирования биологической активности ХС, которые используются свыше 20 тысяч исследователей из 100 стран мира (<http://www.way2drug.com/projects>).

**Благодарности.** Работа поддержана грантом РФФИ-НИН № 17-54-30015-НИЗ\_a.

1. Баренбойм Г.М., Маленков А.Г. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска. М.: Наука, 1986.
2. Филимонов Д.А. и др. Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения // *Biomed. Chem. Res. Meth.* 2018. Vol. 1. P. e00004.
3. Gawande D.Y. et al. Anticonvulsant activity and acute neurotoxic profile of *Achyranthes aspera* Linn // *J. Ethnopharmacol.* 2017. Vol. 202. P. 97.
4. Popugaeva E. et al. Derivatives of piperazines as potential therapeutic agents for Alzheimer’s disease // *Mol. Pharm.* 2019. Vol. 95. P.337.
5. Lloyd K. et al. Identification of a novel therapeutic agent for Inflammatory Bowel Disease guided by systems medicine. *bioRxiv*. Posted January 07, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/513838>.
6. Савосина П.И. и др. Поиск новых антиретровирусных соединений в химическом пространстве “больших данных” библиотеки SAVI // *Биомед. хим.* 2019. Том. 65. С. 73.



**НЕЙРОВАСКУЛЯРНЫЕ СВЯЗИ: ФУНКЦИИ, ПРОБЛЕМЫ, МОДЕЛИРОВАНИЕ**  
**NEUROVASCULAR COUPLING: FUNCTIONS, CHALLENGES, MODELING***Постнов Д.Э.*СГУ имени Н.Г.Чернышевского, Саратов, [postnov@info.sgu.ru](mailto:postnov@info.sgu.ru)

Термином “нейроваскулярная единица” (НВЕ) принято обозначать небольшую гетерогенную группу клеток паренхимы мозга, которая включает нейрон, астроцит, клетки сосудистой стенки и формирует локальные физиологические ответы на изменение нейронной активности. Доминирующая и наиболее известная функция НВЕ заключается в локальной регуляции диаметра кровеносного сосуда в соответствии с текущими потребностями нейрона (прежде всего – в глюкозе и кислороде) [1]. Значительно менее изучены механизмы пространственных связей в пределах каждой из функциональных “подсистем” НВЕ ( модуляция ионных концентраций и перенос веществ в межклеточном пространстве, кальциевые волны в сетях астроцитов, распространяющиеся вазомоторные реакции), которые лежат в основе формирования пространственно-временных паттернов активности паренхимы мозга. Будучи обычно неявно выраженными, эти физиологические механизмы становятся доминирующими во время экстремальных состояний коры головного мозга, таких, как распространяющаяся кортикальная депрессия, мигрень с аурой, а также распространение волн деполаризации при инсульте или в результате травмы [2].

Новый импульс исследованиям в данной области был придан в связи с уточнением механизмов, обеспечивающих дренаж паренхимы мозга. Как известно, мозг – это единственный орган, в паренхиме которого на сегодняшний день не найдено лимфатической системы. В 2012 году группой M. Nedergaard была предложена гипотеза о т.н. “глимфатической” (glymphatic) системе дренажа, ключевая роль в которой отводится потоку воды через поры мембраны астроцитов и процессу “накачки” спинномозговой жидкости в паренхиму за счет пульсаций стенок артериальных сосудов [3]. Предложенный механизм вызвал бурную дискуссию, продолжающуюся в настоящее время [4]. Заметим, что надежное понимание процессов дренажа тканей мозга крайне важно для широкого круга медицинских проблем, таких, как борьба с болезнью Альцгеймера, или же доставка лекарств сквозь гематоэнцефалический барьер.

Таким образом, целый спектр актуальных проблем физиологии мозга настоятельно требует понимания того, как клеточная “машина” паренхимы мозга (нейроны, астроциты, клетки гладкой мускулатуры и эндотелия сосудов) функционирует в комплексе, как единое целое, включая согласование изменения активности клеток с модуляцией объема межклеточного пространства и интенсивностью транспорта веществ в нем. На настоящий момент созданы как детальные модели локальных связей в пределах одиночной НВЕ [5], так и феноменологические модели отдельных механизмов формирования пространственно-временных структур [6]. На очереди – учет различных типов связей в рамках единой математической модели. Эта масштабная задача представляется одновременно и многообещающей перспективой, и серьезным вызовом для модельно-теоретических исследований в области.

Исследования поддержаны грантом Российского Научного Фонда № 19-15-00201.

1. Attwell D. et al. Glial and neuronal control of brain blood flow //Nature. – 2010. – Т. 468. – №. 7321. – С. 232.
2. Brennan K. C. et al. Distinct vascular conduction with cortical spreading depression //Journal of neurophysiology. – 2007. – Т. 97. – №. 6. – С. 4143-4151.
3. Pliff J. J. et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$  //Science translational medicine. – 2012. – Т. 4. – №. 147. – С. 147ra111-147ra111.
4. Semyachkina-Glushkovskaya O., Postnov D., Kurths J. Blood–Brain Barrier, Lymphatic Clearance, and Recovery: Ariadne’s Thread in Labyrinths of Hypotheses //International journal of molecular sciences. – 2018. – Т. 19. – №. 12. – С. 3818.
5. Kenny A., Plank M. J., David T. The role of astrocytic calcium and TRPV4 channels in neurovascular coupling //Journal of computational neuroscience. – 2018. – Т. 44. – №. 1. – С. 97-114.
6. Verisokin A. Y., Vervevko D. V., Postnov D. E. Turing-like structures in a functional model of cortical spreading depression //Physical Review E. – 2017. – Т. 96. – №. 6. – С. 062409.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ И МИКРОВОДОРОСЛЕЙ. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ, БРОУНОВСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ****SIMULATION OF THE PROCESSES IN PHOTOSYNTHETIC MEMBRANE OF GREEN PLANTS AND MICROALGAE. MOLECULAR, BROWNIAN AND KINETIC MODELS****Ризниченко Г.Ю.**

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, riznich46@mail.ru

В докладе представлены результаты последних работ по математическому и компьютерному моделированию, выполненных на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова [1-10]. Детальная кинетическая модель процессов в тилакоидной мембране включает перенос электрона в реакционных центрах фотосистем I и II, цитохромном комплексе, линейный и циклический транспорт электронов, учет электрического и электрохимического потенциала, роль буферных групп, нефотохимическое тушение флуоресценции и регуляцию процессов сопряжения с циклом Кальвина [1,2] и количественно описывает процессы индукции флуоресценции и редокс превращений P700 на временном интервале от микросекунд до 30 сек. Воспроизводить вероятностные процессы в ансамблях фотосинтетических цепей, размеры которых соизмеримы с их количеством в клетках микроводорослей (миллионы отдельных цепей) позволяют модели, основанные на методе Монте Карло [3,4]. Для анализа больших массивов экспериментальных индукционных кривых флуоресценции микроводорослей разработан метод мультиэкспоненциальной аппроксимации. Метод применен для задач экологического и биотехнологического мониторинга [5-7] и позволяет определять участки фотосинтетической цепи ФСII, претерпевающие изменение в ходе роста культуры в различных условиях минерального дефицита. С помощью поэтапного броуновского и молекулярного компьютерного моделирования описан процесс формирования функционально активного белок-белкового комплекса фотосинтетических белков цитохрома *f* м пластоцианина в растворе [8]. Выявлены физические механизмы, определяющие различные пути образования комплекса белков пластоцианина и цитохрома *f* высших растений, зеленых водорослей и цианобактерий. Изучена роль электростатических взаимодействий в ходе образования диффузионно-столкновительных комплексов различных видов фотосинтезирующих организмов [8,9]. Детали проведенных работ будут освещены в докладах на секциях Съезда.

## Литература

1. Belyaeva N.E., Bulychev A.A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Thylakoid membrane model of the Chl *a* fluorescence transient and P700 induction kinetics in plant leaves // *Photosynth. Res.* 2016, 130:491–515
2. Belyaeva, N.E., Bulychev, A.A., Riznichenko, G.Y., Rubin A.B. Analyzing both the fast and the slow phases of chlorophyll *a* fluorescence and P700 absorbance changes in dark-adapted and preilluminated pea leaves using a Thylakoid Membrane model // *Photosynth. Res.* 2019, 140: 1-19
3. Маслаков А.С., Антал Т.К., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование первичных процессов фотосинтеза с помощью кинетического метода Монте-Карло // *Биофизика* 2016, том 61, № 3, с. 464-477
4. Antal T.K., Maslakov A., Yakovleva O.V., Krendeleva T.E., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. (2018) Simulation of chlorophyll fluorescence rise and decay kinetics, and P700 - related absorbance changes by using a rule-based kinetic Monte-Carlo method // *Photosyn Res.*, 2018, 138(2):191-206
5. Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Анализ кинетики индукции флуоресценции хлорофилла с помощью спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации // *Биофизика*. 2015 том 60, № 3, с. 487-495
6. Antal T., Konyukhov I., Volgusheva A., Plyusnina T., Khruschev S., Kukarskikh G., Goryachev S., Rubin A. Chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors. *Physiol Plantarum* // 2018, 165(3):476-486
7. Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Фролов А.Е., Дегтерева Н.С., Конюхов И.В., Погосян С.И., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Мониторинг фотосинтетической активности культуры микроводорослей *Chlorella* при истощении азота в среде. *Биофизика* 2019, 64, № 3, с. 468-477
8. Fedorov V.A.; Kovalenko I.B., Khruschev S.S.; Ustinin D.M., Antal T.K., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Comparative analysis of plastocyanin-cytochrome *f* complex formation in higher plants, green algae and cyanobacteria // *Physiologia Plantarum* 2019, 166(1): 320-335
9. Хрущев С.С., Абатурова А.М., Федоров В.А., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Идентификация промежуточных состояний в процессе диффузионного сближения электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f* // *Биофизика* 2015. Т. 60. С. 629–638
10. Kovalenko I.B., Knyaseva O.S., Antal T.K., Ponomarev V., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Multiparticle Brownian dynamics simulation of experimental kinetics of cytochrome *bf* oxidation and photosystem 1 reduction by plastocyanin // *Physiologia Plantarum* 2017, 161: 88-96.

## **БИФОТОХРОМНЫЕ ЦВЕТНЫЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ: ФЕНОМЕН И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

### **BIPHOTOCROMIC COLOR FLUORESCENT PROTEINS: PHENOMENA AND PERSPECTIVE APPLICATIONS**

*Савицкий А.П., Гавшина А.В., Соловьев И.Д.*

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

Флуоресцентные белки являются уникальным и незаменимым инструментами при изучении разнообразных молекулярных событий в живых клетках и организмах. В настоящее время выделено из различных источников и охарактеризовано более 100 исходных (диких) типов белков практически во всем видимом диапазоне поглощения и излучения. Однако среди этого большого количества разнообразных белков особенно большую роль играет небольшая группа (на сегодняшний день описано всего 7 видов исходных структур) фотоконвертируемых и фотопереключаемых белков. Один из таких белков – Kaede, сыграл ключевую роль в развитии методов субдифракционной микроскопии, в частности в создании метода PALM. Поэтому открытие каждого такого нового гена, кодирующего соответствующий белок, играет важную роль в разработке новых и развитии уже созданных методов изучения живых организмов. В природе свойства фотоконверсии (фотохимический процесс связанный с изменением структуры хромофора) и фотопереключения (фотофизический процесс связанный со значительным изменением квантового выхода хромофора) встречаются порознь и только путем мутагенеза можно достичь совмещения этих двух свойств в одном белке, как например это было сделано для белка IrisFP. Все описано три таких белка.

Открытый нами белок SAASoti из коралла *Stylocoeniella armata* является первым примером, когда оба эти феномена совмещаются в исходном (диком) типе белка. Наиболее удивительно то, что полученные нами методом компьютерного моделирования данные показывают, что специально вводимые в структуру IrisFP мутации и придававшие ему свойство фотопереключения не являются необходимыми в случае SAASoti. Таким образом, механизм фотопереключения является значительно более сложным, особенно в свете установленного методом фемтосекундной кристаллографии факта, что в процессе возбуждения хромофор в фотопереключаемом белке rsEGFP2 осуществляет сложное вращательное движение вдоль бета-бочонка, в котором он находится и претерпевая в конечном итоге цис-транс изомеризацию и протонирование на фемтопикосекундной временной шкале. Удивительно, что получающееся в ходе такого движения новое конформационное состояние, оказывается в большинстве случаев кинетически заторможено и возвращение в исходное состояние занимает минуты и часы, как например в случае нашего белка SAASoti и ранее изученного методами фемтосекундной спектроскопии и молекулярной динамики белка KFP. Таким образом, сравнительное изучение фотофизических (фотопереключение) и фотохимических (фотоконверсия) свойств белка SAASoti позволит выявить тонкие молекулярные механизмы взаимодействия хромофора с окружающими его аминокислотными остатками, что является теоретической основой для рационального дизайна новых сенсорных молекул для молекулярного имиджинга и в частности кинетической субдифракционной микроскопии позволяющей отслеживать движение и релокализацию отдельных молекул.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00373.

1. Solovyev, I.D., Gavshina, A.V., Katti, A.S., Chizhik, A.I., Vinokurov, L.M., Lapshin, G.D., Ivashina, T.V., Khrenova, M.G., Kireev, I.I., Gregor, I., Enderlein, J., and Savitsky, A.P. Monomerization of the photoconvertible fluorescent protein SAASoti by rational mutagenesis of single amino acids, *Scientific reports*, 8 (1), 15542 (2018).
2. Solovyev, I.D., Gavshina, A.V., and Savitsky, A.P. Reversible photobleaching of photoconvertible SAASoti-FP, *Journal of Biomedical Photonics & Engineering* 3 (4), 040303 (2018).

## **МОДУЛЬНАЯ ТРАНСПОРТНАЯ ПЛАТФОРМА – ИНСТРУМЕНТ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ПРОЦЕССЫ В ОРГАНЕЛЛАХ ЖИВОЙ КЛЕТКИ**

### **MODULAR TRANSPORTING PLATFORM AS A TOOL TO SELECTIVELY AFFECT PROCESSES IN LIVING CELLS**

*Соболев А.С.*

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия  
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия, alsobolev@yandex.ru

В докладе рассмотрен спектр возможных применений модульных нанотранспортеров (МНТ) как для медицинских целей, так и как инструмента для исследования живой клетки путем избирательного воздействия на процессы, протекающие в различных компартментах клетки. МНТ – синтетические полипептиды, придающие клеточную специфичность и высокую эффективность противоопухолевым агентам [1]. Принцип,

положенный в основу дизайна МНТ – использование естественных процессов клеточного транспорта, благодаря чему МНТ способны проникать внутрь клетки-мишени, а затем – в её ядро. Данный подход позволяет создавать различные МНТ в зависимости от задачи, например: для создания новых МНТ для новых типов клеток-мишеней, нового целевого внутриклеточного компартмента и т.д. На клеточных и животных моделях показано, что доставляемые МНТ фотосенсибилизаторы и радионуклиды, испускающие электроны Оже [2] или альфа-частицы, благодаря специфической доставке в клетки-мишени, а в них – в ядро, приобретают клеточную специфичность и намного большую эффективность. Доклинические испытания убедительно подтвердили высокую противоопухолевую эффективность и безопасность МНТ, несущих индий-111 (радионуклид, испускающий электроны Оже).

Разработаны «гибридные» МНТ, полученные путем ковалентного присоединения лиганда фолатных рецепторов (производного фолиевой кислоты) к безлигандному МНТ. Полученные «гибридные» фолат-МНТ специфически интернализировались клетками-мишенями (клетки рака шейки матки, рака яичников, характеризующиеся сверхэкспрессией и экспозицией фолатных рецепторов), проникали в их ядра и, доставляя в них индий-111, эффективно поражали их. Фолат-МНТ-индий-111 продемонстрировал выраженную противоопухолевую активность на животных моделях [3].

Помимо доставки лекарств, МНТ можно использовать для доставки иных биологически активных веществ, что позволяет, например, вмешиваться в процессы репарации ДНК: МНТ с фрагментом белка p21 тормозили репарацию ДНК, повреждённую блеомицином [4].

Различные варианты применения таких нанотранспортеров для разнообразных целей и задач позволяют рассматривать этот подход как базовый, на основе которого могут быть получены различные частные решения, иными словами, как платформу.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-14-01304.

1. Sobolev A.S. Modular Transporters. *In: Encyclopedia of Cancer* (Schwab M., Ed.) 4th ed. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2017, PP. 2891-2894.
2. Sobolev A.S. Modular nanotransporters for nuclear-targeted delivery of Auger electron emitters // *Front. Pharmacol.* 2018, Vol. 9, No. 952, PP. 1-9.
3. Slastnikova T.A. et al. Development and evaluation of a new modular nanotransporter for drug delivery into nuclei of pathological cells expressing folate receptors // *Drug Des. Devel. Ther.* 2017, Vol.11, PP. 1315-1334.
4. Камалетдинова Т.Р. и др. Модульный нанотранспортёр с фрагментом белка p21 тормозит репарацию повреждённых ДНК, вызванных блеомицином // *Докл. АН, Биохим, Биофиз., Мол. биол.*, 2018, Том 479, Стр. 456-459.

## ХИРАЛЬНЫЕ ИЕРАРХИИ КАК ФИЗИЧЕСКАЯ ОСНОВА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР

## CHIRAL HIERARCHIES AS THE PHYSICAL BASIS OF MOLECULAR-BIOLOGICAL STRUCTURES

*Твердислов В.А.*

МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, E-mail: tverdislov@mail.ru

Воспроизведение характерных паттернов в самоорганизующихся иерархических структурах разного уровня с изменяющимися физическими механизмами структурообразования основывается на единых симметричных принципах. Как мы показали, эволюционно сформировавшаяся и ставшая базовой система четко стратифицированных уровней макромолекулярных и надмолекулярных биологических структур основана на принципе хирального дуализма. В биологических системах обнаружен общий системный принцип спонтанного формирования дискретных иерархических структур в исходно гомохиральных системах. Его характерная особенность проявляется в формировании череды вложенных или параллельно развивающихся структур с подобным или изменяющимся типом симметрии, возрастающим масштабом и, что принципиально важно, изменяющимся знаком хиральности. Гомохиральные системы, в принципе, неравновесны и способны к структурным перестройкам в ходе диссипации свободной энергии.

В макромолекулярных системах выделены как хиральные инварианты знакопеременные иерархии хиральных структур в последовательностях от «нижнего» ассиметричного атома углерода в  $sp^3$ -гибридизации до суперспиралей и надмолекулярных структур. Отмечено чередование знака хиральности D–L–D–L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК для наиболее распространённой В-формы. Последовательность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии белковых структур подобна той, что мы наблюдаем для ДНК, но стартует с левого энантиомера: L-D-L-D. Устойчивость знакопеременных хиральных иерархий обусловлена жесткой сопряженностью формирования и деградациии уровней их организации. В этом отношении принцип чередования знака

хиральности служит стабилизирующей защелкой для многоярусной структуры. Тип симметрии в череде смены знака хиральности, в принципе, может изменяться: мы это видим при переходе от первичной ко вторичной структурам белка или в ДНК (тетраэдрический, спиральный, гош). Возможны инверсии в смене знака: например, левая полипролиновая спираль в коллагенах (а не правая  $\alpha$ -спираль). В этом случае хиральная дислокация стабилизируется термодинамической выгодностью интегрирующей структуры – правой суперспирали.

Хиральные знакопеременные иерархии не обязательно ограничиваются внутренними структурами биомолекул, а могут распространяться на их комплексы, в которых элементы системного распознавания «свой» - «чужой» и сродство будут определяться знаком хирального соответствия соответствующих уровней организации молекул. Нуклеиновые кислоты взаимодействуют в одном классе хиральных соответствий, белки – в другом, а между собой они взаимодействуют в разных классах хиральных иерархий.

С физической точки зрения белки, нуклеиновые кислоты, мембраны являются молекулярными машинами, совершающими полезную работу и преобразующими тип энергии, вещество или информацию. Стратифицированные разными симметриями и знаком хиральности первичные, вторичные и т.д. структуры макромолекул являются деталями иерархических конструкций молекулярных машин, реализующими выделенные «механические» степени свободы, кинетически отделенными от тепловых степеней свободы. Принципиально, что циклически работающие машины с необходимостью являются динамическими хиральными объектами.

Известной и нерешенной проблемой самосборки уникальных третичных и четвертичных структур белков и нуклеиновых кислот является выбор оптимальных траекторий фолдинга, обеспечивающих детерминированное складывание первичных цепей в нативные конфигурации. Симметричная природа структурных превращений в процессах фолдинга определяет заданность каждого последующего шага в складывании одномерных цепей макромолекул. С точки зрения термодинамики их конформационное движение к минимуму по поверхности энергетической конфигурационной воронки Левинтала как раз и есть движение по цепочке знакопеременных хиральных состояний, соответствующих понижению свободной энергии системы. Исходно гомохиральные системы обладают запасом свободной энергии по энтропийной составляющей, вследствие чего вся система стремится к рацемизации. В данном случае наблюдается не горизонтальная рацемизация с сохранением типа симметрии, а вертикальная иерархическая рацемизация.

В этом отношении именно живая природа продемонстрировала картину общефизического/химического явления, поскольку макроскопических гомохиральных систем в неживой природе вследствие рацемизации не существует. Тем не менее, и в искусственных небологических гомохиральных системах нами обнаружены многочисленные примеры спонтанного формирования знакопеременных структурных хиральных иерархий.

1. V.A.Tverdislov. Chirality as an Instrument of Stratification of Hierarchical Systems in Animate and Inanimate Nature // Preprint at <https://arxiv.org/abs/1212.1677>. 2012.
2. Твердислов В. А., Малышко Е. В. О закономерностях спонтанного формирования структурных иерархий в хиральных системах неживой и живой природы // Успехи физических наук. 2019. Т. 189. №. 4. С. 375-385.

## МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ

### MULTIFUNCTIONAL PROTEINS

*Узденский А.Б.*

Лаборатория молекулярной нейробиологии, Академия биологии и биотехнологии,  
Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: auzd@yandex.ru

Основные догмы недавнего прошлого: «Один ген – один белок» (или «один цистрон – одна полипептидная цепь») и «Один белок – одна функция» в настоящее время пересматриваются. С одной стороны, число генов человека (19-20 тысяч) настолько меньше числа протеоформ ( $\sim 10^6$ ), что даже альтернативный сплайсинг, при котором часто не возникает функционально новых белков, не приводит эти величины в соответствие. С другой стороны, ряд белков многофункциональны. Они выполняют разные биохимические и биофизические функции в зависимости от конкретной ситуации (контекста) – внутриклеточной локализации, микроокружения, взаимодействий с другими белками, посттрансляционных модификаций. Это позволяет увеличить функциональное разнообразие белков.

Многофункциональность многих белков обеспечивается их структурой, доменной организацией, когда разные домены активируются в разных ситуациях. В последние годы привлекают внимание moonlighting proteins (MLP, от термина moonlighting – работа по совместительству), которые выполняют две или больше различных функций, не обусловленных слиянием генов или протеолитической фрагментацией. Таких MLP уже найдено несколько сотен на протяжении всего эволюционного дерева от бактерий до высших организмов, причем многие из них весьма консервативны. К ним относятся ряд разнообразных белков домашнего хозяйства,

включая некоторые компоненты гликолиза, цикла Кребса, шапероны, компоненты цитоскелета, субъединицы протеасом, факторы транскрипции, компоненты рибосом, рецепторы клеточной поверхности, белки клеточной адгезии и т.д. [1,2]. Например, цитохром с в митохондриях переносит электроны, а в цитозоле, объединяясь с прокаспазой 9, белком Araf1 и dATP, образует апоптосому и стимулирует апоптоз. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GADPH), компонент гликолиза, на поверхности клеток млекопитающих является рецептором трансферрина, способствующего поглощению ионов железа, а на поверхности стрептококков связывает плазминоген. После нитрозилирования GADPH обладает активностью шаперона. Более десятка рибосомных белком, участвуя в разных белковых комплексах в клеточном ядре, являются факторами транскрипции. Один из них, грS3, высвобождаясь из рибосом, может фосфорилироваться протеинкиназой PKCδ и, благодаря эндонуклеазной активности, участвует в репарации ДНК, а связываясь с фактором транскрипции NF-κB, участвует в регуляции экспрессии генов. Белок межклеточной адгезии β-катенин, высвобождаясь из мембраны и избегнув протеолиза, попадает в ядро, где является фактором транскрипции. Двойная или тройная функциональная активность MLP может быть связана с наличием двух и более активных центров в одной полипептидной цепи. Переключение их активности может происходить в результате конформационных перестроек при изменении микроокружения в разных клеточных компартментах, в результате посттрансляционных ковалентных модификаций (фосфорилирование/ дефосфорилирование, ацетилирование/ деацетилирование и т.д.), или в результате взаимодействия с другими белками. В последнем случае в структуре белка кроме «активного центра» можно выделить «пассивные центры» на поверхности, распознаваемые другими белками, связывание с которыми происходит по принципу самосборки надмолекулярных комплексов.

Многие сигнальные белки, протеинкиназы и протеинфосфатазы, такие, как PKA, PKB, PKC, PKG, MAP киназы, AMPK и другие являются мастер-регуляторами разнообразных клеточных процессов, которые, фосфорилируя различные белки, активируют или ингибируют их, включают, выключают или переключают их функции. Комплекс регулируемых ими белков выполняет определенные клеточные функции, включая регуляцию метаболизма, поддержание гомеостаза, выживаемость или смерть клеток.

Более высокий уровень мастер-регуляторов – факторы транскрипции, регулирующих экспрессию дополнительных белков, если присутствующие в клетке белки не справляются с ситуацией. Среди них есть сравнительно узконаправленные регуляторы, такие как Nrf-2, регулирующий экспрессию ряда антиоксидантных белков, а есть белки с невероятно широким спектром действия. К ним относится, например, с-Мус или p53, которые, по последним данным, регулируют экспрессию 10-15% всех генов [3].

Ряд многофункциональных белков, таких как APP (amyloid precursor protein), в результате специфического протеолиза распадается на несколько полипептидов, каждый из которых обладает самостоятельной активностью. Их структура и функции будет разобраны более подробно. Также будет рассмотрен эволюционный аспект происхождения многофункциональных белков.

1. Mani M., et al. Moonlighting proteins database (MoonProt): A database of proteins that are known to moonlight // *Nucleic Acids Res.* 2015, D277–D282.
2. Jeffery CJ. Protein moonlighting: what is it, and why is it important? // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018, 373 (1738).
3. Fisher M. Census and evaluation of p53 target genes. // *Oncogenes* 2017, 36:3943-3956.



## ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫЕ ПОЛЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

## ELECTROMAGNETIC FIELDS AND BIOLOGICAL SYSTEMS

*Фесенко Е.Е.*

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, eugenyfesenko@rambler.ru

На сегодняшний день очевидно, что электромагнитные поля способны оказывать как положительные, так и отрицательные эффекты на биологические системы разного уровня организации (многоклеточные организмы, изолированные клетки, ферментные системы, отдельные клеточные компоненты). В докладе приводятся результаты экспериментальных работ по действию электромагнитных полей разных частот, разных мощностей и режимов облучения на биологические системы. Рассматриваются также эффекты «нулевого» поля, т.е. условий, при которых экранируется магнитное поле Земли.



## ПЕРСПЕКТИВЫ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ КОНСЕРВАЦИИ ОРГАНОВ PROSPECTS OF MODERN TECHNOLOGIES FOR ORGAN PRESERVATION

*Фесенко Е.Е. (мл.), Гагаринский Е.Л., Шишова Н.В.*

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, eugeny.ef@gmail.com

В настоящий момент в России проводится порядка двух тысяч трансплантаций органов ежегодно. При этом число пациентов в листах ожидания в 4-5 раз превосходит число проводимых операций. В странах Западной Европы и США количество пересадок на порядок выше, а потребности превосходят число операций в 10 раз. Ограничения на число трансплантаций накладывают как общая нехватка органов из-за отсутствия доноров, так и малая длительность хранения трансплантатов, ограничивающая их транспортировку. Используемый в клинической практике метод сохранения донорских органов – статическая холододовая консервация, обеспечивает жизнеспособность трансплантатов при сроках консервации, не превышающих 24 часов для почки, 12 часов для печени и 6 часов для сердца. При таких сроках хранения особенно в отношении сердца, крайне затруднена логистика. Так, например, невозможно произвести забор сердца во Владивостоке и доставить его в Европейскую часть России. При этом если в Москве на 1 млн. населения приходится 15 доноров, то в целом по стране этот показатель равен всего 3 донорам. Значительная часть регионального ресурса просто теряется. Пролонгация времени хранения органов хотя бы до 1.5 суток существенно улучшила бы ситуацию с доступностью пересадок за счет более эффективной логистики, а разработка технологии долговременного, например, месячного, хранения в перспективе способствовала бы ликвидации дефицита донорских органов за счет создания соответствующих криобанков.

Сегодня хранение органов стандартно осуществляется в специальном консервирующем растворе в гипотермических условиях при 4°C (статическая холододовая консервация). Рассматривая же проблему долговременного хранения органов, необходимо говорить о низкотемпературном замораживании, а не о гипотермии. Скорость протекания химических реакций экспоненциально падает с понижением температуры, и чтобы остановить метаболизм на требуемый месяц, необходимо глубокое охлаждение, до минус 70°C и ниже. Для макрообъектов, таких как массивы тканей и целые органы, проблема глубокого охлаждения не решена.

Таким образом, можно выделить два основных направления развития технологий консервации органов: разработка новых подходов к пролонгации гипотермического хранения и разработка способа низкотемпературного замораживания для долговременного хранения.

В рамках первого направления нами проведены исследования по консервации сердца в газовых смесях различного состава при 4°C и подобраны варианты сочетанного воздействия давления смеси газов на основе монооксида углерода и органопротекторных фармакологических субстанций, обеспечивающие эффективное восстановление активности изолированного сердца крысы после 24+ часов гипотермического хранения. Высокая сохранность трансплантата показана в серии гистологических анализов, а приживляемость подтверждена на модели гетеротопической пересадки сердца крысы. Также впервые газовая консервация успешно использована для сердца мини-свиньи (вес животных 35 кг). Достигнуто восстановление сократительной активности после 20-ти часового хранения при температуре 4°C как на перфузионном стенде, так и на модели гетеротопической пересадки.

Предложенный подход по ряду критериев превосходит активно разрабатываемые сегодня в мире системы для перфузионного хранения органов, основанные на нормотермической перфузии с оксигенацией кровью, когда донорский орган сохраняется в условиях, близких к физиологическим.

В рамках второго направления - низкотемпературного замораживания органов – наиболее перспективным представляется перевод внутриклеточной воды в стекловидное состояние (витрификация), когда не образуется отдельных кристаллов льда - ключевого повреждающего фактора при глубоком охлаждении. На практике витрификация требует высоких концентраций (до 70 вес.%) проникающих низкомолекулярных агентов (этиленгликоль, ДМСО) для того, чтобы повысить вязкость среды и достичь критической температуры стеклования. Такие концентрации оказывают токсический эффект на живые клетки. Нами разработана и экспериментально обоснована на клеточной, тканевой и органной моделях концепция витрификации биологических объектов, обеспечивающая замораживание без кристаллизации в условиях сниженной на 20-30 процентов суммарной концентрации витрифицирующих агентов. С ее помощью осуществлена успешная криоконсервация клеточных суспензий, аорты крысы, а также изолированного органа - сердца травяной лягушки (*Rana temporaria*). Хранение сердца осуществляли при температурах минус 130°C и минус 196°C в течение времени, варьирувавшегося от 1 суток до 1.5 месяцев, с последующим восстановлением сократительной активности на перфузионном стенде.

Среди подходов к низкотемпературному замораживанию, отличных от витрификации, заслуживает внимания метод "градиентного замораживания", разработанный группой А. Арава. Суть метода заключается в том, что объект крайне медленно опускают в градиент температур от 0 до минус 70°C. В результате морфология льда, который при этом образуется носит щадящий для тканей (модельный объект - конечность крысы) характер [1].

1. Arav A. et al. Rat Hindlimb Cryopreservation and Transplantation: A Step Toward "Organ Banking" // American Journal of Transplantation 2017; 17: 2820–2828.

## СТАБИЛЬНОСТЬ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК STABILITY OF THE DNA DOUBLE HELIX

*Франк-Каменецкий М.Д.*  
Бостонский университет, Бостон, США

Исследование плавления и энергетики двойной спирали ДНК является одним из основных направлений молекулярной биофизики вот уже в течение более чем 60 лет. Доклад посвящен краткому обзору современного состояния вопроса, и проведенный анализ приводит к заключению, что в нашем понимании явления еще имеются серьезные пробелы. Сравнительный анализ имеющихся в литературе различных наборов энергетических параметров, описывающих плавление ДНК, показывает, что в случае плавления длинных молекул имеется консенсус, состоящий в том, что необходимо учитывать гетерогенность стэкинг-взаимодействий между ближайшими соседями вдоль цепи ДНК, причем найденные разными группами параметры модели хорошо описывают детали дифференциальных кривых плавления. В отношении плавления коротких дуплексов, использование тех же параметров приводит к неожиданному результату: учет гетерогенности стэкинг-взаимодействия не улучшает предсказательную силу теории по сравнению с простейшей моделью, в которой гетерогенность стэкинг-взаимодействий полностью игнорируется. Существенное внимание уделяется попыткам определить независимо вклад стэкинг-взаимодействий и спаривания оснований в стабильность двойной спирали. Вопреки устоявшемуся представлению, полученные данные свидетельствуют о том, что стэкинг-взаимодействия, а не спаривание оснований, вносит определяющий вклад в стабильность двойной спирали ДНК.

## БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ REGULATION OF CONTRACTION OF STRIATED MUSCLE: BIOPHYSICAL ASPECTS OF

*Цатурян А.К.<sup>1</sup>, Копылова Г.В.<sup>2</sup>, Щепкин Д.В.<sup>2</sup>, Набиев С.Р.<sup>2</sup>, Матюшенко А.М.<sup>3</sup>, Кубасова Н.А.<sup>1</sup>, Левицкий Д.И.<sup>3</sup>, Бершицкий С.Ю.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>НИИ механики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, tsat@imec.msu.ru

<sup>2</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, Москва, mailto:mlevitsky@inbi.ras.ru

<sup>3</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, serg.bersh@gmail.com

В основе сокращения мышц лежит взаимодействие сократительных белков – актина и миозина, сопровождающееся гидролизом АТФ. В поперечно-полосатых (скелетных и сердечной) мышцах актин и миозин образуют тонкие и толстые нити, соответственно. Эти нити, в свою очередь, образуют гексагонально упакованную структурно-функциональную единицу мышцы – саркомер. Актин-миозиновое взаимодействие регулируется ионами  $Ca^{2+}$  при участии регуляторных белков: тропонина (Тн) и тропомиозина (Тм). Молекулы длинного супер-спирального Тм соединяются друг с другом «голова-к-хвосту», формируя непрерывный тяж на поверхности актиновой нити. Тн, состоящий из трех субъединиц, соединяется с молекулой Тм.

В отсутствие  $Ca^{2+}$  Тн связывается с актином, удерживая Тн тяж в «блокирующем» положении и закрывая места связывания миозина на актине. Мышца при этом находится в расслабленном состоянии. В присутствии  $Ca^{2+}$  блокирование снимается, Тм тяж поворачивается относительно оси нити в «закрытое» положение, частично открывая доступ к актину для миозиновых головок. Последующая трансформация актин-миозиновой связи из слабой в прочную сопровождается дальнейшим смещением тяжа и открывает соседние места связывания для головок миозина, запуская сокращение мышцы. Такое состояние называют «открытым».

Простая механическая модель, рассматривающая Тм тяж как упругий спиральный стержень на спиральной поверхности актиновой нити в поле электростатических сил [1], объясняет многие экспериментальные данные, в том числе высокую кооперативность системы. Кооперативность и чувствительность к ионам  $Ca^{2+}$  во многом определяется изгибной жесткостью Тм тяжа. Консервативные аминокислотные остатки Тм, нетипичные для супер-спирали, по-видимому, влияют на его форму и изгибную жесткость. Многие мутации в генах, кодирующих различные изоформы Тм, вызывают наследственные миопатии или кардиомиопатии.

Чтобы выяснить связь между структурными и функциональными свойствами Тм, мы провели комплексное исследование, включающее получение рекомбинантных форм Тм, исследование их термостабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии, измерение сродства Тм к актину и температурной стабильности актин-Тм комплексов [2-3]. Кроме того, мы оценивали изгибную жесткость мутантов Тм с помощью молекулярной динамики [3], измеряли скорость движения реконструированных тонких нитей, содержащих мутантный Тм, по поверхности, покрытой миозином [2-4], и определяли изгибную

жесткость таких нитей с помощью двухлучевой оптической ловушки [5]. Результаты этих исследований показали тесную связь между изгибной жесткостью Тм и актин-Тм комплексов и функциональными характеристиками системы регуляции: максимальной скоростью движения нитей, кальциевой чувствительностью и кооперативностью.

Для исследования движений Тм в сокращающейся мышце можно использовать малоугловую рентгеновскую дифракцию на современных источниках синхротронного излучения. Для количественной интерпретации рентгеноструктурных данных была разработана и верифицирована математическая модель [6]. Эксперименты показали, что уменьшение количества миозиновых головок, присоединенных к актину в полностью активированных быстрых волокнах мышцы кролика, вызванное быстрым укорочением, не приводит к переходу Тм из «открытого» состояния в «закрытое», которое, видимо, не является физиологическим [7].

Поддержано комплексным проектом РФФИ КОМФИ 17-00-00071 (17-00-00066 А.Ц., 17-00-00070 С.Б. и 17-00-00065 Д.Л.).

1. Metalnikova N.A, Tsaturyan A.K. A mechanistic model of Ca regulation of thin filaments in cardiac muscle. // *Biophys J*. 2013. Vol. 105. P. 941.
2. Matyushenko A.M. et al. Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of  $\alpha$ -tropomyosin molecule. // *FEBS J*. 2014. Vol. 281. P. 2004.
3. Matyushenko A.M. et al. Functional role of the core gap in the middle part of tropomyosin. // *FEBS J*. 2018. Vol. 285. P. 871.
4. Shchepkin D.V. et al. Cooperativity of myosin interaction with thin filaments is enhanced by stabilizing substitutions in tropomyosin. // *J Muscle Res Cell Motil*. 2017. Vol. 38. P. 183.
5. Nabiev S.R. et al., Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament. // *Biophys J*. 2015. Vol. 109. P. 373.
6. Koubassova N.A. et al. Tropomyosin movement is described by a quantitative high-resolution model of X-ray diffraction of contracting muscle. // *Eur Biophys J*. 2017. Vol. 46. P. 335.
7. Bershtitsky S.Y. et al. The Closed State of the Thin Filament Is Not Occupied in Fully Activated Skeletal Muscle. // *Biophys J*. 2017. Vol. 112. P.1455.



## РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ПОЛУЧЕНИЮ ЭНЕРГИИ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ TOWARDS TO ALTERNATIVE ENERGY USING BIOLOGICAL SYSTEMS

*Цыганков А.А.*  
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино

Современная цивилизация основана на использовании энергии ископаемых источников. Однако их использование приводит к существенному загрязнению окружающей среды, прежде всего атмосферы Земли. Одним из существенных загрязняющих элементов является углекислый газ, возрастание концентрации которого приводит к так называемому парниковому эффекту. За счет парникового эффекта температура Земли растет угрожающими темпами. Становится очевидна потребность в отказе от ископаемых источников энергии и переходе к альтернативным источникам. Одним из таких источников является солнечная энергия, которой приходит на Землю на 3-4 порядка больше, чем существующее сегодня энергопотребление человечества.

Фотосинтезирующие организмы способны к запасанию солнечной энергии. Более того, некоторые виды микроводорослей и цианобактерий способны к запасанию солнечной энергии в виде водорода, осуществляя прямой или непрямой биофотолит воды. В определенных условиях квантовый выход может достигать значений близких к единице. При этом водород является эффективным теплоносителем. Он может образовываться из воды, и вода является конечным продуктом его сгорания. Наряду с микроводорослями и цианобактериями к светозависимому выделению водорода способны и пурпурные бактерии, причем скорость выделения водорода этой группой бактерий близка к практически значимым. В докладе обсуждаются сегодняшние достижения и направления исследований для создания биотехнологических систем получения водорода за счет энергии света.

Наряду с получением водорода биологические системы способны и к его преобразованию в электричество. Для этого разрабатываются способы модификации гидрогеназ (ферментов, заменяющих платину в топливных элементах) и их иммобилизации на электродах. В докладе представлены последние результаты исследований топливных элементов с использованием гидрогеназных водородных электродов.

Работа поддержана грантом РФФ 19-14-00255.

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР КОНФОРМАЦИОННО ПОДВИЖНЫХ МОЛЕКУЛ***Шайтан К.В.*<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва 119992,<sup>2</sup>Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, Москва 119992,

Рассматриваются физические основы и математические идеи для описания процесса формирования уникальных 3D-структур биополимеров. Проводится сравнительный анализ формирования простых кристаллических структур и 3D-структур биополимеров. Показано, каким образом топология конфигурационного пространства [1-3] макромолекул с конформационной подвижностью и хиральность [4] влияют на топографию многомерной поверхности потенциальной энергии (энергетической воронки [5]).

Демонстрируется расслоение конфигурационного пространства макромолекулы на область центральной воронки, которая связана с глобальным минимумом энергии и области сателлитных воронок, из которых переход в уникальную 3D-структуру сильно затруднен [4,6,7]. Этот эффект объясняет невозможность обратного фолдинга макромолекулярной цепи при силовом разворачивании глобулы атомно-силовым микроскопом [8] в отличие от случая мягкой денатурации глобулы в растворе, а также важную роль начальной (приготовленной) конформации цепи. В гауссовском приближении исследуются переходы между глобулярным и денатурированным состояниями и показан эффект формирования «вулканоподобной» формы энергетической воронки в согласии с результатами по кинетике фолдинга [9,10].

С использованием подходов многомерной геометрии и концентрации меры для многомерных объектов [11] определены правила движения репрезентативной точки на многомерных энергетических ландшафтах при сворачивании макромолекулярных структур в вязкой среде и показано наличие базового принципа для динамики таких систем – равномерного распределения средних скоростей диссипации энергии для узлов цепи [12-14]. По этой причине траектория сворачивания полимерной цепи избегает областей с резким изменением энергии по относительно небольшому числу переменных (принцип «начинающего горнолыжника») и репрезентативная точка имеет возможность не запутаться во множестве локальных особенностей многомерного энергетического ландшафта и достичь глобального минимума за разумное время [14].

Показано выполнение двух экстремальных принципов при сворачивании полимерной цепи в вязкой среде: 1) принцип максимума скорости убыли потенциальной энергии системы и 2) принцип минимума скорости диссипации энергии при заданной скорости убыли потенциальной энергии [15].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-02-40010.

1. Шайтан К.В. Динамика электронно-конформационных переходов и новые подходы к физическим механизмам функционирования биомолекул // Биофизика. 1994. Т. 39. СС. 949-967.
2. Shaitan K.V. The topological structure of hypersurfaces of conformational energy levels and physical mechanisms of the internal mobility of proteins // Macromolecular Symposia. 1996. Vol. 106. PP.321-335.
3. Shaitan K.V. Protein dynamics and new approaches to the molecular mechanisms of protein functioning // Stochastic Dynamics of Reacting Biomolecules, Ed. by W. Ebeling, L. Schimansky-Gefer, and Y. M. Romanovsky. World Scientific. Singapore. 2003. PP. 285-310.
4. Шайтан К.В. Строение энергетических ландшафтов макромолекул, формирующих уникальную пространственную структуру // Биофизика. 2018. Т. 63. СС. 629-642.
5. Wolynes P.G. Energy landscapes and solved protein-folding problems // Phil. Trans. R. Soc. A. 2005. Vol. 363. PP.453-467.
6. Шайтан К.В. О ландшафтах свободной энергии для макромолекул, формирующих уникальную пространственную структуру // Биофизика. 2018. Т. 63. СС. 850-858.
7. Шайтан К.В. Особенности топографии энергетических ландшафтов в пространстве торсионных углов для макромолекул, формирующих уникальные 3D-структуры // Биофизика. 2018. Т. 63. СС. 1057-1069.
8. Borgia A. et al. Single-Molecule Studies of Protein Folding // Annu. Rev. Biochem. 2008. Vol. 77. PP. 101-125.
9. Rollins G.C., Dill K.A. General Mechanism of Two-State Protein Folding Kinetics // JACS. 2014. Vol. 136. P.11420-11427.
10. Finkelstein A.V. et al. There and back again: Two views on the folding puzzles // Physics of Life Rev. 2017. Vol. 21. PP. 56-71.
11. Зорич В.А. Геометрия и вероятность // Теория вероятностей и ее применения. 2017. Т.62. СС. 292-310.
12. Шайтан К.В. Распределение скоростей диссипации энергии по степеням свободы при конформационных движениях и фолдинге макромолекулярной цепи в вязкой среде // Биофизика. 2017. Т. 62. СС. 5-8.
13. Шайтан К.В., Ложников М.А., Кобельков Г.М. Динамика формирования коллективных конформационных степеней свободы при фолдинге макромолекулярной цепи в вязкой среде // Биофизика. 2017. Т. 62. СС. 249-257.
14. Шайтан К.В., Попеленский Ф.Ю., Армеев Г.А. Корреляция конформационных движений при формировании вторичной структуры полипептидов в вязкой среде // Биофизика. 2017. Т. 62. СС. 443-451.
15. Шайтан К.В. Вариационные принципы в механике конформационных движений макромолекул в вязкой среде // Биофизика. 2018. Т. 63. СС. 5-15.

**ПРИРОДНЫЕ И ТЕХНИЧЕСКИЕ КОГНИТИВНЫЕ СИСТЕМЫ: В ЧЕМ ИХ РАЗЛИЧИЕ?  
NATURAL AND TECHNICAL COGNITIVE SYSTEMS: WHAT IS THE DIFFERENCE?**

**Яхно В.Г.**

Институт прикладной физики РАН, Россия, Н.Новгород,  
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, *yakhno@appl.sci-nnov.ru*

Рассмотрены архитектуры "элементарных когнитивных систем", представляющих собой универсальные модули для разного вида сигналов, пространственно-временных масштабов выполняемых операций, целевых функций и областей применения. Используемые алгоритмы в моделях когнитивных систем обязательно зависят от выбранных приоритетов системы уровней обобщенных средств управления.

Из элементарных модулей можно конструировать различные иерархические системы для интерпретации поведения реальных живых систем (суперсистем), а также предлагать разработки технических устройств с функциональными возможностями как у живых прототипов.

Введены определения режимов осознания входного сигнала, бессознательного восприятия, предложены архитектурные связи в модельных системах, аналогичные процессам интуитивного восприятия информации.

Анализ динамических режимов таких моделей позволяет конструировать формализованный язык описания поведения суперсистем и предлагать интерпретации экспериментальных данных, которые до этого казались загадочными.

На основе литературных данных, описывающих опыт практических психологов, приведены разнообразные примеры особенностей обработки сигналов, которые наглядно показывают существующие различия между возможностями приспособления технических и естественных когнитивных систем к реальным условиям природной среды.

Основное различие связано с особенностями управления через два блока "Я" в живых системах, в то время как технические системы обычно управляются через один канал управления. При этом одно "Я" основывается на опыте организма за один период жизнедеятельности, а другой блок "Я", предположительно более высшего управленческого уровня, основывается на целевых функциях, формирующихся на основе нескольких периодов обучения в природной среде. Такое различие в режимах управления системами приводит к тому, что технические системы ориентированы только на снижение ошибок в заданных разработчиками областях операционной деятельности, тогда как для живой системы, кроме уменьшения ошибок в её области функционирования, очень важно снижать также и возможные "ошибочные" влияния на другие когнитивные системы, с которыми она вольно или невольно взаимодействует (в людском социуме такие ошибки контролируются экологическими, этическими или моральными правилами).

Рассмотрение даже некоторых из широкого разнообразия режимов взаимодействующих когнитивных систем приводит к давно известному вопросу: что важнее для исследователя и разработчика - развитие его человеческих качеств у него самого или сообщества, в котором он функционирует, или только те его достижения, которые оцениваются качеством работы технических систем для предоставленной ему социумом "искусственной реальности"? Известен и ответ: для технической когнитивной системы выбор среди режимов функционирования запрограммирован её разработчиком (чаще всего с ориентацией на зомби-режимы), в то время как каждая живая когнитивная система осуществляет такой выбор в соответствии с иерархией её жизненных приоритетов (типы строя психики, уровни обобщенных средств управления) и результатами взаимодействия с другими природными когнитивными системами.

Предложенные базовые модели с опорой на экспериментальные данные позволяют конструировать упомянутые в докладе процессы, которые до этого могли бы выглядеть "загадочными".

Работа выполнена при частичной поддержке Министерства Образования и Науки РФ, проект №14.Y26.31.0022

## SPECTROSCOPY OF PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTERS UNDER HIGH HYDROSTATIC PRESSURE

**Freiberg, A.**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physics, University of Tartu, Estonia, E-mail ([arvi.freiberg@ut.ee](mailto:arvi.freiberg@ut.ee))

<sup>2</sup>Estonian Academy of Sciences, Tallinn, Estonia

Charge transfer processes are ubiquitous in biology. The bacterial photochemical reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* constitutes a useful model system for understanding effects of protein structure on the photoinduced electron transfer in membrane proteins, as a number of crystal structures from native and mutant reaction centers are available. Here, steady state and picosecond time-resolved optical barospectroscopy is applied to reversibly tune the reaction center structure and to obtain new insights into the physical mechanisms that govern the nano-scale primary electron transport.

Here, I will report about first application of high hydrostatic pressure barospectroscopy for obtaining insights into the physical mechanisms that govern the transport of electrons in the Tyrosine M210 to Tryptophan mutant reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. Special care was taken to keep all or most of the reaction centers in photoactive (open) state.

Over the whole applied pressure range up to 10 kbar, the fluorescence kinetics was reasonably described by two exponentially decaying picosecond components assigned to primary charge separation and charge recombination, and a nanosecond component related to forward electron transfer to a secondary electron acceptor. Upon increasing pressure, the corresponding transfer rates increased, decreased, and remained unchanged within the experimental uncertainty. While the free energy gap evaluated from the kinetic data generally narrowed with increasing pressure, a pressure-induced break of a lone hydrogen bond of the special pair observed at ~2 kbar significantly increased the gap, resulting in a three-fold drop of the recombination luminescence amplitude. This work thus strongly favors an electron transfer model with charge recombination over the putative sequential model. By revealing the relationships between the electron coupling energy, reorganization energy and pressure, we confirm that at ambient temperature the electron transfer in bacterial reaction centers can be at all pressures well considered nonadiabatic, proceeding in close to optimal electron transfer regime.

The reaction center emission is strongly (yet reversibly) quenched by the break of the hydrogen bond. The available spectral and kinetic evidence strongly suggests a substantial change of electronic structure of the special pair (if not the whole reaction center) following the break of the local H-bond in the binding pocket of the special pair.

I will generalize by comparing the specific YM210W mutant data with those obtained on wild type and other mutant reaction centers of the same species.



# **Секция 1. Структура и динамика белков и их комплексов.**

**МОДЕЛЬ БРОУНОВСКОЙ ДИНАМИКИ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ЦИТОХРОМА С И ВОДОРАСТВОРИМОЙ ЧАСТИ ЦИТОХРОМА C1 В РАСТВОРЕ**

**BROWNIAN DYNAMICS SIMULATION OF COMPLEX FORMATION FOR RESPIRATORY ELECTRON TRANSPORT CHAIN PROTEINS CYTOCHROME C AND WATER-SOLUBLE PART OF CYTOCHROME C1 IN SOLUTION**

*Абатурова А.М., Браже Н.А., Коваленко И.Б., Федоров В.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б.*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т, кафедра биофизики, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12, abaturova@list.ru

Белок цитохром с (цит.с) при дыхании переносит электроны от цитохрома с1 (субъединицы цитохромного bc1 комплекса) к цитохром с оксидазе. При этом происходит его диффузия в пространстве между наружной и внутренней мембранами митохондрии и в кристах (складках внутренней мембраны) и попеременное связывание его с интегральными мембранными белками. Размеры, форма и ионная сила реакционного пространства влияют на скорость транспорта электрона. При болезнях размер и форма крист меняются [1].

Мы построили модель образования предварительного комплекса цитохрома с и водорастворимой части цитохрома с1 (цит.с1) с помощью программы броуновской динамика ProKSim [2]. Белки рассматриваются как жесткие твердые тела, учитывается их поступательное и вращательное движение и электростатические взаимодействия. Для описания координат атомов белков использовали PDB структуры цит с1, выделенного из митохондрий быка 1BGY и цит с из митохондрий лошади 3O1Y. Заряды на белках расставлялись с помощью силового поля CHARMM27, дополненного параметрами для гема [3]. Комплекс белков считался образованным, если энергия его по модулю была больше, а расстояния между атомами белков меньше заданных значений. Из модельной кинетической кривой связывания белков с помощью закона действующих масс определялась константа второго порядка связывания белков.

Мы оценили значения параметров модели по экспериментальной зависимости константы связывания цит с и цитохромного bc1 комплекса в растворе от ионной силы [4]. Установлено, что для соответствия зависимости константы связывания белков от ионной силы с экспериментальной, в модели надо учитывать ансамбль расположений цитохрома с в предварительных комплексах около сайта связывания с расстоянием между редокс центрами (атомами железа) менее 35Å и энергией электростатического взаимодействия по модулю больше 3.4 kT. Цит.с в месте связывания с цит.с1 имеет область положительного потенциала, а у цит.с1 в месте связывания имеется область отрицательного электростатического потенциала, причем она растянута по области цит.с1, обращенной в межмембранное пространство митохондрии. Полученные предварительные комплексы расположены вдоль этой области.

В дальнейшем учет митохондриальной мембраны и особенностей распределения дыхательных комплексов в мембране позволит оценить влияние размеров и формы крист на скорость связывания белков.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00999.

1. Sara Cogliati et al. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality // Review Special Issue: Mitochondria & Metabolism, 2016, Vol. 41, ISSUE 3, P. 261-273.
2. Хрущев С.С. и др. Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса многочастичной броуновской динамики ProKSim // Компьютерные исследования и моделирование, 2013, том 5, № 1, Стр. 47-64.
3. Felix Autenrieth et al. Classical Force Field Parameters for the Heme Prosthetic Group of Cytochrome c // J Comput Chem., 2004, Vol. 25, No. 13, P. 1613-1622.
4. Gregory Engstrom et al. Design of a Ruthenium-Labeled Cytochrome c Derivative to Study Electron Transfer with the Cytochrome bc 1 Complex // Biochemistry, 2003, 42(10), P. 2816-24.

## КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТАХИКИНИНОВОГО ДЕКАПЕПТИДА СИАЛОКИНИНА I CONFORMATIONAL PARTICULARITIES OF TACHYKININ DECAPEPTIDE SIALOKININ I

Агаева Г.А.

Институт физических проблем, Бакинский государственный университет,  
AZ-1148, Баку, ул. 3.Халилова, 23;

Широкий спектр биологических активностей нейропептидов объясняется хорошей специфической селективностью нейропептидов к различным типам рецепторов, которое в свою очередь реализуется благодаря конформационно-динамическим свойствам взаимодействующих молекул. Особенное сходство по структуре и взаимодействию с рецепторами наблюдается между тахикининовыми нейропептидами, основными свойствами которых являются понижение артериального давления, стимулирование сокращения гладкой мускулатуры и перенос болевых ощущений. В работе [1] сообщалось, что слюна комара желтой лихорадки *Aedes aegypti* содержит пептид с фармакологическими свойствами, типичными для тахикининовых нейропептидов. В данном исследовании этот пептид был очищен до гомогенности и было обнаружено, что он состоит из двух пептидов: сиалокинина I, содержащего 10 аминокислотных остатков с последовательностью Asn-Thr-Gly-Asp-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> и сиалокинина II, идентичного сиалокинину I, за исключением Asn в положении 1. Было выяснено [2], что сиалокинины I и II, два пептида, выделенные из слюнных желез комара желтой лихорадки, *Aedes aegypti*, действуют как вазодилататоры, действующие через тахикининовые рецепторы. Эти пептиды присутствуют в количестве 0,62 и 0,16 пмоль, соответственно, на пару слюнных желез. Как оказалось при анализе на подвздошной кишке морской свинки оба пептида столь же активны, как и вещество P из семейства тахикининовых пептидов млекопитающих. Известно, что сиалокинин I также как и все тахикинины в той или иной мере может взаимодействовать с тремя различными типами тахикининовых рецепторов NK1, NK2 и NK3, но является селективным агонистом NK1 рецепторов. Сиалокинин I способен инициировать ответ связываясь с NK1 тахикининовым рецептором. Поскольку осуществление и эффективность фармакологических воздействий пептидного биорегулятора, так или иначе, связаны со структурной комплементарностью, взаимодействующих пептида и рецептора. Поэтому, для выяснения механизма биологического эффекта, необходимо знание пространственного строения и конформационных возможностей пептидного биорегулятора и его эффективных структурных аналогов. Главной целью настоящей работы является исследование конформационных свойств молекулы сиалокинина I, с целью определения основных структурных требований, необходимых для лиганд-рецепторного взаимодействия. Исследование пространственного строения молекулы сиалокинина I проводилось методом молекулярной механики с использованием стандартной геометрии. При конформационном расчете пептидов учитывали невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. Расчет проводился согласно фрагментарного анализа молекулы. Результаты исследования показали, что N-концевая тетрапептидная последовательность пептида является относительно подвижным участком и способным образовывать бета- и гамма-изгибы, благодаря наличию в цепи остатка пролина. В то же время C-концевая гептапептидная часть молекулы в стабильных конформационных состояниях энергетически предпочтительно формирует альфа-спиральную структуру. В результате расчетов были определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов и взаимное расположение остатков в стабильных конформациях сиалокинина I. Конформационный анализ последовательно наращиваемых C-концевых фрагментов молекулы сиалокинина I выявил значительную преемственность результатов по мере увеличения длины рассматриваемой пептидной цепи. Полученные низкоэнергетические конформации молекулы сиалокинина, входящие в интервал относительной энергии 0-10 ккал/моль, можно представить в виде отдельных семейств конформаций, характеризующиеся одинаковой структурой C-концевого гептапептида. Внутри каждого семейства конформации различаются структурным типом N-концевого фрагмента, который продолжен относительно жестким участком последовательности 5-10. На втором этапе исследования использовался метод молекулярной динамики, который позволил моделировать картину внутримолекулярной подвижности молекулы сиалокинина I. В качестве начальных приближений были использованы 10 наиболее стабильных конформационных состояний молекулы. Был также проведен поиск дополнительных локальных минимумов для боковых цепей каждого из остатков в поле стабильных конформационных состояний молекулы. В результате этой процедуры были определены ключевые остатки, играющие существенную структурообразующую роль в пространственной организации молекулы сиалокинина I.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ribeiro J.M.C., Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito *aedes aegypti*.// J. Exp. Biol., 1992, v.165, pp.61-71.
2. Champagne D. E., Ribeiro J. M. C., Sialokinin I and II: Vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*.// Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Pharmacology, 1994, v. 91, pp. 138-142.

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ NEF С ABCA1 И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ДЛЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ-ИНГИБИТОРОВ**

### **NEF INTERACTIONS WITH ABCA1 AND POTENTIAL SITES FOR BINDING SMALL-MOLECULE INHIBITOR DRUGS**

*Аджубей А.А., Анашкина А.А., Ткачев Я.В.*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

Влияние белка ВИЧ-1 Nef на демиелинизацию клеток центральной нервной системы опосредовано его воздействием на белок-транспортер холестерина ABCA1. Известно, что действие Nef ингибирует активность ABCA1, нарушает его созревание в эндоплазматическом ретикулуме, а также индуцирует интернализацию и деградацию мембранного белка ABCA1. Важную роль в этом процессе также играет шаперон калнексин, с которым Nef образует комплекс. Для определения возможных взаимодействий Nef-ABCA1 была построена экспертная модель цитоплазматического фрагмента ABCA1 и выполнено моделирование сайтов связывания в структурах Nef и ABCA1. Это позволило определить интерфейс взаимодействия белков и локализовать в них сайты связывания.

Нами было показано, что Nef взаимодействует со структурным эпитопом ABCA1, состоящим из участков на двух смежных цитоплазматических доменах [1]. В то время как сайт в С-концевом домене ABCA1 был идентифицирован нами ранее, другие возможные сайты взаимодействия в ABCA1, а также сайты в Nef, ответственные за взаимодействие, остаются неизвестными. Эта информация имеет большое значение для рационального конструирования ингибиторов. Для выполнения задачи поиска других сайтов связывания цитоплазматического домена ABCA1 с Nef была построена экспертная модель цитоплазматического фрагмента ABCA1, уточненная методом молекулярной динамики. Далее было проведено моделирование сайтов связывания в структурах Nef и ABCA1 с помощью глобального докинга, используя разработанные нами ранее подход и сервер [2].

Структура цитоплазматических доменов ABCA1 D1(847-1324) и D2(1870-2261) моделировалась серверами PyMol, iTasser, RaptorX, M4T, SwissModel. Кроме того, была построена модель полноразмерного белка ABCA1 с помощью сервера SwissModel, на основе неполной структуры PDB 5XJY (со множеством отсутствующих фрагментов), полученной методом электронной микроскопии. Дальнейшее построение структуры проводилось методом экспертного моделирования.

Для последующего уточнения методом молекулярной динамики была подготовлена модель, содержащая трансмембранную и цитоплазматическую части ABCA1 и фрагмент липидной мембраны. Система была минимизирована за 5000 шагов, затем уравновешена с шагом в 1 фс для 75000 шагов и с шагом 2 фс для 150000 шагов, используя связь по температуре и давлению. Для траектории длиной 60 нс ансамбль NPT моделировался при температуре во время симуляции 310K. Все моделирования были выполнены с использованием полного атомного силового поля CHARMM36 и программного обеспечения GROMACS.

Построенная нами ранее модель структуры белка Nef [3] также была уточнена методом молекулярной динамики. Учитывая подвижность петель белка Nef, было выбрано 5 различных кластеров конформаций, наиболее полно представляющих пространство конформационных состояний. Репрезентативные структуры этих кластеров были использованы для докинга.

Модель цитоплазматической части ABCA1, полученная после молекулярной динамики, далее была использована для докинга с моделями структуры Nef. Докинг был проведен между моделями структуры Nef и моделью структуры цитоплазматической части ABCA1 без мембраны, с помощью серверов ZDock, SwarmDock, GramX и ClusPro. Всего было получено 80 моделей взаимодействия цитоплазматической части ABCA1 с Nef. После отсева моделей докинга, в которых Nef наложился на структурную область, занимаемую мембраной, осталось восемнадцать моделей ABCA1 - Nef.

Если учесть, что N-конец белка Nef липидирован по остатку Gly2 остатком миристиновой кислоты, который служит для закрепления Nef в мембране, то остается только одна модель ABCA1 - Nef, удовлетворяющая таким пространственным критериям. С помощью сервера QASDOM [2] мы определили участки белков ABCA1 и Nef, образующие интерфейс взаимодействия. Сайты связывания центрированы на остатках, для которых показано наибольшее количество межмолекулярных атомных взаимодействий. Для ABCA1 это Ser1023, Leu1026, Leu1972, Thr1261, Pro1267, Leu1282, Pro1284, Thr1305. Для Nef: Asp32, Asp40, Asn51, Cys59, Trp61, Tyr85, Asp127. Эти сайты будут использованы для проведения структурно-ориентированного виртуального скрининга.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-54-30021 НИЗ\_а.

1. Jacob D. et al. The ABCA1 domain responsible for interaction with HIV-1 Nef is conformational and not linear // *Biochem Biophys Res Commun* 2014. Vol. 444. P. 19.
2. Anashkina AA. et al. Meta-server for automatic analysis, scoring and ranking of docking models // *Bioinformatics* 2018. Vol. 34. P. 297.
3. Hunegnaw R. et al. Interaction Between HIV-1 Nef and CalnexinHighlights // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2016. Vol. 36. P. 1758.

**ВРЕМЕННАЯ КИНЕТИКА РЕКОМБИНАЦИИ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В ПОЛНОСТЬЮ ГИДРАТИРОВАННОМ ФИБРОИНЕ ИНДУЦИРОВАННОМ УФ- ИЗЛУЧЕНИЕМ**

**TIME-DEPENDENT RECOMBINATION KINETICS OF FREE RADICALS IN FULLY HYDRATED FIBROIN INDUCED BY UV-IRRADIATION**

*Aslanov R.B., Dashdemirova L.M., Alekperov O.Z.<sup>1</sup>, Gasymov O.K.*

Institute of Biophysics, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, oktaygasimov@gmail.com

<sup>1</sup>Institute of Physics, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku

The inter-relationship of protein structure, dynamics and function is essential to the understanding many biophysical processes in nature. Silk fibroin (SF) from *Bombyx mori* has a long time been used as a model protein to study various processes. Excellent mechanical properties along with very high tissue biocompatibility make fibroin excellent material for various applications in biotechnology. SF is a good photonic material. Rhodamine 6G in high concentrations incorporate to SF film matrix in a monomeric form that is essential for high quantum yield fluorescence. Aqueous solutions of SF have also been used as a model protein, particularly to study the aggregation of the molecules that related to various amyloid diseases.

In this study, SF is used as a paradigm protein to investigate time-dependent recombination of free radicals in fully hydrated fibroin induced by UV-irradiation. Molecular dynamics of the protein have been shown to determine the temperature interval of recombination of the free radicals [1]. Three characteristic regions with transitions points at ~135 K, 205 K and 279K were observed in thermal decays curves of the free radicals induced by UV-irradiation in hydrated SF. Comparison of the decay curves of UV-induced free radicals in dry and hydrated fibroin samples have discriminated transitions that are weakly (205 K) and strongly (279 K) coupled to water molecules. Here, time-dependent decays of free radicals induced in SF by UV-irradiation were studied at various temperatures.

Silk coons of *Bombyx mori* were used to obtain SF. The widely applied standard method was used to remove water-soluble protein sericin from silk to get SF. Insure of full hydration, SF loaded to quartz tubes completely covered by distilled water were left at room temperature for at least 24 hours. Samples were degassed using a freeze-thaw method that avoids the formation of radicals resulted from the interaction of O<sub>2</sub> with the primary radicals induced by UV-irradiation of SF. This system has some advantage to study the influence of hydration on protein dynamics. At low temperatures, about 50% glycerol is used in aqueous solution of proteins to prevent the desalting process during freezing. While totally hydrated, desalting will not be an issue for SF in the water environment. Therefore, this system is more appropriate to study the influence of hydration on free radical recombination reactions.

Fully hydrated SF samples frozen at 77K were UV-irradiated with 500W mercury arc lamp for about 1 hour. Then the irradiated fibroin sample was kept at a certain temperature for various times. For each time point, the reaction was ended by quick freezing at 77K. Then, the same sample was kept at the same temperature for continuation of the recombination reaction. The decrease of the amount of free radicals was estimated by double integration of EPR spectrum. All spectra were acquired at 77K and, therefore, there was no need for correction due to temperature differences. Time-dependent recombination reactions of the free radicals induced by UV-irradiated SF were performed at 180K, 190K, 200K, 210K and 220K. In all cases step-wise reactions that have two, fast and slow, segments were obvious. Thus, for each temperature, the recombination reactions exhibit different fractions of fast and slow reactions with steady-state levels beyond which the reactions cease. The decay curves in this temperature interval indicate that fractions of the free radicals decayed in fast reaction increase almost linearly from 15% to 57 %. In contrast, the fractions of steady-state levels for each reaction within temperature interval 180K-210K decrease from 78 % to 37 %. Interestingly, the fractions of species participating in slow reactions are almost constant having on average 5.2 % (S.D.= 1.9). For slow reactions, the activation energy of 7.2 kcal/mol was determined from an Arrhenius plot.

Results indicate that the free radical induced by UV-irradiation localized in a heterogeneous environment. Each temperature in the reaction activates a distinct structural region of fibroin specified by steady-state level. Kinetic parameters for the fraction of free radical recombination reaction that occur fast could not be determined by this method. As mentioned above fractions of the slow reactions at the temperature interval 180K-210K are on average of 5.2 %. Therefore, fractions of fast reactions strongly influenced by the environments discriminated by the temperature value.

1. Aslanov R.B., Dashdemirova L.M., Alekperov O.Z., Abdurahimov A.R., Gasymov O.K. Dynamics of proteins by thermal decay of free radicals induced by ultraviolet irradiation // *J. spectrosc.* 2018. 6197636.
2. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, 2015.
3. Mitkevich V.A. et al. Basal Glutathionylation of Na,K-ATPase  $\alpha$ -Subunit Depends on Redox Status of Cells during the Enzyme Biosynthesis // *Oxid Med Cell Longev.* 2016. Vol. 2016.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОФОБНЫХ КЛАСТЕРОВ СЕРИЦИНА С ПОМОЩЬЮ ANS:  
СТАЦИОНАРНАЯ И ВРЕМЯ - РАЗРЕШЕННАЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ**

**CHARACTERIZATION OF HYDROPHOBIC CLUSTERS OF SERICIN BY ANS: STEADY-  
STATE AND TIME-RESOLVED FLUORESCENCE**

*Guliyeva A.J., Mammedzade A.M., Gasymov O.K.*

Institute of Biophysics, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, oktaygasimov@gmail.com

Silk from mulberry silkworm (*Bombyx mori*) is for a long time considered as an excellent textile material. Silk mainly composed of two proteins, the fibroin 70-80% and the sericin 20-30%. Silk has exceptional mechanical properties that make it attractive for very wide applications. Beyond the textile industry, the fibroin obtained from silk has extensively been employed in biotechnology, medicine, cosmetics, etc. It has even perspectives to be utilized in photonics. Fibroin is an excellent matrix for high fluorescence yield for many laser dyes such as rhodamine derivatives, etc. To characterize all above-mentioned applications fibroin has extensively been studied in various forms, in solution, film, hydrogel, fiber, and etc. However, much less attention was paid for second major silk protein, sericin.

Sericin commonly described as glue protein that splices fibroin fibers together. However, recent investigations on sericin indicate that it is more than glue protein. Sericin stimulates conformational transitions in fibroin. Effect of sericin has also been shown in the solution state. In solution, sericin enhances aggregation of fibroin in a dose-dependent manner indicating specific interaction of the two proteins. Therefore, the characterization of sericin is very important to understand the structural transition from Silk I to Silk II. Besides, many possible biotechnological applications have been shown for sericin alone.

Unlike to fibroin, there is no commonly accepted method for isolation of silk sericin (SS). It has been shown that the molecular weight of SS depends on the isolation method ranging from 5000 to 50000 Da [1]. In this study far-UV circular dichroism was used to characterize the secondary structure of sericin isolated by two methods. We have also employed ANS fluorescence to describe hydrophobic clusters of SS. Use of both steady-state and time-resolved fluorescence permitted detailed description of hydrophobic clusters.

Sericin was isolated by incubating silk samples at 95° C for two hours under stirred condition. Sericin powder was obtained by two methods. In the method 1, thin sprayed water solution of sericin was dried in an oven at 60° C. This sericin was referred as sericin 1. In the method 2, ethanol was added to a water solution of sericin, until to get 75% ethanol. Then, the solution was kept at -20° C for about 16 hours. After centrifugation, precipitated sericin was dried in the oven at 60° C to remove residual alcohol. Sericin obtained by the second method was referred as sericin 2. The sericin powder samples obtained by both methods were dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer, at pH 7.3 for spectroscopic studies. Circular dichroism (CD) spectra of aqueous solutions of sericin 1 and sericin 2 were drastically different from each other. Sericin 1 showed a CD spectrum with a single minimum at 198.6 nm and a weak shoulder at around 221 nm. Data indicate that sericin 1 solution adopts predominantly a random coil conformation along with minor alpha-helical conformation. However, sericin 2 solution demonstrates a CD spectrum with double minima at around 200 nm and 220 nm that have almost equal amplitudes. In proteins, a CD spectrum of ideal alpha-helix conformation has two minima at around 206 nm and 222 nm. The feature and shape of the CD spectrum of sericin 2 are similar to that of alpha-helical conformation. Therefore, unlike of sericin1, sericin 2 in solution adopts predominantly alpha-helical conformation. Data indicate that ethanol solution (75%) induces a random coil to alpha-helix transition during the precipitation process.

We chose sericin 2 for fluorescence studies because it has more secondary structure elements compared to that of sericin 1. In solution, free ANS demonstrates very weak fluorescence with a maximum at around 535 nm. Binding of ANS to hydrophobic clusters of proteins produce significant fluorescence enhancement and blue shift of fluorescence maxima. Degree of a blue shift in ANS emission has been considered as a measure of hydrophobicity [2]. ANS (20 µM) binding to sericin 2 (0.7 mg/ml) show significant fluorescence enhancement with emission maximum around 500 nm indicating moderate hydrophobicity for binding sites. The fluorescence spectrum of ANS is very broad and has FWHM value around 146 nm. Time-resolved fluorescence measurements allowed the deconvolution of the heterogeneously broadened fluorescence spectrum of the bound ANS to lifetime-resolved spectra. The deconvolution indicates the spectral components with lifetimes of about 0.2 ns, 4.8 ns, and 14.8 ns. The component with a lifetime of 0.2 ns has an emission maximum of around 530 nm and corresponds to the free ANS molecules in the solution. The spectral component having emission maxima around 480 nm and lifetimes around 4.8 ns and 14.8 ns related to ANS bound to the protein. Higher lifetime component (14.8 ns) indicates that the binding site of ANS is more hydrophobic compared to that of 4.8 ns. The resolution of ANS binding curve to lifetime components indicates that dissociation constants for 4.8 ns and 14.8 ns components are about 16 µM and 30 µM.

Thus, ethanol induces a random coil to alpha-helix conformation in a solution of sericin that has at least two hydrophobic clusters. These hydrophobic sites possess distinct lifetimes and dissociation constants.

1. Padamwar M.N., Pawar A.P. Silk sericin and its applications: A review// J Sci Ind Res. 2004. Vol. 63. P. 323.
2. Gasymov O.K., Glasgow B.J. ANS fluorescence: potential to augment the identification of the external binding sites of proteins //BBA, Proteins Proteomics 2007. Vol. 1774, P. 403.



## КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА АДИПОКИНЕТИЧЕСКИХ НЕЙРОПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ТЕРМИТОВ

## CONFORMATIONAL PROPERTIES OF ADIPOKINETIC NEUROPEPTIDES ISOLATED FROM VARIOUS TERMITES SPECIES

*Алиев Р.Э.*

Бакинский Государственный Университет, Баку, rashid\_aliev@mail.ru

Нейропептиды, выделенные из различных термитов, с первичной структурой pGlu – Val – Asn – Phe – Ser – Pro – Asn – Trp – NH<sub>2</sub> (кодовое название Pea – CАН – 1); pGlu – Ile – Asn – Phe – Thr – Pro – Asn – Trp – NH<sub>2</sub> (кодовое название Miv – CC) [1]; pGlu – Ile/Leu – Thr – Phe – Thr – Pro – Ser – Trp – NH<sub>2</sub> [2]; pGlu – Val – Asn – Phe – Ser – Pro – Ser – Trp – NH<sub>2</sub> (кодовое название Anaим – АКН) [3], принадлежат семейству адипокинетических гормонов (АКН). Все эти молекулы являются октапептидами, содержащими в четвертом и восьмом положениях соответственно Phe и Trp. Важную роль в реализации функций этих пептидов играют их конформационные свойства и трехмерная пространственная организация, изучение которых необходимо для понимания механизма действия этих соединений на молекулярном уровне. В настоящей работе, используя фрагментарный подход, предложенный Поповым Е.М. [4] для расчета оптимальных пространственных структур олигопептидов и белков, на классической основе, при помощи полуэмпирического метода атомных потенциалов, изучены конформационные возможности нейропептидов. Расчеты конформаций проводились в условиях полярной среды и среды, имитирующей окружение мембраны. Пространственные структуры октапептидных молекул изучены на основе составляющих стабильных конформаций метиламидов N – ацетил – α – аминокислот с учетом различных ориентаций их боковых цепей. Поэтапный расчет низкоэнергетических структур нейропептидов включал низкоэнергетические конформационные состояния перекрывающихся по двум аминокислотным остаткам тетрапептидных фрагментов. На основе количественной оценки стабильности были установлены пространственные структуры этих молекул. Глобальный минимум конформационной энергии и равновесная геометрическая конфигурация молекул были найдены путем поиска стационарных точек на многомерной потенциальной поверхности исследуемых молекул.

Исследования пространственного строения октапептидных молекул нейропептидов, принадлежащих семейству адипокинетических гормонов показал, что все их стабильные конформационные состояния можно сгруппировать в нескольких формах основной цепи. Полученные в данном исследовании результаты могут быть использованы в создании усовершенствованных аналогов с заданными функциональными характеристиками и биологической ролью в процессах ингибирования.

1. Liebrich W., Kelner R., Gade G. Isolation and primary structures of neuropeptides of the АКН/RPCH family from various termite species // Peptides, 1995, Vol. 16 (4), p.559 -564.
2. Gade G., Simek P., Marco HG. The first identified neuropeptide in the insect order Megaloptera: a novel member of the adipokinetic hormone family in the alderfly *Sialis lutaria*. // Peptides, 2009, Vol. 30(3), p.477-482.
3. Gade G., Marco HG. The adipokinetic hormone (АКН) of one of the most basal orders of Pterygota: structure and function of Ephemeroptera АКН // Journal Insect Physical, 2012, Vol. 58 (11), p. 1390 -1396.
4. Попов Е.М. Структурно -функциональная организация белков, Москва: Наука, 1992, с.358.

## УРОВНИ ОРГАНИЗАЦИИ СТРУКТУРНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ

## LEVELS OF ORGANIZATION OF PROTEIN STRUCTURAL DOMAINS

*Некрасов А.Н.<sup>1</sup>, Козмин Ю.П.<sup>1</sup>, Козырев С.В.<sup>2</sup>, Анашкина А.А.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, E-mail alexei\_nekrasov@mail.ru

<sup>2</sup>Математический институт им. В. А. Стеклова РАН, Москва, E-mail kozyrev@mi-ras.ru

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, E-mail anastasya.anashkina@gmail.com

Структурная организация белков была и остается одной из актуальнейших задач современной науки. Исследователям хорошо известны работы по анализу и классификации структурных доменов белков [1,2]. Элементы структурной организации более низкого уровня известны значительно хуже. Эти работы в основном базируются на сходстве в топологии укладки элементов вторичной структуры и ранее для их обозначения использовался термин «элементы супер-вторичной структуры». Однако экспериментальные результаты показывают, что в изолированном состоянии элементы вторичной структуры белков как правило не являются структурно-устойчивыми элементами. Более того, для формирования элементов вторичной структуры вероятно необходимо определенное сочетание структурно-устойчивых и структурно-лабильных блоков различной

топологии [3]. Все это делает вопрос из каких структурно-устойчивых элементов состоят структурные домены особенно актуальным.

В представленной работе на основе результатов метода анализа информационной структуры (АНИС метод) [4] примененного для исследования негомологичных первичных структур 24647 белков были выявлены 11 уровней организации структурных доменов белков (см Таблицу).

Таблица Уровни организации структурных элементов белков имеющие размер меньший чем структурные домены.

Имя уровня структурной организации	Диапазон значений полуширины сглаживающей функции	Длина соответствующей последовательности белка, а.к.о.
X1	1-6	7-12
X2	9-14	15-20
X3	16-18	22-24
X4	20-21	26-27
X5	22-24	28-30
X6	25-27	31-33
X7	28-30	34-36
X8	31-34	37-40
X9	36-38	42-44
X10	39-40	45-46
X11	44-50	50-56

Так как выявляемые методом АНИС в первичных структурах белков иерархически организованные образования являются структурно устойчивыми, то можно полагать, что новые по топологии элементы пространственной организации структурных доменов так же будут обладать этим характерным свойством. Это откроет возможность не только для рационального дизайна структурных доменов белков с известной пространственной структурой, но и откроет возможность «проектирования» структурных доменов, новых, ранее неизвестных типов из топологически устойчивых элементов.

1. Orengo C.A., Michie A.D., Jones S., Jones D.T., Swindells M.B., Thornton J.M. CATH-a hierarchic classification of protein domain structures // Structure 1997 Vol. 5(8) 1093-108.
2. Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T., Chothia C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures // J Mol Biol. 1995 Vol.247(4) 536-40.
3. Nekrasov A.N., Alekseeva L.G., Pogosyan R.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., de Brevern A.G., Anashkina A.A. A minimum set of stable blocks for rational design of polypeptide chains // Biochimie 2019. Vol.160, 88-92
4. Anashkina A.A., Nekrasov A.N. The method for identification of hierarchical organization of protein sequences // Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling 2014. Vol. 29(5), 266–273

## МИНИМАЛЬНЫЙ НАБОР СТАБИЛЬНЫХ БЛОКОВ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

### A MINIMUM SET OF STABLE BLOCK FOR POLYPEPTIDE CHAINS

*Некрасов А.Н.<sup>1</sup>, де Бреверн А.Г.<sup>2</sup>, Анашкина А.А.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, E-mail alexei\_nekrasov@mail.ru

<sup>2</sup>Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cite, Paris, E-mail alexandre.debrevern@gmail.com

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, E-mail anastasya.anashkina@gmail.com

В работе [1] было показано, что наиболее адекватным способом описания полипептидной цепи являются блоки состоящие из пяти аминокислотных остатков. Такое приближение эффективно описывает пространственные структуры белков [2] и позволило создать метод выявляющий иерархическую организацию записанную в первичных структурах белков [3]. Различные экспериментальные исследования подтвердили правильность этого приближения. Одним из его следствий является утверждение, что структурная информация неравномерно распределена по первичной структуре белков.

В настоящей работе методом молекулярной динамики проведено исследование набора модельных пентапептидов. При кластеризации полученных в процессе моделирования конформационных состояний

решалась задача выявления пентапептидов имеющих преимущественное конформационное состояние. Таковыми считались пентапептиды, которые находились в одном из возможных конформационных состояний более 80% времени молекулярного моделирования. Мы полагали, что для наличия преимущественной конформации достаточно взаимодействия лишь двух-трех функциональных групп внутри пентапептидов. Основываясь на этих предположениях при генерации последовательностей модельных пентапептидов в исходную матрицу, состоящую из слабозаимодействующих между собой остатков ALA, первоначально в центральную позицию вводился аминокислотный одного из 20 типов. Затем проводилась замена для типов аминокислотных остатков в двух из четырех позиций, которые пока занимали остатки ALA. Таким образом, было сгенерированы, а потом исследованы 44 860 пентапептидов различными аминокислотными последовательностями.

В результате анализа молекулярно-динамических траекторий было выявлено 1 225 пентапептидов имеющих преимущественную конформационную состояние, т.е. в исследуемом наборе свойством структурной устойчивости обладало 2.73% пентапептидов. У всех этих пентапептидов более 80% полученных при молекулярном моделировании конформационных состояний попали в самый большой по размеру кластер близких пространственных структур. Кластеризация конформационных состояний пентапептидов велась по торсионным углам  $\phi$  и  $\psi$  полипептидного остова и каждый полученный кластер характеризовался центральной конформацией кластера и средним отклонением всех структур вошедших в кластер от этой центральной конформации.

Необходимо отметить, что среди центральных конформаций кластеров целый ряд имели сходные значения торсионных углов  $\phi$  и  $\psi$ , что позволило сформировать из них 54 группы сходных по топологии пространственных структур. С деталями проведенного исследования можно ознакомиться в [4]. Выявленные структурно-устойчивые пентапептиды могут инициировать или терминировать элементы вторичной структуры, а также являться точками фолдинга пространственной структуры белков.

1. Nekrasov A.N. Entropy of protein sequences: an integral approach. // J Biomol Struct Dyn. 2002 Vol.20(1) 87-92.
2. Vetrivel I., Mahajan S., Tyagi M., Hoffmann L., Sanejouand Y.-H., Srinivasan N., de Brevern A.G., F. Cadet, B. Offmann, Knowledge-based prediction of protein backbone conformation using a structural alphabet // PLoS One 2017. Vol.12(11) e0186215
3. Nekrasov A.N., Anashkina A.A., Zinchenko A.A. A New Paradigm of Protein Structural Organization Proceedings of the 2nd International Conference "Theoretical Approaches to BioInformation Systems" Institute of Physics, Belgrade, 2014 1-24 ISBN 978-86-82441-40-3.
4. Nekrasov A.N., Alekseeva L.G., Pogosyan R.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., de Brevern A.G., Anashkina A.A. A minimum set of stable blocks for rational design of polypeptide chains // Biochimie 2019. Vol.160, 88-92

## ФИЗИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ УСЛОВИЯ ФОРМИРОВАНИЯ ПРЕОПРЕДЕЛЕННЫХ ЛОКАЛЬНЫХ КОНФОРМАЦИЙ БЕЛКА НА ПРИМЕРЕ В-ИЗГИБОВ

## PHYSICAL AND STRUCTURAL CONDITIONS FOR THE FORMATION OF PREDETERMINED LOCAL PROTEIN CONFORMATIONS ON THE EXAMPLE OF B-TURNS

*Анашкина А.А., Урошлев Л.А.<sup>1</sup>, Торшин И.Ю.<sup>2</sup>, Есипова Н.Г., Туманян В.Г.*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

<sup>2</sup>Вычислительный центр им. А.А. Дородницына Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» РАН, 119333, Москва, ул. Вавилова, 40

nastya@eimb.ru

В данной работе мы исследовали распространенный тип нерегулярной вторичной структуры - бета-изгибы четырех основных типов.

Из структур белков полного PDB банка, полученных методом рентгеноструктурного анализа, были отобраны фрагменты полипептидной цепи длиной 8 аминокислотных остатков, в которых два центральных остатка имели конформационные углы, соответствующие четырем типам бета-изгиба, с точностью 10°.

Всего было найдено 596902 фрагмента полипептидной цепи с поворотом I типа, 27421 фрагмент с поворотом I' типа, 48526 фрагментов с поворотом II типа и 13439 фрагментов с поворотом типа II'.

Анализ последовательностей найденных фрагментов показал, что октапептиды с одинаковой последовательностью встречались в PDB от 2 до 619 раз, причем пространственное выравнивание структур октапептидов с одинаковой последовательностью показывает их структурную идентичность. Для последующего анализа мы оставили по одной структуре для каждой последовательности, с наилучшим показателем разрешения. После удаления дублирующихся структур осталось 162262 фрагмента полипептидной

цепи с поворотом I типа, 7024 фрагмента с поворотом I' типа, 13747 фрагментов с поворотом II типа и 4351 фрагмент с поворотом типа II'.

Мы проанализировали встречаемость аминокислотных остатков в разных положениях октапептида в разных типах бета-изгиба и показали, что аминокислоты, имеющие конформационные преимущества (глицин) или ограничения (пролин) имеют особенности локализации в области изгиба.

Водородные связи между атомами определяли исходя из критерия расстояния между кислородом карбонильной группы и азотом аминной группы. Водородная связь типа  $CO_i \rightarrow NH_{i+3}$  является критерием для бета-изгибов, введенным в 1968 году Венкатачаламом [1]. Такая связь была найдена в 95% всех найденных изгибов. Мы также изучили водородную связь  $N_i \rightarrow CO_{i+3}$ . Такая связь была найдена в 58,7% изгиба I' и 29,4% изгиба II'. В изгибах I и II таких связей было найдено менее 4%.

Кроме того, мы проанализировали возможность образования водородной связи  $CO_i \rightarrow NH_{i+2}$ . Оказалось, что во всех четырех типах изгибов доля этой связи более 95,7%.

Одновременное наличие водородных связей  $CO_i \rightarrow NH_{i+3}$  и  $CO_i \rightarrow NH_{i+2}$  приводит к образованию мультицентральной водородной связи с одним акцептором и двумя донорами. Статистика водородных связей была подтверждена данными DSSP, т.е. независимым методом.

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 17-04-02105.

1. Venkatachalam C.M. Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units // Biopolymers. 1968. Vol. 6 (10). P.1425–1436.
2. Урошлев Л.А., Торшин И.Ю., Батяновский А.В., Есипова Н.Г., Туманян В.Г. Запрещенные конформации полипептидной цепи на примере  $\beta$ -изгиба  $\beta$ -шпильки в SH3-домене  $\alpha$ -спектрина // Биофизика. 2015. Vol. 60(1). P. 5-14.
3. Урошлев Л.А., Торшин И.Ю., Батяновский А.В., Есипова Н.Г., Туманян В.Г. Предопределенные конформации в изгибах полипептидных цепей. Геометрический анализ // Биофизика. 2019. Vol. 64(2). P. 272.

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ФАРМАКОФОРНЫХ МОДЕЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ

## A THEORETICAL APPROACH TO CONSTRUCTION OF PHARMACOPHORE MODELS OF BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES

*Ахвердиева Г.А.*

Институт физических проблем, Бакинский Государственный Университет, hagverdigu@nara@gmail.com

Развитие представлений о механизме взаимодействия биологически активной молекулы с рецептором и понимание ее избирательной способности возможно благодаря структурно-функциональным исследованиям, проводимым на молекулярном уровне. В настоящее время использование различных теоретических методов расчета, последних достижений компьютерной техники, в том числе программ с графическим представлением пространственных структур позволяет исследователям строить всевозможные модели исследуемых пептидных молекул. Научно-исследовательская работа, проводимая на основе молекулярного моделирования в рамках концепции фармакофора, является наиболее актуальной.

В данной работе методами молекулярной механики, молекулярной динамики и квантовой химии с применением современных компьютерных программ исследованы конформационные возможности, электронная структура, динамические свойства биологически активных молекул - пептида T, проявляющих терапевтическое действие против ВИЧ, опиоидных пептидов дерморфина, дельторфина I, дельторфина II. Сопоставление результатов расчета исследованных пептидов, их активных и неактивных аналогов позволило выявить конформационно-электронные особенности, важные для их функционирования. На основе полученных данных была проведена оценка биологически активной конформации исследуемых молекул, построены модели фармакофоров для их взаимодействия со специфическими рецепторами. Отметим, что стабильность пространственной структуры биомолекулы определяется взаимным расположением фармакофорных элементов и характеризуется специфическим распределением электронной плотности, что играет важную роль при взаимодействии с рецептором. Относительное расположение фармакофорных областей в исследованных молекулах охарактеризовано набором дистанций, плоских и двугранных углов.

Установлено, что циклическая структура пептида T может рассматриваться как биоактивная конформация; энергетически предпочтительное формирование элемента вторичной структуры –  $\beta$ -поворота на C-конце физиологически активном пентапептидном участке данной молекулы является необходимым для ее связывания с CD4 рецептором [1]. Основными фармакофорными элементами пептида T являются ароматическое кольцо боковой цепи остатка Tyr7, амидная группа  $NH_2$  в боковой цепи остатка Asn6, алкогольная группа  $CH_3$  в боковой цепи остатка Thr5, карбонильная группа CO остатка Thr4 и карбоксильная группа концевой цепи остатка Thr8. Указанные атомные группы могут служить, соответственно, донорами и

акцепторами Н-связи, а остальные атомы этих остатков способны участвовать в гидрофобных взаимодействиях с рецептором.

Установлено, что биологически активная конформация дерморфина является компактной структурой, в которой физиологически активный N-концевой тетрапептидный фрагмент имеет спиральную структуру [2]. Основными фармакофорными элементами дерморфина являются протонированный атом азота, участвующий в электростатическом взаимодействии с отрицательно заряженным остатком опиатного рецептора, гидроксильная группа в боковой цепи остатка Tyr1, участвующая в роли донора электронной плотности, осуществляя перенос заряда и установление водородной связи, фенольное кольцо остатка Tyr1 и ароматическое кольцо остатка Phe3, участвующие в гидрофобном взаимодействии, фенольное кольцо остатка Tyr5, участвующее в гидрофобном взаимодействии или в установлении водородной связи, что в свою очередь определяет селективность данного лиганда.

Установлено, что биоактивные конформации дельторфинов представляют собой петлеобразные структуры, в которых C-концевой трипептидный фрагмент, имеющий вытянутую конформацию, благодаря обратному повороту на остатке Val5 в пространстве сближен с N-концевым тетрапептидным фрагментом, что придает этим молекулам компактность [3]. Стабильность пространственной структуры этих молекул определяется взаимным расположением фармакофорных элементов: α-аминогруппы, фенольного кольца остатка Tyr1, ароматического кольца остатка Phe3, отрицательно заряженных групп остатков Asp/Glu и характеризуется установлением солевых мостиков между протонированным атомом азота и атомами кислорода боковых цепей отрицательно заряженных остатков Asp/Glu. Рецепторное связывание молекул дельторфинов может осуществляться образованием водородных связей с участием ионизируемых функциональных групп.

Построенные фармакофорные модели могут быть использованы для дизайна пептидомиметиков, проектирования устойчивых лекарственных препаратов.

1. Akverdieva G.A., Godjajev N.M., Akyuz S. Comparative conformational analysis of peptide T analogs // Journal of Molecular Structure, 2009, Vol.917, pp.21-26
2. Akverdieva G.A. Insights into bioactive conformation of dermorphin // Azerbaijan Journal of Physics, 2016, Vol. XXII, No. 2, Section: En, pp.12-20.
3. Akverdieva G.A. Insights into spatial structure of deltorphins // Journal of Qafqaz University, 2016, V.4, N.1, pp.13



## МЕТОД ФУРЬЕ-АНАЛИЗА В ИССЛЕДОВАНИЯХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР

## FOURIER ANALYSIS METHOD IN STUDIES OF MOLECULAR STRUCTURES

*Батяновский А.В.<sup>1</sup>, Намиот В.А.<sup>1</sup>, Туманян В.Г.<sup>2</sup>, Есипова Н.Г.<sup>2</sup>*

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, РБ, г. Минск, suner\_s@mail.ru

<sup>1</sup> Институт ядерной физики Московского государственного университета им.

М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Развитие компьютерных методов анализа макромолекулярных структур требует соответствующей адаптации Фурье-аппарата к различным представлениям такого рода объектов. Нами развивается подход обеспечивающий вычисление Фурье-образов молекулярных структур на разных иерархических уровнях, включая атомарный, и оперирования этими образами. В зависимости от выбора математических функций, представляющих отдельный атом, для Фурье-образа может быть вычислен свой набор специальных функций. В данной работе в качестве атомной функции рассматривается возможность использования комбинации сферических функций, отвечающих за угловое распределение, совместно с произвольными степенными функциями, отвечающими за радиальную составляющую. Для наиболее простого случая представления атома сферой (сферическая гармоника нулевого порядка, ответственная за угловые координаты, совместно с радиальной прямоугольной функцией) интегрирование по угловым координатам при Фурье-преобразовании в сферической системе координат, приводит к следующим соотношениям:

$$F_k = \int_0^R \int_0^\pi \int_0^{2\pi} e^{-2\pi i k r (\cos(\theta) \cos k_\theta + \sin(\theta) \sin(k_\theta) \cos(\varphi - k_\varphi))} * r^2 * \sin \theta * d\varphi * d\theta * dr =$$

$$2\pi * \int_0^R \frac{r^2 J_0(2\pi k r)}{k r} * dr = \int_0^R 2\pi k r * \frac{R}{k}^{3/2}, \text{ где } R - \text{ радиус сферы, } k - \text{ модуль вектора частоты.}$$

Для молекулы как совокупности атомов получаем:

$$M_k = \sum_n e^{-2\pi i k r_n} F_n k,$$

где  $r_n$  – радиус-вектор атома,  $F_n k$  – Фурье-образ отдельного атома молекулы.

Фурье-преобразования в таком случае сводятся к интегралам по угловым координатам сферических функций совместно с экспонентами от мнимого аргумента. Результатом интегрирования являются функции Бесселя полуцелого порядка. Это влечет за собой необходимость совмещать аппарат Фурье-преобразований и его возможности с аппаратом функций Бесселя. Так, задача о совмещении плотностей молекул друг с другом или о молекулярной стыковке приводит к задачам ковариации и свертки из области Фурье-анализа, включая использование ряда его теорем, касающихся пространственных преобразований, которые при адаптации к объектам такого рода влекут за собой появление различных интегралов, содержащих в своём составе произведения функций Бесселя. В общем случае при взятии такого рода интегралов возникают так называемые разрывные интегралы, приводящие к гипергеометрическим функциям.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б18Р-268) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-54-00037-Бел).

---

## ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЕННОСТЕЙ КИНЕТИКИ АГРЕГАЦИИ В РАСТВОРЕ ФИБРОИНА CHARACTERISTIC FEATURES OF AGGREGATION KINETICS OF FIBROIN SOLUTION

*Mammedzade A.M., Bakhishova M.J., Gasymov O.K.*

Institute of Biophysics, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, oktaygasimov@gmail.com

Silk fibroin (SF) from *Bombyx mori* is one of the most widely applied protein material in biotechnology. SF has excellent mechanical properties shared with tissue biocompatibility. SF film with rhodamine 6G has been shown to be an excellent material for laser application [1]. It has been shown that SF solution has a tendency for aggregation. Depending on conditions, fibroin solution may yield large aggregate or transparent gel. Previously we have demonstrated that alcohol treatment of the transparent SF film leads to the beta-amyloid formation, which has characteristic circular dichroism spectra [1]. Therefore, aggregation properties of SF indicate that this protein could be a good model to study amyloid formation related to Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and other age-related disorders. Interestingly, commonly used laser dye, rhodamine 6G, specifically binds to SF and inhibits the formation of protein aggregates [2]. Mechanism of the rhodamine binding and search for nontoxic rhodamine like molecules may deliver drug therapy for amyloid diseases. Some aggregation properties of SF solution have previously been studied. However, detailed kinetic characteristics of the aggregation reactions are missing. In this study, we studied aggregation kinetics of SF solution at various pH values and temperatures. In addition, to reveal the mechanism of binding, the concentration dependence of aggregation kinetics has been studied.

Fibroin was obtained from silk cocoons of *Bombyx mori* using standard procedure widely described in the literature. Secondary structure of SF in solution was studied using a Chirascan V100 circular dichroism spectrometer. Aggregation kinetics of SF solutions (15  $\mu\text{M}$  to 25  $\mu\text{M}$ ) were measured using a spectrophotometer watching optical density at 360 nm due to light scattering from the protein aggregates. Temperature-dependent aggregation kinetics of fibroin solutions were conducted in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at temperature interval of 20° C-50° C. pH-dependence of aggregation reactions were performed at 20° C in buffers with pH values ranging from 4.0 to 8.6. Aggregation rate constant values of fibroin solutions at various conditions were determined by non-linear curve fitting procedures using the software OriginLab.

Far-UV circular dichroism spectrum of fibroin solution at room temperature displays large negative minimum at 195.4 nm and a broad shoulder around ~221 nm. To increase accuracy, the peak values were determined using the 2nd derivative of the spectrum. The result indicates formation predominantly random coil conformation. The shoulder around ~221 nm may indicate a small contribution from alpha-helix conformation. This is in contrast to fibroin in fiber or in film form where it assumes mostly beta-structure. At 20° C, fibroin solution at pH value of 8.6 does not show any aggregation for a long period of time and, therefore, is a good condition for the storage. Extensive aggregation in fibroin solution was observed at pH values lower than pH 7.0. In pH dependent experiments, a negative correlation was observed between the aggregation rates and pH values for fibroin in solution. The most intensive aggregation was observed at pH 4.5.

Time-dependent aggregation kinetics of fibroin solutions at various pH values are well characterized with a single exponential function. Concentration dependence of aggregation reactions at pH values 6.0-7.0 indicates that aggregation rate constant values are proportional to [Molar concentration]<sup>k</sup> where k=1. This is consistent with the random polymerization model. However, at lower pH about 4.5 for much-enhanced aggregation reactions, k value is about 2.8 for concentration dependence rate constants indicating the formation of nucleation in aggregation experiments.

Temperature dependence of the aggregation kinetics of fibroin solutions was performed at a pH value of 6.2. Aggregation rate constants determined for temperature interval of 30° C -40° C used for Arrhenius plot. The reaction rate at temperatures 45-50° C were too high and resulted in very fast aggregation and precipitation. Therefore, the data

for aggregation of fibroin solution in these temperatures are not included in the Arrhenius plot. The activation energy for the aggregation reaction of fibroin in solution at pH 6.2 is 19.8 kcal/mol.

Thus, many characteristics of aggregation kinetics of fibroin solution, particularly pH dependence, are in accord with the features of amyloid formation in humans [3]. Therefore, fibroin can be a very valuable model for screening of a large number of drugs for amyloid diseases.

1. Gasyimov O.K., Botta Ch., Ragona L., Guliyeva A.J., Molinari H. Silk fibroin-based films enhance rhodamine 6G emission in the solid state: A chemical-physical analysis of their interactions for the design of highly emissive biomaterials // *Macromol Chem Phys.* 2019, 220, 1800460.
2. Ragona L., Gasyimov O.K., Guliyeva A.J., Aslanov R.B., Zanzoni S., Botta Ch., Molinari H. Rhodamine binds to silk fibroin and inhibits its self-aggregation // *BBA-Protein and Proteomics* 2018, 1866, 661-667.
3. Abedini A., Raleigh D.P. The role of His-18 in amyloid formation by human islet amyloid polypeptide // *Biochemistry* 2005, 44, 16284-16291.

---

## ОСОБЕННОСТИ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ МИОЗИН СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА-C IN VITRO AMYLOID AGGREGATION OF MYOSIN BINDING PROTEIN-C IN VITRO

**Бобылёв А.Г.<sup>1</sup>, Бобылёва Л.Г.<sup>1</sup>, Шумейко С.А.<sup>1</sup>, Якупова Э.И.<sup>1</sup>, Тимченко М.А.<sup>1</sup>,  
Тимченко А.А.<sup>2</sup>, Пеньков Н.В.<sup>3</sup>, Молочков Н.В.<sup>1</sup>, Вихлянцев И.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, E-mail  
bobylev1982@gmail.com

<sup>2</sup> ФГБУН Институт белка РАН, Пушкино

<sup>3</sup> Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино

Агрегация белков – распространенный процесс, который достаточно часто происходит в клетках организма. В наибольшей степени это касается амилоидной агрегации, которую ассоциируют с различными заболеваниями организма человека и животных – амилоидозами. В данной работе проведено исследование агрегации *in vitro* саркомерного цитоскелетного миозин-связывающегося белка-C (sMyBP-C) скелетных мышц кролика. Показано, что sMyBP-C агрегирует в условиях с низкой ионной силой. Важной отличительной особенностью агрегации sMyBP-C является быстрое (первые 5-10 минут агрегации) образование аморфных агрегатов размером 2 мкм и более, обнаруженных методом электронной микроскопии.

Исследование скорости агрегации sMyBP-C методом динамического светорассеяния показало образование и рост олигомеров (до ~10-12 мономеров в олигомере) в течение 16 часов. Олигомеры sMyBP-C также были визуализированы с помощью электронной и атомно-силовой микроскопии и охарактеризованы методом малоуглового рентгеновского рассеяния после 24 часов агрегации.

Структурные исследования агрегатов sMyBP-C проведенные методом рентгеновской дифракции выявили наличие рефлексов, относящихся к четвертичной кросс-β структуре, свойственной амилоидным агрегатам. С помощью кругового дихроизма обнаружено, что в процессе агрегации не происходит изменений во вторичной структуре sMyBP-C. Это может указывать на то, что в процессе агрегации sMyBP-C, формирование кросс-β структуры может происходить за счет частичного/неполного анфолдинга доменов белка свободных от S-S связей с последующим взаимодействием открытых β-стрендов, приводящим к формированию длинной водородной связи 4,58 Å между двумя или более молекулами белка, или, возможно, между соседними доменами в рамках одной молекулы белка. В отличие от формирования патологических амилоидных агрегатов, для формирования амилоидо-подобной структуры у агрегатов sMyBP-C, по-видимому, не требуется большой энергии, так как для этого не требуется полный анфолдинг белка. Следует отметить, что подобная высокая скорость агрегации и формирование четвертичной кросс-β структуры без изменения вторичной структуры являются особенностями амилоидной агрегации *in vitro* другого мультидоменного белка титина. Полученные нами результаты указывают на общий механизм агрегации sMyBP-C и титина – гигантских мультидоменных мышечных белков.

Результаты наших исследований вносят вклад в понимание на структурном уровне процесса амилоидной агрегации в широком понимании этого процесса. Это, в свою очередь, необходимо для выяснения особенностей различных типов амилоидной агрегации, а именно патологической и функциональной у различных белков.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института теоретической и экспериментальной биофизики (ИТЭБ) РАН при финансовой поддержке гранта РФФИ (№18-015-00268).

## СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ SH3-ПОДОБНЫХ ДОМЕНОВ STEREOCHEMICAL ANALYSIS OF SH3-LIKE DOMAINS STRUCTURE

***Бразжников Е.В., Ефимов А.В.***

*Институт белка Российской академии наук, Пуцино, Московская обл., 142290 Россия*

*E-mail: tefg@vega.protrs.ru, efimov@protres.ru*

SH3-подобные домены, как правило, включают в себя около 60 аминокислотных остатков, которые уложены в компактную пространственную структуру с гидрофобным ядром. Они часто встречаются как в гомологичных, так и в негомологичных белках. Структуру этих доменов можно представить в виде комбинации двух скрученных  $\beta$ -шпилек, которые замыкаются  $\beta$ -тяжем на С-конце, что приводит к образованию укладки цепи типа  $\beta$ -бочонка. Такие замкнутые цилиндрические структуры имеют более высокую кооперативность и стабильность [1].

База данных исследованных белков получена с помощью программы PDBOST. Она включала около 800 PDB-файлов, в которых было найдено 67 доменов (59 PDB файлов) в строго негомологичных белках при разрешении лучше 2.0 Å. Стереохимический анализ  $\beta\beta$ -шпилек, показал, что многие из них сильно скручены и изогнуты. Внутренняя поверхность таких  $\beta$ -шпилек образуется главным образом гидрофобными аминокислотными остатками, тогда как внешняя поверхность образуется гидрофильными остатками [2].

Обнаружено, что для образования сильно скрученных и изогнутых  $\beta\beta$ -шпилек требуется не только чередование гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, но и избыток глициновых и аланиновых остатков на внутренней поверхности в участках сильного скручивания тяжей. Замыкающий участок полипептидной цепи мы назвали L-модулем, поскольку его структура напоминает букву L. При наложении друг на друга трехмерные структуры  $\beta$ -шпилек, а также L-модулей из различных белков хорошо совмещались. Мы проанализировали конформации перетяжек в  $\beta$ -шпильках и L-модулях в SH3-подобных доменах. Были определены частоты встречаемости перетяжек разной длины и построены соответствующие гистограммы. Обнаружено, что перетяжки в  $\beta$ -шпильках, в основном, короткие, а в L-модулях чаще других встречаются перетяжки из 3-х и 5-ти аминокислотных остатков (60% и 13%, соответственно). В 97% случаев перетяжки из 3-х аминокислотных остатков имеют конформацию " $\beta(m)aaa\beta(n)$ ", а перетяжки из 5-ти аминокислотных остатков имеют конформацию " $\beta(m)aaa\beta\beta(n)$ ". При наложении L-модулей с перетяжками одного типа их структуры практически совпадают. Определены ключевые позиции гидрофобных, гидрофильных и глициновых остатков [3].

Работа поддержана грантом РФФИ #17-04-00242-а.

1. Efimov, A. V. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010, 399, 412-415.
2. Boshkova, E. A., Brazhnikov, E. V., Efimov, A. V. 2016, Molekul. Biol. (in Russian) 50, 880-886.
3. Kargatov A.M., E. A., Brazhnikov, E. V., Efimov, A. V. 2018, Molekul. Biol. (in Russian) 52, 1074-1081.

## РОЛЬ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОХРОМА C1 В ПРОЦЕССЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА МЕЖДУ ЦИТОХРОМАМИ C И C1

## THE ROLE OF STRUCTURAL ORGANIZATION OF CYTOCHROME C1 IN THE PROCESS OF A COMPLEX FORMATION BETWEEN CYTOCHROMES C AND C1

***Васюченко Е.П., Федоров В.А., Абатурова А.М., Коваленко И.Б.***

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т, кафедра биофизики,  
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12, +7(495)9390289, vasyuchenko.katya@gmail.com

Цитохром *c* является подвижным переносчиком электронов в дыхательной цепи митохондрий, который транспортирует электрон от цитохромного *bc1* комплекса к цитохром *c* оксидазе. Цитохром *c* представляет собой растворимый белок, расположенный в межмембранном пространстве митохондрий, имеет в качестве функциональной группы гем типа *c*, соединенный с белковой частью с помощью двух тиозфирных связей через остатки цистеина.

В настоящее время известна структура комплекса между цитохромным *bc1* комплексом и цитохромом *c* только для организма *Saccharomyces cerevisiae*. Мы построили модель взаимодействия этих белков, выделенных из *Bos taurus* с помощью методов броуновской и молекулярной динамики, а также методом однопараметрического иерархического кластерного анализа.

Мы использовали структуру комплекса между цитохромным *bc1* комплексом и цитохромом *c*, полученного из *Saccharomyces cerevisiae*, для белков цитохромов *c* и *c1* мы получили набор диффузионно-столкновительных комплексов методом броуновской динамики с энергией электростатического взаимодействия не менее -10 кТ с помощью программы ProKSim [1], который анализировали с помощью



метода кластерного анализа. Затем мы смоделировали процесс образования финальных комплексов из центральных структур полученных кластеров с помощью метода молекулярной динамики в программе GROMACS [2]. В работе использовалось силовое поле CHARMM27 [3], для описания гема поле модифицировалось в соответствии с литературными данными [4]. Финальные структуры сравнивались с исходной структурой, полученной экспериментально.

В случае белков из *Bos taurus* были использованы две структуры цитохрома  $c_1$ , различающиеся по структурной организации петлевого участка и  $\alpha$ -спирали (V168-G185), но имеющие одинаковую аминокислотную последовательность. Структура этого участка сильно влияет на распределение электростатического потенциала на поверхности цитохрома  $c_1$ . В процессе моделирования комплексообразования были обнаружены существенные различия в способности образовывать стабильный финальный комплекс, в котором возможна передача электрона между функциональными группами исследуемых белков, обусловленные структурой участка V168-G185.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа поддержана грантом РФФИ № 18-07-01219.

1. Хрущев С. С. и др. Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса многочастичной броуновской динамики ProKSim // Компьютерные исследования и моделирование. – 2013. – Т. 5. – №. 1. – С. 47-64.
2. Abraham M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // SoftwareX. – 2015. – Т. 1. – С. 19-25.
3. MacKerell A. D. et al. The encyclopedia of computational chemistry // Schleyer, PVR. – 1998. – С. 271-277.
4. Autenrieth F. et al. Classical force field parameters for the heme prosthetic group of cytochrome c // Journal of computational chemistry. – 2004. – Т. 25. – №. 13. – С. 1613-1622.

## ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА И КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЫ АЛЛАТОСТАТИНА DIPPU AST7

## SPATIAL STRUCTURE AND CONFORMATIONAL PROPERTIES OF ALLOTOSTATIN MOLECULE DIPPU AST7

*Велиева Л.И., Алиев Э.З.*

Бакинский Государственный Университет, Баку, Lala\_Velieva@rambler.ru

Нейропептиды семейства аллатостатинов, обладающие уникальной способностью регулировать процессы синтеза и выделения ювенильных гормонов у различных видов насекомых, относятся к числу объектов интенсивного исследования последнего десятилетия. Семейство включает в себя пептидные молекулы, известные под названием аллатостатинов 1-13, или Dipru-ASTs. В работе методами теоретического моделирования детально исследована структура и конформационные свойства одного из представителей данного семейства - аллатостатина 7, или Dipru-AST7, содержащего в своей первичной структуре тринадцать аминокислотных остатков [1,2].

Низкоэнергетические конформационные состояния Dipru AST7 были установлены путем минимизации полной конформационной энергии в силовом поле атом-атомных потенциальных функций. При расчете энергии учитывались невалентные ( $E_{нев}$ ) и электростатические ( $E_{эл}$ ) взаимодействия атомов, водородные связи ( $E_{вод}$ ) и торсионные вклады ( $E_{торс}$ ), для описания которых были использованы полуэмпирические потенциальные функции, предложенные в работах [3-5]. Расчеты проводились в рамках жесткой валентной схемы, т.е. при фиксированных значениях длин валентных связей и валентных углов аминокислотных остатков, входящих в химическую структуру Dipru AST7. Примененная система потенциальных функций и вычислительные программы были апробированы на большом числе пептидов и белков авторами данной работы и другими исследователями.

Для моделирования водного окружения использовалась параметризация, предложенная в работах [3-5]. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе при значении энергии диссоциации водородной связи, равной 1,5 ккал/моль, соответствующей расстоянию связи  $NH...OC$   $r=1.8\text{\AA}$  для водных растворов. Величина диэлектрической постоянной принята равной 10. При обсуждении результатов расчета была использована общепринятая классификация пептидных структур. Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных пептидов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов ( $\phi$  и  $\psi$ ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты  $R,B,L$  и  $P$  для каждого монопептида. Отсчет двугранных углов проводился согласно международной номенклатуре [6].

Как было сказано выше, аллатостатин Dipru AST7 - нейропептид, в химической структуре которого содержатся тринадцать аминокислотных остатков Ala1-Pro2-Ser3-Gly4-Ala5-Gln6-Arg7-Leu8-Tyr9-Gly10-Phe11-

**Gly12-Leu13-NH<sub>2</sub>**. Исследование конформационных возможностей молекулы начато с расчета оптимальных конформаций N-концевого дипептида Ala1-Pro2 и последующего изучения поостаточно наращиваемых три- и тетрапептидных фрагментов. Далее были изучены конформационные состояния C-концевых ди-, три-, тетра- и пентапептидных фрагментов. На конечном этапе путем сочетания перекрывающихся фрагментов, изучены конформационные состояния основной и боковых цепей молекулы.

Как показали результаты расчета, аллостатин Dippu AST7 обладает высокой конформационной подвижностью, так как его пептидная цепь представлена 36-ью шейпами в интервале относительной энергии 0-5 ккал/моль. Девять шейпов из рассчитанных 36-ти формируют конформации, энергия которых варьирует в интервале -35.80÷-33.84 ккал/моль. Анализ межостаточных взаимодействий для двух низкоэнергетических конформаций показал, что устойчивый β-поворот реализуется на участке Leu8-Leu13 (расстояние между C<sup>α</sup>-атомами составляет 6.1 Å). Структура стабилизирована системой водородных связей, к числу которых относятся взаимодействия между CO и NH группами остатков Tyr9 и Phe11 (E<sub>вод.</sub> = -1.05 ккал/моль).

1. Clark L., Lange A.B., Zhang J.R., Tobe S.S. The roles of Dippu-allatostatin in the modulation of hormone release in *Locusta migratoria* // *J.Insect.Physiol.*, 2008, v.54(6), p.949-958
2. Gäde G., Marco H.G., Richter D., Weaver R.J. Structure-activity studies with endogenous allatostatins from *Periplaneta americana*: expressed receptor compared with functional bioassay // *J Insect. Physiol.*, 2008, v.54(6), p.988-996
3. Popov E.M. Quantitative approach to conformations of proteins *Int.J.Quant.Chem.*, 1979, v. 16, p. 707-737
4. Popov, E.M. The Structural Organization of Proteins (in Russian), Nauka, Moscow, 1989, 352 pp
5. Momany F.A., McGuire R., Burgess A.W., Scheraga H.A. Energy parameters in polypeptides: geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interaction for naturally occurring amino acid // *J.Phys.Chem.*, 1975, v.79, p. 2361-2381
6. IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains (1974) *Pure Appl. Chem.*, 40, 291-308

---

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАИБОЛЕЕ СТАБИЛЬНОЙ УКЛАДКИ ПЕПТИДОВ ИЗ S1 И BGL2P В БИСЛОЯХ DETERMINATION OF THE MOST STABLE PACKING OF PEPTIDES FROM S1 AND BGL2P IN BILAYERS

***Глякина А.В., Балабаев Н.К., Галзитская О.В.<sup>1</sup>***

Институт математических проблем биологии РАН, ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Пущино,  
quark777@rambler.ru

<sup>1</sup>Институт белка РАН, Пущино

В настоящее время изучение амилоидов, которые являются фибриллярными белковыми агрегатами, является очень важной областью исследований. Многие белки и пептиды, которые способны образовывать амилоиды в физиологических условиях, связаны с такими тяжелыми заболеваниями человека как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др. На сегодняшний день считается, что практически все известные белки в тех или иных условиях могут образовывать амилоиды. Это может служить указанием на то, что должны существовать какие-то общие механизмы и закономерности процесса амилоидообразования. Важным аспектом исследования амилоидных структур является определение условий влияющих на процесс амилоидообразования, таких как температура, значение pH, ионная сила, наличие лигандов и др. Для исследования данных вопросов удобно использовать модельные пептиды, большую часть последовательности которых составляет заведомо амилоидогенный участок.

В качестве модельных объектов были взяты бислои, состоящие из восьми коротких пептидов, с аминокислотными последовательностями VDSWNVLVAG (VESWNVLVAG) и IVRGVVVAID. Аминокислотная последовательность VDSWNVLVAG соответствует фрагменту белка глюкантрансферазы Bgl2p из клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae*. Экспериментально было показано, что данный пептид способен образовывать амилоиды [1]. Аминокислотная последовательность IVRGVVVAID соответствует амилоидогенному участку белка S1 из *E. coli* и тоже образует амилоиды.

Были сконструированы β-слои, в которых β-участки располагались параллельно или антипараллельно относительно друг друга. Далее, параллельно первому β-слою на расстоянии 10 Å был помещён второй β-слой (параллельно или антипараллельно относительно первого β-слоя, соответственно). Таким образом, было получено четыре типа бислоёв, которые в дальнейшем использовались для моделирования. Для каждого бислоя рассматривалось три варианта его зарядового состояния: 1) нейтральная система; 2) система, соответствующая pH3 (N-конец заряжен положительно); 3) система, соответствующая pH5 (N-конец заряжен положительно, а C-конец и Asp (или Glu) заряжены отрицательно).

Молекулярно-динамическое моделирование проводилось с помощью программы PUMA [2]. Полученные бислои были окружены более чем 1500 молекулами воды. Вначале, в течение порядка 400 пс проводилась

релаксация гидратированных бислоев в NPT-ансамбле с использованием стандартного силового поля AMBER [3]. Для воды использовалась модель TIP3P [4]. Моделирование проводилось в периодических граничных условиях. Постоянные давление и температура поддерживались с помощью баростата Берендсена [5] и столкновительного термостата [6]. В процессе молекулярно-динамического эксперимента следили за тем, как меняется процент вторичной структуры в бислоях с течением времени. В данной работе этот параметр (доля  $\beta$ -структуры в бислое) и служил мерой стабильности для каждого бислоя. Доля вторичной структуры рассчитывалась с помощью программы YASARA [7].

Таким образом, с помощью метода молекулярной динамики, было изучено поведение и стабильность различных типов бислоев в зависимости от их зарядового состояния и аминокислотной последовательности  $\beta$ -участков, составляющих эти бислои [8].

Работа поддержана грантом РФФИ.

1. Bezsonov E.E. et al. Amyloidogenic peptides of yeast cell wall glucantransferase Bgl2p as a model for the investigation of its pH-dependent fibril formation // *Prion*. 2013. Vol. 7. P. 175–184.
2. Glyakina A.V. et al. Two-,three-,and four-state events occur in the mechanical unfolding of small protein L using molecular dynamics simulation // *Protein Pept. Lett.* 2010. Vol. 17. P. 92–103.
3. Wang J. et al. How well a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? // *J. Comp. Chem.* 2000. Vol. 21. P. 1049–1074.
4. Jorgensen W.L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* 1983. Vol. 79. P. 926–935.
5. Berendsen H.J.C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* 1984. Vol. 81. P. 3684–3690.
6. Lemak A.S., Balabaev N.K. Molecular dynamics simulation of polymer chain in solution by collisional dynamics method // *J. Comp. Chem.* 1996. Vol. 17. P. 1685–1695.
7. Krieger E. et al. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA – a self-parameterizing force field // *Proteins*. 2002. Vol. 47. P. 393–402.
8. Glyakina A.V. et al. Dataset of the molecular dynamics simulations of bilayers consisting of short amyloidogenic peptide VDSWNVLVAG from Bgl2p-glucantransferase of *S. cerevisiae* cell wall // *Data Brief*. 2016. Vol. 9. P. 597.

---

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ТРИПЕПТИДОВ- ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА (АПФ)

## COMPARATIVE CONFORMATIONAL ANALYSIS OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) INHIBITORY TRIPEPTIDES

*Годжаев Н.М.<sup>1,2</sup>, Агаева Г.А.<sup>1</sup>, Агаева У.Т.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> – Институт физических проблем, Бакинский государственный университет, AZ-1148, ул. З.Халилова 23;

<sup>2</sup> – Бакинский инженерный университет, AZ-0101, пос.Хырдалан, 16 км Сумгаитского шоссе

Как известно, ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) – ключевой фермент ренин-ангиотензиновой и кинин-калликреиновой систем [1], играет существенную роль в регуляции артериального давления (АД). Поскольку АПФ вовлечен в метаболизм вазоактивных пептидов, он становится важной молекулярной мишенью в лечении гипертонии и сердечно-сосудистой недостаточности. Поэтому широкое распространение принимает использование ингибиторов АПФ как в качестве антигипертензивных средств, так и для терапии сердечной недостаточности. В работе [2] из яичного белка овотрансферрина были недавно выделены и охарактеризованы два трипептида, IQW (Ile-Gln-Trp) и LKP (Leu-Lys-Pro), ингибирующие ангиотензин-превращающий фермент. Данное исследование проверило потенциал снижения артериального давления перорально вводимых IQW и LKP у крыс со спонтанной гипертонией. Использование природных ингибиторов АПФ, IQW и LKP снижало среднее кровяное давление (МАР) на ~ 19 и ~ 30 мм рт.ст. соответственно. Эти результаты демонстрируют антигипертензивные эффекты как для IQW, так и для LKP *in vivo*, но обнаруживают дополнительные противовоспалительные и антиоксидантные эффекты у трипептида IQW, отсутствующие у трипептида LKP. Исследование пространственного и электронного строения биологически активных природных пептидов позволяет определить структурные критерии, необходимые для их функционирования и может способствовать созданию более эффективных лекарственных препаратов. Электронная структура пептидной молекулы и его отдельные радикалы являются ключом для продуктивного пептид-рецепторного взаимодействия. Флуктуации отдельных атомных групп в пределах пептидной молекулы в зависимости от заряда, электростатического поля или конформационного изменения играют важную роль в определении структуры и связывающих свойств молекулы. С этой целью в данной работе были исследованы пространственное и электронное строение гипотензивных трипептидных молекул IQW и LKP методами молекулярной механики (ММ) и квантово-

химических расчетов (AM1). Определение пространственного строения гипотензивных трипептидных молекул проводилось путем минимизации потенциальной энергии выбранных конформационных состояний, исходя из особенностей, составляющих их аминокислотных остатков. Электронное строение молекул изучалось с помощью полумпирического метода квантовой химии AM1, позволяющего количественно оценить суммарное влияние структурных изменений на распределение электронной плотности молекулы в целом и в любой ее части. Как показал расчет конформаций исследуемых трипептидов стабильные пространственные структуры отличаются в основном энергией электростатических и дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки пептидной цепи. Структурный анализ трипептидов позволяет сделать заключение, что благодаря наличию различных остатков в молекулах трипептидов они обладают существенно различным конформационным поведением. Поскольку из всех четырех возможных для трипептида форм пептидного остова для IQW пептида наиболее энергетически предпочтительными оказались полностью свернутые спиральные формы, а для LKP – развернутые вытянутые формы остова. Наблюдается также существенная дифференциация по ориентации боковых цепей остатков в стабильных конформационных состояниях трипептидов. Анализ зарядовых характеристик и электронной плотности на атомах пептидных групп молекул трипептидов позволяет сделать вывод, что большей электронодонорной способностью обладают атомы кислорода карбонильной группы по сравнению с ее другими атомами, т.е. наличие высокозаряженных пептидных групп играет существенную роль в реакционной способности молекул. Полученные величины энергетических и электронных параметров наиболее стабильных конформаций трипептидов дают представление о предпочтительной пространственной организации молекул и дают основание предполагать о вероятности различного механизма ингибирования АПФ исследуемыми трипептидами.

1. Bernstein K.E., Khan Z., Giani J.F., Cao D.Y., Bernstein E.A., Shen X.Z., Angiotensin-converting enzyme innate and adaptive immunity.// Nat. Rev. Nephrol. 2018, vol.14, pp. 325–336.
2. Majumder K., Chakrabarti S., Morton J.S., Panahi S., Kaufman S., Davidge S. T., Wu J., Egg-derived ACE-inhibitory peptides IQW and LKP reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats.// Journal of Functional Foods, 2015. vol. 13, pp. 50-60.

## **ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ОБРАБОТКИ ТИОЦИАНАТОМ КАЛИЯ И МОЧЕВИНОЙ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G С ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ**

### **INFLUENCE OF SHORT-TERM TREATMENT OF POTASSIUM THYOCYANATE AND UREA ON THE INTERACTION OF CLASS G IMMUNOGLOBULINS WITH ENTEROBACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES**

***Гордиенко А.И., Химич Н.В.***

«Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь.

В крови здоровых людей помимо антител, специфичных к строго определенным антигенам, всегда присутствует некоторое количество иммуноглобулинов, способных к низкоаффинному взаимодействию с самыми разнообразными серологически несходными антигенами, включая аутоантигены. Такие полиреактивные антитела синтезируются В1-лимфоцитами и считаются одним из эволюционно наиболее ранних эффекторов иммунной системы. Наряду с этим экспериментально установлено, что при кратковременном воздействии ряда физико-химических факторов (в частности, хаотропных реагентов) молекулы нативных иммуноглобулинов класса G (ИГ) претерпевают определенные конформационные перестройки, что ведет к многократному усилению их способности к взаимодействию с различными неродственными антигенами [1, 2]. На сегодняшний день связывание таких полиреактивно трансформированных иммуноглобулинов (ПРИГ) с модельными белками охарактеризовано достаточно хорошо, тогда как особенности их взаимодействия с важнейшими бактериальными антигенами небелковой природы остаются неизученными.

Проведенные эксперименты показали, что 10-минутная экспозиция ИГ в растворе, содержащем 3,5 М тиоцианат калия, ведет к существенному усилению взаимодействия образующихся ПРИГ с липополисахаридом (ЛПС) *E. coli* K235, ЛПС *S. minnesota* и ЛПС *S. enteritidis* (соответственно в 6,4, 2,6 и 8,0 раз выше по сравнению с аналогичными показателями для ИГ). В тоже время 10-минутная инкубация ИГ в присутствии 1 М и 3,5 М мочевины не ведет к достоверному усилению их связывания с ЛПС *Escherichia coli* K235, ЛПС *Salmonella minnesota* и ЛПС *Salmonella enteritidis*.

Мочевина и ее производные в высоких концентрациях являются сильными денатурантами и вызывают глубокие конформационные изменения белковых молекул, которые сопровождаются существенным изменением их спектра поглощения в ультрафиолетовой области [3]. В наших экспериментах 10-минутная

инкубация ИГ в присутствии 1 М и 3,5 М мочевины сопровождалась достоверным снижением поглощения в диапазоне длин волн 240-300 нм по сравнению с исходно взятыми ИГ. Однако такая же по времени экспозиция ИГ с 3,5 М тиоцианатом калия не приводила к изменению их экстинкции в ультрафиолетовой области спектра. Проведенные спектральные исследования свидетельствуют о том, что воздействие на ИГ 1 М и 3,5 М мочевины ведет к полной или частичной потере контакта хромофорных групп с окружающими их соседними группами в молекуле белка и к переходу их в окружение, создаваемое растворителем. В результате в водную среду высвобождается часть аминокислот и углеводов, локализованных в междоменной области ИГ. В тоже время экспозиция ИГ с 3,5 М тиоцианатом калия не вызывает существенных изменений в микроокружении их хромофорных групп. Таким образом, особенности структурной пертурбации ИГ при воздействии различных дестабилизирующих факторов определяют функциональные свойства образующихся конформеров. При этом внутримолекулярные механизмы, лежащие в основе феномена полиреактивной трансформации ИГ, представляют собой гораздо более сложное явление, нежели простая денатурация белковых молекул.

ИГ выделяли из сыворотки крови четырехкратным осаждением сульфатом аммония (40 % от насыщения) и трансформировали в ПРИГ путем 10-минутной инкубации в присутствии 3,5 М тиоцианата калия, а также воздействовали 1 М и 3,5 М мочевиной. Качественный состав полученных иммуноглобулинов контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле, с последующим окрашиванием геля белковым красителем Coomassie R-250; количественное содержание белка определяли методом Bredford. Связывание ПРИГ с ЛПС энтеробактерий оценивали методом ИФА [4]. Спектры поглощения растворов ИГ и ПРИГ регистрировали в режиме сканирования в диапазоне длин волн 200-350 нм с помощью спектрофотометра UV/VIS NanoPhotometer P360.

1. Бобровник С.А. Полиреактивные иммуноглобулины и натуральные антитела являются функционально различными субстанциями // Укр. біохім. журн. 2002. 74, №5. С. 49-54.
2. Bouvet J.P, Stahl D., Rose S. et al. Induction of natural autoantibody activity following treatment of human immunoglobulin with dissociating agents // J. Autoimmun. 2001. 16, N2. P. 163-172.
3. Tischenko V.M., Zav'yalov V.P. Long-term metastable conformation of human Fc $\gamma$  subunit // Immunology Letters. 2002. 84. P. 241-245.
4. Гордиенко А.И. Новый подход к повышению специфичности определения антител к липополисахаридам грамотрицательных бактерий методом твердофазного иммуоферментного анализа // Укр. біохім. журн. 2004. 76, № 6. С. 130-135.

---

## НОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ СБОРКИ ТУБУЛИНОВЫХ МИКРОТРУБОЧЕК NOVEL VIEW OF THE MECHANISM FOR ASSEMBLY OF TUBULIN MICROTUBULES

Гудимчук Н.Б.<sup>1,2</sup>, Ульянов Е.В.<sup>1</sup>, О'Тул А.<sup>3</sup>, Виноградов Д.С.<sup>2</sup>, Атауллаханов Ф.И.<sup>1,2</sup>, Д.Р.МакИнтош<sup>3</sup>

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 1.

<sup>2</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Россия, Москва, ул. Косыгина, 4.

<sup>3</sup>Университет Колорадо, г. Боудер, США 80309

Email: gudimchuk@phys.msu.ru

Несмотря на несколько десятилетий исследований свойств микротрубочек – важнейших компонентов клеточного скелета, механизмы их динамического поведения остаются предметом жарких споров. Микротрубочки в клетках пребывают попеременно в фазах роста и укорочения, тем самым постоянно исследуя внутриклеточный объем и заполняя его непрерывно перестраивающейся сетью. Их динамика играет ключевую роль в таких процессах как деление клеток, миграция, поддержание их формы и др. Известно, что сборка микротрубочек происходит спонтанно в присутствии молекул гуанозинтрифосфата (ГТФ) и достаточной концентрации свободных димеров тубулина, которые встраиваются в концы микротрубочек в комплексе друг с другом. Впоследствии, молекулы ГТФ испытывают гидролиз в теле микротрубочки, тем самым приводя к ее дестабилизации. Однако, каким образом стабильность микротрубочки связана с типом связанного нуклеотида, неизвестно. Ответить на этот вопрос помогают данные о структурных изменениях на концах микротрубочек при их переходе от сборки к разборке. Пионерские исследования с помощью криоэлектронной микроскопии обнаружили цилиндрическую форму конца растущей микротрубочки и обилие изогнутых протофиламентов на конце микротрубочки при разборке (Mandelkow *et al.*, 1991). Отсюда возникла элегантная модель, согласно которой ГТФ-тубулины имеют прямую конформацию, что позволяет им собираться в трубку с «тупым концом», в то время как ГДФ-тубулины - изогнуты, и должны быть деформированы, чтобы удерживаться в решетке микротрубочки. Поэтому микротрубочка, состоящая только из ГДФ-тубулинов, нестабильна и разбирается, разламываясь на изогнутые ГДФ-тубулиновые протофиламенты. Однако, позже эти представления были подвергнуты сомнению: группа Д.Кретьена сообщила о листовидных структурах концов микротрубочек в очищенных системах (Chretien *et al.*, 1995), а другие авторы видели изогнутые протофиламенты на концах растущих микротрубочек в клетках дрожжей (Hogg *et al.*, 2011). Кроме того, кристаллографические данные

указывали на то, что свободные димеры ГТФ-тубулина имеют такую же изогнутую форму, как и ГДФ-тубулины (Rice *et al.*, 2008).

С целью связать конформацию тубулинов с типом связанного нуклеотида и построить непротиворечивую теорию самосборки микротрубочек мы визуализировали и количественно проанализировали формы концов собирающихся и разбирающихся микротрубочек *in vitro* и *in vivo* у шести видов организмов, с помощью криоэлектронной томографии (McIntosh *et al.*, 2018). Неожиданно, мы обнаружили, что микротрубочки собираются всегда с изогнутыми протофиламентами на концах, предполагая новый механизм сборки. Учитывая изогнутую форму отдельных димеров ГТФ-тубулина, мы построили компьютерную модель полимеризации микротрубочки, используя метод броуновской динамики. В такой модели, действительно, существует диапазон значений свободных энергий боковых и продольных связей между тубулинами, изгибных жесткостей протофиламентов и констант присоединения тубулинов к микротрубочке, при котором возможно количественно воспроизвести целый ряд известных данных о структуре и свойствах микротрубочек, включая обнаруженные нами формы их концов при сборке и разборке. Наша модель предсказала частые разрывы и формирования боковых связей между тубулинами на концах собирающихся микротрубочек, указывая на то, что регулируя эти связи, можно эффективно управлять скоростью сборки и стабильностью микротрубочки. Изменения в боковых связях тубулина только на 1-2 кТ были достаточными для переключения микротрубочки от роста к укорочению в модели. Одним из ключевых предсказаний модели была линейная зависимость скорости полимеризации микротрубочки от концентрации свободного тубулина и нечувствительность длины изогнутых протофиламентов к этой концентрации. Таким образом, микротрубочки в широком диапазоне экспериментальных условий должны иметь похожие по форме и длине изогнутые протофиламенты на концах. Мы подтвердили это предсказание, визуализируя сборку микротрубочек методом криоэлектронной микроскопии при разных концентрациях тубулина и в присутствии катализаторов и ингибиторов полимеризации тубулина.

Дополнительным интересным предсказанием модели является способность микротрубочки развивать толкающие и тянущие силы, что является крайне интересными свойствами для понимания механизмов работы микротрубочек в качестве основных движителей хромосом во время митоза. Совокупно, наши данные устанавливают новые представления о механизме полимеризации микротрубочек, тем самым проливая свет на одну из интересных и важных фундаментальных проблем современной биофизики.

Работа была выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке гранта РФФИ, проект № 17-74-20152.

---

## КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЫ АЛЛАТОСТАТИНА DIPPU AST6 CONFORMATIONAL POSSIBILITIES OF THE ALLATOSTATIN MOLECULE DIPPU AST6

*Гулехмедов О.Г., Велиева Л.И.*

Бакинский Государственный Университет, Баку, [ogxangulehmedov1@gmail.com](mailto:ogxangulehmedov1@gmail.com)

В данной работе методом молекулярной механики на основе поэтапного подхода, описанного в работах [1-4] проведено исследование структуры и конформационной динамики молекулы аллатостатина Dipru AST6. Аллатостатин Dipru AST6 состоит из последовательности восьми аминокислотных остатков Ala1-Arg2-Pro3-Tyr4-Ser5-Phe6-Gly7-Leu8-NH<sub>2</sub> (ARPYSFGL). Пространственная структура молекулы изучена на основе стабильных конформаций метиламидов N-ацетил- $\alpha$ -аминокислот с учетом различных ориентаций их боковых цепей. Поэтапный расчет пространственной структуры аллатостатина Dipru AST6 включал изучение конформационных состояний последовательно наращиваемых фрагментов Ala1-Arg2-Pro3, Pro3-Tyr4-Ser5-Phe6 и Pro3-Tyr4-Ser5-Phe6-Gly7-Leu8.

Ala1-Arg2-Pro3 трипептидный фрагмент содержит полярную аминокислоту аргинин и две неполярные аминокислоты - аланин и пролин, которые относятся к группе гидрофобных остатков, не имеющих средств к воде. Для конформационного анализа фрагмента Ala1-Arg2-Pro3 было составлено 162 варианта. Для обоих неглициновых монопептидов - аланина и аргинина начальные варианты для процедуры минимизации полной конформационной энергии составлялись из R, B и L областей, а для остатка пролина, благодаря жестко фиксированной связи N-C <sup>$\alpha$</sup> , только из R и B областей. Как известно, для пептидного фрагмента число рассматриваемых структурных типов, т.е. шейпов, определяется формулой  $2^{n-1}$ , где n-число остатков в последовательности фрагмента. В случае трипептида число шейпов должно быть 4. Однако для остатка предшествующего пролину, стерически разрешена лишь B форма основной цепи, что значительно ограничивает его конформационные возможности, поэтому были рассмотрены конформации только четырех структурных типов. Общее число низкоэнергетических конформаций, входящих в состав энергетического интервала с относительной энергией 0-5 ккал/моль составило 20. Наиболее предпочтительными являются

конформации, принадлежащие шейпам *fe* (11 конформаций) и *ee* (8 конформаций), различие в величинах полной энергии в которых не превышает 0.6 ккал/моль.

Для расчета тетрапептидного фрагмента Pro3-Tyr4-Ser5-Phe6 было составлен 441 вариант. Согласно результатам расчетов в интервал с относительной энергией 0-10 ккал/моль попадает 81 конформация, из которых наибольшее число принадлежит шейпу *fff* (24 конформации). Три конформации этого шейпа имеют энергии в интервале 0-1 ккал/моль. В целом в интервале 0-3 ккал/моль находятся конформации шейпов *fff*, *fef* и *ffe*, которые и включены в процедуру последующего расчета.

Согласно схеме расчета был проведен конформационный анализ фрагмента Pro3-Tyr4-Ser5-Phe6-Gly7-Leu8. В составленных начальных структурных вариантах всех допустимых шейпов данного фрагмента варьировались двугранные углы как в основной, так и в боковых цепях аминокислотных остатков. Всего для процедуры минимизации полной конформационной энергии было составлено 510 вариантов. Согласно результатам расчета, в интервал с относительной энергией 0÷5 ккал/моль попадают конформации всех допустимых 11 шейпов, причем состояние с минимальным значением энергии принадлежит шейпу *ffff*.

**Молекула аллатогостатина Dppu AST 6.** Полученные на предыдущих этапах расчета результаты были положены в основу конформационного анализа всей молекулы аллатогостатина Dppu AST 6, содержащего 132 атома и 40 варьируемых двугранных угла вращения. Всего было рассчитано 539 вариантов, из которых 63 попадают в интервал относительной энергии 0-10 ккал/моль. Как следует из результатов расчета, сохраняется преемственность структур, рассчитанных на предыдущих этапах расчета, т.е. низкоэнергетические конформационные состояния пептида являются сочетанием глобальных конформаций как трипептидного фрагмента Ala1-Arg2-Pro3, так и фрагмента Pro3-Tyr4-Ser5-Phe6-Gly7-Leu8.

Состояние с низкими значениями энергии обладают преимущественно свернутыми формами пептидной цепи. Такие конформации стабилизированы, главным образом, невалентными взаимодействиями остатков аргинина с фенилаланином и аргинина с тирозином. Наличие близких контактов между остатками Pro3 и Leu8 (расстояние между C<sup>α</sup> атомами <7 Å) свидетельствует о формировании β-изгиба на этом участке цепи. Низкоэнергетические конформационные состояния стабилизированы системой водородных связей, среди которых связь между CO и NH атомами основной цепи остатков Pro3 и Leu8, которая стабилизирует β-поворот на этом участке пептидной цепи.

1. Попов Е.М. Структурная организация белков. М.: Наука, 1989, 352с.
2. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчёта конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ //Журнал структурной химии, 1983, т.24, №4, с.147-148
3. Momany F.A., McGuire R.F., Burgess A.W., Scheraga H.A. "Energy Parameters in Polypeptides: Geometric Parameters, Partial Atomic Charges, Nonbonded Interaction for Naturally Occuring Amino Acid" //Phys. Chem., 1975, v.79, p.2361-2381
4. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and Symbols for Description of Conformation of Polypeptide Chains //Pure Applied Chem., 1974, v.40, p.291-308

## АНАЛИЗ ВНУТРЕННЕ-НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ ОБЛАСТЕЙ оцДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА VirE2 ANALYSIS OF THE INTRINSICALLY DISORDERED REGIONS OF ssDNA-BINDING VirE2 PROTEIN

Гусев Ю.С., Мазилев С.И., Волохина И.В., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов,  
E-mail: gusev\_yu@ibppm.ru

Белок вирулентности VirE2 почвенной бактерии *A. tumefaciens* обеспечивает перенос фрагмента ее Ti-плазмиды (одноцепочечной (оц)Т-ДНК) в геном широкого круга растений и некоторых видов животных в виде оцДНК-VirE2-VirD2-белкового комплекса. Предполагается, что белок VirE2 участвует в нескольких важных для этого процесса функциях, в том числе, образует самоорганизующийся с оцДНК комплекс, защищает ДНК от эндонуклеаз эукариотической клетки, переносит оцДНК через мембрану клетки-мишени [1].

Модель белка VirE2, полученная рентгеноструктурным методом, представляет собой два независимых домена, соединенных подвижным линкером (неупорядоченная структура) [2], имеет незакристаллизованные части на С- (40 аминокислотных остатков) и N- (111 аминокислотных остатков) концах белка, которые также считаются неупорядоченными. Внутренне неупорядоченные области (intrinsically disordered regions) белков, несмотря на отсутствие третичной структуры, имеют биохимические и биофизические функции, в том числе в качестве сайтов посттрансляционной модификации, эффекторов, энтропийных линкеров между структурированными доменами [3]. Одним из важных свойств внутренне неупорядоченных структур может быть связывание с ДНК. В частности, VirE2 внутренне неупорядоченный линкер отвечает за связывание с оцДНК, в ее отсутствие этот сайт связывания блокируется белком-шапероном VirE1 [2]. Анализ неупорядоченных областей, имеющихся в структуре белка VirE2 на N- и С- концах, приведен в первой части доклада. С помощью

нескольких компьютерных программ нами предсказано 3  $\alpha$ -спирали (на N-конце) и одна  $\alpha$ -спираль (на C-конце) в неупорядоченных областях 3D модели белка VirE2, не имеющих электронной плотности и соответствующих незакристаллизованной части.

Во второй части доклада приведена информация о полной трехмерной модели VirE2, основанной на рентгеноструктурной модели VirE2 (3btp) [2] с учетом отсутствующих в рентгеноструктурной модели участков на N- и C-концах. Проведена полноатомная молекулярная динамика полной модели белка VirE2 при времени моделирования 1 нс.

В третьей части доклада проанализированы вероятностные 3D модели комплексов из двух и четырех субъединиц белка VirE2. С помощью метода полноатомной молекулярной динамики в программе Namd 2.10 исследована модель комплекса из двух белков VirE2 при времени моделирования 50 нс. Установлено, что комплекс из двух субъединиц белков VirE2 достигает равновесного состояния к 27 нс и остается стабильным.

Мы впервые показали участие неупорядоченных участков в образовании четырех-субъединичных VirE2 комплексов. Формирование тетрамеров из белка VirE2 и комплексов оцДНК–VirE2 было продемонстрировано компьютерными и электронно-микроскопическими методами.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-2187.2019.4).

1. Dumas F. et al. An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells // PNAS USA. 2001. Vol. 98. P. 485-490.
2. Dym O. et al. Crystal structure of the *Agrobacterium* virulence complex VirE1-VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners // PNAS USA. 2008. Vol. 105. P. 11170-11175.
3. van der Lee R. et al. Classification of intrinsically disordered regions and proteins // Chem. Rev. 2014. Vol. 114. P. 6589-6631.

---

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТ В ВОДНОЙ СРЕДЕ, ИССЛЕДОВАННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОЙ И КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

### INVESTIGATIONS ON MOLECULAR INTERACTIONS OF AMINO ACIDS IN AQUEOUS SOLUTION BY UV-VISIBLE AND INFRARED SPECTROSCOPY

Дегтярева О.В., Терпугов Е. Л.

Институт биофизики клетки РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, olga\_degt@mail.ru

Аминокислоты - основные строительные блоки белков - используются как простые модели для изучения функциональных свойств и поведения белков. Относительно простое строение аминокислот, между тем, не является гарантией их простого поведения в водных растворах. Хотя строение и свойства аминокислот в изолированном состоянии достаточно хорошо изучены теоретически и экспериментально, свойства и поведение аминокислот в водных растворах все - еще слабо изучены. Это объясняется как ограниченностью экспериментальных подходов, так и предубежденностью в отношении свойств самих аминокислот, в результате чего открытие нового эффекта в последние годы стало самой настоящей сенсацией. Недавно было показано, что в растворе лизин (Lys), так же как и триптофан (Trp), способен поглощать около 270 нм и при этом люминесцировать не только в ближней УФ, но и видимой области [1], что ранее представлялось невозможным.

Lys, как известно, в водной фазе может существовать в четырех ионных формах, структура которых представляет собой линейную цепь из четырех (-CH<sub>2</sub>) групп с концевой аминогруппой. При этом структура лизина не содержит систему конъюгированных связей, как это наблюдается у ароматических аминокислот (Trp, Tug, Phe). Ароматические аминокислоты, как известно, активно используются в качестве собственных флуоресцентных зондов при изучении функциональных свойств белков. Первоначально полагали, что новое флуоресцентное свойство уникально для Lys и проявляется в случае его агрегации, что подтвердили эксперименты с поли- Lys [2]. Однако в литературе увеличивается число экспериментальных данных, свидетельствующих об универсальности этого феномена, получившем свое название - «агрегацией индуцированная эмиссия» (AIE, aggregation-induced emission). Хотя в настоящее время механизм этого феномена до конца еще не изучен, в большинстве случаев полагают, что эти уникальные и широко распространенные среди аминокислот люминесцентные свойства обусловлены кластеризацией мономеров, перекрыванием электронных облаков соответствующих хромофорных (амино-, карбокси- и гидроксильной) групп и жесткостью образующейся новой структуры.

В настоящей работе продемонстрировано, что аутолюминесценция, наблюдаемая в концентрированных растворах аминокислот (Lys, Gly, Val, Ala и др.), не связана с «ароматикой» и может возбуждаться не только УФ-, но и видимым светом, что согласуется с литературными данными [3]. Показано, что излучательные свойства исследованных образцов зависят от структуры молекулы, присутствия в растворе дополнительных химических компонентов, а так же от сроков хранения растворов.



Данные ИК-спектроскопии показали, что в растворах с нейтральным pH присутствуют водородо-связанные структуры подобные димерам и/или гидратированным кластерам, существование которых было предсказано на основе только теоретических работ.

Мы полагаем, что открытие люминесцентных свойств неароматических АК в водных растворах может пролить света на дальнейшее понимание аутолюминесценции биологических систем, а также понимание механизмов функционирования фоторецепторных и фоточувствительных белков. Кроме того, это открывает путь для дизайна и разработки нового класса флуоресцирующих биомолекул с многообещающей перспективой применения в области оптоэлектроники и биомедицины. Дальнейшее исследование люминесцентных свойств аминокислот может помочь пролить свет на кинетику белкового фолдинга и агрегации белков, что является существенным для установления молекулярного механизма, относящегося к нейродегенеративным заболеваниям. Это также представляется важным с точки зрения разработки новых диагностических средств в ближней УФ и видимой области.

1. Homchaudhuri, L., Swaminathan, R. Novel absorption and fluorescence characteristics of l-lysine // Chem. Lett. - 2001. - P. 844.
2. Homchaudhuri, L., Swaminathan A.G. Near ultraviolet absorption arising from lysine residues in close proximity: a probe to monitor protein unfolding and aggregation in lysine-rich proteins// Bull.Chem.Soc.Jpn. 2004. Vol. 77. P. 765.
3. Chen et al. // Sci. China Chem. 2018. Vol.61. P. 351.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА КАЗЕИНКИНАЗЫ-1 1CSN

### THE STUDY OF THE MOLECULAR DYNAMICS METHOD OF CATALYTIC DOMAIN CASEIN KINASE-1 1CSN

*Демухамедова С.Д., Гаджиев З.И.*

Институт физических проблем, Бакинский Государственный Университет, ул.З.Халилова, 23, AZ 1148, Баку, Азербайджан, e-mail: [svetlanabest@mail.ru](mailto:svetlanabest@mail.ru)

В процессе изучения биохимических процессов, протекающих в живой клетке, все большее значение приобретают теоретические исследования различными методами компьютерного моделирования. Наиболее точными считаются квантовохимические методы расчета с использованием методов *ab initio* Хартри-Фока и метода функционала электронной плотности DFT/B3LYP в расширенном базисе. Однако для молекул, состоящих из очень большого числа атомов квантомеханические методы непригодны. В настоящее время одним из важнейших способов исследования больших биологических молекул является метод молекулярной динамики, способный моделировать поведение молекул, состоящих из большого числа атомов. Метод молекулярной динамики играет важную роль в определении структурных, динамических и термодинамических характеристик белковых молекул, изучении процессов ионного транспорта, стабильности белков, конформационных превращений, докинга лигандов. Молекулярная динамика связана с внутренним движением белков и обеспечивает большую детализацию информации об индивидуальном движении атомов как функции времени. В основе метода молекулярной динамики лежит представление о многоатомной молекуле, в которой все атомы представляют собой материальные точки, а поведение атомов описывается классическими уравнениями движения. Численное интегрирование этих уравнений позволяет рассчитывать траектории движения всех точек, математическая обработка этих траекторий дает возможность получать структурные и динамические характеристики и отслеживать их во времени.

Казеинкиназа 1 (СК1) представляет собой серин/треонин киназу и относится к большому семейству протеинкиназ СК1, ферментов, которые регулируют большинство сигнальных процессов внутри клетки, включая процессинг и репарацию ДНК, пролиферацию, апоптоз, дифференцировку клеток. Аномальная активность этих протеинкиназ участвует в ряде патологий, таких как псориаз, ревматоидный артрит, остеопороз, септический шок, болезнь Альцгеймера и др. В последнее время, учитывая важность СК1 в процессе точного деления клеток и те последствия, которые наблюдаются при возможных мутациях и изменениях их активности, повышенное внимание в научных исследованиях стало уделяться роли СК1 в развитии рака и разработке СК1-специфических ингибиторов в качестве противоопухолевых препаратов.

Для нашего исследования была выбрана модель кристаллической структуры усеченного варианта казеинкиназы-1 от *Schizosaccharomyces pombe* в комплексе с MgATP [1,2] из Protein Data Base (PDB код: 1CSN). Эта структура показала 45,5% идентичности с последовательностью человеческого sk1a и является лучшей структурой для исследования, поскольку киназа находится в активной конформации [3]. В работе все моделирование методом молекулярной динамики проводилось с использованием наиболее популярного пакета программного обеспечения для молекулярной динамики биологических молекул NAMD и программы VMD для визуализации, построения и первичной обработки результатов моделирования [4]. С помощью этих программ можно динамически отслеживать изменения выбранного параметра со временем, например, проследить, как

меняется со временем расстояние между атомами. Все изменения можно рассматривать в графическом виде. После проведения подготовительных операций исследуемая структура помещается в ящик с водой или в водяную сферу. Эти два способа учета водного окружения отличаются тем, что в ящике учитывается взаимодействие с окружением, а в сфере не учитывается. В нашем моделировании каталитического домена кazeинкиназы-1 1csp мы использовали оба способа учета водного окружения. На начальном этапе моделирования производится минимизация энергии с целью обнуления скоростей и накладываются периодические условия. В результате проведенного моделирования МД мы получили равновесное состояние 1csp, детальную информацию о структуре, графике энергии, температуры и т.д. В процессе МД конформация белка изменяется. Для выяснения каких участков белка и в какой степени затрагивают изменения, вычисляется среднеквадратичное отклонение RMSD различных типов атомов белка от их начального состояния. RMSD белковой цепи дает представление о стабильности белка. Нами получен график изменения среднеквадратичного отклонения RMSD координат атомов 1csp (в нанометрах) в процессе молекулярной динамики со временем (в пикосекундах). График выходит на плато через 350 пс, что говорит о том, что система стабилизировалась. Проведенные расчеты доказывают стабильность структуры 1csp.

1. Xu R.M., Carmel G., Sweet R.M., Kuret J., Cheng X. Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase // EMBO J. 1995. Vol. 14, No. 5. P.1015.
2. Xu R.M., Carmel G., Kuret J., Cheng X. Structural basis for selectivity of the isoquinoline sulfonamide family of protein kinase inhibitors // Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. Vol. 93, No 13. P. 6308.
3. Sudha G., Yamunadevi S., Tyagi N., Das S., Srinivasan N. Structural and molecular basis of interaction of HCV non-structural protein 5A with human casein kinase 1 $\alpha$  and PKR // BMC Struct Biol. 2012. Vol. 12. P. 28.
4. Phillips J.C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD // J.Comput.Chem. 2005. Vol. 26. P. 1781.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФАЗОВЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ В БЫЧЬЕМ СЫВОРОТОЧНОМ АЛЬБУМИНЕ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ИОННОЙ СИЛЫ РАСТВОРА.

## STUDY OF PHASE TRANSITIONS IN BOVINE SERUM ALBUMIN WITH A CHANGE IN THE IONIC STRENGTH OF THE SOLUTION

*Дмитриев А.В., Федосеев А.И., Вашченков В.Э., Лушников С.Г.*  
ФТИ. им А.Ф. Иоффе, 194021, Санкт-Петербург, Россия.

Фазовые превращения белков активно изучаются в последние десятилетия. Изменение внешних условий, таких как повышение температуры или давления, или добавление со-растворителя, приводит к изменению пространственной структуры белков. Потеря нативного состояния может приводить к необратимой агрегации белка, в том числе в виде нерастворимых осадков или в упорядоченные амилоидные соединения. В настоящее время предполагается, что существование подобных образований в организме, являются причиной для таких нейродегенеративных заболеваний, как Альцгеймер, Паркинсон и другие. Таким образом, становится особенно важным исследование фазовых превращений, происходящих в растворах белков при изменении внешних условий и параметров растворителя. Примером подобных исследований является работа [1] по изучению фазовых превращений в бычьем сывороточном альбумине (БСА) при тепловой денатурации. В указанной работе было показано, что концентрированном растворе БСА, в 0.1M натрий-фосфатном буфере образуется фаза с ориентированными фибриллярными структурами (в области температур  $T_m < T < 347$  K). При дальнейшем повышении температуры это состояние преобразуется в гель-фазы. Все выше сказанное мотивировало нас на изучение влияния ионной силы на последовательность фазовых превращений при тепловой денатурации БСА.

Объектом исследования служил белок БСА (Sigma, O40M 1649) с молекулярной массой 69 kDa. Белок растворялся вначале в дистиллированной воде, а затем в натрий-фосфатном буфере с ионной силой 0.1 M. Концентрация растворенного белка в буфере составляла 100 мг/мл для обоих растворов. В качестве основного метода исследований мы использовали неупругое рассеяние света Мандельштама-Бриллюэна. Для анализа рассеянного света применялся 3х проходной интерферометр Фабри-Перо. В качестве источника света выступал аргоновый лазер с длиной волны 488 нм. Температура в ходе эксперимента изменялась от 290 до 363 K. Полученные экспериментальные спектры (для каждой температуры) обрабатывались и строились температурные зависимости таких параметров рассеянного света, как сдвиг частоты, полуширина и интенсивность дублета дублетов Мандельштама-Бриллюэна, а также интенсивность упругой компоненты рассеяния. Это позволило восстановить фазовую диаграмму, отражающую всю последовательность фазовых превращений при тепловой денатурации БСА в дистиллированной воде и сопоставить ее с известной диаграммой в натрий фосфатном буфере. В работе обсуждаются влияние ионной силы на последовательность фазовых превращений БСА в растворе.

1. A.V. Dmitriev, V.E. Vashchenkov, A.I. Fedoseev, S.G. Lushnikov Phase transformations of bovine serum albumin: Evidences from Rayleigh-Brillouin light scattering //J. Raman Spectrosc. 2019, Vol. 50(4) P. 537

## КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТРИТИЕВОЙ ПЛАНИГРАФИИ

## KINETIC ASPECTS OF THE TRITIUM PLANIGRAPHY

*Долгов А.А., Богачева Е.Н., Ксенофонтов А.Л.<sup>1</sup>*

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Метод тритиевой планиграфии [1] нашел применение к решению широкого круга задач современной биофизики, структурной химии, молекулярной и физико-химической биологии. Он основан на неселективном замещении водорода в углеводородных фрагментах молекул на его радиоактивный изотоп - тритий. Число замещаемых атомов для разных типов аминокислотных остатков меняется от 1 (глицин) до 7 (триптофан). Распределение активности по остаткам в объектах (биомолекулы или вирусы), полученное этим методом, необходимо сопоставить с информацией о пространственной структуре объекта, полученной другими методами

Для получения информации о структуре объекта по опытным данным тритиевой планиграфии разработана модель взаимодействия потока реагирующих атомов с атомами объекта на базе следующих допущений:

1. Атомы аппроксимируются сферами с известным Ван-дер-ваальсовым радиусом.
2. Объект описывается как совокупность координат центров атомов (обычно в виде pdb-файла).
3. Во внешней по отношению к объекту области задано распределение потока по направлениям:  
 $\mathbf{j}(\mathbf{n}) = j(\mathbf{n})\mathbf{n}$ ,  $\mathbf{n}: |\mathbf{r}| = 1$ .
4. Вероятность реакции атома за единицу времени

$$\frac{dp}{dt} \sim \int j(\mathbf{n}) \mathbf{n} dS d\Omega,$$

интегрирование ведется по доступной поверхности атома  $S$  и области  $\Omega$  доступных для потока направлений.

Показано, что вначале доли прореагировавших атомов,  $a$ , следовательно, и опытные активности, растут пропорционально стерически доступной площади  $S_a = \langle f \rangle S$ , где  $\langle f \rangle$  - усредненная по доступной поверхности  $S$  атома доля потока. Под  $S$  в соответствии с [2] понимается площадь поверхности допустимых положений центров атомов трития, способных достичь активный атом. Отсюда следует, что опытное распределение активностей по остаткам пропорционально распределению  $S_a$ . Для изотропного потока величина  $\langle f \rangle = S_a / S$  является характеристикой рельефа поверхности объекта, не зависящей от масштаба и существенной при взаимодействии с потоком. Использование только доступной площади без учета стерических ограничений для поверхностей со сложно организованным рельефом, таких, как, например, поверхность вириона вируса гриппа, на которой расположены шипы нейраминидазы и гемагглютинина, приводит к существенным отклонениям от экспериментальных данных [3]. У каждого атома свое безразмерное характерное время процесса  $\tau \sim cS_a$ ,  $c$  – концентрация частиц в потоке. При  $t \rightarrow \infty$  активность пропорциональна числу активных атомов. Анализ опытных данных приводит к выводу, что это соотношение не выполняется за время опыта и при используемых концентрациях трития. Значения  $S_a$  можно рассчитать, если известны данные по структуре объекта, полученные другими методами. Это позволяет сравнивать опытные данные тритиевой планиграфии и других методов.

Проанализированы факторы, влияющие на уменьшение доступности: 1) перекрытие поверхности атома смежными атомами остатка. В среднем на поверхности в изолированном остатке остается примерно треть от исходной площади, доля доступной поверхности в изолированных остатках варьируется от 17 до 35%; 2) перекрытие поверхности атома другими атомами; 3) для комплексов (например, капсидов вируса) существенна ориентация реагирующего атома к потоку. При этом около половины потенциально реагирующих атомов могут оказаться недоступны; 4) экранирование периферией.

На базе созданной модели разработан алгоритм имитации тритиевой бомбардировки объекта [4].

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (18-04-00525).

1. Баратова Л.А., Богачева Е.Н., Гольданский В.И., Колб В.А., Спирин А.С., Шишков А.В. Тритиевая планиграфия биологических макромолекул. М., Наука, 1999. 175с.
2. В. Lee, F.M. Richards. J. Mol. Biol. 1971. Vol. 55, P. 379.
3. Е.Н. Богачева, А.А. Долгов, А.Л. Чуличков, А.В. Шишков. 2013. Структурная организация вириона вируса гриппа. Тритиевая планиграфия. Перспективные материалы, № 14, с. 462.
4. Е.Н. Богачева, А.А. Долгов, Ф.Л. Ксенофонтов. Моделирование пространственной структуры потексвирусов. // Актуальные вопросы биологической физики и химии», 2018, т.3, № 2, с. 296-301

## **МНОГОЧАСТИЧНОЕ БРОУНОВСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ФЕРРЕДОКСИНОМ И ЕГО БЕЛКОВЫМИ ПАРТНЕРАМИ**

### **MULTIPARTICLE BROWNIAN SIMULATION OF INTERACTIONS BETWEEN FERREDOXIN AND ITS PROTEIN PARTNERS**

***Дьяконова А.Н., Федоров В.А., Хрущев С.С., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б.***

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, Москва, alex.diakonova@gmail.com

Некоторые бактерии и зеленые водоросли в определенных условиях способны выделять молекулярный водород, который потенциально может служить экологически чистым топливом. В анаэробных условиях при голодании по сере или магнию зеленые водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* используют электроны электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) не для синтеза НАДФН, а для объединения двух протонов в молекулу водорода. Предположительно, данный процесс служит для разгрузки ЭТЦ в неблагоприятных условиях. При этом конечный акцептор ЭТЦ ферредоксин передает электроны с фотосистемы I (ФСІ) не на ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктазу (ФНР), восстанавливающую НАДФН для цикла Кальвина, а на гидрогеназу, [Fe-Fe]-кластер которой восстанавливает протоны. Для того, чтобы понять молекулярные механизмы взаимодействия белков ферредоксина, ФНР, гидрогеназы и ФСІ, мы применили разработанный нами метод многочастичной броуновской динамики.

В методе многочастичной броуновской динамики молекулы белков представляются как жесткие структуры, несущие фиксированные заряды, расположенные на кофакторах и заряженных аминокислотных остатках. Молекулы могут располагаться как в объеме, так и в структурах, имитирующих строение хлоропласта. Белки движутся за счет броуновской силы и электростатических взаимодействий, ориентируясь в поле друг друга, и могут образовывать комплексы, необходимые для передачи электрона [1].

Мы исследовали конкуренцию между ФНР и гидрогеназой за ферредоксин. Известно, что в условиях освещения строма хлоропласта защелачивается, поэтому мы изучили, как рН влияет на скорость взаимодействия этих трех белков. При рН от 5,0 до 9,0 константа скорости связывания ферредоксина и ФНР практически постоянна, однако скорость связывания ферредоксина с гидрогеназой значительно зависит от рН: при увеличении рН от 6,0 до 8,0 константа возрастает в три раза. Это говорит о разных механизмах регуляции взаимодействия ферредоксина с его белками-партнерами.

Одним из подходов к увеличению выхода водорода является геновая инженерия, то есть внесение мутаций в молекулы белков, приводящие к улучшению или ухудшению их функционирования. При помощи метода многочастичной броуновской динамики мы идентифицировали точечные мутации ферредоксина, приводящие к изменению константы скорости его взаимодействия с ФНР и гидрогеназой и потенциально способные привести к увеличению выхода водорода.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00676А.

1. Хрущев С.С., Абатурова А.М., Дьяконова А.Н., Федоров В.А., Устинин Д.М., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование взаимодействий белков фотосинтетической электрон-транспортной цепи фотосинтеза методом броуновской динамики // *Биофизика*. 2015. Т. 60(2). С. 270–292.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ДЕФЕНЗИНА С МОДЕЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**

### **INTERACTION OF PLANT DEFENSIN WITH MODEL MEMBRANES BY COARSE-GRAINED MOLECULAR DYNAMICS**

***Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф.***

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН, г.Казань  
ermakova@kibb.knc.ru

Антимикробные пептиды (АМП) являются важным компонентом иммунной системы и вызывают значительный интерес как новый потенциальный класс природных антибиотиков и иммунорегулирующих соединений. К АМП относятся небольшие катионные богатые цистеинами пептиды млекопитающих, насекомых, растений, в том числе и дефензины. Растительные дефензины известны, прежде всего, своей антигрибковой активностью, но последние исследования показывают, что растительные дефензины проявляют активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий. В настоящее время механизм действия дефензинов не известен. Согласно современной теории дефензины взаимодействуют, прежде всего, с мембраной, и либо образуют в ней поры, либо вызывают ее разрушение, что, в свою очередь, приводит к лизису клетки. В то же время механизм действия может зависеть как от структуры и аминокислотной

последовательности дефенинов, так и от свойств целевого объекта, прежде всего от структуры и состава мембран.

В данной работе методы компьютерного моделирования, включая методы структурного моделирования, молекулярный докинг и крупно-зернистой молекулярной динамики (CGMD) были применены для изучения структуры, динамики растительного дефенина сосны, а также его взаимодействия с многокомпонентными мембранами. Методом структурного моделирования с применением программ Geno3D, SWISS-MODEL, I-TASSER, Phyre2, FUGUE была сконструирована трехмерная структура растительного дефенина сосны. Методом молекулярного докинга смоделированы 4 различных типа димеров дефенина PsDef1. Проведено сравнение предсказанных структур димеров с известными олигомерными состояниями дефенинов растений и человека. Показано, что при димеризации основную роль играют электростатические и гидрофобные взаимодействия. Охарактеризовано изменение динамики белка в процессе димеризации, определены ключевые аминокислотные остатки белка, влияющие на его олигомеризацию.

Метод крупно-зернистой молекулярной динамики был применен для изучения взаимодействия АМП с модельными мембранами. Модельные мембраны содержали анионные и цвиттерионные фосфолипиды. По сравнению с классической молекулярной динамикой метод CGMD позволяет анализировать более медленные процессы, происходящие в системе. Все расчеты проводились в программе GROMACS с использованием силового поля Martini. Показано, что дефенин образует устойчивый комплекс с мембранами, содержащими анионные липиды, при этом дефенин не проникает вглубь мембраны и не образует в ней пор. Анализ распределения различных компонент мембран вдоль перпендикуляра к поверхности мембраны показал, что дефенин локализуется, в основном, на поверхности мембраны, достигает фосфатных групп и не встраивается в гидрофобную зону бислоя. Определены преимущественная ориентация пептида относительно поверхности мембраны и ключевые аминокислотные остатки белка, взаимодействующие с липидами. Взаимодействие молекул дефенина с поверхностью комбинированных мембран приводит к изменению распределения липидов в мембране, он более предпочтительно связывается с анионными липидами, чем с нейтральными липидами. Анализ двумерной матрицы плотности распределения липидов показывает, что присутствие дефенина приводит к реорганизации липидного бислоя, анионные липиды локализуются в первой гидратной оболочке дефенина. Эта реорганизация приводит к образованию двух различных областей. Область вблизи дефенина обогащена анионными липидами, в других зонах концентрация нейтральных липидов увеличена. Кроме того, взаимодействие с дефенином замедляет скорость латеральной диффузии липидов.

Таким образом, дефенин сосны не образует пор в исследованных модельных мембранах, а локализуется на их поверхности, дефенин образует устойчивый комплекс с комбинированными мембранами, содержащими анионные липиды, и взаимодействует с мембранами согласно “ковровой” модели. Связывание дефенина на поверхности мембраны приводит к изменению распределения липидов в мембране и изменению электростатического потенциала мембраны. Деформация электростатического потенциала мембраны может привести к образованию временных дефектов в структуре мембраны и служить причиной гибели клетки.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и правительства республики Татарстан №18-44-160013.

## **ХИРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИФЕНИЛАЛАНИНОВЫХ ПЕПТИДНЫХ НАНОТРУБОК**

## **CHIRAL PROPERTIES AND STRUCTURAL FEATURES OF DIPHENYLALANINE PEPTIDE NANOTUBES**

***Жулябина О.А., Быстров В.С.<sup>1</sup>, Твердислов В.А.***

*Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, zhulyabina.o@yandex.ru*

*<sup>1</sup>ИМПБ РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Пущино, vsbys@mail.ru*

Хиральность является основой структурной организации большинства биомолекул. Объект называют хиральным, если он несовместим со своим зеркальным отображением. Благодаря данному свойству возникает стереоспецифичность в межмолекулярных взаимодействиях, что приводит к появлению различий в физических химических и иных свойствах у правых и левых молекул одного и того же вещества.

Компьютерное моделирование различных биомолекул представляет большой интерес, т.к. позволяет подробно исследовать процессы самоорганизации. Однако является достаточно трудоемкой задачей из-за большого количества атомов. В таких случаях прибегают к биомиметическим макромолекулам и структурам. Это искусственные объекты, имитирующие свойства биоматериалов. Они обладают способностью к

самоорганизации, достаточно просты со структурной точки зрения, а также прекрасно имитируют свойства биологических молекул, что позволяет их использовать в модельных подходах.

Одним из таких биомиметиков являются дифенилаланиновые пептидные нанотрубки. Дифенилаланин (FF) – это дипептид, состоящий из двух аминокислотных остатков фенилаланина. В результате самосборки образуется кольцо, которое состоит из шести мономеров. Далее между кольцами образуются водородные связи, и происходит сборка всей нанотрубки.

При моделировании структур на основе дифенилаланина большое значение имела хиральность исходных аминокислот (L или D) и конформация ( $\alpha$ -спираль ( $\alpha$ -helix) и  $\beta$ -лист ( $\beta$ -sheet)). В зависимости от этого менялась геометрическая конфигурация пептидных нанотрубок, полная энергия моделируемой системы, дипольный момент, поляризация. Было обнаружено, что трубки на основе D-фенилаланина формируются более толстыми и короткими, чем трубки на основе L-фенилаланина. Полная энергия структур на основе L-фенилаланина меньше для  $\alpha$ -структур, причем наибольшей энергией обладают L- $\beta$ -структуры. Дипольный момент и поляризация для L- $\beta$ -структур примерно в 2 раза больше, чем для L- $\alpha$ -структур, однако между D- $\alpha$ -структурами и D- $\beta$ -структурами значительных отличий в величине дипольного момента не обнаружено [1].

Для более детального исследования и подтверждения различий для пептидных структур разной хиральности были выполнены расчеты для аналогичных молекулярных структур, построенных на основе экспериментальных кристаллографических баз данных, полученных рентгеновскими методами. Данные структуры состояли из витков спирали, а не из колец, как предполагалось ранее в наших модельных структурах. В экспериментальных трубках наблюдалось чередование левых и правых структур при переходе на более высокий иерархический уровень организации, что полностью соответствует ранее сформулированной концепции смены знака хиральности: при прохождении через точки бифуркаций, нелинейная система имеет тенденцию к спонтанному формированию последовательности иерархических уровней с изменяющимся знаком хиральности заново образующихся структур и с увеличением их относительного масштаба [2]. При расчете параметров было обнаружено, что спиральные структуры энергетически более выгодны, чем кольцевые, т. к. их энергия ниже на величину порядка нескольких эВ.

Таким образом, хиральность исходных аминокислот обуславливает различия в свойствах правых и левых пептидных нанотрубок, что в свою очередь имеет важное значение для практического применения. Обобщение полученных данных позволит построить единую систему, отражающую иерархическое структурообразование как в биомиметических системах, так и в отдельных самоорганизующихся биологических макромолекулах.

Выражаю благодарность д.ф.-м.н. В.С.Быстрову и д.ф.-м.н. В.А.Твердислову за помощь в обсуждении материалов тезисов. Работа поддержана грантом РФФИ 19-01-00519-а.

1. Bystrov V. S. et al. Investigation of physical properties of diphenylalanine peptide nanotubes having different chiralities and embedded water molecules //Ferroelectrics. – 2018. – Т. 525. – №. 1. – С. 168-177.
2. Tverdislov V. A. Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular biological systems //Biophysics. – 2013. – Т. 58. – №. 1. – С. 128-132.

## АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ ТИОЛОВ КАК ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6

### APPLICABILITY OF THIOLS AS HUMAN PEROXIREDOXIN 6 REDUCERS

*Захарова Е.В., Кондратьев М.С., Гончаров Р.Г., Шаранов М.Г.*

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ ПНЦБИ РАН», г. Пущино, zakharovaekaterina.97@yandex.ru

Пероксиредоксин 6 человека (Prx6) (КФ 1.11.1.15) это небольшой белок из семейства неселеновых пероксидаз. В отличие от других пероксиредоксинов, Prx6 проявляет не только пероксидазную, но и фосфолипазную активность. Ранее для Prx6 была показана высокая терапевтическая эффективность при лечении механических ран, химических и термических повреждений верхних дыхательных путей у крыс [1,2]. В 2016 году было показано, что Prx6 также является эффективным природным радиопротектором [3]. Несмотря на активное исследование данного белка, до сих пор ведутся поиски его эффективных природных восстановителей, необходимых в каталитическом цикле, т.к. в отсутствие восстановителя Prx6 быстро инактивируется, переходя в переокисленное состояние. В лабораторных условиях, было показано, что некоторые синтетические тиолы, такие как дитиотреитол, могут быть эффективными восстановителями Prx6. Мы предположили, что восстанавливающими агентами Prx6 могут выступать не только низкомолекулярные тиоловые соединения, но и короткие цистеинсодержащие пептиды.

С помощью методов компьютерного молекулярного моделирования были обнаружены два сайта связывания – типичный, образованный аминокислотными остатками Arg41, Ile73, Asp74, Ser75, Arg106, Asn107, Arg108, Lys122, Asp123, Glu124, Lys125, и атипичный, расположенный ближе к N-концевому участку

молекулы и образованный Ala16, Asn17, Arg22, Asp104, Asp105, Arg106, Asn107. Наибольшее сродство к новому атипичному сайту было показано для молекулы сукцимера. Всего в связывании лигандов участвует 18 аминокислотных остатков. По результатам аланинового скрининга *in silico* наиболее вероятными аминокислотными остатками, влияющими на связывание с тиолами являются Arg41, Lys125 и Glu121. Расчёты динамического поведения мутантных форм Rtx6 показали, что полная замена сайтов связывания с тиоловыми лигандами значительно дестабилизирует глобулу (аланин неполярная аминокислота, и не образует водородных связей в тех местах, где они необходимы для стабилизации структуры белка).

Также были рассчитаны данные по локализации НОМО/LUMO и величине GAP для лигандов, которые показали, что предполагаемая корреляция между величиной GAP и эффективностью связывания имеет значение, отличное от предположенного исходно (чем меньше GAP, тем эффективнее лиганд будет связываться в необходимом нам месте) – лиганды цистамин и CCCC связываются с низкой частотой в интересующих нас сайтах именно из-за наименьшего значения GAP. Анализ распределения НОМО и LUMO подтвердил нуклеофильные свойства тиоловых соединений. Расчёты дипольного момента и энергии депротонирования показали, что лиганды отличаются по своим характеристикам. Дитиотреитол является наименее полярным и наиболее склонен к депротонированию, что объясняет различное поведение тиолов в *in vitro* экспериментах. Мы предполагаем, что ингибирующие свойства более полярных тиолов связаны с их способностью связываться с полярными аминокислотными остатками в кармане активного центра, создавая стерическое препятствие для прохода субстрата к месту катализа.

Таким образом в данной работе была предложена и проверена схема определения возможности применения тиоловых соединений в качестве восстановителей для перспективного антиоксидантного белка пероксиредоксина 6 человека.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-04-00080-а.

1. Volkova A.G., Sharapov M.G., Ravin V.K., Gordeeva A.E., Karaduleva E. V., Mubarakshina E.K., Temnov A.A., Fesenko E.E., Novoselov V.I. Effects of Different Antioxidant Enzymes on the Tracheal Epithelium Regeneration after Chemical Burn // Russ. Pulmonol. 2017 Vol. 6. P. 84–90.
2. Новоселов В.И., Барышникова Л.М., Янин В.А., Амелина С.Е., Фесенко Е.Е. Влияние пероксиредоксина VI на заживление резаной раны у крыс // Доклады Академии Наук. 2003. Том 393.
3. Шарапов М.Г., Гудков С.В., Гордеева А.Е., Карп О.Э., Иванов В.Е., Шелковская О.В., Брусков В.И., Новоселов В.И., Фесенко Е.Е. Пероксиредоксин 6 – Природный Радиопротектор // Доклады Академии Наук. 2016. Том 467. Стр. 355–357.

## **ДВА НОВЫХ ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРА Kv КАНАЛА ИЗ АКТИНИИ HETERACTIS CRISPA: ВАРИАЦИИ МЕХАНИЗМА БЛОКИРОВАНИЯ**

## **TWO NEW KV CHANNEL PEPTIDE BLOCKERS FROM SEA ANEMONE HETERACTIS CRISPA: BLOCKING MECHANISM VARIABILITY**

*Зеленуга Е.А., Гладких И.Н., Титгат Я.<sup>1</sup>, Пеньер С.<sup>1</sup>, Монастырская М.М., Козловская Э.П.*

ТИБОХ ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, Владивосток, zel@piboc.dvo.ru

<sup>1</sup>Католический университет Левена (KU Leuven), отделение токсикологии и фармакологии, Левен, Бельгия (Leuven, Belgium)

Ионные каналы играют ключевую роль в организме, регулируя гомеостаз и проведение электрических сигналов. Достижения в области структурной биологии, обнаружение в ядовитых организмах многочисленных модуляторов ионных каналов способствуют углублению понимания механизмов их функционирования. Повсеместное распределение в тканях, а также физиологическое значение механизмов регуляции многочисленных процессов жизнедеятельности дает им особую привлекательность в качестве лекарственных мишеней. В частности, калиевые каналы имеют высокую терапевтическую значимость поскольку они отвечают за поддержание мембранного потенциала и модуляцию электрической возбудимости нейронов и мышечных клеток. Многие заболевания нервной, сердечно-сосудистой, иммунной и эндокринной систем напрямую связывают с нарушением работы этих каналов. Начавшийся в 1980-х годах исследования их модуляторов увенчались идентификацией более 200 пептидов с ингибирующим действием на Kv каналы. В соответствии с уникальным механизмом действия на канал эти пептиды принято делить на два типа – блокаторы и модуляторы воротного механизма. Блокаторы связываются с неглубоким вестибулем во внеклеточной области поры, в то время как модификаторы регуляции проводимости – с так называемым потенциал-чувствительным доменом «VSD», доступным с внеклеточной стороны. Каналы субсемейства Kv1.1 обнаружены в мембранах клеток головного мозга, сердца, сетчатки глаза, скелетной мускулатуры. Такие заболевания, как нервный тик и эпизодическое нарушение координации движений (атаксия), связывают с дисфункцией каналов данного типа. Некоторые ингибиторы протеаз Кунитц-типа из актиний обладают, помимо регуляции протеолиза,

способностью блокировать ток ионов через Kv каналы. Так, ShPI-1 из актинии *Stichodactyla helianthus* эффективно блокирует три субтипа Kv каналов (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6) [1]. Несмотря на то, что пространственная структура ShPI-1 была установлена экспериментально, молекулярный механизм его взаимодействия с Kvs еще не изучен.

Недавно нами было показано, что два пептида, HCRG1 и HCRG2, выделенные из актинии *Heteractis crispa*, являются мощными ингибиторами сериновых протеаз, трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина ( $K_i \sim 10^{-8}$  М) [2]. Кроме того, обладая противовоспалительной активностью, они уменьшают секрецию фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкина 6 (IL-6), а также экспрессию proIL-1 $\beta$  в макрофагах, активированных липополисахаридом (LPS) [2]. Эти пептиды характеризуются высокой гомологией аминокислотной последовательности (68.7 %) и трехмерной структуры с токсинами Кунитц-типа ShPI-1 и дендротоксинами (DTxs) из яда змей рода *Dendroaspis*, которые блокируют калиевые каналы, управляемые потенциалом, при микро- и наномолярных концентрациях.

В этой работе мы представляем исследование структурно-функциональных взаимоотношений пептидов Кунитц-типа из актиний с точки зрения блокирования потенциал-управляемого канала субтипа Kv1.1. Расчетные методы исследования белок-белковых взаимодействий, включая гомологичное моделирование и белок-белковый докинг с последующей симуляцией полноатомной молекулярной динамики комплексов в DPPC бислое, позволили нам показать, что оба пептида являются, подобно ShPI-1, блокаторами поры канала Kv1.1. Обнаружено, что HCRG1 и HCRG2 связываются во внешнем вестибуле канала со всеми четырьмя субъединицами посредством обширной сети электростатических взаимодействий и водородных связей своих основных остатков. Однако несмотря на то, что различия в структурах HCRG1 и HCRG2 ограничиваются лишь точечными заменами (в частности, Gly16Lys и Glu28Lys, а также Lys38Gly), при образовании комплексов с каналом пептиды HCRG1 и ShPI-1 имеют отличную от HCRG2 ориентацию. Оказалось, что архитектура комплексов, равно как и аффинность взаимодействия, определяются вариацией локализации на поверхности HCRG1 и HCRG2 паттернов остатков, функционально важных для блокирования канала. Более того, уникальная способность боковой цепи остатка Lys28 функциональной диады пептида HCRG2 (Lys28 и Leu47) проникать глубоко в пору и взаимодействовать с тремя из четырех атомов карбонильного кислорода Tyr375, выстилающего селективный фильтр Kv1.1, определяет более высокую эффективность блокирующего действия пептида. Эти результаты хорошо согласуются с данными проведенных нами электрофизиологических экспериментов, которые показали, что HCRG2 блокирует канал rKv1.1 в десять раз сильнее ( $12,6 \pm 1,72$  нМ), чем ShPI-1 и HCRG1 ( $117 \pm 15$  [1] и  $142,6 \pm 28,1$  нМ соответственно).

Исследование частично финансировано RUS\_ST2017-228.

1. García-Fernández R et al. The Kunitz-Type Protein ShPI-1 Inhibits Serine Proteases and Voltage-Gated Potassium Channels // *Toxins*. 2016. Vol. 13. P.110.
2. Gladkikh I. et al. New Kunitz-type HCRG polypeptides from the sea anemone *Heteractis crispa* // *Mar. Drugs*. 2015 Vol. 13. P. 6038.

---

## ДИНАМИКА ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СУПЕР- БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ПОВЕРХНОСТИ РАЗДЕЛА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ НА ПРИМЕРЕ ФАЗОВОГО РОСТА ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ПОПУЛЯЦИОННОЙ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ E.COLI

### DYNAMICS OF TRANSFORMATION OF SUPER-PROTEIN COMPONENTS ON THE INTERFACE OF SUPRAMOLECULAR SYSTEMS ON THE EXAMPLE OF PHASE GROWTH OF THE LIFE CYCLE OF THE POPULATION PERIODIC CULTURE E.COLI

*Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Тропынина Т.С.*

Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия, E-mail: [Fiona\\_belobor@mail.ru](mailto:Fiona_belobor@mail.ru)

В последнее время остро проявился интерес к физико-химическим особенностям самоорганизующихся пространственно-временных гетерополимерных-супрамолекулярных ансамблей, в которых система компонентов флуктуационной динамики белковых поверхностных групп, является эволюционно отобранной для реализации морфогенетических процессов онтогенеза. Известно, что боковые группы аминокислотных остатков колеблются заметно сильнее, чем главная цепь. Эволюция создавала химические соединения, исключительная организация которых обеспечивала выполнение наиболее сложных и точных задач. В настоящее время, усовершенствуются методы конформационного анализа, позволяющие не только предсказывать, но и объяснять экспериментальные данные, находящиеся на стыке физики и биохимии, чтобы выйти на нужный уровень приближения к пониманию морфогенетических процессов онтогенетического развития организма.

Понимание биологических процессов значительно легче достигается с помощью модельных организмов, в которых клеточный уровень организации жизнедеятельности можно рассматривать с позиции



самоорганизации гетерополимерных-супрамолекулярных ансамблей, постоянно взаимодействующих друг с другом и окружающей средой. Известно, что множество синтетических супрамолекулярных систем было создано в рамках биомиметического подхода, то есть, подражая структуре или функции более сложных биологических объектов. В данной работе бактериальная клетка - *E. coli* рассматривается в концепции супрамолекулярной науки, где в соответствии с информационной программой развития, работающей на основе принципов молекулярного распознавания, возникают фазовые ансамбли, которые характеризуются определенной организацией на супермикроскопическом уровне, с проявлением супрамакроскопических свойств, зависящих от фазового роста популяционной культуры. В этом отношении, *супермолекулярная физико-химия* может рассматриваться как физико-химическая или молекулярная информатика.

Цель данной работы - представить клетку *E. coli* в виде: Бп-бактериоплазмы, Нс-непрочно-, Пс-прочносвязанных с Ко- клеточным остатком гетерополимерных- супрамолекулярных ансамблей, в молекулах которых уже запрограммирована генетическая память самоорганизации и её реализации в наноциклах, циклах и морфогенетических фазах развития. Супрамолекулярные ансамбли представляют собой гетерополимерные структуры, состоящие из белков, ДНК, РНК, гексоз. Представленная цель работы экспериментально разработана в лаборатории и оформлена в виде шести патентов по способам: препаративного выделения основных белков из надмолекулярных супраструктур растущей популяции *E. coli*; получению фракций, обладающих протеолитической и ингибирующей протеазы активностью; получению положительно заряженных белковых фракций с ингибирующей в отношении трипсина активностью; способу анализа процесса *Arg-X* протеолиза в положительно заряженных фракциях белков супрамолекулярных структур в растущей популяции; способу определения гексоз в супрамолекулярных структурах.

Так как, в пространственно-временной самоорганизации супрамолекулярных ансамблей, активную роль выполняют шапероны, некоторые из которых обладают протеолитической функцией, то, с этой позиции исследована локализация *Arg-X* протеазо-чувствительных сайтов, как возможных зон ремоделирования функциональной системы организма в процессе фазового роста бактериальной культуры. Интерес к аргинину вызван тем, что его молекула практически вся активна и облигатно взаимодействует как с ДНК, так и с другими гистонами и негистонами. Особенностью представленной экспериментальной работы является то, что выявлено активное позиционирование *Arg-X* протеазо-процессинга на поверхности раздела Бп – жидкокристаллической супрамолекулярной гетерополимерной структуры, по-видимому контролирующей все морфогенетические фазы роста жизненного цикла бактерии. В данной работе рассматривается простая, то есть, резко упрощенная, по сравнению с реальностью, модель и делаются просто прикидочные оценки.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № НИОКТР АААА-А18-118022190104-7. В работе использована приборная база Центра коллективного пользования «Агидель» УФИЦ РАН.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА DPS ESCHERICHIA COLI С МЕТАЛЛАМИ ПЕРЕХОДНЫХ ВАЛЕНТНОСТЕЙ

### DPS PROTEIN INTERACTION FEATURES WITH METALS OF TRANSITION OXIDATION DEGREES

*Капитунова А.И., Преображенская Е.В.<sup>1</sup>, Шешукова А.А.<sup>2</sup>, Озолин О.Н.<sup>1</sup>, Антипов С.С.<sup>1,2,3</sup>*

Балтийский федеральный университет им. И.Канта, г. Калининград, [intellihortex@yandex.ru](mailto:intellihortex@yandex.ru)

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение ФБГУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино

<sup>2</sup> Балтийский федеральный университет им. И.Канта, г. Калининград

<sup>3</sup> Воронежский государственный университет, г. Воронеж

Одной из двух основных функций Dps является его способность окислять ионы  $Fe^{2+}$  в специальных каталитических центрах с использованием  $H_2O_2$  и накапливать продукты реакции в белковой полости в виде аморфного ядра размером до 5 нм [1]. Кроме оксидов трёхвалентного железа в этом ядре обнаружены ионы двухвалентного железа [2] и могут находиться ионы других металлов с переменной валентностью. Было установлено, что  $Fe^{2+}$  вызывает стабилизацию функционально активной додекамерной формы Dps [3], но вопрос о способности других металлов, обладающих степенями окисления (II) и (III), стимулировать аналогичную олигомеризацию остается открытым, хотя изучение механизмов альтернативного насыщения молекул Dps ионами разных металлов является крайне актуальной не только фундаментальной, но и прикладной задачей. Эти данные, в частности, могут стать основой для создания гибридных биоорганических наночастиц и композитных наноматериалов заданного состава. Поэтому целями данной работы были оценка эффективности олигомеризации Dps в присутствии  $Co^{2+}$  и  $Ni^{2+}$  и поиск наиболее вероятных областей их локализации в структуре олигомера Dps.

Степень влияния ионов кобальта и никеля на структурное состояние Dps оценивали по профилю миграции его олигомерных форм в условиях неденатурирующего электрофореза. В качестве источников катионов использовали соответствующие сульфаты в концентрациях, обеспечивающих присутствие 100, 250 и 500 ионов металлов на один додекамер белка, а контрольными образцами были очищенный Dps и белок, насыщенный таким же количеством ионов железа. В результате, оба катиона оказались способными стимулировать олигомеризацию Dps, хотя с меньшей эффективностью, чем железо, но в присутствии никеля детектировалась ранее не зарегистрированная белковая фракция. Это может указывать на наличие особого интермедиата в процессе олигомеризации Dps, специфически стабилизируемого ионами этого металла или, наоборот, свидетельствовать о диссоциации додекамера на олигомеры меньшего размера, если механизм миграции  $Ni^{2+}$  к каталитическим центрам Dps, расположенным на стыках соседних мономеров Dps, отличается от катионов железа и кобальта.

Так как Dps аккумулирует ионы железа в виде оксидов, было использовано сто раундов последовательного молекулярного докинга для поиска белковых поверхностей, обладающих наибольшим сродством к оксидам Ni и Co. Распределение CoO носило стохастический характер, а для NiO,  $Ni_2O_3$  и  $Co_2O_3$  было выявлено два места предпочтительной локализации. Одно из них находится рядом с ферроксидазными центрами Dps в окружении аминокислотных остатков Ser(44), Leu(45), принадлежащих одному мономеру и остатков Arg(70) и Ile(74), расположенных на поверхности соседней субъединицы. Так как в аналогичном модельном эксперименте молекулы  $Fe_2O_3$  тоже группировались в этой области белка [3], предпочтительный контакт с ней ионов никеля не может быть причиной появления дополнительной олигомерной формы. Вторая область связывания была найдена на стыке N-концевых модулей трех мономеров, формирующих белковую пору, контакт с которой оксидов железа менее очевиден [3], но именно с этим участками взаимодействуют глюкуронат и галактуронат, вызывающие диссоциацию Dps [4]. Это делает второе предположение о причинах появления необычного интермедиата более вероятным и позволяет сформулировать модельные представления о возможных механизмах структурной пластичности белка. Согласно им, стабилизация додекамерной формы, необходимая для функционирования Dps как ферритина и белка нуклеоида, ассоциирована с субстратами ферроксидазной активности, а физиологически значимое возвращение хроматина в активное состояние запускается, по-видимому, интермедиатами метаболических путей и некоторыми оксидами.

Данное исследование было поддержано из средств субсидии, выделенной на реализацию Программы повышения конкурентоспособности БФУ им. И.Канта.

1. Pari A., et al. Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core // The Journal of Biological Chemistry. 2002. V.277(40). P.37619–37623
2. Турищев С.Ю. и др., Синхротронные исследования в мягком рентгеновском диапазоне зарядового состояния ионов железа в ферригидритном ядре ферритина Dps *Escherichia coli* // Биофизика. 2016. Т.61(5), с. 837–843
3. Antipov S. et al. The Oligomeric Form of the *Escherichia coli* Dps Protein Depends on the Availability of Iron Ions // Molecules. 2017. Vol.22(11). P.1904.
4. Бессонова Т.А. и др. Гексуронаты влияют на олигомерную форму структурного белка бактериального нуклеоида Dps и его способность к взаимодействию с линейными фрагментами ДНК / Биофизика. 2016. Т.61(6), с. 1059-1067.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ ГТФ- И ГДФ-СВЯЗАННОГО ТУБУЛИНА

### MOLECULAR DYNAMIC SIMULATION OF THE CONFORMATIONAL MOBILITY OF GTP- AND GDP-BOUND TUBULIN

***Коваленко И.Б., Федоров В.А., Орехов Ф.С., Холина Е.Г., Гудимчук Н.Б.***

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, 119992, г. Москва, Ленинские горы, 1-24

Молекулы  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина образуют гетеродимеры, из которых строятся внутриклеточные структуры эукариот - микротрубочки, являющиеся основным компонентом цитоскелета. Помимо поддержания формы клетки, микротрубочки выполняют много других функций, таких как образование системы путей для внутриклеточного транспорта или поиск, захват и перемещение хромосом при клеточном делении. Возможность такой многофункциональности обеспечивает явление, известное как “динамическая нестабильность”. Оно заключается в том, что вместо того, чтобы пребывать в состоянии динамического равновесия с раствором, концы микротрубочек спонтанно переключаются между двумя стадиями - медленным ростом и быстрым укорочением. Известно, что к переходам между фазами роста и укорочения имеет отношение гидролиз гуанозинтрифосфата (ГТФ), присоединённого к  $\beta$ -тубулину, до гуанозиндифосфата (ГДФ).

Многие годы ведутся исследования с целью выявления конкретных молекулярных механизмов, лежащих в основе динамической нестабильности. Есть предположение, что гидролиз ГТФ изменяет конформацию

тубулина, что сказывается на общем изгибе тубулинового протофиламента. Для проверки этой гипотезы и ответа на вопрос, какие конформационные изменения влечёт за собой гидролиз, нами были построены полноатомные модели свободных тетрамеров ГТФ- и ГДФ-связанного тубулина в растворе в прямой конформации, согласно экспериментальным данным о структуре протофиламентов в составе стенки микротрубочки. Из молекулярно-динамических расчетов были получены данные о конформационной подвижности этих структур. Для анализа вклада в изгиб тетрамера конформационных изменений были рассчитаны углы Эйлера, характеризующие изменение взаимного расположения молекул тубулина. Полученные молекулярной динамикой данные согласуются с экспериментальными данными. Были выявлены различия в величине изгибных деформаций на внутри- и междимерных интерфейсах, а также были обнаружены различия в поведении ГТФ- и ГДФ-связанного тубулина, не зафиксированные ранее в исследованиях структуры тубулина в присутствии белка статин.

На основе проведенного анализа было выявлено, что междимерные интерфейсы в протофиламентах тубулина являются значительно более гибкими по сравнению внутримерными интерфейсами. Мы утверждаем, что такая разница в гибкости может быть ключевой для различной стабильности плюс и минус концов микротрубочек. Более высокая гибкость междимерного интерфейса также имеет значение для развития силы натяжения при изгибе протофиламентов тубулина во время разборки микротрубочек, процесса, имеющего большое значение для движений хромосом при митозе.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа поддержана грантом РФФИ 17-74-20152.

---

## ФАРМАКОФОРНЫЙ ПОИСК СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ВОДОРОСЛЕВОГО РОСТА PHARMACOPHORE SEARCH FOR SELECTIVE INHIBITORS OF ALGAE GROWTH

*Кондратьев М.С., Терентьев В.В.<sup>1</sup>*

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия. ma-ko@bk.ru  
1- Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Существенной проблемой водоемов, а также искусственных систем хранения технической воды является возможность массового размножения водорослей и, как следствие, резкого увеличения их общей биомассы – т.н. «цветение». При этом сами водоросли могут выделять в воду токсины, а гниение большого объема отмерших клеток резко ухудшает качество воды вплоть до невозможности ее использования. Для более эффективного подхода к поиску решения данной проблемы представляется важным изучить селективное ингибирующее действие ряда малых молекул на эффективность фотосинтеза посредством исключения активности его отдельных участников.

Карбоангидраза (КА) САНЗ, локализуемая в люмене тилакоидов, как известно, необходима для максимальной эффективности фотосинтеза у микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. САНЗ была выбрана в качестве модельной системы для поиска эффективных ингибиторов КА. Изучение образования комплексов между ингибиторами КА и САНЗ может помочь в разработке активных химических агентов, которые будут негативно действовать только на микроводоросли, сохраняя качество воды.

В данной работе при помощи современных методов компьютерной химии (молекулярный докинг, фармакофорный поиск, квантовая химия) теоретически изучены особенности некоторых структурных и термодинамических параметров молекул ингибиторов карбоангидразы САНЗ.

Выполненные нами квантово-химические расчеты позволили промоделировать конформационную лабильность ряда веществ-кандидатов, молекул на основе сурьмы, которые ранее были изучены экспериментально. Эти симметричные соединения с двумя бензольными кольцами, а также с галогеновыми заместителями, являются столь же эффективными ингибиторами изучаемого фермента, как и классические соединения: ацетазоламид, этоксизоламид, ТФМСА. Для галогеновых производных нами показано уменьшение термодинамической стабильности таких молекул в ряду F–Cl–Br–I, а также отмечена важная стабилизирующая роль водородных связей между N–H и бензольными кольцами.

При помощи методов гибкого докинга нами изучен механизм взаимодействия ряда ингибиторов с аминокислотными остатками, формирующими активный центр карбоангидразы САНЗ.

**ПРОТОН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЦЕНТРЫ С-КОЛЬЦА АТФ-СИНТАЗЫ: НЕЭМПИРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТАДИИ ПРОТОНИРОВАНИЯ И ФОРМИРОВАНИЯ ЗАКРЫТОЙ КОНФОРМАЦИИ.**

**PROTON-BINDING SITES OF ATP SYNTHASE: NONEMPIRICAL MODELING OF PROTONATION AND FORMATION OF CLOSED CONFORMATION**

*Е.С. Корунова, Ю.В. Новаковская, Л.С. Ягузинский<sup>1</sup>, С. В. Нестеров.*

Московский государственный университет имени Ломоносова, Москва, lizakorunova@yandex.ru

<sup>1</sup>. Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозёрского, Москва.

Работа посвящена изучению механизма функционирования важнейшей молекулярной машины, АТФ-синтазы. АТФ-синтаза – это уникальный фермент, структура которого сохранена во всех существующих живых организмах, синтезирующих АТФ в качестве универсального переносчика энергии. Точное определение сложного механизма работы АТФ-синтазы имеет фундаментальное значение для современной химии и биологии. Множество работ посвящено исследованию функционирования АТФ-синтазы, механизм которого можно условно разделить на две стадии. Первая стадия – это вращение с-кольца вокруг своей оси в мембранном секторе белка F<sub>0</sub> при миграции протонов из межмембранного пространства внутрь бактерий или митохондрий и вращение вместе с ним центрального ротора, образованного субъединицами  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$  и входящего в полость с-кольца. Вторая стадия включает изменение положения каталитических субъединиц  $\alpha$ ,  $\beta$  сектора F<sub>1</sub>, осуществляемое за счёт вращения центрального ротора. Таким образом, каталитическую работу фермента обуславливают процессы, протекающие в секторе F<sub>0</sub>[1].

Роторный механизм с-кольца неизвестен, но есть экспериментальные данные, которые указывают на то, что протон-связывающие центры с-кольца в разные моменты времени испытывают влияние двух сред, с которыми взаимодействуют различным образом. Сначала такой центр связывает протон, перемещающийся от одной из поверхностей мембраны под действием градиента рН и электрического потенциала. Будучи обращён к липидному би-слою, этот центр должен удерживать протон до тех пор, пока не достигнет поверхности а-субъединицы, где он отдаёт протон в направлении противоположной стороны мембраны, и на следующем шаге принимает другой протон.

Авторами статей [2,3] в результате рентгеноструктурного анализа образцов, сформированных в различающихся по гидрофобности кристаллизационных средах, были получены структуры с10-кольца из митохондрий дрожжей *S. cerevisiae* с закрытой и открытой конформациями консервативного для протон-связывающего центра остатка глутаминовой кислоты, что может указывать на регуляцию протон-связывающего сайта окружением.

В данной работе была изучена первая стадия сложного процесса вращения с-кольца, а именно протонирование Н-связывающего центра с-кольца и сопряжённого с ним поворота протонированного остатка глутаминовой кислоты вглубь центра с образованием закрытой конформации, способной удержать протон в ходе вращения кольца. В качестве базовой модели взята структура белка алкалофильной бактерии *Bacillus pseudofirmus* (2X2V, PDB), которая характеризуется выраженной ориентацией молекулы воды в изучаемом центре [4]. Моделирование было выполнено методом функционала электронной плотности с использованием обменно-корреляционного функционала B3LYP и расширенного двухэкспонентного базиса, что позволяет получать надежные энергетические оценки для интересующих систем. Расчёты были проведены с использованием программного пакета Firefly 8.2 [5] и вычислительных ресурсов суперкомпьютерного комплекса Ломоносов Московского государственного университета [6].

1. Jonckheere A., Smeitink J., Rodenburg R. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology // *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2012, 35, 2, 211-223.
2. Srivastava A., Luo M., Zhou W., Symersky J., Bai D., Chambers M., Faraldo-Gómez J., Liao M., Mueller D. High-resolution cryo-EM analysis of the yeast ATP synthase in a lipid membrane // *Science*, 2018, 360, 6389, 1-23.
3. Symersky J., Pagadala V., Osowski D., Krah A., Meier T., Faraldo-Gómez J., Mueller D. Structure of the c10 ring of the yeast mitochondrial ATP synthase in the open conformation // *nature structural & molecular biology*, 2012, 19, 5, 485-492.
4. Preiss L., Yildiz O., Hicks D., Krulwich T., Meier T. A New Type of Proton Coordination in an F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase Rotor Ring // *PLOS Biology*, 2010, 8, 8, 1-10.
5. Granovsky A.A., Firefly version 8, www <http://classic.chem.su/gran/firefly/index.html>.
6. Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V.I., Opanasenko V. «Lomonosov»: Supercomputing at Moscow State University. In *Contemporary High Performance Computing: From Petascale toward Exascale*, Boca Raton, USA, CRC Press: 2013. P. 283.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СВЯЗАННЫХ С КЛАСТЕРОМ ЗОЛОТА ПОЛИАМФОЛИТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ НА ЗАРЯЖЕННОЙ ЗОЛОТОЙ ПОВЕРХНОСТИ**

**MOLECULAR DYNAMIC SIMULATION OF POLYAMPHOLYTIC POLYPEPTIDES ASSOCIATED WITH GOLD CLUSTER ON A CHARGED GOLD SURFACE**

*Кручинин Н.Ю., Кучеренко М.Г.*

Оренбургский государственный университет, г. Оренбург, kruchinin\_56@mail.ru

Гибридные плазмонные наноструктуры, состоящие из расположенных на золотой подложке полимерных цепей связанных с золотыми наночастицами, находят широкое применение в биомедицинских исследованиях, а также при создании различных химических сенсоров, в том числе сенсоров на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса (ППР) или эффекта гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) [1-2]. При этом особый интерес вызывает управление конформационными изменениями полимерных цепей под воздействием электрического поля [3-4]. В датчиках на основе эффектов ППР или ГКР на поверхности золота могут быть размещены макромолекулярные цепи, которые либо могут сами являться рецепторами, либо содержать рецепторы в своей структуре. Под воздействием электрического поля конформационная структура полиамфолита на поверхности будет изменяться [5], что приведет к изменению условий эффектов ППР и ГКР.

Методом молекулярной динамики (МД) была исследована адсорбция полиамфолитных полипептидов (100 звеньев) с разными законами распределения положительных и отрицательных звеньев на заряженной золотой подложке. МД-моделирование было произведено для двух молекулярных систем. В одном случае моделирование производилось для полиамфолитных пептидов без кластеров золота на поверхности золотой подложки при различных значениях поверхностной плотности заряда. Во втором случае была рассмотрена такая же молекулярная система, но полиамфолитный пептид через аминокислотный остаток Cys был связан с кластером золота из 32 или 80 атомов. При этом аминокислотный остаток Cys с кластером золота располагался рядом с одним из заряженных аминокислотных остатков. По результатам МД-моделирования рассчитывались распределения «высотных» концентраций атомов полипептидов и зависимости изменения «высоты» центра кластера золота на поверхности подложки при различных значениях поверхностной плотности заряда.

При МД-моделировании на нейтральной поверхности подложки происходила адсорбция аминокислотных остатков полипептидов вне зависимости от их типа. При этом формировалось характерное «высотное» распределение атомов полипептида, которое хорошо аппроксимируется экспоненциальной кривой [6]. При МД-моделировании на заряженной подложке по мере увеличения абсолютной величины поверхностной плотности заряда в конечных конформационных структурах наблюдалось перераспределение заряженных остатков полипептида: все большее количество остатков, имеющие знак заряда одинаковый с подложкой, удалялись от нее, а остатки с противоположным знаком адсорбировались на поверхности. Кластер золота, который связан с макроцепью около заряженного аминокислотного остатка при МД-моделировании на одноименно заряженной поверхности по отношению к данному остатку, отдаляется от подложки, достигая максимального расстояния приблизительно равного толщине макромолекулярного слоя.

Таким образом, наличие кластеров небольшого размера в структуре макроцепи оказывает слабое влияние на конформационную структуру полипептидов, адсорбированных на золотой подложке. Располагая кластеры золота вблизи положительных или отрицательных звеньев макроцепи, можно получить конформационные структуры, в которых кластеры золота будут находиться на различных расстояниях от поверхности подложки при изменении поверхностной плотности электрического заряда подложки. Тем самым, под воздействием электрического поля будет изменяться чувствительность датчика на основе эффектов ППР и ГКР. Такие структуры могут быть использованы в сенсорах на основе эффектов ППР и ГКР с регулируемыми под воздействием электрического поля параметрами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Оренбургской области в рамках научного проекта № 19-43-560003.

1. Lee J. et al. In Situ Studies of Surface-Plasmon-Resonance-Coupling Sensor Mediated by Stimuli-Sensitive Polymer Linker // *Adv. Funct. Mater.* 2015. V. 25, P. 6716–6724.
2. Ferhan A., Kim D. Nanoparticle polymer composites on solid substrates for plasmonic sensing applications // *Nano Today*. 2016. V. 11. P 415–434.
3. Chen Y. et al. Electrically induced conformational change of peptides on metallic nano-surfaces // *ACS Nano*. 2012. V. 6. P. 8847-8856.
4. Cantini E. et al. Electrically Responsive Surfaces: Experimental and Theoretical Investigations // *Acc. Chem. Res.* 2016. V. 49 (6), P. 1223–1231.
5. Кручинин Н.Ю., Кучеренко М.Г. Молекулярно-динамическое моделирование электрически индуцированных конформационных изменений полиамфолитных полипептидов на поверхности золотой наночастицы // *Коллоидный журнал*. 2019. Т. 81. № 2. С. 175-184.
6. Гроссберг А.Ю., Хохлов А.Р. Статистическая физика макромолекул // М.: Наука, 1989.

## ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛУТОРОИДАЛЬНЫХ ПОР В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МЕМБРАНАХ FORMATION OF SEMITOROIDAL PORES IN MULTICOMPONENT MEMBRANES

*Курбанов Р.Х., Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф.*

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН

Трансмембранные поры играют важную роль во многих процессах, происходящих в клетках. В то же время, детальная структура этих пор, механизм их образования и их влияние на свойства и функционирование клеточных мембран остаются плохо изученными. Антимикробные пептиды (АМП) являются частью иммунной системы различных организмов и характеризуются способностью подавлять рост грибов и бактериальных патогенов. Активность АМП связана с их способностью взаимодействовать с клеточными мембранами или проникать через мембраны.

В данной работе метод крупно-зернистой молекулярной динамики (CGMD) был применен для изучения взаимодействия катионных пептидов, имеющих  $\beta$ -структуру, с многокомпонентными мембранами. Модельный пептид с последовательностью RMCKTPCGKFCYKPCP был построен на основе анализа аминокислотной последовательности антимикробного пептида: дефензина сосны PsDef1. Модельные мембраны содержали четыре различных типа фосфолипидов, два типа анионных липидов с различными головными группами фосфодитилинозитол (ФИ), фосфодитилсерин (ФС) и два типа нейтральных фосфолипидов фосфодитилэтанолламин (ФЭ) и фосфодитилхолин (ФХ). По сравнению с классической молекулярной динамикой метод CGMD позволяет анализировать более медленные процессы, происходящие в системе. Все расчеты проводились в программе GROMACS с использованием силового поля Martini.

В результате выполнения проекта был выявлен новый тип полутороидальных/гибридных пор образованных  $\beta$ -пептидами в многокомпонентной мембране. Образованные поры имеют принципиальное отличие от пор, образованных другими  $\beta$ -пептидами. Наблюдаемые в данной работе поры не имеют центрального водного канала, молекулы воды проникают через мембрану через узкие щели между пептидами или между пептидами и заряженными головными группами анионных липидов. Основную роль в образовании пор играют анионные липиды с сильным отрицательным зарядом. Детально исследовано влияние олигомерного состояния пептидов на стабильность образованных пор. Показано, что образование олигомеров пептидов является необходимым для образования и стабилизации пор. Поры, образованные двумя, тремя или четырьмя пептидами были стабильны в течение 3-6 мкс. В тоже время, мономерный пептид не смог стабилизировать образованную пору.

Образование пор в мембранах приводит к изменению свойств мембраны. Чтобы охарактеризовать влияние пор на структурные и динамические свойства мембраны, были проанализированы толщина липидного бислоя, степень упорядоченности и распределение липидов в мембране, а также скорость латеральной диффузии липидов. В результате образования пор в мембране происходит перераспределение липидов в бислое, вокруг пор образуется область, обогащенная отрицательно заряженными липидами. Напротив, нейтральные липиды почти полностью отсутствуют в окрестностях пор. В результате перераспределения липидов вокруг пор в мембране образуются зоны с различным электростатическим потенциалом. Реорганизация липидов и образование доменов приводит к изменению латеральной диффузии липидов и упорядоченности липидов. Для характеристики подвижности липидов были рассчитаны коэффициенты латеральной диффузии для всех типов липидов. Расчетные коэффициенты диффузии оказались очень близки и равны  $4.1 \pm 0.5 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s для всех типов липидов, в то время как, анионные липиды демонстрируют немного более медленную диффузию. Полутороидальные поры связывают небольшое количество липидов, которые участвуют в образовании пор, и уменьшают их подвижность. Коэффициенты диффузии показывают, что этот эффект в основном наблюдается для анионных липидов. В районе образованной поры наблюдается заметное локальное уменьшение толщины бислоя и уменьшение упорядоченности липидов, что, в свою очередь, влияет на проницаемость мембраны. Изменение проницаемости мембраны приводит к тому, что молекулы воды и другие полярные молекулы могут проникать через мембрану. Исследовано влияние пор на движение воды через мембрану.

Таким образом, в результате образования пор в мембране, мембрана становится неоднородной по толщине, образуются достаточно протяженные зоны с различным электростатическим потенциалом, что, в свою очередь, может привести к деформации или искривлению мембраны, к нарушению ее функционирования.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и правительства республики Татарстан №18-44-160013.

**РАЗРЕШЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ  
АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ БРОМЕЛИНА С ПОМОЩЬЮ АДДИТИВНЫХ МОДЕЛЕЙ**

**OVERLAPPING ABSORPTION BANDS OF AMINO ACID RESIDUES IN THE BROMELAIN  
MOLECULE: RESOLUTION AND IDENTIFICATION WITH ADDITIVE MODELS**

*Лавриненко И.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.*

Воронежский государственный университет, Воронеж, lavrinenko\_ia@bio.vsu.ru

Одним из возможных путей в идентификации полос поглощения белков является сравнительный анализ дифференцированного спектра светопоглощения раствора биополимера и соответствующего ему аддитивного спектра, полученного в результате суммирования парциальных спектров растворов аминокислот, входящих в состав макромолекулы. Очевидно, что при этом не учитываются наличие внутримолекулярных связей, полярность локального окружения, расположение боковых групп в молекуле белка и других физико-химических характеристик, дополнительно трансформирующих интегральный спектр макромолекулы относительно его аддитивной модели. Тем не менее, такой прием позволяет более корректно установить происхождение полос светопоглощения в молекуле белка, относительно операции сравнения по отдельным свободным аминокислотам, а также дает возможность использовать модельный спектр в качестве базового при анализе особенностей микроокружения экспонированных аминокислотных остатков макромолекулы и оценки их приблизительного количества.

Нами предлагается обновленный подход [1], позволяющий в два этапа выявлять с достаточной степенью приближения плохо разрешенные пики поглощения, а также устанавливая их происхождение путем сопоставления исходных спектров с их аддитивными моделями на первом этапе, и последующим разложением аддитивного спектра поглощения до уровня спектров свободных аминокислот на втором этапе. В качестве тестового объекта исследования был выбран бромелин — гликопротеин — относящийся к группе цистеиновых протеиназ.

В экспериментах использованы водные растворы (моль/л) бромелина (Sigma-Aldrich)  $2.4 \cdot 10^{-5}$ , растворы L-аминокислот (Ajinomoto, PanEco): фенилаланина —  $3.5 \cdot 10^{-3}$ , тирозина —  $3.2 \cdot 10^{-4}$ , триптофана —  $1.1 \cdot 10^{-4}$ , гистидина —  $9.0 \cdot 10^{-2}$ , цистеина —  $7.0 \cdot 10^{-2}$ , метионина —  $1.0 \cdot 10^{-1}$  и цистина  $2.0 \cdot 10^{-4}$  (моль/л) в сантимолярном Na-фосфатном буфере (PanEco) с pH 7.4. Для предотвращения окисления сульфгидрильной группы цистеина использовали деаэрированный буфер в атмосфере азота.

Спектры поглощения исследуемых образцов регистрировали на спектрофотометре UV-2550(PC) (Shimadzu) в диапазоне длин волн 240–320 нм. Спектральная ширина щели составляла 0.5 нм, шаг сканирования — 0.2 нм, скорость сканирования соответствовала режиму «Slow». Измерения проводили в стандартной кварцевой кювете QS (Hellma) с длиной оптического пути 10 мм.

Для уменьшения случайных ошибок фотометрических измерений спектры поглощения сглаживались кубическими сплайнами (Cubic Spline Smoothing, CSS). Увеличение разрешения в спектрах поглощения образцов достигалось вычислением второй производной. Дополнительная фильтрация шумов при анализе дифференцированного спектра поглощения осуществлялась с помощью низкочастотной фильтрации окном Кайзера-Бесселя (Kaiser-Bessel Lowpass Filtering, KBLF).

Анализ второй производной спектра поглощения нативного бромелина, его аддитивной модели и спектров поглощения свободных аминокислот позволил установить происхождение и особенности формирования максимумов полос светопоглощения исследуемой макромолекулы гликопротеина. Показано, что пики с длиной волны 248.2, 253.2, 258.4 и 264.2 нм определяются максимумами фенилаланина; прогнозируемый пик 279.6 нм, практически совпадающий с экстремумом интегрального спектра (279.4 нм) обусловлен, главным образом, максимумом тирозина; 274.6 и 290.6 нм — триптофана; 268.0 нм — суперпозицией пиков тирозина и фенилаланина и 283.4 нм — тирозина и триптофана.

Продемонстрировано, что в интегральном спектре поглощения белка наибольший положительный волновой сдвиг относительно модельного (аддитивного) спектра претерпевают аминокислотные остатки триптофана, промежуточный — тирозина, наименьший — фенилаланина.

Предлагаемый подход в анализе спектров поглощения белков с помощью аддитивных моделей может быть перенесен и на другие объекты исследования в области аналитической и органической химии высокомолекулярных соединений, содержащих мономерные звенья с хромофорами различной природы.

1. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Ruban M.K. / Analysis of the Contribution of Chromophores in side Groups of Amino Acids to the Absorption Spectrum of Hemoglobin // J. Appl. Spectrosc. 2014. Vol. 80. P. 899.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КИНЕТОХОРОНОГО КОМПЛЕКСА NDC80 И МИКРОТРУБОЧКИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**

**DISSECTING INTERACTION OF KINETOCHORE COMPLEX NDC80 AND MICROTUBULE WITH MOLECULAR DYNAMICS**

***Лопанская Ю.Н., Холина Е.Г., Федоров В.А., Коваленко И.Б., Гудимчук Н.Б.***

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 1., Email: lopanskaia.julia@mail.ru

Во время клеточного деления необходимо с высочайшей точностью распределить удвоенный генетический материал между дочерними клетками. Главными участниками этого процесса являются тубулиновые микротрубочки и кинетохоры - крупные белковые комплексы на хромосомах, осуществляющие прикрепление хромосом к концам микротрубочек. Ключевую роль в этом прикреплении играет кинетохорный комплекс NDC80, который состоит из четырех белков: Ndc1, Nuf2, Spc24 и Spc25. Опубликованные исследования показали, что во многих раковых клетках наблюдается избыточная экспрессия белков NDC80, а блокирование функций этого комплекса приводит к остановке митоза и последующей смерти раковых клеток [1]. Таким образом, ингибитор функций NDC80 кажется многообещающим терапевтическим средством для остановки деления клеток опухолей. Для создания такого ингибитора необходимо детальное понимание молекулярных аспектов взаимодействия белков NDC80 и микротрубочек, которое еще не достигнуто. Так, в кристаллической структуре комплекса микротрубочки и NDC80 наблюдается связь только между одним белком комплекса, Ndc1, и микротрубочкой. Но мутации в белке Nuf2 также ослабляют взаимодействие комплекса NDC80 с микротрубочкой, позволяя предположить, что и Nuf2 вносит вклад в связывание с тубулином [2].

С целью пролить свет на эту проблему, мы провели анализ взаимодействия кинетохорного комплекса NDC80 и микротрубочки методом молекулярно-динамических расчетов. Нами была построена полноатомная молекулярно-динамическая модель комплекса фрагмента микротрубочки и NDC80 с явным растворителем. В расчете учитывались не только глобулярные домены белков NDC80 и тубулина, но и их важные подвижные неструктурированные цепи на N- и C-концах [2]. Результаты наших расчетов показали, что взаимодействие между NDC80 и микротрубочкой происходит между глобулярными и подвижными частями белков. В течение расчета формировался прямой контакт Nuf2 как с C-концевой последовательностью тубулина, так и с глобулами тубулинов, что позволяет объяснить причину влияния удаленных от интерфейса взаимодействия точечных мутаций на связывание микротрубочки. Наши расчеты также позволяют предсказать конформационные изменения NDC80 комплекса для определения потенциальных сайтов связывания лигандов на его поверхности, оценить контакты между NDC80 и тубулинами для фармакофорного поиска ингибитора их взаимодействия. Мы надеемся, что данная работа позволит лучше понять молекулярные механизмы взаимодействия кинетохора и микротрубочки и поможет поиску эффективного ингибитора NDC80 комплекса для борьбы с пролиферацией раковых клеток. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке гранта РФФИ, проект № 17-74-20152.

- 1) Y. Chen, D. J. Riley, P. L. Chen, и W. H. Lee, «NDC80, a novel nuclear protein rich in leucine heptad repeats specifically involved in mitosis.», *Mol. Cell. Biol.*, 1997, т. 17, вып. 10, сс. 6049–6056.
- 2) C. Ciferri *и др.*, «Implications for Kinetochores-Microtubule Attachment from the Structure of an Engineered Ndc80 Complex», *Cell*, 2008, т. 133, вып. 3, сс. 427–439.

**ИССЛЕДОВАНИЯ ФАЗОВЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ В БИОПОЛИМЕРАХ С ПОМОЩЬЮ РЭЛЕЕВСКОГО И МАНДЕЛЬШТАМ-БРИЛЛЮЭНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА**

**STUDY OF PHASE TRANSFORMATION IN BIOPOLYMERS BY RAYLEIGH-BRILLOUIN LIGHT SCATTERING**

***Лушников С.Г.***

ФТИ. им А.Ф. Иоффе, 194021, Санкт-Петербург, Россия.

Интерес к динамике фазовых превращений в биополимерах, наблюдающийся в последние годы связан как с включением в исследования современного арсенала физических методов (рассеяние нейтронов, синхротронное излучение и т.д.), так и пониманием ключевой роли, которую играют фазовые превращения в биологических процессах. К фазовым превращениям в биополимерах принято относить изменения нативного состояния белков, конформационные переходы, агрегацию, плавление и т.д., то есть изменения пространственной организации биологической макромолекулы под воздействием изменения внешних условий (температуры, давления, pH и т.д.). Исследования этих фазовых превращений сталкиваются с методическими трудностями, связанными с невозможностью проводить эксперименты, в которых одновременно можно было



анализировать как изменения структуры, так и динамики биополимеров. Мандельшам-бриллюэновское и рэлеевское (МБР) рассеяние света позволяет анализировать поведение низкочастотной области колебательного спектра макромолекулы (акустические возбуждения, релаксационные процессы) и процессы связанные с образованием агрегатов, гелей в растворах биополимеров при изменении внешних условий. В настоящем докладе будут обсуждаться метод МБР рассеяния света и полученные нами результаты. Будет показано, как в ходе МБР экспериментов на таких модельных объектах, как короткие пептиды [1], лизоцим [2,3], бычий сывороточный альбумин (БСА [4], коротких фрагменты ДНК [5] при изменении температуры анализировалось поведение жесткости, затухания гиперзвуковых фононов, времени жизни образующихся комплексов, энергии активации. Результаты этих измерений в ряде случаев хорошо согласуются с модельными расчетами. Совокупность полученных нами данных позволила показать динамику фазовых превращений в изучаемых объектах, рассмотреть возможные фазовые диаграммы и обнаружить предполагаемые ранее состояния. Так, например, в исследованиях лизоцима в окрестности тепловой денатурации нами была обнаружена промежуточная фаза, относящаяся к состоянию расплавленной глобулы [2]. При плавлении коротких фрагментов ДНК обнаружено нетривиальное поведение структуры, которое можно связать с возникновением динамически упорядоченных состояний [5]. Показано возникновение упорядоченной фазы при превращении раствора БСА в гелеобразное состояние. Эти и другие результаты обсуждаются нами в рамках современных представлений физики конденсированных сред.

1. V.E. Vashchenkov., A.I. Fedoseev, M.G. Petukhov, et.al. Study of low-frequency dynamics of short peptides by Brillouin light scattering and Monte-Carlo global energy minimization // J.Phys. Conference Series 2014 Vol. 572 C. 1.
2. A.V. Svanidze, S.G. Lushnikov, S. Kojima Protein dynamics in Brillouin light scattering: thermal denaturation of hen egg white lysozyme // JETP Lett. 2009, Vol. 90(1). P. 80
3. A.V. Svanidze, S. G. Lushnikov, V.P. Romanov, S. Kojima Multicomponent Rayleigh scattering from guanidine hydrochloride solutions // J. Raman Spectrosc. 2012 Vol. 43(10) P. 1510
4. A.V. Dmitriev, V.E. Vashchenkov, A.I. Fedoseev, S.G. Lushnikov Phase transformations of bovine serum albumin: Evidences from Rayleigh-Brillouin light scattering //J. Raman Spectrosc. 2019, Vol. 50(4) P. 537
5. S.G. Lushnikov, A.V. Dmitriev, A.I. Fedoseev , et al. Low-frequency dynamics of DNA in Brillouin light scattering spectra // JETP Lett. 2013 Vol. 98(11) P. 735

## **ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА РЕГУЛИРУЕТ ПЕРЕДАЧУ СИГНАЛА ПО МОЛЕКУЛЕ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

## **INTRAMOLECULAR DYNAMICS REGULATES SIGNAL TRANSDUCTION IN GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE MOLECULE**

***Макшакова О.Н., Кошкарлов А.А.***

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН, г. Казань  
olga.makshakova@kibb.knc.ru

Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (ГАФД) - фермент гликолиза, катализирующий окислительное фосфорилирование глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-дифосфоглицерат, сопряженное с восстановлением кофактора НАД<sup>+</sup> до НАДН. Кроме того, он задействован в репарации ДНК, переносе и репликации РНК, апоптозе и других клеточных процессах [1]. При отклонениях от нормы, например, в клетках меланомы, наблюдается экспрессия тканенеспецифичной формы ГАФД, что может быть сопряжено с развитием злокачественных образований [2]. Понимание структурно-динамических особенностей и молекулярных механизмов, лежащих в основе функционирования белка, необходимо для разработки способов регулирования его активности, что может в последствии быть использовано в комплексной терапии ряда заболеваний [3].

ГАФД - природный гомотетрамер, каждая субъединица которого состоит из каталитического и НАД-связывающего доменов. Белок демонстрирует кооперативность по отношению к связыванию кофактора и полуцентровую реактивность, что свидетельствует о функциональной неэквивалентности субъединиц в составе тетрамера. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, субъединицы в составе тетрамера имеют одинаковую пространственную организацию, причем она не меняется при связывании кофактора. Исходя из этого можно предполагать, что причиной функциональных различий может быть неэквивалентность динамики остатков субъединиц, которая появляется при формировании олигомеров. В данной работе был проведен *in silico* анализ внутримолекулярной динамики ГАФД в форме тетрамера и образующих его димеров, с целью установить влияние олигомеризации белка на подвижность его остатков и вклада отдельных межсубъединичных контактов в регулирование динамики.

Для этого были проведены расчеты методом полноатомной классической молекулярной динамики, который позволяет проследить эволюцию довольно крупных молекулярных систем во времени. Белок помещался в бокс с водой с периодическими граничными условиями. Вода задавалась в явном виде, а для

нейтрализации заряда в систему вводились противоионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ . После фазы уравнивания длина одной траектории составляла 500 пс. Все расчеты траекторий молекулярной динамики были выполнены в программном пакете GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations) с использованием силового поля CROMOS. Анализ траекторий проводился с привлечением методов динамически-корреляционных матриц, метода главных компонент (PCA, Principal Component Analysis) и метода анализа динамической сети (DNA, Dynamical Network Analysis). Примененная совокупность методов анализа позволила выявить наличие коррелированности движений ряда пространственно удаленных остатков ГАФД. При этом, высокую степень коррелированности флуктуаций показали остатки в окрестности субъединичных контактов типа OP, где каталитические домены взаимодействуют  $\beta$ -слоями. В эту область попадают каталитические остатки двух субъединиц, которые также оказываются динамически связанными. Таким образом сигнал от связывания кофактора одной субъединицей передается через межсубъединичный контакт на другую субъединицу, что может лежать в основе кооперативности. Кроме того, выявленные динамические связи между каталитическими и периферийными остатками открывают возможность для разработки аллостерических активаторов ГАФД.

Исследование было выполнено при использовании оборудования центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и оборудования центра коллективного пользования вычислительными ресурсами МСЦ РАН - филиала ФГУ ФНЦ НИИСИ РАН.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта № 18-44-160026.

1. Sirover M. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH): The Quintessential Moonlighting Protein in Normal Cell Function and in Human Disease // Academic Press, MA (Massachusetts), USA. 2017.
2. Sevostyanova I. et al. Sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is expressed in melanoma cells // Biochem Biophys Res Commun. 2012. Vol. 427. P. 649.
3. Makshakova O. et al. Structural basis for regulation of stability and activity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. Differential scanning calorimetry and molecular dynamics // J Struct Biol. 2015. Vol. 190. P. 224.

---

## **ЗНАКОПЕРЕМЕННАЯ ХИРАЛЬНОСТЬ КАК БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЗАКОНОМЕРНОСТЬ ИЕРАРХИЧЕСКОГО СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ В БЕЛКАХ И МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ**

### **SIGN-ALTERNATING CHIRALITY AS A BIOPHYSICAL REGULARITY OF HIERARCHICAL STRUCTURE FORMATION IN PROTEINS AND ARTIFICIAL SYSTEMS**

***Мальшико Е.В., Твердислов В.А.***

МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, E-mail: katyamalyshko@mail.ru

Одной из важнейших нерешенных проблем современной науки является отсутствие завершенной физической концепции упаковки биологических макромолекул - перехода системы в энергетический минимум, соответствующий ее конечной нативной конформации. Разрабатываемый подход даёт возможность выдвинуть утверждение, согласно которому иерархичность хирально знакопеременных спиральных и суперспиральных биомолекулярных структур составляет симметричную (хиральную) основу процесса фолдинга макромолекул, направляющую его траекторию в энергетическую «ловушку Левинталя». Она же служит физической основой функционирования белков и нуклеиновых кислот как молекулярных машин.

Ранее авторами выявлена системная молекулярно-биологическая закономерность: начиная с уровня асимметричного углерода в дезоксирибозе и аминокислотах, прослеживается тенденция чередования знака хиральности внутримолекулярных структурных уровней L-D-L-D для белков и D-L-D-L для ДНК. Первичные полимерные структуры белков и нуклеиновых кислот, аминокислотные остатки и (дезокс)рибоза, гомохиральны по асимметричному углероду (L и D), а по вторичному и высшим уровням структуры знак хиральности определяется спиральными и суперспиральными структурами.

Подобный эффект обнаружен и описан во многих механических, гидродинамических, физико-химических, полимерных и жидкокристаллических системах.

Впервые обосновывается концепция, согласно которой гомохиральность аминокислот, рибозы и дезоксирибозы является ресурсом свободной энергии и важнейшим инструментом фолдинга и стратификации внутримолекулярных и надмолекулярных структурных уровней. Выдвинуто и обосновывается утверждение, что симметричный фактор, связанный с формированием каскада хиральных структур, определяет оптимальную траекторию фолдинга, что является ключевой проблемой молекулярной динамики свёртывания первичной пептидной цепи в уникальную белковую глобулу.

Развиваемый принцип актуален для биофизики и молекулярной биологии, поскольку выявляет аналитический физический критерий, не связанный с конкретным (био)химическим «наполнением» макромолекулярных конструкций, но определяющий механизмы структурной дискретности на основании

знакопеременных хиральных мотивов. Существующие градации структур биомакромолекул основаны исключительно на их качественном описании. В известных концепциях строения макромолекул не существует единого сквозного критерия, позволяющего отразить дискретность структурных уровней биомакромолекул, подобного знакопеременной хиральности.

Имеющиеся теории и модели фолдинга биомакромолекул основаны на физических представлениях, связанных с изотропными системами. Авторами впервые рассматривается симметричный фактор как компонент энтропийного вклада в изменение свободной энергии при фолдинге. В основе симметричного подхода используется явление хирального дуализма как инструмента стратификации в иерархиях знакопеременных хиральных структур макромолекул и надмолекулярных образований.

1. Твердислов В. А. Хиральность как первичный переключатель иерархических уровней в молекулярно-биологических системах // Биофизика. 2013. Т. 58. №. 1. С. 159-164.
2. Твердислов В. А., Малышко Е. В. О закономерностях спонтанного формирования структурных иерархий в хиральных системах неживой и живой природы // Успехи физических наук. 2019. Т. 189. №. 4. С. 375-385.

## **НИЗКОЧАСТОТНАЯ ИК-ФУРЬЕ И КР СПЕКТРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ ЭЛЕМЕНТОВ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛ БЕЛКОВ**

### **LOW-FREQUENCY RAMAN AND FTIR SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF STRUCTURAL ELEMENTS OF PROTEIN MOLECULES**

**Манькова А.А.<sup>1</sup>, Чикишев А.Ю.<sup>2</sup> и Брандт Н.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, [mankova@physics.msu.ru](mailto:mankova@physics.msu.ru), [brandt@physics.msu.ru](mailto:brandt@physics.msu.ru)

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Международный лазерный центр, 119991 Москва, Россия; [ach@ilc.edu.ru](mailto:ach@ilc.edu.ru)

В основе концепции «белок-машина» лежит модель молекулы белка как некоей механической структуры, которая состоит из фрагментов, обладающих различной упругостью и подвижностью - активного центра и несущих конструкций. Согласно этой концепции то, как функционирует белок, напрямую связано с движением фрагментов молекулы друг относительно друга. Такими фрагментами, например, могут считаться как домены третичной структуры, так и высоко упорядоченные  $\alpha$ -спиральные и  $\beta$ -структурные элементы.

В работе для исследования структуры молекул и изменений в их функционировании предлагается использовать методы ИК-Фурье и КР спектроскопии, как в низкочастотном диапазоне, так и в диапазоне «отпечатков пальцев». Проводится поиск спектральных изменений, соответствующих различиям во вторичной и третичной структурах молекул в обоих диапазонах. В качестве исследуемых образцов выбраны белки, обладающие различным содержанием элементов структуры, а также проводится исследование группы белков, имеющих в нативном состоянии схожую вторичную (спиральную), но разную третичную структуру.

Первые результаты показывают, что форма низкочастотного ИК-Фурье спектра спиральных белков схожа между собой, и отличается от спектров других (глобулярных) белков. Отличия наблюдаются и в выявленных ранее авторами диапазонах, названных конформационно-чувствительными [1]. Также выявлено несколько линий КР спектра белков в диапазоне «отпечатков пальцев», которые, вероятно, соответствуют элементам третичной структуры молекулы. Дополнительно методами низкочастотной КР и ИК-Фурье спектроскопии проводится исследование спектральных изменений, происходящих вследствие денатурации суперспирального белка коллагена. Сравнение спектров коллагена и желатина (денатурированного коллагена) показывает возможность применения этих методов для выявления наличия процесса денатурации коллагена.

1. Balakhnina I. et al. Low-frequency vibrational spectroscopy of proteins with different secondary structures // J. Biomed. Opt. 2017. Vol. 22. P.091509

## **ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ТИПОВ МУТАЦИЙ НА ПУТЬ СВОРАЧИВАНИЯ БЫЧЬЕЙ КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ Б**

### **THE EFFECT OF DIFFERENT TYPES OF MUTATIONS ON THE FOLDING PATHWAY OF BOVINE CARBONIC ANHYDRASE II**

*Мельник Б.С., Карузина Н.Е.<sup>1</sup>, Мельник Т.Н., Немцева Е.В.<sup>1,2</sup>*

Институт белка РАН, Пущино, Московская область, bmelnik@phys.protres.ru

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН, Красноярск

В работе показано, что сочетание метода спектроскопии высокого разрешения и мутационного анализа позволяет исследовать путь сворачивания белка. С помощью метода спектроскопии высокого разрешения можно детектировать изменения конформации и окружения отдельных триптофановых аминокислотных остатков, расположенных в разных структурных элементах белка, что в свою очередь, позволяет отличать разные конформационные состояния белка, возникающие в процессе его сворачивания или разворачивания [1]. Проведено исследование шести мутантных форм бычьей карбоксиангидразы Б с заменами одиночных аминокислотных остатков и с введенными цистеиновыми мостиками. Показано, что форма параметрических графиков, построенных с использованием характеристик кривых затухания триптофановой флуоресценции белков после импульсного (наносекундного) возбуждения, отражает особенности пути сворачивания/разворачивания карбоксиангидразы [2].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00420.

1. Nemtseva E.V., et al. Fluorescence lifetime components reveal kinetic intermediate states upon equilibrium denaturation of carbonic anhydrase II. // *Methods Appl. Fluoresc.* 2018. Vol. 6. P. 015006.
2. Nemtseva et al. Experimental approach to study the effect of mutations on the protein folding pathway. // *PloS One* 2019. Vol. 14. P. 0210361.



## **ВЛИЯНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ МОСТИКОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА НА ГИДРАТАЦИЮ ЕГО ПЕРЕХОДНЫХ И ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ**

### **THE EFFECT OF ARTIFICIAL CYSTEINE BRIDGES ON THE SURFACE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN ON THE HYDRATION OF ITS TRANSITION AND INTERMEDIATE STATES**

*Мельник Т.Н., Нагибина Г.С., Глухова К.А., Мельник Б.С.*

Институт белка РАН, Пущино, Московская обл., e-mail: tmelnik@vega.protres.ru

Ранее нами было показано, что тепловая денатурация зеленого флуоресцентного белка (GFP) необратима и проходит через несколько стадий. [1,2]. В этой работе методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии мы изучили влияние трех цистеиновых мостиков, введенных в разных структурных элементах зеленого флуоресцентного белка, на энтальпии денатурации, энергии активации и скачки теплоемкости при переходе этого белка из нативного в промежуточные и переходные состояния. Проведенные исследования позволили подтвердить, что первым при денатурации этого белка происходит процесс, практически не нарушающий его структуру, а затем происходят изменения структуры белка в области 4–6 бета-складок [3]. Цистеиновый мостик, введенный в этой области, уменьшает гидратацию второго переходного состояния и увеличивает гидратацию второго промежуточного состояния при тепловой денатурации зеленого флуоресцентного белка. Изучение влияния цистеиновых мостиков на различные энергетические уровни многостадийно сворачивающихся белков важно и позволит лучше понять процесс сворачивания и функционирования глобулярных белков, в частности, открыть перспективы направленного изменения стабильности и скорости сворачивания белков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00420.

1. Melnik T., et al. Studies of irreversible heat denaturation of green fluorescent protein by differential scanning microcalorimetry.// *Thermochimica Acta.* 2011. Vol. 512. P. 71.
2. Melnik T.N., et al. Multi-state proteins. Approach allowing experimental determination of the formation order of structure elements in the green fluorescent protein.// *PloS One* 2012. Vol. 7. P. 48604.
3. Мельник Т.Н. и др. Искусственные цистеиновые мостики на поверхности зеленого флуоресцентного белка влияют на гидратацию его переходных и промежуточных состояний // *Мол. биол.* 2018. Том 52. Стр.88.

**ЦИТОСКЕЛЕТ КАК СТРУКТУРНЫЙ УРОВЕНЬ ХИРАЛЬНОЙ ИЕРАРХИИ МАКРОМОЛЕКУЛ**  
**CYTOSKELET AS A STRUCTURAL LEVEL OF THE CHIRAL HIERARCHY OF**  
**MACROMOLECULES**

*Муртазина А.Р., Малышко Е.В., Твердислов В.А.*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва  
E-mail: murtazina.alina@physics.msu.ru

Работа содержит развитие гипотезы о роли хиральности как инструмента структурообразования на молекулярном и надмолекулярном уровнях в клетках, а также в неживой природе [1, 2]. Во внутримолекулярных уровнях белков и нуклеиновых кислот была выявлена и описана общая закономерность. Отмечено чередование знака хиральности D–L–D–L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК для наиболее распространённой В-формы. Последовательность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии белковых структур подобна той, что мы наблюдаем для ДНК: L–D–L–D. В данной работе внимание сфокусировано на переходе от макромолекул к надмолекулярным структурам (элементам цитоскелета внутри живой клетки - микрофиламентам, промежуточным филаментам и микротрубочкам). Высказывается гипотеза о том, что периодичность хиральных структур и взаимодействий во внутримолекулярных структурах распространяется на надмолекулярный уровень - уровень цитоскелета.

Отмечено чередование знака хиральности на более высоких уровнях организации структур клетки. Так, четвертичный уровень микрофиламента представляет собой одну левозакрученную нить из глобулярного актлина [3, 4, 5]. Супрамолекулярная структура микрофиламента - двойная правая спираль, образованная двумя левозакрученными нитями G- актлина. Чередование знака хиральности при переходе на более высокий уровень структурной организации выявлено также в промежуточных филаментах. Промежуточный филамент представляет собой подобную верёвке структуру – суперспираль из 32 протяжённых правых  $\alpha$ -спиралей в поперечном сечении филамента [6]. На третичном уровне структуры промежуточного филамента две  $\alpha$ -спирали образуют левозакрученный димер [6,7] по принципу «голова к голове, хвост к хвосту». На четвертичном уровне два таких димера объединяются по принципу «голова к хвосту», образуя тетрамер, также называемый протофиламентом. При этом скручиваются эти димеры друг относительно друга вправо, чтобы максимизировать площадь контакта [8]. Наконец, на супрамолекулярном уровне восемь тетрамеров собираются в промежуточный филамент, скручиваясь влево [9, 10]. Микротрубочка на супрамолекулярном уровне своей структуры представляет собой трёхзаходную левозакрученную спираль [11,12]. Левозакрученные микротрубочки нацелены на взаимодействие (хоть и опосредованное) с хромосомной ДНК при митозе [9].

Поскольку цитоскелет - система, пронизывающая клетку, можно предположить, что хиральность его элементов служит направляющей для внутриклеточных взаимодействий между молекулами различного типа. Обнаружено взаимодействие между разнотипными молекулами с разным знаком хиральности. Так, правозакрученные микрофиламенты взаимодействуют с левыми фосфолипидами мембран клеток эукариотов. Левозакрученные ламины и микротрубочки направлены на взаимодействие с ДНК (правыми двойными спиральями).

1. Твердислов В. А. Хиральность как первичный переключатель иерархических уровней в молекулярно-биологических системах //Биофизика. 2013. Т. 58. №. 1. С. 159-164.
2. Твердислов В. А., Малышко Е. В. О закономерностях спонтанного формирования структурных иерархий в хиральных системах неживой и живой природы //Успехи физических наук. 2019. Т. 189. №. 4. С. 375-385.
3. Korn E. D. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells //Physiological reviews. 1982. Vol. 62. №. 2. P. 672-737.
4. Milligan R. A., Whittaker M., Safer D. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites //Nature. 1990. Vol. 348. №. 6298. P. 217.
5. Dominguez R., Holmes K. C. Actin structure and function //Annual review of biophysics. 2011. Vol. 40. P.169-186.
6. Herrmann H., Aebi U. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds //Annual review of biochemistry. 2004. Vol. 73. №. 1. P. 749-789.
7. Crick F. H. C. The packing of  $\alpha$ -helices: simple coiled-coils //Acta crystallographica. 1953. Vol. 6. №. 8-9. P. 689-697.
8. Bray D. J. et al. Complete structure of an epithelial keratin dimer: implications for intermediate filament assembly //PloS one. 2015. Vol. 10. №. 7. P. e0132706.
9. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular biology of the cell. - New York: Garland Science, 2015.
10. Fuchs E., Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease //Annual review of biochemistry. 1994. Vol. 63. №. 1. P. 345-382.
11. Amos L. A., Klug A. Arrangement of subunits in flagellar microtubules //Journal of cell science. 1974. Vol. 14. №. 3. P. 523-549.
12. Chrétien D. et al. Determination of microtubule polarity by cryo-electron microscopy //Structure. 1996. Vol. 4. №. 9. P. 1031-1040.

**МЕХАНИЗМ СПАСЕНИЯ МИКРОТРУБОЧЕК: СТОХАСТИЧЕСКОЕ СВОЙСТВО ДЕПОЛИМЕРИЗУЮЩЕГО КОНЦА ИЛИ СТРУКТУРНАЯ ПРЕДОПРЕДЕЛЕННОСТЬ**

**MICROTUBULE RESCUE MECHANISM: STOCHASTIC PROPERTY OF DEPOLYMERIZING END OR STRUCTURAL PREDISPOSITION**

***Мустяца В.В.<sup>1,2,3</sup>, Зайцев А. В.<sup>2</sup>, Костарев А. В.<sup>2</sup>, Атауллаханов Ф.И.<sup>1,2,3</sup>, Гудимчук Н.Б.<sup>1,2,3</sup>***

<sup>1</sup>НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева — Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова — Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 1.

<sup>3</sup>ЦТП ФХФ РАН — Россия, 119991, Москва, ул. Косыгина д. 4

Email: vadimmustyatsa@gmail.com

Микротрубочки представляют собой один из основных типов филаментов, формирующих цитоскелет. Они придают клеточным структурам необходимую жёсткость, обеспечивают движение и деление клетки, выступают в качестве платформ и путей для внутриклеточного транспорта и пр. Микротрубочки характеризуются динамической нестабильностью: при одних и тех же внешних условиях микротрубочки могут как расти, так и укорачиваться, и эти фазы сменяют друг друга. Переход от роста к укорочению принято называть катастрофой, а обратный переход – спасением. Спасения микротрубочки, как и катастрофы, определяют длину микротрубочки в клетках и влияют на множество внутриклеточных процессов. Механизмы динамической нестабильности, и особенно механизмы спасений микротрубочек, остаются невыясненными на сегодняшний день. В рамках нашего исследования были получены данные о наблюдаемых в системе *in vitro* спасениях микротрубочек. На их основании были сформулированы и проверены различные гипотезы о механизме данного явления.

На основании прямых измерений методом DIC микроскопии *in vitro* в системе из очищенного тубулина нами были получены экспериментальные данные о распределении расстояний, на которых происходят спасения, а также о зависимости этого распределения от возраста наблюдаемой микротрубочки. На основании анализа предсказаний моделирования и сравнения их с экспериментальными данными был сделан следующий вывод: различные механизмы, описывающие спасение как результат структурных особенностей тела микротрубочки, существующих ещё до момента, когда деполимеризация дошла до точки спасения, не могут быть доминирующим механизмом спасений. Напротив, наблюдаемые данные не противоречат моделям, описывающим спасения как результат процессов, происходящих на конце микротрубочки при деполимеризации (аналогично тому, как катастрофы определяется процессами, происходящими на растущем конце [1]). В целом наши данные позволяют предполагать, что наблюдаемая экспериментально совокупность событий спасения может состоять из нескольких суб-популяций, но при этом механизмы, связанные с непосредственно концевой динамикой, являются доминирующими.

1. Zakharov, P., Gudimchuk, N., Voevodin, V., Tikhonravov, A., Ataulakhanov, F.I., and Grishchuk, E.L. Molecular and Mechanical Causes of Microtubule Catastrophe and Aging // *Biophys. J.*, 2015, том 109(12), стр. 2574–2591.

**АНАЛИЗ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА**

**RECEPTOR SPECIFICITY OF INFLUENZA A VIRUS STRAINS MEASURED BY SURFACE PLASMON RESONANCE**

***Онхонова Г.С.<sup>1,2</sup>, Торжкова П.Ю.<sup>1</sup>, Марченко В.Ю.<sup>1</sup>, Святченко С.В.<sup>1</sup>, Гудымо А.С.<sup>1</sup>, Рыжиков А.Б.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Мониторинг вируса гриппа является частью глобальной системы надзора и имеет важную научно-практическую значимость с точки зрения предупреждения и контроля ежегодных эпидемий, а также повышения готовности к пандемиям. Вирусологические и серологические методы исследования позволяют подтверждать клинические диагнозы, дифференцировать грипп от ОРВИ другой этиологии, изучать эволюцию штаммов, а также отслеживать уровень коллективного иммунитета. Оценка рецепторной специфичности на сегодняшний день не входит в перечень обязательных исследований, хотя ее практическая значимость очень высока. Одним из определяющих этапов в процессе жизненного цикла вируса гриппа является рецепторное связывание оболочечного вирусного белка гемагглютинина с сиаловыми кислотами на поверхности клеточ-

мишеней. Это взаимодействие определяет весь дальнейший ход событий: проникновение в клетку, репликацию, почкование и дальнейшую передачу вируса. Таким образом, возможность вирусного белка гемагглютинина связываться с рецепторами клеток организма является одним из факторов, определяющим видовую специфичность хозяина по отношению к вирусной инфекции.

Для оценки специфичности связывания вирусного белка гемагглютинина с рецепторами существуют различные стационарные и кинетические методы: иммуноферментный анализ, гликановый скрининг, интерферометрия биослоя, микроскопический термофорез и др. Метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР) является современным и точным способом измерения лиганд-рецепторного взаимодействия белков. Принцип ППР основан на явлении полного внутреннего отражения, возникающего на границе раздела стеклянной призмы и нанесенной на нее золотой пленки. На поверхности пленки генерируется затухающая волна, которая возбуждает свободные колеблющиеся электроны (плазмон). При определенном угле падения возникает резонанс поверхностного плазмона, что приводит к снижению интенсивности отраженного света. Резонансный угол является функцией показателя преломления на границе раздела металлической пленки и раствора. Таким образом, сдвиг угла резонанса отражает события на границе раздела, такие как адсорбция белка на поверхности и взаимодействие антиген-антитела.

Оценку рецепторной специфичности проводили с помощью системы ProteOnXPR36 (Bio-Rad), принцип которой основан на эффекте ППР. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения ProteOnManager 3.1.0. В ходе работы были исследованы различные штаммы вируса гриппа типа А и получены равновесные константы диссоциации с клеточными рецепторами, так называемого «птичьего» типа (3'-Sialyl-N-acetylactosamine) и «человеческого» типа (6'-Sialyl-N-acetylactosamine). Полученные результаты могут быть использованы для оценки специфичности вируса гриппа птиц по отношению к рецепторам клеток верхнего дыхательного тракта человека и принятия соответствующих мер защиты.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 13/19.

## **ФАРМАКОФОРНАЯ МОДЕЛЬ РАСПОЗНАВАНИЯ НИЗИНОМ ЛИПИДА II В БАКТЕРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ**

## **PHARMACOPHORE MODEL FOR NISIN/LIPID II RECOGNITION IN BACTERIAL MEMBRANE**

*Панина И.С.<sup>1</sup>, Чузунов А.О.<sup>1,2</sup>, Крылов Н.А.<sup>1,2</sup>, Нольде Д.Е.<sup>1</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, irinaspanina@gmail.com

<sup>2</sup>Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва

Устойчивость микроорганизмов к применяемым в клинической практике антибиотикам является серьезной проблемой медицины во всем мире. В связи с этим одной из актуальных задач современной фармакологии является поиск или дизайн новых антибактериальных веществ, свободных от бремени резистентности. Перспективными кандидатами для разработки новых лекарств являются антимикробные пептиды (АМП). Среди всего разнообразия АМП особое внимание привлекают пептиды, мишенью которых является молекула-предшественник бактериальной клеточной стенки — липид II. Липид II локализуется в плазматической мембране бактериальной клетки и участвует в биосинтезе пептидогликана. Молекула липида II состоит из пептидогликановой субъединицы, соединенной через пиррофосфатную группу с длинной полиизопреновой цепью. Некоторые АМП, например, лантибиотики, селективно распознают на поверхности бислоя и связывают в прочный комплекс химически консервативную пиррофосфатную группу липида II [1], заменить которую существенно сложнее, чем одну аминокислоту другой в составе белка. Такие АМП считаются перспективными прототипами антибиотиков нового поколения, ввиду низкой вероятности развития резистентности к ним.

Наиболее изученным представителем класса лантибиотиков является низин — посттрансляционно модифицированный пептид, состоящий из 34 аминокислот, содержащий в своем составе пять лантиониновых колец (А-Е). Низин обладает двойным механизмом действия: связываясь N-концом с пиррофосфатом липида II, он ингибирует биосинтез пептидогликана, тогда как его С-конец обладает поровой активностью и нарушает целостность бактериальной мембраны [2]. Для направленной модификации пептида с целью его применения в клинической практике требуется понимание механизма взаимодействия низина с липидом II на молекулярном уровне. С помощью ЯМР спектроскопии установлена пространственная структура комплекса низина с укороченным аналогом липида II в диметилсульфоксиде (ДМСО) [3]. Однако на поверхности бислоя структура комплекса остается неизвестной.

В настоящей работе проведено исследование межмолекулярного распознавания низином его мишени с помощью моделирования методом молекулярной динамики (МД). Были проведены расчеты траекторий МД для следующих систем: липид II в гидратированном липидном бислое; укороченный аналог низина (остатки 1-11) в

воде в присутствии и отсутствии диметилпирофосфата, имитирующего сайт связывания липида II. Показано, что пирофосфат липида II принимает три различных конформации в бислое, только две из которых способны связываться с низином. В этих состояниях на поверхности бислоя формируется «пирофосфатный фармакофор», характеризующийся уникальным пространственным расположением акцепторов водородных связей. Мы предполагаем, что эта особенность обеспечивает высокую селективность распознавания липида II низином. Установлено, что аналог низина в водном растворе принимает пять основных конформаций. С помощью разработанного нами метода, основанного на расчетах энергии пробной пары атомов кислорода, было установлено, что только в одном из пяти состояний молекула способна взаимодействовать с мишенью. Это состояние («распознающий фармакофор») характеризуется четырьмя сонаправленными NH-группами кольца А. В результате предложен механизм распознавания низином липида II, основанный на индуцированном соответствии доноров водородных связей в системе колец А/В низина и распознаваемого ими фрагмента липида II в модельной мембране. Кроме того, предложена молекулярная модель комплекса укороченного аналога низина с липидом II в бактериальной мембране, которая может быть использована для создания новых антибиотиков.

Работа выполнена в рамках программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ и государственной поддержки ведущих университетов РФ «5-100». Авторы благодарны СКЦ «Политехнический» СПбПУ за предоставленные суперкомпьютерные ресурсы.

1. Ng V., Chan W. New found hope for antibiotic discovery: Lipid II inhibitors // *Med. Chemistry*. 2016. Vol. 22. P. 12606–12616.
2. McAuliffe O. et al. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action // *FEMS Microbiol. Rev.* 2001. Vol. 25. P. 285–308.
3. Hsu S.-T. D. et al. The nisin–lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. Vol. 11. P. 963–967.

## **ФАЗОВЫЕ ЭФФЕКТЫ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ОБЛАСТИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕМПЕРАТУР ПО ДАННЫМ МЕТОДА ЭПР СПИН-МЕТОК**

### **PHASE EFFECTS OF CONFORMATIONAL TRANSFORMATIONS OF SERUM ALBUMIN IN THE RANGE OF PHYSIOLOGICAL TEMPERATURES ACCORDING TO THE ESR SPIN-LABEL METHOD**

*Рожков С.П., Горюнов А.С.*

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ Карельский научный центр РАН, Петрозаводск, Россия

Способность цитоплазмы образовывать безмембранные органеллы - микроскопические жидкие фазы, ограниченные межфазной поверхностью, привлекает все больший интерес исследователей. Такие микрофазы и соответствующие фазовые переходы типа жидкость-жидкость (ФП L-L) играют важную роль в регуляции клеточной активности и поддержании гомеостаза, однако их физико-химическая природа изучена недостаточно [1]. Вместе с тем к настоящему времени накоплен определенный опыт исследования подобных механизмов при изучении L-L фазовых переходов в относительно простых системах вода-глобулярный белок-соль [2,3]. Экспериментальные работы в условиях концентрированных биодисперсий и краудинга сопряжены со значительными трудностями, в частности, при использовании оптических методов, что делает актуальным поиск новых подходов. В нашей работе для изучения механизма фазовых переходов в модельных многокомпонентных белковых дисперсиях мы применили метод ЭПР спиновых меток - репортерских групп, связанных с молекулой белка и чувствительных к изменению как структурно-динамического и конформационного состояния белковых молекул, так и фазового состояния белковых дисперсий. Для моделирования эффектов белкового краудинга использовались различные осмолиты и водорастворимые полимеры, разные виды белков.

На примере сывороточного альбумина с применением различных спиновых меток на основе малеимида и дихлортриазина [4-6] показано, что конформационные изменения молекул белка, вызываемые варьированием концентрации различных солей и температуры, связаны с фазовыми изменениями в дисперсиях. Показаны возможности метода при регистрации структурных изменений в дисперсиях в результате фазовых переходов, например, по изменению среднего расстояния между взаимодействующими молекулами белков, а также и термодинамических параметров соответствующих фазовых состояний. Так, варьирование состава позволяет оценить диапазон термодинамической стабильности фазового состояния дисперсии. Теоретически обосновано и отображено на фазовой диаграмме, что глобулярный белок может иметь и нижнюю, и верхнюю критические температуры смещения (НКТР и ВКТР). Обсуждаются закономерности возникновения фазовых переходов типа



жидкость-жидкость в дисперсии при существовании как одного, так и двух нативных конформеров белка в физиологической области температур.

Установлены особенности фазовой диаграммы сывороточного альбумина как системы с замкнутой фазовой диаграммой, в которой НКТР меньше, чем ВКТР). При этом две жидкие фазы сосуществуют в замкнутой области в физиологическом диапазоне температур [7] (около 15-50 °С, в зависимости от концентраций и типа солей, концентрации и типа осмолитов), а при нагревании и охлаждении дисперсии равновесие исчезает в результате ФП L-L. Предполагается, что такие закономерности возникновения фазовых переходов характерны для белковых систем, способных иметь не менее двух стабильных нативных конформеров в физиологической области температур, один из которых доминирует при пониженных, а другой при повышенных температурах. При этом в зависимости от температуры, доминирующий конформер создает основную жидкую фазу, в которой диспергированы микрофазы или кластеры, содержащие второй конформер. Равенство химических потенциалов конформеров белка, обеспечивающее фазовое равновесие, в этом случае обеспечивается дополнительным давлением Лапласа в микрофазах или кластерах при одинаковом внешнем давлении.

1. Nyman A.A., et al., Liquid-Liquid Phase Separation in Biology // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2014. V.30, P.39.
2. Vekilov P.G., Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions. // J.Phys.: Cond.Matter. 2012. 24. 193101.
3. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Thermodynamic study of protein phases formation and clustering in model water-protein-salt solutions. //Biophys.Chem. 2010. V.151 (1-2). P.22.
4. Рожков С.П., Кяйвярайнен А.И. Изучение гибкости молекул сывороточного альбумина методом спиновой метки // Биофизика. 1985. Т.30. №5. С.772.
5. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Effects of inorganic salts on the structural heterogeneity of serum albumin solutions // Eur. Biophys. J. 2000. V.28. N8. P.639-647.
6. Rozhkov S.P. Phase transitions and precrystallization processes in a water-protein-electrolyte system. // J. Cryst.Growth. 2004. V. 273(1-2), P.266.
7. Bian L, et al. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous solution by reversed-phase liquid chromatography.// Biomed. Chromatogr. 2014; V.28. P. 295.



## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА СТРУКТУРУ СЫВОРОТОЧНЫХ АЛЬБУМИНОВ В РАСТВОРЕ EFFECT OF METAL IONS ON THE STRUCTURE OF SERUM ALBUMINES IN SOLUTIONS

*Романов Н.М.<sup>1</sup>, Баранова Ю.Г.<sup>1</sup>, Поляничко А.М.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, nikmromanov@gmail.com

Сывороточный альбумин (СА) является одним из самых распространенных транспортных белков в плазме млекопитающих [1]. В пространственной структуре сывороточных альбуминов выделяют три повторяющихся консервативных домена, в которых выделяют четыре основных сайта связывания с ионами металлами: N-концевой сайт, Cys34 связывающий сайт (домен IA), мульти-металлический сайт A (находится на стыке первого и второго домена), мульти-металлический сайт B. Также существуют специфические сайты связывания для некоторых металлов [2].

В данной работе изучалось взаимодействие ионов двухвалентных металлов кальция, магния, марганца и меди с бычьим и человеческим сывороточными альбуминами.

Для изучения изменения вторичной структуры СА при взаимодействии с ионами металлов использовалась ИК Фурье спектроскопия. Анализировалась полоса Амид I, которая является суперпозицией колебаний карбонильной группы пептидной связи разных вторичных структур. Декомпозиции полосы Амид I позволяет различить в составе белка 5-7 подтипов вторичной структуры [3]. Для анализа формы и размеров молекул сывороточного альбумина и его комплексов с ионами двухвалентных металлов в работе использовался метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР).

В работе было показано, что при взаимодействии с ионами меди происходит сильное изменение вторичной структуры, что, вероятнее всего, происходит в результате взаимодействия иона меди с N-концевым сайтом связывания, который находится в неструктурированной области и не конкурирует с жирными кислотами. Данное взаимодействие вызывает димеризацию белка.

Похожий механизм взаимодействия можно предположить и с ионами марганца, предположительно, со вторым специфичным сайтом связывания. Вероятно, этот сайт связывания расположен также вне структурных доменов.

В присутствии жирных кислот, вторичная структура белка при большом избытке ионов кальция и магния в растворе сохраняется. Данный факт указывает на то, что изменение вторичной структуры сывороточного

альбумина человека при большом избытке ионов меди и марганца не является результатом изменения ионной силы раствора.

В ходе работы была использована экспериментальная установка ДИКСИ в национальном исследовательском центре «Курчатовский Институт».

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №18-08-01500). Часть работ была выполнена с использованием оборудования научного парка СПбГУ («Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и наноэлектроники», «Нанотехнологии», «Криогенный отдел»).

- [1] Вуязз А., “Structures of bovine, equine and leporine serum albumin // Acta Crystallogr. D68, pp. 1278, 2012.  
[2] Fanali G. et al. Molecular Aspects of Medicine Human serum albumin : From bench to bedside // Mol. Aspects Med., vol. 33, no. 3, pp. 209–290, 2012.  
[3] J. Kong and S. Yu, Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures //Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)., vol. 39, no. 8, pp. 549–559, 2007.

## РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО КАРДИТОКСИНА S-ТИПА ИЗ ЯДА КОБРЫ *N. NAJA*

### X-RAY STUDY OF NEW CARDIOTOXIN S-TYPE FROM *N. NAJA* COBRA'S POISON

Дубова К.М.<sup>1,2</sup>, Самыгина В.Р.<sup>1,2</sup>, Буренков Г.<sup>3</sup>, Дубовский П.В.<sup>4</sup>, Уткин Ю.Н.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>НИЦ «Курчатовский Институт, Москва, Россия

<sup>3</sup>Европейская Молекулярно Биологическая Лаборатория, Гамбург, Германия

<sup>4</sup>ИБХ им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Кардиотоксины из кобры представляют из себя амфифильные «трехпальцевые» (петли L1-L3) основные цитолитические полипептиды (длиной 59-61 остатка), связывание с клеточными мембранами которых приводит к различным последствиям. К ним относятся деполяризация и некроз сердца и скелетных мышц, лизис крови и эпителиальных клеток, стимуляция токсичности в корковых нейронах и различных типах раковых клеток. Кардиотоксины на основании активности связывания с цвиттер-ионными мембранами разделяют на два типа: P-тип (содержащие Pro в 30 положении) и S-тип (содержащие Ser в 28 положении), из которых кардиотоксины P-типа взаимодействует с мембранами активнее, чем S-тип. Используя гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию и ВЭЖХ с обращенной фазой, нами были выделены несколько кардиотоксинов из яда кобры *Naja Naja* и с помощью масс-спектрометрии проведён анализ их аминокислотной последовательности. Наиболее распространённым оказался S-тип, аналог L48V49 CX3 (P24780) *N. naja*. В настоящей работе методом рентгеноструктурного анализа была установлена его трёхмерная структура. Кристаллы кардиотоксина 16-1, принадлежащие к пространственным группам C222<sub>1</sub> и P6<sub>4</sub>22, выращивали методом диффузией в парах или встречной диффузии. Дифракционные наборы данных были собраны с использованием синхротронного излучения. Структуры гексагональной (с тремя молекулами в асимметричной ячейке) и ромбической (с шестью молекулами в асимметричной ячейке) кристаллических форм были решены при 2,3 и 2,5 Å соответственно. Рентгеноструктурный анализ выявил необычную конформацию функциональной петли L2 во всех субъединицах гексагональной структуры и в пяти субъединицах ромбической формы, тогда как в остальных моделях обнаруживается структура, о которой сообщалось ранее. Заметное отличие определено в конформации петли L2 в структурах обеих кристаллических форм, которая соответствует конформации, обнаруженной с помощью ЯМР в цитотоксине I, связанном с додецилфосфохолином, из *N. oxiana*. Таким образом, впервые методом рентгеноструктурного анализа мы получили мембраносвязанную форму кардиотоксина S-типа.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН и в рамках Федеральной космической программы 2016-2025 (МКС «Наука»).

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ И МОРФОЛОГИЯ PML-ТЕЛЕЦ, ОБРАЗОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ИЗОФОРМАМИ PML, В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ U2OS

### LOCALIZATION AND MORPHOLOGY OF PML-BODIES FORMED BY DIFFERENT PML ISOFORMS IN U2OS CELL LINE

Силонов С.А., Шпиринок О.Г., Фонин А.В., Кузнецова И.М.<sup>1</sup>, Туроверов К.К.<sup>1</sup>

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, silonovsa25@yandex.ru

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, kkt@incras.ru

Известно, что у раковых клеток нарушен процесс нормального клеточного деления и это приводит к их неограниченному росту. На сегодняшний день обнаружено два основных пути, по которому раковые клетки поддерживают длину теломерной ДНК постоянной. Первый путь связан с активацией теломеразы, второй - с процессом альтернативного удлинения теломер (ALT). Установлено, что встречаемость ALT составляет примерно 15% среди всех онкологических заболеваний, при этом ALT существует практически только в раковых клетках. Стоит отметить, что ALT-положительные клетки хуже поддаются химиотерапии по сравнению с опухолевыми клетками, обладающими теломеразной активностью. Кроме того, при терапевтическом подавлении теломеразной активности, опухолевые клетки могут переключать механизм удлинения теломер на ALT. К злокачественным опухолям с высокой встречаемостью ALT относятся: остеосаркома - 64%, гистиоцитома - 62%, фиброзная леймиосаркома - 58%, MSI-H рак желудка - 57%, нейроэндокринная опухоль поджелудочной железы - 53%, астроцитомы - 42%, нейробластома - 34%, глиобластома - 28% [1]. Соответственно, разработка способов ингибирования ALT является перспективным способом борьбы с агрессивными и трудно поддающимися лечению в настоящее время формами онкологических заболеваний. В последние годы появляется все больше работ по изучению ALT и выясняются детали этого процесса [2].

Одной из характерных особенностей ALT является формирование PML-телец (PML-NB) ассоциированных с процессом альтернативного удлинения теломер (ALT-ассоциированными PML-NB, APB). Показано, что разрушение APBs способствует укорочению теломер, что позволяет рассматривать эти немембранные органеллы в качестве потенциальной терапевтической мишени для подавления ALT, а, следовательно, и для терапии онкологических заболеваний. Известно, что APBs содержат все изоформы PML, белки SP100 и SUMO, теломерную ДНК, белки шелтерина (TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 и Rap1), а также белки репарации ДНК (MRE11, RAD50, NBS1 и 53BP1). Несмотря на большое количество исследований в этой области, факторы, определяющие сборку/разборку APBs, и молекулярные механизмы их функционирования остаются малоизученными [3].

Изучена морфология, локализация и динамика APBs, сформированных семью изоформами PML (I-VII), слитых с зеленым EGFP, в ALT-положительных клетках U2OS (остеосаркома человека). Установлено, что морфология наблюдаемых телец существенно зависит от их локализации и каркасной изоформы PML. Продемонстрированы основные трудности использования флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP) для изучения подвижности молекул изоформ PML в составе APBs и динамики самих немембранных органелл. В дальнейшем предполагается исследовать формирование APBs различными изоформами PML в условиях нокаута эндогенного PML.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного фонда, грант РФФ № 19-15-00107 (рук. К.К. Туроверов).

1. De Vitis M., Berardinelli F., Sgura A. Telomere length maintenance in cancer: At the crossroad between telomerase and alternative lengthening of telomeres (ALT) // International journal of molecular sciences. 2018. Vol. 19. P. 606.
2. Chang H. R. et al. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2018. Vol. 809. P. 99-107.
3. Guan D., Kao H. Y. The function, regulation and therapeutic implications of the tumor suppressor protein, PML // Cell & bioscience. 2015. Vol. 5. P. 60.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА HOF1 С АКТИНОВЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ

### INTERACTION OF HOF1 PROTEIN WITH ACTIN FILAMENTS

Станишинева-Коновалова Т.Б., Вахрушева А.В., Соколова О.С.

МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва

Асимметричное деление играет важную роль в многих процессах жизнедеятельности организма, в том числе в обновлении и дифференциации стволовых клеток, миграции эндотелиальных клеток и ангиогенезе. В качестве модельного объекта для изучения асимметричного деления часто используются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. В начале асимметричного деления дрожжевой клетки на её поверхности образуется выступ, от которого протягиваются актиновые филаменты, нужные для транспорта веществ в дочернюю

клетку. Белок Hof1 располагается в области шейки формирующегося выступа и выполняет несколько функций в процессе деления. Hof1 состоит из нескольких доменов, в том числе N-концевого F-BAR-домена. F-BAR-домены обычно выступают в качестве мембранно-связывающих модулей, взаимодействуя с отрицательно заряженными липидами. Однако, ранее нами было показано, что F-BAR-домен Hof1 обладает ещё одной активностью: он связывается с форминем Vnr1 вблизи его актин-связывающего сайта и таким образом ингибирует полимеризацию актиновых филаментов [1]. Это ингибирование необходимо на определённых этапах деления для правильной организации актиновых филаментов, а у линии дрожжей с делецией hof1 наблюдались нарушения в их направлении и структуре. Кроме этого, Hof1 играет роль в цитокинезе, участвуя в организации акто-миозинового кольца и септы [2]. Было показано, что Hof1 взаимодействует с актином и септинами напрямую, но пока это взаимодействие изучено мало. В данной работе мы с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии изучали организацию Hof1 на актиновых филаментах.

Образец с белками Hof1 и филаментами наносился на сетки, окрашивался 1.5% раствором уранилацетата, затем сетки просматривались в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100. Съёмка изображений проводилась в режиме низкой дозы электронов (<60 электронов на Å<sup>2</sup>), при дефокусе <1 мкм и увеличении 40000. Было снято несколько десятков микрографий актиновых филаментов, декорированных Hof1. Обработка изображений, сборка отдельных частиц и их классификация проводились в программах EMAN2 и Relion-3.0. В результате был описан способ организации Hof1 на актиновых филаментах и показано, что F-BAR-домен связывается с ними дистальными участками.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-2614.2018.4.

[1] M. V Garabedian, T.S. Konovalova, C. Lou, T.J. Rands, L.W. Pollard, O.S. Sokolova, B.L. Goode, Integrated control of formin-mediated actin assembly by a stationary inhibitor and a mobile activator, *J. Cell Biol.* 217 (2018) 3512–3530.

[2] Y. Oh, J. Schreiter, R. Nishihama, C. Wloka, E. Bi, Targeting and functional mechanisms of the cytokinesis-related F-BAR protein Hof1 during the cell cycle., *Mol. Biol. Cell.* 24 (2013) 1305–20.



## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОЛЛАГЕНОВ ЖИВОТНОГО И РЫБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ COMPARATIVE EVALUATION OF COLLAGEN OF ANIMAL AND FISH ORIGIN

*Антипова Л.В., Антипов С.С.<sup>1,2,3</sup>, Чупахин Е.Г.<sup>1</sup>, Сторублевцев С.А.<sup>4</sup>*

Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж, *c1111983yandex.ru*

<sup>1</sup> Балтийский федеральный университет им. И.Канта, г. Калининград

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино

<sup>3</sup> Воронежский государственный университет, г. Воронеж

<sup>4</sup> Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж

Современный уровень знаний структуры, биологических функций и свойств коллагеновых белков свидетельствует об их уникальности и чрезвычайной распространенности на различных уровнях жизненной организации. Фундаментальные исследования коллагеновых белков животного происхождения привели к прорыву в биомедицинской практике, лечении тканевых ран, получении медицинских средств и специального питания для коррекции физиологических состояний, а так же в косметологии для омоложения, поддержания эстетических эффектов и лечения последствий пластических операций [1,2]. Мировой опыт производства препаратов и средств коллагеновой природы базируется на использовании гольевого спилка шкур крупного рогатого скота, получаемого при переработке сельскохозяйственных животных. Падение объемов российского производства мяса, известная ситуация с распространением бешенства животных в европейских странах, санкции ЕЭС в отношении России создали весьма неблагоприятные условия для реализации производства таких биологических препаратов. В тоже время появились сведения [1,2] о чрезвычайно важных свойствах коллагеновых белков рыбного происхождения и перспективах их применения в альтернативных биомедицинских технологиях. Поэтому цель исследований состояла в выделении и идентификации коллагенов гидробионтов и исследовании структурных особенностей и свойств этих объектов в сравнении с коллагенами животных, полученных из гольевого спилка крупного рогатого скота.

В ходе экспериментальных исследований в качестве объектов исследования использовали шкуру толстолобика. Коллагеновые рыбные дисперсии получали в лабораторных условиях по разработанной нами технологии и определяли общий химический состав, фракционный состав белков на основании их растворимости по методам [3]. Электрофоретическую подвижность и молекулярную массу определяли электрофоретически. При выделении коллагеновых белков рыбные шкуры подвергали перекисно-щелочной обработке, диспергированию в присутствии уксусной кислоты и использовали в дальнейших исследованиях. Результаты показали, что коллагеновые субстанции отличаются лишь по содержанию оксипролина – структурного признака животных коллагенов: 0,75% - в образце рыбного происхождения 1,75% – в образце

животного происхождения. При близком значении массовой доли сухих веществ это указывает на вероятные отличия в структуре белков.

Сравнительный анализ фракционного состава белков субстанций свидетельствует, что объекты имеют отличия в электрофоретической подвижности фракций: для коллагенов из спилка крупного рогатого скота характерна миграция фракций в области свыше 212 кДа. Имеются фракции, мигрирующие в области, соответствующей диапазону 66-212 кДа, что может быть связано с наличием минорных компонентов и сопутствующих белков. Судя по интенсивности окраски и ширине полос, их содержание незначительно. Это указывает на то, что даже в условиях денатурирующего электрофореза основную массу составляют высокомолекулярные белки, для которых не характерна субъединичная структура. Для образца, полученного из рыбной шкуры, так же наблюдается миграция мономеров в высокомолекулярной области, однако количество этих фракций значительно меньше. Основная часть белков этого объекта мигрирует в области 212 кДа, присутствует большое количество фракций в области от 45 до 212 кДа. Это свидетельствует, вероятно, о том, что структура рыбного коллагена стабилизируется менее прочными связями, либо, как в принципе, в своем составе имеет более низкомолекулярные фракции. Аналогичные результаты показаны польскими учеными [4], доказавшими, что рыбные коллагены ограничиваются структурой тропоколлагенов и поэтому легко проникают в дермальные слои кожи, оказывая биологически мощное воздействие.

Данное исследование было поддержано из средств субсидии, выделенной на реализацию Программы повышения конкурентоспособности БФУ им. И.Канта.

1. Антипова, Л. В. Коллагены: источники, свойства, применение /Л. В. Антипова, С.А. Сторублевцев / Воронеж: ВГУИТ. – 2014.-525 с.
2. Антипова, Л.В. Шкуры рыб - как объект для получения коллагеновых субстанций [Текст] Научная конференция хранительная наука, техника и технологии Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев, М.В. Бобрешова / Научитрудове Университет по хранительной технологии Пловдив Том LIX. - Volume LIX. – 2012. – С.976-978.
3. Антипова Л.В. Методы исследования мяса и мясопродуктов [Текст]: учебное пособие /Л.В. Антипова, И. А. Глотова, И.А. Рогов. - М.: Колос, 2004. – 571 с.
4. Батечко С.А., Ледзевиров А.М. Коллаген «Invitaskinbeauti» Новая стратегия восстановления здоровья. - Одесса: «Хоббит плюс», 2007. -224 с.

## РОЛЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ЭФФЕКТЕ ВЯЗКИХ СРЕД С ГЛИЦЕРИНОМ И САХАРОЗОЙ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ РЕАКЦИЮ БАКТЕРИЙ

### THE ROLE OF SPECIFIC INTERACTIONS IN THE EFFECT OF VISCOUS MEDIA WITH GLYCEROL AND SUCROSE ON THE BIOLUMINESCENT REACTION OF BACTERIA

**Л.А. Суковатый, А.Е. Лисица<sup>1</sup>, Е.В. Немцева<sup>1,2</sup>,**

Сибирский федеральный университет, Красноярск, lev4322@gmail.com

<sup>1</sup> Сибирский федеральный университет, Красноярск

<sup>2</sup> Институт биофизики СО РАН, Красноярск

Во внутриклеточных условиях (*in vivo*) ферментативные реакции протекают под влиянием многих факторов, которые, как правило, не учитываются при стандартных биохимических исследованиях ферментов (*in vitro*). В частности, вязкость внутриклеточной среды может превышать вязкость буферных растворов (воды) в 2-15 раз, в зависимости от типа клеток и их физиологического состояния [1]. Механизмы влияния вязкости на биохимические реакции не ограничиваются замедлением диффузии субстратов и ферментов, но также включают изменение структурно-динамических характеристик белков, что сказывается на их активности. Помимо общего эффекта вязкости, компоненты сред могут оказывать специфическое воздействие на ферментативную реакцию, связанное с особенностью их химического строения. Целью данной работы было определить с помощью метода молекулярной динамики (МД) роль взаимодействия между молекулами фермента и вязкого соразтворителя в эффекте, производимом вязкими средами на активность бактериальной люциферазы.

**Материалы и методы.** Для молекулярно-динамического расчета была использована кристаллическая структура бактериальной люциферазы *V. harveyi* (BLuc, PDB ID:3FGC). Молекулу люциферазы размещали в трехмерный бокс с условиями периодической границы, содержащий воду и некоторое количество молекул сахарозы (PDBChem ID:SUC) и глицерина (PDBChem ID:GOL), соответствующее концентрации 10, 20, 30, 40 w%. Подготовка систем, релаксация и вычисление МД в течение 40 нс были проведены с помощью программного обеспечения GROMACS 5.1.4. Для описания параметров взаимодействия между атомами использовали силовое поле CHARMM36.

Экспериментально эффект вязких сред (10-40 w% сахарозы или глицерина) был определен методом остановленного потока с помощью анализатора SX-20 (Applied Photophysics). Кинетику биолюминесценции регистрировали после смешивания люциферазы *P. leiognathi* (ИБФ СО РАН, Красноярск) с деканалем (Sigma) и флавинмононуклеотидом (FMN, Sigma), предварительно восстановленным фотохимическим методом.

**Результаты.** Нестационарная кинетика реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, была зарегистрирована в средах с повышенной вязкостью, содержащих различное количество глицерина или сахарозы. Помимо замедления кинетики установлено, что повышение вязкости среды приводит к уменьшению (до двухкратного) относительного квантового выхода биолюминесцентной реакции в средах с глицерином, чего не наблюдается в средах с сахарозой.

На основе полученных молекулярно-динамических траекторий было проанализировано распределение молекул соразтворителей и воды на расстоянии 3 Å (первый гидратационный слой) от поверхности белка. Молекулу растворителя включали в счет, если атом, где находится центр ее масс (O – для воды, O2 и O11, для молекул глицерина и сахарозы, соответственно), попадает в выбранный радиус. Было получено, что для систем с 10, 20, 30 и 40 w% соразтворителя среднее количество молекул глицерина в радиусе 3 Å от поверхности люциферазы составляет 31±5, 58±7, 87±8 и 102±9 шт., в то время как для систем с сахарозой это количество составляет 1±1, 3±1, 3±2 и 5±2 шт., соответственно. По полученным результатам был сделан вывод, что среды с глицерином оказывают больший эффект в нарушении структуры гидратной оболочки белка, чем среды с сахарозой. Кроме того, была проведена оценка доступности сайта связывания FMN для молекул глицерина и сахарозы в течение последних 20 нс симуляции. Атом серы остатка αCys106 был выбран в качестве центра сферы радиусом 8 Å для оценки количества молекул в сайте связывания FMN. В данную область попадают все аминокислотные остатки, отвечающие за взаимодействие люциферазы с данным субстратом. Показано, что молекулы глицерина имеют доступ к данной области при всех промоделированных концентрациях, а при концентрации 40 w% они присутствуют в течение 100 % времени. В то же время, ни одна молекула сахарозы не была обнаружена в исследуемой области, не зависимо от концентрации сахарозы в боксе.

Наблюдаемая низкая доступность поверхности белка и центра связывания FMN в активном центре для молекул сахарозы может быть объяснена стерическими ограничениями и меньшим количеством молекул сахарозы в системе в целом. В тоже время, молекулы глицерина, имея меньший размер, способны проникать в различные области в структуре люциферазы, в том числе и функционально важные, которые недоступны для сахарозы. Это может объяснить экспериментально обнаруженный факт уменьшения квантового выхода биолюминесцентной реакции в вязкой среде с глицерином, не наблюдаемый в растворах с сахарозой [2].

1. Пучков Е. О. Внутриклеточная вязкость: методы измерения и роль в метаболизме // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии, 2014, Т. 31, Номер 1, С. 3-13.
2. Суковатый Л. А., Деева А. А., Немцева Е. В. анализ влияния растворов сахарозы и глицерина на структуру бактериальной люциферазы методами молекулярной динамики // Материалы международной студенческой конференции: Проспект свободный, 2018, С. 572-575.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С КАТЕХИНАМИ

### STUDY OF CATECHINS INTERACTION WITH HUMAN SERUM ALBUMIN

***Танковская С. А., Акоюн Т. В., Пастон С. В.***

*Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская набережная 7-9, Санкт-Петербург, 199034, Россия (tasva-ara1@yandex.ru)*

Катехины являются растительными полифенольными соединениями, которые представляют собой один из классов флавоноидов. Бобы, черный виноград, груши и шоколад содержат их в довольно большом количестве [1]. Также они содержатся в чае, который употребляется во всем мире. Стереоизомеры катехин и эпикатехин, а также эпигаллокатехин галлат являются представителями семейства катехинов. Они оказывают благотворное влияние на здоровье человека при профилактике и лечении различных заболеваний, таких как рак, болезни сердца, диабет, нейродегенеративные заболевания. Эти активные соединения обладают антиоксидантным, противовоспалительным, противовирусным и антимикробным действием [2]. Структура катехинов предполагает возможность связывания с ферментами и другими белками.

Сывороточный альбумин человека (САЧ) является главным транспортировщиком различных низкомолекулярных лигандов в плазме крови. Его связывание с лекарственными препаратами играет значительную роль в их доставке к тканям организма. Понимание механизмов взаимодействия САЧ с катехинами может помочь разработать методы более эффективного терапевтического использования катехинов.

В ходе работы были исследованы конформационные переходы САЧ в растворах с различной концентрацией катехина, эпикатехина и эпигаллокатехин галлата методами УФ спектроскопии поглощения и флуоресцентной спектроскопии, ИК-Фурье спектроскопии, спектрофотометрического плавления и др. Обнаружены изменения в спектрах ИК и УФ поглощения альбумина в растворах, содержащих катехины, что свидетельствует о комплексообразовании белка с исследуемыми соединениями. В присутствии катехинов наблюдается рост содержания  $\alpha$ -спиралей и снижение количества  $\beta$ -листов во вторичной структуре белка.

Часть работы выполнена с использованием оборудования ресурсного центра оптических и лазерных методов исследования вещества (РЦ ОЛМИВ) научно-исследовательского парка Санкт-Петербургского государственного университета.

1. Z. Durackova, S. Knasmuller, The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy, Slovak Academic Press, Bratislava, 2007.

2. L. Trnkova, I. Bousova, V. Stankova, Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques, Journal of Molecular Structure 985 (2011) 243–250.

3. Kong J., Yu Sh.. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 39, p.549 (2007).

## ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ И ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

## INFRARED SPECTROSCOPY OF BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA AND CHRONIC LYMPHOLEUCOSIS

*Тельная Е.А.<sup>1</sup>, Плотникова Л.В.<sup>1</sup>, Гарифуллин А.Д.<sup>2</sup>, Кувшинов А.Ю.<sup>2,3,4</sup>, Волошин С.В.<sup>2,3,4</sup>, Поляничко А.М.<sup>1</sup>.*

1. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. serlina1624@gmail.com

2. ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, Санкт-Петербург, 191024, ул. 2-Советская, 16.

3. Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044, ул. Академика Лебедева, 6.

4. ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, 191015, ул. Кирочная, 4

Множественная миелома (ММ) – онкогематологическое заболевание, распространенное по всему миру. Случаи заболевания множественной миеломой составляют около 10% случаев возникновения онкогематологических и 1% от всех онкологических заболеваний в целом. Данное заболевание сопровождается гиперпродукцией моноклональных иммуноглобулинов и сокращением числа альбуминов в крови. Еще одно онкогематологическое заболевание – хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), сопровождающееся накоплением атипичных В – лимфоцитов. Среди белков сыворотки крови преобладают сывороточный альбумин и иммуноглобулины. Во вторичной структуре сывороточного альбумина человека преобладают  $\alpha$ -спиральные участки. Для иммуноглобулина характерно наличие большого количества  $\beta$ -слоистых фрагментов. Параметры вторичной структуры смеси белков в сыворотке определяются в основном параметрами вторичной структуры альбумина и иммуноглобулинов. При изменении содержания данных белков в сыворотке происходит изменение содержания и основных типов вторичных структур белков. В рамках работы проведен сравнительный анализ ИК-спектров сыворотки крови пациентов с диагностированными онкогематологическими заболеваниями (ММ и ХЛЛ) и здоровых доноров.

Для определения вторичной структуры белков в составе сыворотки крови был выбран метод ИК – спектроскопии. Данный метод позволяет анализировать информацию о содержании таких типов вторичных структур как  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -слои параллельные и антипараллельные,  $\beta$ -повороты,  $3_{10}$ -спирали, неупорядоченные участки и другие. Также для использования данного метода приемлема концентрация белков сыворотки крови, и не требуется дополнительной пробоподготовки образца, которая может повлиять на структуру белков. Для получения информации о вторичной структуре анализируется полоса поглощения белка – Амид I (1600-1700  $\text{см}^{-1}$ ). Данная полоса представляет собой суперпозицию нескольких составляющих её спектральных полос, соответствующих различным типам вторичных структур. Положение этих составляющих определялись по минимумам второй производной спектра ИК поглощения. Доля площади, занимаемая каждой полосой от площади полосы Амид I, соответствует вкладу данного типа вторичной структуры в общей структуре белков.

При работе в водном растворе в спектре присутствует полоса поглощения воды в диапазоне 1500-1700  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая деформационным колебаниям в молекуле воды. Данная полоса перекрывается с полосой поглощения Амид I, что мешает корректной интерпретации данных. Один из способов избавиться от вклада воды это произвести замещение растворителя на  $\text{D}_2\text{O}$ , со смещением окна прозрачности. Второй способ – это использование метода нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), который позволит произвести корректное вычитание растворителя. В работе исследовали три группы образцов: здоровые доноры, больные

ММ и больные ХЛЛ. В работе был проведен анализ спектров и сравнение полученных параметров вторичных структур для всех трех групп. Результаты, полученные с использованием НПВО и при замещении  $H_2O$  на  $D_2O$ , сравнивались между собой.

Анализ спектров выявил, что для здоровых доноров характерно преобладание  $\alpha$ -спиральных участков в белках сыворотки крови. Для больных ММ, во вторичных структурах белков сыворотки наблюдалось увеличение доли  $\beta$  – слоев на 6-9% и сокращения доли  $\alpha$  – спиралей на 8-16% по сравнению со здоровыми донорами. Подобные изменения наблюдаются и при анализе спектров, полученных как с использованием метода НПВО, так и при изотопном замещении растворителя. Для проб сыворотки крови больных ХЛЛ и здоровых доноров не было выявлено значительных отличий.

По результатам данной работы можно сделать вывод, что метод ИК – спектроскопии позволяет регистрировать различия во вторичной структуре белков в составе сыворотки крови больных множественной миеломой и здоровых доноров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №18-08-01500). Часть работ была выполнена с использованием оборудования научного парка СПбГУ («Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и нанoeлектроники», «Нанотехнологии», «Криогенный отдел»).

## ДИНАМИКА БИОКРИСТАЛЛИЗАЦИИ У БАКТЕРИЙ DYNAMICS OF BIOCRYSTALLIZATION IN BACTERIA

*Терешкин Э.В., Лойко Н.Г.<sup>1</sup>, Терешкина К.Б., Зуйкова А.А., Чуличков А.Л., Коваленко В.В., Крупянский Ю.Ф.*

ИХФ РАН, Москва, gamm@mail.ru

<sup>1</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

Для защиты нуклеоида, бактерии прибегают к помощи особых ДНК-стабилизирующих белков. Так, ДНК-связывающие малые кислоторастворимые белки  $\alpha/\beta$ -типа и  $\gamma$ -типа (SASP) являются основным фактором устойчивости и долгосрочного выживания в виде эндоспор спорообразующих грамположительных бактерий родов *Bacillus*, *Thermoactinomyces* и *Clostridium*. Белки SASP защищают ДНК этих бактерий от повреждений, вызванных недостатком воды (пересыханием), солевым шоком, а также воздействием высоких температур, токсичных химических веществ, ферментативного расщепления или ультрафиолетового излучения [1]. При шоковых воздействиях у не образующих спор бактерий, задействуется особый механизм внутриклеточной нанокристаллизации, происходящий при участии ДНК-стабилизирующих белков DPS (DNA-binding proteins from starved cells) и их гомологов [2]. Было показано, что во время экспоненциальной фазы роста бактерий *E. coli* DPS является второстепенным компонентом нуклеоида, однако во время стационарной фазы его концентрация резко (до 300 раз) возрастает, пока DPS не станет преобладающим нуклеоид-ассоциированным белком, достигая 180000 молекул на бактериальную клетку. При этом происходит внутриклеточная кристаллизация нуклеоида с образованием нанокристаллов. Находясь в кристаллизованном состоянии, нуклеоид бактерий практически не подвержен никаким воздействиям и не может быть поврежден, что, по-видимому, создаёт серьёзные трудности при борьбе с бактериальными инфекциями, значительно увеличивая устойчивость бактерий к антибиотикам во время стационарной фазы роста.

В данной работе методами молекулярной динамики исследовано взаимодействие белков SASP бактерий *Bacillus cereus* и белков DPS бактерий *Escherichia coli* с ДНК. Рассмотрены структурные особенности этих белков, связанные со способностью аккумулировать ионы (белок DPS), химически защищая клетку бактерий, и образовывать кристаллы с ДНК (белки DPS и SASP), осуществляя физическую защиту. Приводятся результаты молекулярного моделирования исследования комплексов DPS-ДНК в условиях десольватации и увеличения концентрации ионов, а также структурно-динамических характеристик комплексов DPS и SASP в присутствии и отсутствии ДНК. Обсуждается возможное положение ДНК в кристаллах белка DPS, расшифрованных нами на станции ID23-1 синхротрона ESRF в 2017 году (PDB ID: 6GSM) [3-4]. Моделирование проведено методом молекулярной динамики с использованием крупнозернистых моделей (силовое поле MARTINI 2.1\_DNA) в программе Gromacs: выбран NPT ансамбль, температура 300K поддерживалась с помощью стохастического термостата; давление – с помощью термостата Парринелло-Рамана с постоянной времени 2 пс. Быстрые степени свободы ограничивались с помощью алгоритма LINCS. Радиусы обрезания для кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий брались равными 1.5 нм. Шаг интегрирования – 2фс, длины траекторий от 0.02 до 0.5 мкс [5]. Показано, что присутствие DPS стабилизирует структуру ДНК в условиях стрессовых воздействий. Обнаружено влияние ДНК на динамику образования нанокристаллов. Показано, какие положения ДНК являются энергетически выгодными в комплексах DPS и SASP. Найдены сайты связывания SASP-ДНК и DPS-ДНК, наиболее важные при образовании и стабилизации комплексов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Тема 0082-2014-0001, №



AAAA-A17-117040610310-6, Тема 0104-2019-0005). Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МСЦ РАН), проект СРН2. Авторы благодарят Европейский центр синхротронного излучения (European Synchrotron Radiation Facility) за предоставление возможности проведения экспериментов.

1. Lee K.S., Bumbaca D., Kosman J., Setlow P., Jedrzejak M.J. Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of *Bacillus* species // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. Vol. 105. No 8. P. 2806.
2. Almirón M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // *Genes Dev*. 1992. Vol. 6. No 12B. P. 2646.
3. Ю.Ф. Крупянский, Н.Г. Лойко, Д.О. Сеницын, К.Б. Терешкина, Э.В. Терешкин, И.А. Фролов, А.Л. Чуличков, Д.А. Бокарева, И.С. Мысякина, Ю.А. Николаев, Г.И. Эль-Регистан, В.О. Попов, О.С. Соколова, К.В. Шайтан, А. Попов Биокристаллизация в клетках и спорах бактерий и грибов // *Кристаллография*, 2018, 63 (4), 572-577
4. Loiko N., Kovalenko V., Tereshkin E., Krupyanskiy Y. Russian Grant Proposal: Study of the phenomenon of biocrystallization at the European Synchrotron Radiation Facility / ESRF Scientific report, 2018, [ftp://ftp.esrf.eu/pub/UserReports/61468\\_D.pdf](ftp://ftp.esrf.eu/pub/UserReports/61468_D.pdf)
5. Tereshkin, E., Tereshkina, K., Loiko, N., Chulichkov, A., Kovalenko, V., & Krupyanskii, Y. Interaction of deoxyribonucleic acid with deoxyribonucleic acid-binding protein from starved cells: cluster formation and crystal growing as a model of initial stages of nucleoid biocrystallization. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019, 37(10):2600-2607. doi: 10.1080/07391102.2018.1492458.

## ТРИ ДИНАМИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯ МИОЗИНА S1 ПО ДАННЫМ МЕТОДА СПИН-МЕТКИ В X- И W-ДИАПАЗОНАХ

### THREE DYNAMICAL STATES OF MYOSIN S1 BY SPIN LABEL MULTIFREQUENCY METHOD

*Тимофеев В.П., Ткачев Я.В.*

ИМБ РАН, Москва

Проведена расшифровка спектров ЭПР спин-меченого субфрагмента S1 миозина в трех динамических состояниях. Используемая процедура основывается на том, что попытка интерпретировать с помощью симуляции спектры ЭПР, записанные в виде первой производной спектра поглощения в X-диапазоне СВЧ (9 GHz), не имела бы большого окончательного успеха, поскольку эти спектры имеют вырожденный характер по многим параметрам при приемлемом совпадении (fitting) формы теоретического спектра с экспериментальным, и обязательном условии совпадения экстремумов крайних широких пиков (КШП) [2,3]. Но в случае наличия дополнительной информации в виде спектров ЭПР W-диапазона СВЧ (94 GHz), которые сильно отличаются по своей форме из-за большей разрешающей способности прибора, то при их симуляции в этом диапазоне можно с успехом проводить однозначное определение величин почти всех параметров. При этом необходимо добиться одновременного совпадения теоретических спектров с экспериментальными по главным экстремумам и интенсивностям пиков как в X-, так и W-диапазоне.

Спин-метка вводилась по SH-группе 707 головки миозина. Представлены шесть экспериментальных спектров ЭПР для трех образцов миозина: apoS1, adpS1 и adpVi, записанных при 20C на приборах X- и W-диапазонов. Расшифровка (симуляция) спектров проводилась с помощью программы S\_mult6.19 [1, 4, 5]. В этой версии программы время расчета одного спектра составляет не более 10 мсек.

Оказалось, что ЭПР спектры apoS1 and adpS1, слегка отличаясь в обоих СВЧ диапазонах, описываются одним набором динамических параметров (единственное состояние), в то время, как спектры adpVi показывают очень резкие отличия в обоих диапазонах. Если в X-диапазоне форма спектра только наводит на мысль о существовании двух состояний, то в W-диапазоне форма спектра явно показывает их наличие, и поэтому необходимо вводить второй набор динамических параметров для его корректного описания. Поэтому использование прибора W-диапазона оправдано, несмотря на сложность использования этого капризного прибора.

Необходимо отметить, что без учета влияния медленного движения, в котором участвует нитроксильный радикал, невозможно качественно симулировать спектр ЭПР. В миозине существует медленно релаксирующий домен, что в параметрах симуляции сказывается на временах корреляции. Релаксирующий домен белка определяется тремя компонентами времени корреляции. Как в образцах apoS1 и adpS1, которые имеют только одно состояние, так и в первом состоянии adpViS1, эти компоненты имеют величины  $\tau_X = \tau_Y = 80$  нс и  $\tau_Z = 40$  нс. В белке adpViS1 во втором состоянии релаксирующий домен имеет другие компоненты  $\tau$ :  $\tau_X = 23$  нс,  $\tau_Y = 80$  нс и  $\tau_Z = 50$  нс, резко отличающиеся от первого состояния. При этом вес первого состояния 0.2, а второго 0.8. Таким образом, оказывается в образце adpVi, миозин S1 переходит в другое состояние. Обсуждается функциональное значение трех динамических состояний головки S1 миозина.

1. Tkachev Ya.V. The general form of fast oscillation model and its consequences for nitroxide EPR spectra interpretation in biological systems // *EUROMAR Magnetic Resonance Conference*, 2009. Gothenburg, Sweden, July 5-9.
2. Shakirova L, Mikhailova V, Siletskaya E, Timofeev VP, Levitsky DI. Nucleotide-induced and actin-induced structural changes in SH1-SH2-modified myosin subfragment 1. *J Muscle Res Cell Motil.* 2007. Vol. 28. P. 67.
3. Ponomarev MA1, Timofeev VP, Levitsky DI. The difference between ADP-beryllium fluoride and ADP-aluminium-fluoride complexes of the spin-labeled myosin subfragment 1 // *Oxid Med Cell Longev.* 2016. Vol. 2016.
4. Yaroslav Tkachev and Vladimir Timofeev. Uniform EPR Spectra Analysis of Spin-Labeled Macromolecules by Temperature and Viscosity Dependences // *Nitroxides – Theory, Experiment and Applications*. Chapter 10. Ed. A.I. Kokorin. InTech, 2012.
5. Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю., Ткачев Я.В. Моделирование спектров ЭПР радикала ТЕМПО в водно-липидных системах в различных частотных диапазонах // *Биофизика*. 2011. Vol. 56. P. 420.

### **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРЯМЫХ АНТАГОНИСТОВ С АНДРОГЕНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ ЧЕЛОВЕКА: ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ АНТИАНДРОГЕНОВ IN SILICO МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.**

### **HUMAN ANDROGEN RECEPTOR INHIBITORS DIRECT ANTAGONISM PROBED BY MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS: PLATFORM FOR THE IN SILICO SEARCH OF NEW ANTIANDROGENS**

*Ткачев Я. В.<sup>1</sup>, Латышева А. С.<sup>2</sup>, Золотцев В. А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

<sup>2</sup>Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва

Андрогеновый рецептор (АР) играет важнейшую роль в сигнальных механизмах, управляющих ростом и пролиферацией клеток. Активность АР влияет на развитие таких патологий, как частичная или полная нечувствительность к андрогенам (PAIS/CAIS), рак предстательной железы (РПЖ), мышечные дистрофии и некоторые нарушения формирования нормального фенотипа. В терапии РПЖ АР является основной лекарственной мишенью, в связи с чем поиск его антагонистов является актуальной задачей, в особенности учитывая разнообразие его мутантных форм, невосприимчивых к существующим антагонистам канонической изоформы АР.

Связывание антагонистов с лиганд-связывающим доменом АР изучена сколь тщательно, столь и выборочно. В связи с резистентностью к бикалутамиду мутанта T877A, его комплексы с антагонистами изучены методом рентгеновской дифракции, однако структура комплекса рецептора с канонической последовательностью не установлена. Это затрудняет понимание молекулярных основ взаимодействия АР с антагонистами, а следовательно и возможность предсказания антагонистической активности новых соединений-кандидатов методом виртуального скрининга. Один из стероидных антагонистов АР, VN/124-1 (галетерон) обладает как прямым [1], так и непрямым (ингибирование CYP17A1) антагонизмом по отношению к АР (т.н. «мультитаргетный фармакофор»). Структура его комплекса с CYP17A1 известна (3SWZ), также предпринимались попытки моделирования структуры его комплекса с АР методом докинга [2].

Для моделирования взаимодействия лиганд-связывающего домена АР с галетероном и его аналогами, производными андроста-5,16-диена, в данной работе был использован метод молекулярной динамики (МД), который позволяет предсказывать физически достижимые конформации боковых групп аминокислотных остатков в сайте связывания. Для обработки результатов был использован набор статистических методов, при этом ориентация лиганда в сайте связывания описывалась тремя независимыми компонентами кватерниона вращения наиболее жесткой системы связанных атомов лиганда («якоря»), а его конформация – набором двугранных углов для описания внутренних степеней свободы. Данный метод подходит как для стероидных, так и нестероидных лигандов, и является в значительной степени универсальным. Докин исходных лигандов к различным кадрам траектории позволил получить набор модельных структур, из которых были отброшены модели с энергиями, превышающими минимальное ее значение более, чем на 4 ккал/моль. Полученный набор структур был классифицирован с помощью метода DBSCAN для определения наиболее часто встречающихся конформаций. Разработанный метод может служить платформой для поиска новых ингибиторов АР.

В качестве исходной была взята структура 2AM9, содержащая активатор АР тестостерон. Расчеты проводились с помощью Gromacs-2019 с использованием полноатомного потенциала CHARMM36 (модель воды – TIP3P) на рабочих станциях Xeon E5-1650v3, оснащенных GPGPU-ускорителями Nvidia Quadro. Для ускорения расчетов и увеличения выборки, при расчетах был МД степени свободы системы с высокими частотами переходов были зафиксированы с помощью введения виртуальных сайтов взаимодействия (v-sites), и установлен шаг интегрирования 5 фс, что позволило получать траектории длиной до 500 нс.

В результате было показано, что динамика боковых групп сайта связывания AR такова, что позволяет стероидным ингибиторам с массивной боковой группой в 17-м положении, к которым относится галетерон и представленные в данной работе его новые аналоги, сдвигаться в направлении остатка ARG752 вдоль длинной оси стероидного скелета. Такой сдвиг невозможен при докинге к кристаллической структуре AR, поэтому МД позволяет лучше понять механизм прямого антагонизма галетерона и сходных стероидных ингибиторов.

Проведенное моделирование показало значительное сходство галетерона и его новых рассмотренных аналогов в терминах прямого антагонизма AR. Было также установлено, что два из исследованных соединений обладают высокой антипролиферативной активностью в клетках карциномы LNCaP и PC-3.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-34-70023.

1. Vasaitis T. *et al.* Androgen Receptor Inactivation Contributes to Antitumor Efficacy of CYP17 Inhibitor VN/124-1 in Prostate Cancer. // *Mol. Cancer Ther.* 2008. Vol. 7. P. 2348.

2. Gianti E., Zauhar R.J. Modeling Androgen Receptor Flexibility: A Binding Mode Hypothesis of CYP17 Inhibitors/Antiandrogens for Prostate Cancer Therapy // *J. Chem. Inf. Model.* 2012. Vol. 52 P. 2670.

## КОМБИНАЦИЯ МЕТОДОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ВИРУСА ГРИППА А ДЛЯ ОЦЕНКИ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

### COMBINATION OF SAMPLE PREPARATION METHODS FOR INFLUENZA A VIRUS RECEPTOR SPECIFICITY ESTIMATION

*Торжкова П.Ю.<sup>1</sup>, Онхонова Г.С.<sup>1,2</sup>, Марченко В.Ю.<sup>1</sup>, Святченко С.В.<sup>1</sup>, Гудымо А.С.<sup>1</sup>, Рыжиков А.Б.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Высокая степень очистки образцов необходима в разных сферах биотехнологического производства и биокинетики. Так, например, метод поверхностного плазмонного резонанса, основанный на явлении полного внутреннего отражения, дает наиболее точные результаты с максимально очищенными образцами. Также процесс очистки и концентрирования вирусного компонента влияет на эффективность и реактогенность вакцинных препаратов. Применяющиеся в настоящее время технологические схемы включают комбинации нескольких методов, которые позволяют добиваться максимальной очистки вируса от яичного белка и различных компонентов клеток. Основным критерием пригодности и эффективности той или иной схемы очистки и концентрирования является степень чистоты и концентрирования вирусного антигена. Эффективность метода оценивают по выходу вируса, выраженному по проценту удаления балластных белков и нуклеиновых кислот. После осуществления процедур по очистке и концентрированию препарата вирусный компонент должен не только сохранять, но и повышать свои антигенные свойства, т.е. биологическую, иммуногенную, гемагглютинирующую, нейраминидазную активность, а также быть максимально свободным от балластных белков системы культивирования.

Для концентрирования вирусных суспензий и их частичной очистки используются ультрафильтрационные методы. Ультрафильтрация относится к баромембранным методам, в ходе которых перенос вещества через мембрану происходит благодаря градиенту давления. Принцип заключается в пропускании вирусной суспензии через установку, задерживающую вирусы и пропускающую молекулы примесей, путем разделения веществ с помощью полупроницаемых мембран. Успех ультрафильтрации зависит от суммарной проницаемости фильтров на единицу площади и применению принципа тангенциального потока. Одним из методов стерилизации вирусосодержащих материалов является микрофильтрация на основе использования мембранных фильтров с диаметром пор 0,20 мкм. Микрофильтрация осуществляется при низком давлении и служит для отделения коллоидных и взвешенных частицы размером 0,01-10 мкм.

Метод гель-хроматографии заключается в пропускании суспензии через колонку, заполненную пористым материалом. Вирусы проходят через колонку без задержки, а примеси задерживаются. Для заполнения колонки применяется макропористое стекло с диаметром пор порядка 100 нм, с удельной поверхностью 10-25 м<sup>2</sup>/г. Финальным этапом очистки проб является адсорбционная хроматография.

Таким образом, применение наиболее оптимального методического и технического решения для концентрирования и очистки вируса (антигена) от контаминантов систем культивирования и других технологических процессов позволяет исключить механические повреждающие воздействия на вирус, повысить эффективность очистки и выход продукта, уменьшить этапомкость и продолжительность процесса.

В результате комбинации нескольких методов были очищены и сконцентрированы различные штаммы вируса гриппа типа А, наработанные на развивающихся куриных эмбрионах. В ходе электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли была проверена чистота вирусных препаратов. Было подтверждено, что чистота полученных образцов соответствует требованиям, необходимым для исследования штаммов методом поверхностного плазмонного резонанса.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 13/19.

**ВЛИЯНИЕ НАДФ<sup>+</sup> НА СТАБИЛИЗАЦИЮ КОМПЛЕКСА ФД-ФНР. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

**EFFECT OF NADP<sup>+</sup> ON STABILIZATION OF THE FD-FNR COMPLEX: MOLECULAR DYNAMICS INVESTIGATION**

**Федоров В.А., Хрущев С.С., Дьяконова А.Н., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б.**

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, Москва, xbgth@yandex.ru

Перенос электрона по электрон-транспортной цепи фотосинтеза (ЭТЦ) приводит к образованию сильного восстановителя – НАДФН, необходимого для фиксации углерода в цикле Кальвина-Бенсона-Бассама. В реакции синтеза НАДФН участвуют три молекулы: НАДФ<sup>+</sup>, ферредоксин и ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктаза (ФНР). Ферредоксин служит конечным акцептором ЭТЦ фотосинтеза и передает электроны на ФНР, которая с их помощью восстанавливает НАДФ<sup>+</sup> до НАДФН. Этот процесс требует образования белок-белкового комплекса ферредоксин-ФНР. Мы исследовали методами броуновской и молекулярной динамики, как происходит это взаимодействие, и как наличие связанной с ФНР молекулы НАДФ<sup>+</sup> влияет на стабилизацию этого комплекса.

Для расчетов броуновской и молекулярной динамики была использована пространственная структура белка ферредоксина зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, полученная методом ЯМР в 2013 году, PDB ID: 2MH7, и структура белка ФНР *Zea mays*, полученная методом рентгеноструктурного анализа в 2016 году, PDB ID: 5H59. Расчеты броуновской динамики проводились при помощи разработанной нами программы ProKSim [1]. Молекулярно-динамические модели белков были созданы с использованием силового поля CHARMM27. С применением метода кластерного анализа результатов броуновского моделирования было выявлено два типа энергетически выгодных взаимных расположений ферредоксина в комплексе с ФНР с энергией электростатического притяжения не менее 10 *kT*. В обоих комплексах ферредоксин находится вблизи ФАДа, входящего в состав ФНР, и являющегося кофактором электронного транспорта. Центральные структуры выявленных кластеров были использованы в качестве начальных для расчетов методом полноатомной молекулярной динамики в явно заданном растворителе. Для оценки роли НАДФ<sup>+</sup> в стабилизации комплекса были созданы модели, в которых взаимные расположения белков соответствовали центральным структурам выявленных кластеров, а положение НАДФ<sup>+</sup> относительно ФНР было задано в соответствии с его положением в экспериментально полученной структуре ФНР цианобактерии *Nostoc* sp. (PDB ID: 1GJR). Для всех четырех моделей в процессе расчетов молекулярной динамики не происходило диссоциации комплексов. По результатам молекулярно-динамических расчетов одна из двух центральных структур кластеров была охарактеризована как непродуктивный комплекс, так как независимо от наличия НАДФ<sup>+</sup> расстояние между сопряженной π-системой ФАДа и Fe-S-кластером ферредоксина превышало 2 нм. Для другой центральной структуры наличие НАДФ<sup>+</sup> оказывало существенное влияние на динамику комплекса. В отсутствие НАДФ<sup>+</sup> расстояние между π-системой ФАДа и Fe-S-кластером превышало 1,5 нм, в то время как при его наличии устанавливался тесный контакт между ФАД и Fe-S-кластером и указанное расстояние уменьшалось до 0,7 нм. Мы предполагаем, что такое сближение способствует передаче электрона. Таким образом, эта структура может быть охарактеризована как предварительный комплекс, который может перейти в функционально активный только при наличии НАДФ<sup>+</sup>.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-00676А.

1. Хрущев С.С., Абатурова А.М., Дьяконова А.Н., Федоров В.А., Устинин Д.М., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование взаимодействий белков фотосинтетической электрон-транспортной цепи фотосинтеза методом броуновской динамики // *Биофизика*. 2015. Т. 60(2). С. 270–292.

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА КОМПЛЕКС БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

## INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE COMPLEX OF BOVINE SERUM ALBUMIN WITH GALLIC ACID

*Будкевич Р.О., Федорцов Н.М.*

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г.Ставрополь

Бычий сывороточный альбумин (БСА) принадлежит к группе сывороточных белков, является небольшим стабильным белком (66 кДа), содержится в коровьем молоке и крови. Сывороточные альбумины в молоке являются растворимыми белками с различными физиологическими свойствами [1]. Транспортная функция обусловлена способностью молекул обратимо связываться с большинством эндо- и экзогенных лигандов в крови [2]. Галловая кислота (ГК) относится к классу полифенолов, которые являются вторичными метаболитами растений и исполняют роль маркеров качества фруктов, овощей и самих растений [3].

Температурная обработка является важным инструментом пищевой промышленности. Термическое воздействие на бычий сывороточный альбумин свыше 64°C оказывает отрицательное влияние – приводит к его денатурации, влияет на агрегацию и образование различных окисленных форм [4], продуктов свободно-радикального окисления. Но фенольные соединения обладают хорошо известными свойствами обеспечивать защиту организма от оксидативного стресса и воздействия свободных радикалов [5], увеличивать термическую стабильность молекул [6].

Целью работы было исследование физико-химических свойств комплекса бычьего сывороточного альбумина и галловой кислоты (ГК+БСА) после термической обработки.

Исследования проводились на базе НИЛ «Нанобиотехнология и биофизика» Центра Биотехнологического Инжиниринга. Комплекс ГК+БСА был получен взаимодействием галловой кислоты в различных концентрациях (100-300 мг/л) с бычьим сывороточным альбумином в течение суток при 4°C.

Термическая обработка комплекса ГК+БСА проводилась в трех температурных диапазонах с различным временем выдержки образца – 62-65°C в течение 30 минут, 72-75°C в течение 30 секунд и 85-90°C без выдержки. Оценка свойств комплекса проводилась с использованием метода ИК-Фурье спектроскопии и потенциометрического метода определения антиоксидантной активности (АОА).

При исследовании комплекса ГК+БСА после термической обработки методом ИК-Фурье спектроскопии отслеживались изменения на основных полосах поглощения белка и те функциональные группы, которые могли вступить в реакцию Майяра. Это области амид I и II (1500-1700 см<sup>-1</sup>), продукты перегруппировки Амадори (C=O, 1743 см<sup>-1</sup> и C-O-C, 1020-1150 см<sup>-1</sup>), основания Шиффа (C=N, 1630-1690 см<sup>-1</sup>) и пиазины (C-N, 3000-3100 см<sup>-1</sup>) [7]. Изменения наблюдались только в области образования продуктов перегруппировки Амадори - увеличение интенсивности пика на длине волны 1077 см<sup>-1</sup>. Влияния различной температурной обработки в образце ГК+БСА не выявило изменения амидных полос, отвечающих за конформацию белка. Оценка изменения АОА образца БСА потенциометрическим методом в контрольном образце без добавления полифенолов составила 0,005±0,001 мг/л. Уровень АОА комплекса ГК+БСА без нагревания составил 28,5 мг/л, что достоверно отличалось от АОА контроля БСА. В комплексе ГК+БСА при концентрации ГК 300 мг/л показатели соответствовали при 62-65°C 1,38±0,1 мг/л, при 72-75°C 1,21±0,09 мг/л и при 85-90°C 1,33±0,05 мг/л эквивалента галловой кислоты соответственно. Достоверное снижение выявлено между АОА ГК+БСА после нагревания в сравнении с фоном ГК+БСА до тепловой обработки.

Таким образом, по данным ИК-Фурье спектроскопии конформация комплекса ГК+БСА при температурной обработке не претерпевает никаких изменений. Происходит увеличение интенсивности на полосе поглощения продуктов перегруппировки Амадори, указывая на начальную стадию реакции меланоидинообразования. Исследование комплекса бычьего сывороточного альбумина и галловой кислоты потенциометрическим методом показало снижение антиоксидантной активности после термической обработки во всех трех диапазонах температур.

1. Monaci L. et al. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review // *European Food Research and Technology*, 2006, Т. 223. № 2, pp. 149–179.
2. Gao H. et al. The study on the interaction between human serum albumin and a new reagent with antitumour activity by spectrophotometric methods // *J. Photochem. Photobiol*, 2004, 167, pp. 213–221.
3. Ignat I., Volf I., Popa V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables // *Food Chemistry*, 2011, № 4 (126), pp. 1821–1835.
4. Wu W., Clifford M., Howell N.K. The effect of instant green tea on the foaming and rheological properties of egg albumen proteins // *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, № 10 (87), pp. 1810–1819.
5. Ślusarczyk S., Hajnos M., Skalicka-Woźniak K., Matkowski A. Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz // *Food Chemistry*, 2009, № 1 (113), pp. 134–138.
6. Relkin P. Thermal Unfolding of β-Lactoglobulin, α-Lactalbumin, and Bovine Serum Albumin. A Thermodynamic Approach // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1996, № 6 (36), pp. 565–601.
7. Беккер Г. и др. Органикум. - М.: Мир, 1979, 2, 254.

**ЗНАЧЕНИЕ ЛИЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ ЦИТОХРОМА С ДЛЯ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ЭТОГО БЕЛКА С КАРДИОЛИПИНОМ**

**IMPACT OF LYSINE RESIDUES OF CYTOCHROME C ON THE PEROXIDASE ACTIVITY OF THE COMPLEX OF THIS PROTEIN WITH CARDIOLIPIN**

*А.М. Фирсов<sup>1</sup>, Р.В. Черткова<sup>2</sup>, Е.А. Котова<sup>1</sup>, Д.А. Долгих<sup>2</sup>, Ю.Н. Антоненко<sup>1</sup>*

1. НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы 1/40, Москва 119991, Россия; факс: +7(495)939-3181, электронная почта amfamf@yandex.ru

2. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, улица Миклухо-Маклая 16/10, Москва 117997, Россия

Известно, что при взаимодействии с кардиолипином мембран цитохром *c* превращается из переносчика электронов в пероксидазу. Положительный заряд молекулы цитохрома *c*, который определяет его связывание с отрицательно-заряженной мембраной, обеспечивается, в основном, остатками лизинов. Кластер положительно заряженных лизиновых остатков располагается на фронтальной стороне молекулы цитохрома *c* вокруг гемовой впадины и образует универсальный сайт связывания цитохрома *c*. Остатки лизина из этого кластера в разной степени вовлечены в формирование реакционноспособных комплексов с белками-партнерами цитохрома *c* - комплексами III [1] и IV [2] электрон-транспортной цепи митохондрий, Araf-1 [3] и другими.

В молекуле цитохрома *c* присутствует всего 19 лизиновых остатков. Основной вклад во взаимодействие с отрицательно заряженными сайтами его редокс партнеров по дыхательной цепи вносят остатки в положениях 8, 13, 72, 73, 86 и 87, тогда как остатки в положениях 5, 7, 25, 27, 79 и 88 находятся на периферии контактной поверхности и участвуют в связывании в меньшей степени [4-7]. С другой стороны, было показано, что лизин 79, наряду с лизинами 72 и 73 играет важную роль при связывании цитохрома *c* с кардиолипином мембран [8]. В настоящей работе было изучено влияние лизиновых остатков в положениях 8, 13, 72, 79, 86, 87 на связывание цитохрома *c* с кардиолипин-содержащей мембраной липосом и индукцию его пероксидазной активности.

Нами показано, что замены периферических лизинов в положениях 13, 86 и 87 приводят к значительной активации пероксидазной активности белка в условиях его связывания с кардиолипином мембраны. По всей вероятности, эти лизины участвуют в стабилизации структуры белка и их замена ведет к нарушению координации атома железа гема с метионином 80, которая определяет уровень пероксидазной активности белка. Важно отметить, что пероксидазная активность изученных мутантов цитохрома *c* в водном растворе оставалась очень низкой и не коррелировала с таковой в комплексе с кардиолипином. В работе также изучалась пермеабилizующая активность данных мутантов в системе кардиолипин-содержащих липосом. В целом индукция пермеабилizации достаточно хорошо коррелировала с пероксидазной активностью. При этом наблюдалось несколько заметных отклонений от данной корреляции, например, в случае мутантов K86E/K87E и K13E. По-видимому, данные лизины могут принимать участие не только в модуляции пероксидазной активности связанных с мембраной белков, но и непосредственно участвовать в процессе формировании белковой или белково-липидной поры.

1. Lange C., et al. Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome *c*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(5):2800-5.
2. Shimada S., et al. Complex structure of cytochrome *c*-cytochrome *c* oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode. EMBO J. 2017, 36(3):291-300.
3. Josephs TM., et al. Interspecies Variation in the Functional Consequences of Mutation of Cytochrome *c*. PLoS One. 2015, 10(6):e0130292
4. Rieder R., et al. Comparison of the binding sites on cytochrome *c* for cytochrome *c* oxidase, cytochrome bc1, and cytochrome c1. Differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome *c*. J Biol Chem. 1980, 255(10):4732-9.
5. Smith HT., et al. Electrostatic interaction of cytochrome *c* with cytochrome c1 and cytochrome oxidase. J Biol Chem. 1981, 256(10):4984-90.
6. Döpner S., et al. The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome *c* in the electron transfer to cytochrome *c* oxidase. Eur J Biochem. 1999, 261(2):379-91.
7. Roberts VA., et al. Definition of the interaction domain for cytochrome *c* on cytochrome *c* oxidase. III. Prediction of the docked complex by a complete, systematic search. J Biol Chem. 1999, 274(53):38051-60.
8. Sinibaldi F., et al. Role of lysines in Cytochrome *c*-cardiolipin interaction. Biochemistry. 2013, 52(26):4578-88.

**ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОСТРОЕНИЮ НЕПРЕРЫВНОЙ МЕРЫ ХИРАЛЬНОСТИ МАКРОМОЛЕКУЛ****APPROACHES TO THE CONSTRUCTION OF CONTINUOUS MEASUREMENT OF MACROMOLECULAR CHIRALITY***Хамицаев А.К.**МГУ им. М.В.Ломоносова, физический факультет, E-mail: Alexkhamitsaev@yandex.ru*

Симметрия – фундаментальное понятие современной теоретической физики. Законы сохранения в природе являются отражением существования определённых типов симметрии. Физические и химические характеристики вещества в значительной мере определяются наличием в его составе структур, обладающих некоторой формой симметрии. В основе всей природы лежит наличие двух фундаментальных асимметрий ионной – клеточной – и хиральной – молекулярной, обеспечивающей стереоспецифичность биологических молекул. Все биомолекулы построены из блоков одной хиральности (т.е. гомохиральных), что является фундаментальной особенностью живых систем, получившей название хиральной чистоты биосферы [1, 2]. Недавно была открыта новая закономерность в молекулярной биологии – чередование «знака» хиральности в иерархиях структурных уровней белков и нуклеиновых кислот [3]. Эта системная закономерность позволяет по-новому подойти к решению важнейшей проблемы теоретической биофизики – выяснению физических основ взаимосвязи структуры и функций биомолекул. Одной из главных задач при этом является разработка методов сравнения макромолекул по степени хиральности. Существует два основных подхода к решению данной задачи: первый – это разработка меры хиральности, учитывающей физические взаимодействия внутри молекул, второй – это разработка меры, учитывающей геометрические особенности молекул. Для определения роли гомохиральности первичных структур в процессах структурообразования, необходимо использовать меру хиральности, значения которой связаны с физическими характеристиками макромолекул. В рамках исследования процесса фолдинга минибелков типа TRP-cage, было изучено поведение непрерывной меры хиральности, предложенной А.В.Лузановым [4], и её связь с энтропией системы. Поиск такой взаимосвязи связан с тем, что обе величины определяются симметрией системы. Особенностью индекса хиральности является смена знака при изменении знака хиральности. В связи с этим степень симметрии молекулы связана с модулем индекса хиральности: чем меньше его модуль, тем симметричнее молекула. Расчет энтропии в процессе фолдинга производился методом молекулярного моделирования с помощью программного комплекса Gromacs.

В результате исследования была обнаружена корреляция между модулем индекса хиральности и значением энтропии. В то же время сумма значений индексов отдельных аминокислот белка не соответствовала его значению для целой молекулы белка TRP-cage. Таким образом, изученная мера не обладает свойством аддитивности. Данная особенность меры не позволяет определить вклад отдельных участков макромолекулы в общее значение индекса и, следовательно, предсказывать структурные и функциональные особенности макромолекул. Основной целью исследования стал поиск взаимосвязи между различными структурами на основе геометрического критерия. С этой целью было произведено сравнение макромолекул с эталонной структурой на основе расстояния Фреше и меры Хаусдорфа [5].

1. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Жаворонков А.А. Хиральность как проблема биохимической физики. // Рос. хим. журнал, 2007, т. 51, № 1, с. 13–23.
2. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Ивлиева А.А., Твердислова И.Л. Ионная и хиральная асимметрии как физические факторы биогенеза и онтогенеза. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3: Физика, астрономия, 2011, № 2, с. 3.
3. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А., Жулябина О.А., Яковенко Л.В. Периодическая система хиральных структур в молекулярной биологии. // Биофизика, 2017, т. 62, вып. 3, с. 421–434.
4. Luzanov A.V., Nerukh D. Simple one-electron invariants of molecular chirality // Journal of Mathematical Chemistry, 2007, Vol. 41, No. 4, pp. 417-435.
5. Petitjean M. Chirality and Symmetry Measures: A Transdisciplinary Review, // Entropy, 2003, 5, pp. 271-312.

**АБСОЛЮТНАЯ СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ И ЭНТРОПИЯ НАТИВНОГО ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА****ABSOLUTE FREE ENERGY AND ENTROPY OF NATIVE GLOBULAR PROTEIN***Хечинашвили Н.Н., Кондратьев М.С., Кабанов А.В., Полозов Р.В.<sup>1</sup>**Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, nikolay@icb.psn.ru**<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*

Решена одна из наиболее важных проблем молекулярной биофизики, связанной с определением численных значений абсолютных величин свободной энергии и энтропии нативной конформации глобулярного белка:

$$G^{NC}(T) = E - T \cdot S^{NC} \quad (1)$$

$G^{NC}$  и  $S^{NC}$  – свободная энергия и энтропия нативной конформации белка, соответственно. На основе анализа термодинамических данных по исследованию тепловой денатурации водных растворов белков (с молекулярным весом 7 – 25 кД и термостабильностью 323 – 383 К) нами предложен подход для оценки энергии внутримолекулярных слабых связей ( $E$ ) в нативной структуре белка. Расчеты проводились с учетом энтальпии гидратации атомов ядра с водой при тепловой денатурации и энтальпии колебательных мод. Показано, что энергия ( $E$ ) белков с различной структурой и молекулярным весом одинакова в расчете на один остаток и, составляет  $12.8 \pm 0.8$  кД/мол. Для анализа термодинамических параметров, следует рассмотреть равенство (1) для процесса прогрева водного раствора белка от низких температур до начала процесса тепловой денатурации.  $E$  – в первом приближении независимая от температуры параметр;  $S^{NC}$  – конформационная энтропия, характеризующая динамические свойства белка, обусловлена в основном вкладами боковых цепей аминокислотных остатков на поверхности белка. По данным ЯМР подвижные боковые цепи на поверхности глобулы формируют конформационное пространство, в пределах которого индивидуальный остаток реализует множество ротамерных состояний, определяющих при данной температуре значение конформационной энтропии. Здесь допускается, что с повышением температуры число ротамеров остается неизменным, но при этом возрастает частота переходов из одного конформационного состояния боковой цепи в другое. В противном случае возрастание конформационной энтропии с температурой приведет к расширению конформационного пространства и связанное с этим возрастание амплитуды движения боковых цепей и, следовательно, увеличению числа ротамеров. Это может привести к градуальному плавлению белка с температурой, что противоречит представлению о глобулярных белках, как о кооперативных системах, претерпевающих «two-state» переходы. Кроме того, по данным сканирующей микро-калориметрии линейная температурная зависимость удельной парциальной теплоемкости водных растворов белков вплоть до начала тепловой денатурации свидетельствует об отсутствии фазовых переходов второго рода и связано с теплоемкости колебательных мод атомов и групп аминокислотных остатков. Из равенства (1) следует, что снижение  $G^{NC}$  с повышением температуры связано с возрастанием конформационной составляющей свободной энергии,  $T \cdot S^{NC}$ , где температура является мерой интенсивности теплового движения в основе которой, лежит независимая от температуры конформационная энтропия белка. Для определения численных значений конформационной энтропии рассматривается референтное состояние белка, где свободная энергия  $G_{pTS}^{ref}$  становится равной нулю:

$$G_{pTS}^{ref} = E - T_{pTS} \cdot S^{NC} \quad (2)$$

В рассматриваемой модели референтное состояние виртуально и рассматривается как скоротечное пред-переходное состояние (pTS) на пути к разворачиванию белка. В этом состоянии внутренняя область остается не гидратированной, а внутримолекулярные слабые связи остаются интактными. Энергия теплового движения ( $T_{pTS} \cdot S^{NC}$ ) в пред-переходном состоянии сопоставимой с энергией ( $E$ ) и тогда,  $G_{pTS}^{ref} = 0$  и, следовательно,  $S^{NC} = E/T_{pTS}$ . В первом приближении можно принять  $T_{pTS} = T_{tr}$ , где  $T_{tr}$  – экспериментальное значение температуры перехода. Свободная энергия в пред-денатурационной области температур рассчитывается как:

$$\delta G^{NC}(T) = G^{NC}(T) - G^{ref}(pTS) = (E - T \cdot S^{NC}) - (E - T_{pTS} \cdot S^{NC}) = S^{NC} (T_{pTS} - T) \quad (3)$$

Абсолютная свободная энергия исследованных белков при 298 К в расчете на один остаток равна 1.15 – 2.55 кД/мол и близка по значению с тепловой энергией,  $RT$ . Конформационная энтропия составляет 34.4 – 39.1 Дж/К мол одного остатка. Из установленной корреляции следует, что чем ниже значение конформационной энтропии, тем выше термостабильность белка и тем больше значение  $G^{NC}$ . Отсюда следует, что движущей силой тепловой денатурации белков является конформационная энтропия нативного белка.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОЛЛАГЕНОВЫХ ПЕПТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ГИАЛИНОВЫХ ХРЯЩЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

### COMPARATIVE ANALYSIS OF COLLAGEN PEPTIDES OBTAINED FROM HYALINE CARTILAGES UNDER THE INFLUENCE OF PROTEOLYTIC ENZYMES

*Шеховцов П.В.<sup>1</sup>, Капцов В.В.<sup>2</sup>, Лауринвичюс К.С.<sup>3</sup>, Молчанов М.В.<sup>1</sup>, Николаева Т.И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> - ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пушкино

<sup>2</sup> - ФГБУН Институт биофизики клетки Российской академии наук, г. Пушкино Московской обл., пр. Науки, 3

<sup>3</sup> - ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук, 142290, г. Пушкино Московской обл., пр. Науки, 5, E-mail: pavsheck@yandex.ru; e-mail: tomivnik@yandex.ru

Задачей настоящей работы является получение регулируемых размеров пептидов коллагена типа II из гиалиновых хрящей, используя биокаталитический подход.

Доступность фермента для молекул коллагена, упакованных в фибриллы, облегчается после теплового воздействия на ткань с целью ослабления и разрыва межмолекулярных связей. Процесс «тонкой гомогенизации» выполняли при температурах, денатурирующих молекулы коллагена, и проводили в



гомогенизаторе высокого давления «Донор-3» при совместном действии давления и температуры. Для данной экспериментальной работы были получены образцы В (конечная температура гомогенизации 60°C) и Е (конечная температура гомогенизации 70°C). Было проверено действие ферментов, произведенных в России: химопсин (ООО «СамсонМед», Санкт-Петербург) и карипазим (ООО «МедФлорина» и ЗАО «Вифитех», пос. Оболенск Московской обл.). Показано, что гомогенизация хрящей в условиях высоких значений давления и температуры активизирует последующий ферментативный гидролиз: степень гидролиза возрастает при увеличении давления от 40 до 80 МПа, а температуры от 30 до 70°C. Более того, степень гидролиза была выше у гидролизатов, полученных под действием карипазима ООО «МедФлорина». Анализ гидролизатов был выполнен с использованием методов масс-спектрометрии («MALDI-TOF» Autoflex speed, Bruker) и ЯМР-спектроскопии («Bruker 600 AVANCE III»).

Под влиянием химопсина в 33,4 mM калий-натрий фосфатном буфере, pH 8,0 при 42°C, концентрации 5% в течение 6 час. были образованы пептиды с молекулярной массой от 1000 до 7000 Д. ЯМР – исследования подтверждают, что пептиды содержат 10 – 30 аминокислотных остатков. После действия карипазима на гомогенат при T=50°C, концентрации 5% образуются пептиды в интервале от 250 до 780 Д. Распределение пептидов по молекулярным массам под влиянием карипазима на гомогенат в 33,4 mM K-Na фосфатном буфере, pH 6,0 при T=55°C, концентрации 10% находится в интервале от 240 до 620 Д. Гидролиз в течение 3 час. приводит к образованию пептидов в диапазоне 240-620 Д, тогда как после гидролиза в течение 6 час. пептидный профиль был расположен в интервале 240-520 Д. Согласно данным по аминокислотам коллагена молекулярные массы соответствуют следующим олигопептидам: дипептидам, трипептидам, тетрапептидам, пентапептидам, гексапептидам. Проведенные исследования методом ЯМР показывают, что длина пептидов не превышает 10 аминокислотных остатков. Имеющиеся сведения в базе данных олигопептидов EROP-MOSKOW, включающих менее 50 аминокислот, свидетельствуют о регуляторной роли экзогенных пептидов в организме человека [1]. Под влиянием карипазима с повышением температуры, концентрации и времени гидролиза образуются более низкомолекулярные пептиды.

Действие пептидов на соединительную ткань является специфичным как на молекулярном (по составу аминокислот, характерному для хрящевой ткани), так и на макромолекулярном уровне (олигопептиды влияют на активность клеток матрикса). Установлено стимулирующее действие пептидов коллагена типа II (молекулярные массы от 500 до 13 500 Д) в культуре клеток на биосинтез хондроцитами коллагена типа II [2]. При поступлении коллагеновых пептидов в организм человека может замещаться поврежденное звено в соединительных тканях суставов, как на уровне структуры, так и на уровне сигнализации между клетками матрикса.

Таким образом, ферментами, катализирующими расщепление специфических связей в полипептидных цепях, можно влиять на размеры пептидов и разрабатывать образцы, содержащие пептиды коллагена с разной молекулярной массой. Химопсин позволяет получать пептиды от 1000 до 7000 Д, а карипазим — пептиды от 240 до 780 Д.

1. Zamyatnin A.A., Borchikov A.S., Vladimirov M.G., Voronina O.L. The EROP-Moscow oligopeptide database // Nucl. Acids Res. 2006. Vol. 34. P. D261-D266.

2. Oesser S., Seifert J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen // Cell Tissue Res. 2003. Vol. 311. N 3. P. 393-399.

## ОЦЕНКА СОВМЕСТНОГО ВЛИЯНИЯ САХАРОВ И ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ОЛИГОМЕРНУЮ ФОРМУ БЕЛКА DPS ESCHERICHIA COLI

## ASSESSMENT OF THE MUTUAL INFLUENCE OF SUGARS AND IRON IONS ON THE ESCHERICHIA COLI DPS PROTEIN OLIGOMERIC FORM

***Шешукова А.А., Преображенская Е.В.<sup>1</sup>, Капитунова А.И.<sup>2</sup>, Пуртов Ю.А.<sup>1</sup>, Озолин О.Н.<sup>1</sup>, Антипов С.С.<sup>1,2,3</sup>***

Балтийский федеральный университет им. И.Канта, г. Калининград, *n.scheschukowa@yandex.ru*

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН - обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино, Московская область

<sup>2</sup> Балтийский федеральный университет им. И.Канта, г. Калининград

<sup>3</sup> Воронежский государственный университет, г. Воронеж

Бактериальный белок Dps несёт ответственность за конденсацию бактериальной ДНК при переходе клеток к стационарному росту с возможностью формирования кристалл-подобной структуры в условиях длительного отсутствия источников питания [1], а очищенный Dps в условиях крио-эксперимента образует высоко упорядоченные структуры [2]. Это отражает его способность формировать прочные комплексы с ДНК, которые стабилизируются за счёт белок-белковых контактов, обеспечивая сохранность генома, но вопрос о механизмах, способствующих ремоделированию нуклеоида для возвращения клеток к нормальному росту, остается открытым. Ранее было установлено, что присутствие некоторых сахаров (D-глюкуроната и D-

галактуроната, но не глюкозы) способствует разрушению додекамера Dps [3], а присутствие ионов металлов стимулирует его олигомеризацию [4]. В данной работе проведена оценка совместного воздействия ионов железа, глюкозы, глюкуроната и галактуроната на олигомерный профиль Dps, т.е. превращение, которое может быть ключевым фактором, обеспечивающим возвращение бактериального нуклеоида в активное состояние.

Для оценки возможности взаимного влияния ионов железа и модельных углеводов на олигомерную форму белка, использовали последовательный молекулярный докинг и электрофоретическое фракционирование препаратов очищенного белка в нативных условиях. В качестве модели использовали 3D-структуру додекамера Dps (PDB: 1dps), на которую, в результате последовательного докинга, были нанесены сто молекул FeO. Их преимущественная локализация оказалась в области межсубъединичных контактов. Последующий докинг ста структурных моделей глюкозы, не влияющей на олигомерную форму Dps [3], выявил преимущественное связывание углевода на стыках трех N-концевых модулей мономеров белка, а молекулы глюкуроната, дестабилизирующие додекамеры, кроме этой области, формировали контакты в межсубъединичном пространстве, где возможна взаимная конкуренция с ионами железа.

Для экспериментального тестирования было использовано две схемы. В первой, Dps сначала инкубировали в присутствии 100 молекул углеводов на один додекамер в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего к пробе добавляли соль Мора (100, 300 и 500 ионов железа на додекамер) и инкубировали еще 30 минут. Во втором случае, проводили предварительное насыщение белка ионами железа (500 ионов на один додекамер), после чего добавляли углеводы из расчета 100, 200 или 300 молекул на один додекамер Dps. Во всех случаях в качестве контроля использовали очищенный препарат белка, а для оценки индивидуального воздействия сахаров или ионов железа – препарат белка насыщенный каждым из них. Неожиданно было обнаружено, что присутствие углеводов способствует опосредованной ионами железа олигомеризации белка, которая оказалась максимальной в случае галактуроната. Это предполагает некоторую кооперативность их связывания с общей контактной поверхностью. Так же, как и ранее [3], глюкоза не оказывала никакого воздействия на Dps, додекамерная форма которого была предварительно стабилизирована солью Мора, в то время как добавление глюкуроната и галактуроната сопровождалось появлением олигомеров меньшего размера. Удивительно, но этот эффект наблюдался только при низкой концентрации углеводов (100 молекул на додекамер). Такая необычная концентрационная зависимость может иметь особое биологическое значение. В условиях избытка углеводов она позволяет сохранить додекамерную форму Dps, совмещающего в бактериях роль структурного белка нулеоида с функциями ферритина, т.е. белка окисляющего и депонирующего ионы железа и обеспечивающего потребности в нём клеток во время быстрого роста.

Данное исследование было поддержано из средств субсидии, выделенной на реализацию Программы повышения конкурентоспособности БФУ им. И.Канта.

1. Wolf S.G., et al. DNA protection by stress-induced biocrystallization // Nature. 1999. Vol.400. P.83–85.
2. Antipov S.S. et al., High resolution cryogenic transmission electron microscopy study of *Escherichia coli* Dps protein: first direct observation in quasinative state / Results in Physics. 2018. Vol. 11. P. 926-928.
3. Бессонова Т.А. и др. Гексуронаты влияют на олигомерную форму структурного белка бактериального нуклеоида Dps и его способность к взаимодействию с линейными фрагментами ДНК / Биофизика. 2016. Т.61(6), с. 1059-1067.
4. Antipov S. et al. The Oligomeric Form of the *Escherichia coli* Dps Protein Depends on the Availability of Iron Ions / Molecules. 2017. Vol.22(11). P.1904.

## **ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ U2OS НОКАУТНОЙ ПО PML ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФОРМИРОВАНИЯ APBs DE NOVO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9**

### **GENERATING OF MODEL PML KNOCKOUT CELL LINE U2OS FOR STUDY OF APBs DE NOVO FORMATION USING CRISPR / CAS9 TECHNOLOGY**

***Шпирюнок О.Г., Силонов С.А., Фонин А.В., Кузнецова И.М., Туроверов К.К.***

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Поддержание постоянной длины теломер является необходимым условием иммортализации раковых клеток. Известно два основных механизма, обеспечивающих стабильность длины теломер: классический путь, связанный с постоянной реактивацией теломеразы и так называемый альтернативный путь удлинения теломер (ALT), обусловленной гомологичной рекомбинацией теломерной ДНК. Приблизительно в 15% онкологических заболеваний реализуется ALT механизм. Особый интерес к ALT обусловлен возможностью некоторых типов опухолей переключать классический механизм удлинения теломер на ALT при терапевтическом подавлении активности теломеразы [1].

Одним из маркеров ALT механизма является формирование патологических немембранных органелл – PML-телец, ассоциированных с процессом альтернативного удлинения теломер (APBs). Каркасным белком

APBs является белок промиелоцитарного лейкоза (PML). Вследствие альтернативного сплайсинга PML имеет 7 основных изоформ, отличающихся вариативными С-концами и транскрибируемых с одного гена. Эти тельца являются функциональной платформой для гомологичной рекомбинации теломерной ДНК, их подавление приводит к укорочению теломер. Это позволяет рассматривать APBs в качестве перспективной терапевтической мишени для ингибирования ALT. К настоящему времени молекулярный механизм формирования и разборки этих немембранных органелл практически не изучен [2,3].

Мы предполагаем исследовать формирование APBs de novo различными изоформами PML в условиях нокаута собственного гена PML в ALT-позитивной клеточной линии U2OS (остеосаркома). Для генерации индуцибельного нокаута PML была использована технология CRISPR/Cas9. Таргетный участок гена PML, кодирующий N-концевой участок PML (1 – 435 аминокислотные остатки), одинаковый для всех изоформ PML, был встроен в вектор CRISPR-Cas9. Через 48 часов после трансфекции разработанного конструкта в клетки U2OS целевые клетки были отобраны с помощью флуоресцентного сортирования и высеяны на 96-луночный планшет с плотностью одна клетка на лунку. Через две недели были отобраны целевые клоны, которые дополнительно растили в течение 3 недель, после чего отобранные клоны переносили на 12-луночный планшет. Полученные клоны были подвергнуты первоначальному скринингу с помощью ПЦР и секвенированы. Установлено, что кариотип и фенотип полученных клеток отличается от клеток линии U2OS. Полученная PML-негативная клеточная линия будет использована для изучения формирования APBs эктопической экспрессии различных изоформ PML в условиях отсутствия экспрессии эндогенного белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант РНФ№ 19-15-00107 (рук. Турочков К.К.)

1. Chung I. et al. PML body meets telomere. The beginning of an alternate ending // *Nucleus*. 2012. 3:3. P. 263-275.
2. Drascovic I. et al. Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination // *PNAS*. 2009. 106(37). P. 15726-15731.
3. Cesare A.J., Reddel R.R. Alternative Lengthening of Telomeres in Mammalian Cells, *Landes Bioscience* 2000-2013.

## **Секция 2. Структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов**

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С ФЕНАНТРОЛИНОМ И НОВЫМИ ФЕНАНТРОЦИАНИНОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ZN(II)

### DNA INTERACTION WITH PHENANTHROLIN AND NEW PHANANTHROCYNANINE ZN (II) COMPLEXES

*Акуленкова Е.В., Демидов В.Н., Мартынова А.О., Пастон С.В.*

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

В настоящее время известно немалое количество производных фенантролина, содержащих ионы переходных металлов. Актуальность разработки металлокомплексов на основе фенантролина обусловлена их высокой эффективностью в качестве противоопухолевых, противомикробных и противогрибковых препаратов.

В данной работе изучены свойства фенантролина и двух новых соединений на его основе: бис-(1,10-фенантролин)-(1,10-фенантроцианин)-дицинка(II) ацетата (Zn7) и его предшественника – бис-(1,10-фенантролин)-дицинка(II) ацетата (Zn8). При pH от 4 до 8 в случае Zn8 и при pH от 4 до 6 в случае Zn7 спектральные свойства не меняются, что может указывать на постоянную степень ионизации вещества. При pH от 4 до 6,5 спектральные свойства фенантролина также не меняются. При уменьшении pH от 3 до 1,5 в спектрах поглощения Zn8 и Zn7 наблюдается bathochromный сдвиг полосы поглощения и увеличение оптической плотности на этой полосе. Аналогичные изменения обнаружены и в спектрах поглощения фенантролина при pH от 4 до 0,7. В спектрах флуоресценции исследуемых соединений при низких значениях pH происходит тушение флуоресценции. Таким образом, можно предположить, что при данных значениях pH наблюдаемые изменения в спектрах поглощения связаны с протонированием фенантролина. Для Zn7 и Zn8 протонирование фенантролина возможно в случае диссоциации одной или нескольких молекул фенантролина из металлокомплекса. При увеличении pH от 8 до 12 для Zn7 и Zn8 наблюдается гипсохромный сдвиг и значительный рост оптической плотности. В спектрах поглощения фенантролина замечен гипсохромный сдвиг, который может быть обусловлен депротонированием молекулы. Однако при возрастании pH наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции фенантролина, в то время как при таких же значениях pH у Zn7 и Zn8 происходит тушение флуоресценции. На основе данных спектральных изменений можно предположить, что при щелочных pH у Zn7 и Zn8 молекулы воды во внутренней координационной сфере заменяются на ионы OH<sup>-</sup>.

Взаимодействие Zn7 и Zn8 с молекулой ДНК изучалось в нейтральных растворах. Данные электронной спектроскопии указывают на связывание этих соединений с ДНК. Результаты аналогичного эксперимента, проведенного для исследования взаимодействия фенантролина с ДНК, позволяют предположить, что типы связывания фенантролина и металлокомплексов с ДНК различны. В спектрах поглощения ДНК с Zn7 и Zn8 наблюдаются более существенные изменения по сравнению со спектрами поглощения ДНК в присутствии фенантролина. Кроме того, при взаимодействии Zn7 и Zn8 с молекулой ДНК наблюдается тушение флуоресценции металлокомплексов, тогда как в растворе фенантролина с ДНК его спектр испускания не меняется. Это свидетельствует о переносе возбуждения с молекул металлокомплексов на ДНК. В растворах фенантролина с ДНК переноса возбуждения не происходит.

Комплексы ДНК с фенантролином, Zn7 и Zn8 были исследованы методом спектрофотометрического плавления ДНК. Присутствие в растворе ДНК фенантролина не приводит к изменению температуры плавления двойной спирали, в то время как комплексообразование ДНК с Zn7 и Zn8 значительно изменяет температуру плавления ДНК. При увеличении концентраций Zn7 и Zn8 в растворах с постоянной концентрацией ДНК наблюдается рост температуры плавления ( $T_m=(74\pm 1)^\circ\text{C}$  для Zn8 и  $T_m=(75\pm 1)^\circ\text{C}$  для Zn7 при  $[\text{Zn7}]/[\text{пар оснований}]=[\text{Zn8}]/[\text{пар оснований}]=0.13$ , температура плавления интактной ДНК  $(58\pm 1)^\circ\text{C}$ ). Значительное возрастание температуры плавления ДНК в присутствии металлокомплексов может говорить об интеркаляционном типе связывания [1, 2].

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ "Методы анализа состава вещества", "Оптические и лазерные методы исследования вещества".

1. A. Bolhuis, R. Janice. DNA as a target for antimicrobials // *Bioorganic Chemistry*, 2014, 55, 51–59.
2. N. Kasyanenko, Z. Qiushi, V. Bakulev, M. Osolodkov, P. Sokolov, V. Demidov. DNA Binding with Acetate Bis(1,10-phenanthroline) silver(I) Monohydrate in a Solution and Metallization of Formed Structures // *Polymers*, 2017, 9, 211.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С ДИАМИНОКАРБЕНОВЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ПЛАТИНЫ И ПАЛЛАДИЯ

### DNA INTERACTION WITH PLATINUM AND PALLADIUM DIAMINOCARBENE COMPOUNDS

*Алексеев Г.В.<sup>1</sup>, Серебрянская Т.В.<sup>2,3</sup> Бакулев В.М.<sup>1</sup>, Андреева А.А.<sup>1</sup>, Касьяненко Н.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Физический факультет Санкт-Петербургского Государственного Университета, Санкт-Петербург, komelbud@mail.ru, nkasyanenko@mail.ru

<sup>2</sup>Институт Химии СПбГУ, Санкт-Петербург, tserebryanskaya@gmail.com

<sup>3</sup>Беларусский Государственный Университет, Химический факультет, Минск

Проблема борьбы с онкологическими заболеваниями тесно связана с поиском фармацевтических препаратов, способных эффективно подавлять рост опухолей и бороться с метастазами. Несмотря на различные клеточные мишени, основным направлением для поиска подобных препаратов является выявление веществ, действие которых направлено на подавление репликации ДНК через формирование комплексов. Координационные соединения платины и металлов платиновой группы с различными лигандами занимают особое место среди потенциальных противоопухолевых препаратов. Ввиду неизбирательности действия и токсичности самого эффективного препарата этого класса, цисплатина, и в настоящее время остается актуальной проблема синтеза и тестирования его новых аналогов.

Были синтезированы препараты на основе диаминокарбенов с ксилилом либо циклогексиллом в качестве лигандов второй координационной сферы, имеющие в качестве координационного центра атом двухвалентной платины или палладия. Эксперименты на клеточных линиях MCF-7 breast и HT-29 colon в группе проф. И. Отта (Институт медицинской и фармацевтической химии Технического университета г. Брауншвейга, Германия) показали, что два из четырех препаратов имеют высокий IC50.

Ввиду алкилоподобного действия цисплатина и его аналогов (разрушение клетки является результатом блокирования репликации из-за связывания препарата с азотистыми основаниями ДНК), первичное тестирование новых соединений с использованием модельных систем в виде растворов ДНК малой ионной силы, является удобным и эффективным способом анализа молекулярного действия этих веществ.

В работе изучали взаимодействие высокомолекулярной ДНК тимуса телёнка (10 МДа, Sigma-Aldrich) с соединениями Pd-bis-Xyl, Pt-bis-Xyl, Pt-bis-Cy и Pd-bis-Cy, которые прошли тестирование на клеточных линиях. Методами электронной спектроскопии, кругового дихроизма, флуоресценции, низкоградиентной вискозиметрии, динамического двойного лучепреломления и атомной силовой микроскопии изучали комплексообразование этих соединений с молекулой ДНК в растворах разной ионной силы.

Было установлено, что изученные соединения взаимодействуют с ДНК в растворе. Замена циклогексила на ксилит приводит к существенному изменению влияния координационного соединения на конформацию ДНК. Соединения, содержащие ксилит в качестве лиганда, способны образовывать координационную связь с ДНК, тогда как присутствие циклогексила в качестве лиганда не дает такой возможности. Палладиевые соединения, подобно цисплатину, мешают частичной ренатурации ДНК после нагрева до 95 градусов Цельсия в эксперименте с плавлением ДНК, при этом температура плавления ДНК в комплексах меняется мало по сравнению с плавлением свободной ДНК, но ширина перехода меняется. Проведено сравнение влияния используемых в работе новых соединений и цисплатина на конформационные свойства молекулы ДНК. Показано, что связывание ДНК с цисплатином и с изучаемыми соединениями имеет общие черты. Изучение конкуренции за место связывания на ДНК между используемыми соединениями и цисплатином показало, что в таких системах проявляется как связывание цисплатина, так и диаминокарбенового соединения, то есть они не конкурируют за место связывания на ДНК. При взаимодействии новых соединений с ДНК возможен выход в раствор лигандов, которые вступают во вторичное связывание с макромолекулой.

Таким образом, основываясь на данных исследований связывания новых соединений с молекулой ДНК в растворе, представленных различными методами, мы предполагаем, что соединения Pd-bis-Xyl, Pt-bis-Xyl взаимодействуют с двухцепочечной ДНК преимущественно посредством координации с азотистыми основаниями в большой бороздке ДНК, причем связывание не дестабилизирует вторичную структуру ДНК и, по-видимому, происходит с образованием монодентатных комплексов. Как показывают результаты исследования спектроскопии КД, образование бидентатных внутрицепочечных поперечных связей также возможно в случае соединения на основе Pt. Как подтверждают результаты исследования протонирования ДНК, координация происходит по атому N7 гуанина. Согласно результатам исследования флуоресценции DAPI при его добавлении в раствор, содержащий комплексы, малая бороздка ДНК остается свободной при формировании комплексов с соединениями платины. Электростатические взаимодействия с фосфатными группами ДНК также играют важную роль в связывании. Как доказано с помощью АСМ-визуализации, связывание соединений провоцирует образование межмолекулярных ДНК-ДНК-контактов в растворе. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить природу этих контактов и их роль в механизме антипролиферативной активности изучаемых соединений.

## ВЛИЯНИЕ АДСОРБЦИИ ЛИГАНДОВ НА СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫХОДНОГО СИГНАЛА ДНК-БИОСЕНСОРА

### EFFECT OF ADSORPTION OF LIGANDS ON STATISTIC CHARACTERISTICS ON THE OUTPUT SIGNAL OF DNA-BIOSENSOR

*Аракелян В.Б., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Шагинян М.А., Вардеванян П.О.*  
Ереванский Государственный Университет, Ереван, Армения, v.arakelyan@ysu.am

В настоящее время создание ДНК-биосенсоров является приоритетным направлением современной биоаналитической химии. Это связано с тем, что с помощью ДНК-биосенсоров решаются актуальные задачи в различных областях медицинской диагностики, экотоксикологии, фармакологии и молекулярной биологии. У ДНК-биосенсоров имеется важное преимущество по сравнению с традиционными методами исследования и оно связано с возможностью существенно уменьшить размеры исследуемых образцов и анализаторов. Однако, как это хорошо известно из статистической физики, уменьшение размеров исследуемой системы неизбежно приводит к двум проблемам – это уменьшение величины выходного сигнала ДНК-биосенсора и повышение уровня шумов сигнала.

Нами предложен вариант решения этих проблем. Известно, что величина выходного сигнала ДНК-биосенсора пропорциональна числу дуплексов ДНК. Можно подобрать лиганд, который адсорбируясь на дуплексы усиливает выходной сигнал. Так как образование и распад комплекса лигандов с дуплексом ДНК происходит случайным образом, то число связанных с дуплексом ДНК лигандов будет флуктуировать. Флуктуации числа связанных с дуплексами лигандов неизбежно приведут к флуктуации выходного сигнала ДНК-биосенсора.

В рамках теории случайных процессов вычислены среднее значение, дисперсия, корреляционная функция и спектральная плотность выходного сигнала ДНК-биосенсора. Теоретически показано, что с увеличением концентрации лигандов в растворе выходной сигнал ДНК-биосенсоров монотонно растет. Получено также, что дисперсия выходного сигнала ДНК-биосенсора с увеличением концентрации лигандов вначале увеличивается, а затем, проходя через максимум, уменьшается и стремится к нулю при дальнейшем увеличении концентрации лигандов. Такая зависимость дисперсии от концентрации лиганда в растворе физически понятна и связана с тем, что в начале процесса адсорбции с увеличением концентрации лигандов в растворе растет и число адсорбированных лигандов на дуплексе ДНК и соответственно должна расти и дисперсия. При больших концентрациях лиганда в растворе число адсорбированных лигандов на дуплексе ДНК выходит на постоянное значение, что и приводит к выходу дисперсии на ноль.

Корреляционная функция выходного сигнала ДНК-биосенсора имеет экспоненциальный вид, а соответствующая спектральная плотность описывается функцией Лоренца. Теоретически рассчитано, что с увеличением концентрации лигандов в растворе время релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора уменьшается.

Анализ полученных результатов показывает, что для улучшения характеристик выходного сигнала ДНК-биосенсора следует брать такие концентрации лигандов в растворе, при которых число связанных с дуплексами ДНК лигандов близко к насыщающим значениям [1]. В этом случае среднее значение выходного сигнала ДНК-биосенсора имеет максимальное значение, время релаксации минимальное значение, а флуктуации сигнала близки к нулю.

1. Vardevanyan P.O., Arakelyan V.B., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Hovhannisyan G.G., Shahinyan M.A. Analysis of experimental binding curves of EtBr with single- and double-stranded DNA at small fillings // Modern Physics Letters B. 2014. Vol. 28. P. 1450178-1.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ UL9 И ICP8 ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО ТИПА СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ОДНОТЯЖЕВЫМИ И ДВУТЯЖЕВЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

### INTERACTION OF UL9 AND ICP8 PROTEINS OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE I WITH SPECIFIC SINGLE-STRANDED AND DOUBLE-STRANDED OLIGONUCLEOTIDES

*Бажулина Н.П., Моисеева Е.Д., Лепехина С.Ю., Суrowая А.Н., Гурский Я.Г.<sup>1</sup>,  
Андропова В.Л.<sup>2</sup>, Никитин А. М., Галегов Г.А.<sup>2</sup>, Гроховский С.Л., Гурский Г.В.*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, E-mail: [bazh@eimb.ru](mailto:bazh@eimb.ru)

<sup>1</sup> Кардиологический научно-производственный комплекс Москва

<sup>2</sup> Институт вирусологии им. Д.И. Иванова Министерства здравоохранения, Москва

С помощью электрофореза в геле и метода FRET исследовано связывание вирусных белков UL9 и ICP8 со специфическими фрагментами вирусной ДНК в начале репликации OriS вируса герпеса. Мы обнаружили, что после отжига олигонуклеотидов, которые содержат связывающие места Box I и Box II для хеликазы и A+T

кластер между ними вирусные белки UL9 и ICP8 в отсутствие АТФ индуцируют трансформацию линейной формы OriS в структуру Холлидея при температуре 40 °С, при которой А+Т-кластер частично дестабилизирован и служит субстратом для связывания ICP8 в форме гетеродимера с хеликазой UL9. Образование гетеродимера в 4 раза увеличивает процессивность хеликазы UL9. С помощью измерения эффективности резонансного переноса энергии (FRET - метод) между флуоресцентными зондами, присоединенными ковалентно к 3'- и 5'-концам олигонуклеотидов, соответствующих верхней и нижней нитям минимального дуплекса в начале репликации OriS вируса герпеса, исследована кинетика раскручивания ДНК хеликазой UL9. В качестве флуорофора и тушителя использовали 6-карбоксиродамин и краситель ВНQ2 (Black hole quencher 2), радиус миграции энергии равен 63 Å. Связывание димеров хеликазы с частичным дуплексом, содержащим связывающие места I и III для хеликазы и АТ-богатый однотяжевый хвост, в отсутствие АТФ приводит к образованию промежуточной структуры дуплекса, для которой расстояние между флуорофором и тушителем уменьшается с 77 Å до 58 Å, что согласуется с образованием антипараллельной структуры Холлидея. Значительное уменьшение расстояния между зондами наблюдалось также при связывании хеликазы с дуплексом, содержащим связывающие места I и II и А+Т-кластер, при условии, что два димера хеликазы были присоединены к дуплексу, вызывали его изгиб и частичное расплетение А+Т-кластера, что приводило к образованию структуры Холлидея, включающей обратные повторы в связывающих местах I и II. Хеликаза UL9 узнает 4-х нитевые модельные структуры Холлидея, образующиеся в растворе при отжиге неспецифических синтетических олигонуклеотидов и связывается менее прочно с неспецифической двутяжевой и однотяжевой ДНК. Однотяжевые олигонуклеотиды (63 н), содержащие специфические связывающие места I и II или I и III при взаимодействии с хеликазой образуют олигомеры, подвижность которых при электрофорезе в геле близка к подвижности комплексов хеликазы с модельной структурой Холлидея. Получены кривые плавления модельной структуры Холлидея, специфических дуплексов и однотяжевых специфических олигонуклеотидов.

Pt-бис-нетропсин избирательно связывается с А+Т-кластером и ингибирует процесс раскручивания минимального дуплекса OriS хеликазой UL9. Противовирусная активность бис-нетропсинов связана с их способностью ингибировать хеликазную активность инициаторного белка UL9 вируса герпеса.

Работа поддержана Программой Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и грантом РФФИ № 18-04-01376.

## УГЛОВАЯ МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ ДНК С УЧЕТОМ ПОТЕНЦИАЛА МОРЗЕ

## THE ANGULAR MODEL OF DNA DYNAMICS WITH MORSE POTENTIAL

*Балашова В.Н., Закирьянов Ф.К., Якушев Л.В.<sup>1</sup>*

Башкирский государственный университет, г. Уфа

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино

Разработка адекватной математической модели для описания процессов конформационных переключений в молекуле ДНК с явным учетом диссипативных процессов (потерь энергии на внутримолекулярные перестройки мономерных звеньев) и внешних воздействий – физических (электромагнитные поля) и биологических (влияние лекарственных препаратов) - позволит определить критические амплитуды и частоты внешних воздействий, генерирующих конформационные возмущения в молекулярных цепочках.

На настоящий момент существует два наиболее обширных класса мезоскопических моделей: радиальные и угловые. Радиальные модели рассматривают поперечные колебания азотистых оснований [1]. Угловые модели рассматривают угловые колебания азотистых оснований в плоскости, перпендикулярной главной оси молекулы ДНК [2].

Поперечные модели прекрасно зарекомендовали себя для описания процессов денатурации молекулы ДНК. Параметры этих моделей получили надёжное экспериментальное обоснование и хорошо известны. В то же время именно угловые модели более адекватно описывают конформационные изменения в процессе функционирования ДНК. Вместе с тем, экспериментальное определение параметров моделей этой группы затруднено. В данной работе мы совместили эти два подхода и разработали новую математическую модель молекулы ДНК – МУ-модель (Morse-Yakushevich-model).

Уравнение движения для этой модели имеет вид:

$$I_k \theta_k = - \frac{\partial U}{\partial \theta_k} = 2 D (e^{-\mu r - r_0} - 1) \mu e^{-\mu r - r_0} \cdot \frac{d r - r_0}{d \theta_k}, k = 1, 2.$$

где  $I_1$  и  $I_2$  – моменты инерции оснований, взаимодействие между комплементарными основаниями описывается потенциалом Морзе:

$$U \Delta r = D (e^{-\mu r - r_0} - 1)^2$$

где  $D$  – параметр, определяемый экспериментально.



После определённых преобразований получаем уравнение sin-Гордона, описывающее динамику ДНК в МУ-модели:

$$I_k \theta_k = \theta'' - 2\mu^2 D r_1 \varepsilon - h \cdot \sin \theta_k + r_2 \sin 2\theta_k .$$

Это уравнение имеет солитонные решения, параметры которых (ширина, импульс и энергия) уже можно сравнить с экспериментальными результатами.

При сравнении полученного решения с решением классической Y-модели четко видна разница в форме, а также размере кинков.

1. M. Peyrard, A.R. Bishop and Th. Dauxois. Dynamics and thermodynamics of a nonlinear model for DNA denaturation // Phys. Rev. E 47, 1993. – P. 684–697.
2. S.W. Englander, N.R. Kallenbach, A.J. Heeger, J.A. Krumhansl, A. Litwin. Nature of the open state in long polynucleotide double helices: possibility of soliton excitations // PNAS USA 77, 1980. – P. 7222–7226.

---

## КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ ОЛИВОМИЦИНА А К НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

### KINETIC ASPECTS OF OLIVOMYCIN A SPECIFICITY TO NUCLEOTIDE SEQUENCE OF DNA

***Бениаминов А.Д., Калюжный Д.Н.***

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Антибиотик оливомицин А (ОА), производное ауреловой кислоты, способен проявлять противоопухолевую и антибактериальную активность. ОА ингибирует процессы репликации и транскрипции, связываясь с малой бороздкой G/C-богатых участков ДНК. Для выявления специфичности ОА к различным C/G последовательностями ДНК мы провели скрининг всех тетра-нуклеотидных SSSS (S = G или C) сайтов связывания Оливомицина А. Методом электрофоретической подвижности определено, что сайты, содержащие центральные динуклеотиды GC или GG способны связывать ОА, тогда как образование комплекса на сайтах с центральным динуклеотидом CG не обнаружено. С другой стороны, исследования равновесного связывания в растворе оптическими методами не подтвердили найденной специфичности, а свидетельствовали о схожей структуре комплекса ОА со всеми последовательностями. Разрешить противоречие удалось при анализе кинетики взаимодействия ОА с ДНК. Скорость ассоциации антибиотика с ДНК не зависела от нуклеотидной последовательности, тогда как скорость диссоциации оказалась на порядок выше для сайтов SCGS, чем для сайтов SGGS или SGCS. Функциональная значимость наблюдаемой кинетической специфичности продемонстрирована с помощью модельной транскрипции *in vitro*: ОА ингибировал РНК-полимеразу T7 более эффективно на сайтах SGCS и SGGS, чем на сайтах SCGS. Эти результаты указывают на важность кинетики в механизмах действия антибиотиков.

---

## О ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОМ ПАРАМЕТРЕ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩЕМ ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛЫ ДНК В РЕЗУЛЬТАТЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СО СВОИМ ВОДНЫМ ОКРУЖЕНИЕМ

### THE THERMODYNAMIC PARAMETER, WHICH CHARACTERIZES THE CHANGE IN STRUCTURE OF DNA MOLECULES BY THE INTERACTION WITH ITS WATER ENVIRONMENT

***Горовой Ю.М.***

Ярославский государственный технический университет, Ярославль, [gorovoyj@mail.ru](mailto:gorovoyj@mail.ru)

Ключевая роль водного окружения молекул ДНК в формировании структуры и проявлении свойств молекул ДНК подробно описана в работах академика Э.Л. Андроникашвили и Г.М. Мревлишвили [1]. Получены экспериментальные доказательства того, что именно в водном окружении молекулы ДНК приобретают нативные свойства и способность выполнять свои биологические функции. Примечательно качественное («драматическое») различие между поведением теплоемкости нативных молекул ДНК со своим водным окружением и поведением теплоемкости механической смеси нуклеотидов со своим водным окружением, которое в частности заключается в отсутствии фазового перехода при 0 С у воды, окружающей нативные молекулы ДНК. Водное окружение нативных молекул ДНК оказалось более упорядоченным (имеющим меньшую энтропию) по сравнению с водным окружением аналогичной смеси нуклеотидов. Поскольку Э.Л. Андроникашвили и Г.М. Мревлишвили измерили теплоемкость нативных ДНК со своим водным окружением и

теплоемкость аналогичной смеси воды и нуклеотидов в диапазоне температур от 4,2 до 300 К, то возможно рассчитать разницу энтропий этих систем. Эта разница по нашей оценке составила 700 Дж/(кг\*К) для ДНК спермы лосося со своим водным окружением и смеси нуклеотидов и воды.

Автор предполагает, что именно разность энтропий нативных ДНК со своим водным окружением и смеси нуклеотидов с аналогичным количеством воды характеризует глубину взаимодействия между молекулами ДНК и их водным окружением и, следовательно, изменение пространственной структуры ДНК в результате такого взаимодействия. Следует отметить, что такая разность энтропий является термодинамической координатой, изменение которой характеризует работу необходимую для перевода сложной системы из равновесного в метастабильное (нативное) состояние.

Для такого предположения есть основания в теории информации. Так А.Н. Колмогоров в своей фундаментальной работе [2] ввел понятие «количество информации содержащееся в переменном X относительно связанного с ним переменного Y», названное впоследствии «количество взаимной информации». Количество взаимной информации равно разности информационных энтропий сложной системы, состоящей из взаимодействующих подсистем, и суммарной энтропии невзаимодействующих подсистем, которые могли бы составить такую сложную систему.

Для такого предположения есть и физические основания. В сложных «запутанных» квантовых системах, состоящих из взаимодействующих подсистем, понятие количество взаимной информации характеризует степень «запутанности» квантовых подсистем — глубину взаимодействия таких квантовых подсистем. Количество взаимной информации равно разности энтропии фон Неймана сложной системы и суммарной энтропии невзаимодействующих подсистем, которые могли бы составить такую сложную систему. Количество взаимной информации является измеримым физическим параметром. Так для квантовых компьютеров принципиально важно получить устойчивое «запутанное» состояние сложных квантовых систем, то есть состояние со стабильным количеством взаимной информации.

Понятие количество взаимной информации обладает четким физическим смыслом: это — физический (термодинамический) параметр, характеризующий глубину взаимодействия подсистем, составляющих сложную систему. Для нативных ДНК такими подсистемами являются собственно молекулы ДНК и их водное окружение. Очевидно, что внешние воздействия, влияющие на структуру ДНК, должны менять параметры водного окружения молекул ДНК. Экспериментальные и расчетные доказательства таких изменений, а именно: изменения при взаимодействии Молекул ДНК с лигандами, известны [3].

Таким образом, сложная система: молекулы ДНК со своим водным окружением содержат не только информацию, заключенную в коде ДНК, но и некоторое количество взаимной информации, характеризующей глубину взаимодействия молекул ДНК со своим водным окружением и характеризующей изменения структуры молекул ДНК в результате такого взаимодействия. Причем количество взаимной информации меняется при внешних воздействиях на молекулы ДНК, например, при взаимодействии молекул ДНК с лигандами. Если молекулы ДНК со своим водным окружением способны запомнить количество взаимной информации (изменения своей пространственной структуры), то такая информация, возможно, тоже будет передаваться по наследству.

1. Андроникашвили Э.Л., Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная теплоемкость ДНК/УФН. 1986. Том. 150 Вып. 4. Стр. 625-628.
2. Колмогоров А.Н. Три подхода к определению понятия «количество информации»//Проблемы передачи информации. 1966. Вып. 1. Стр. 3-11.
3. Костюков В.В., Евстигнеев В.П. Изменение гидратации при связывании лигандов с малым желобком ДНК//Физика живого. 2010. Том. 18. № 2. Стр. 34-40.

## **УПРАВЛЕНИЕ КОНФОРМАЦИЯМИ МОЛЕКУЛ ДНК С ПОМОЩЬЮ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ**

### **CONFORMATION CONTROL OF DNA MOLECULES BY MEANS GEOMETRIC AND PHYSICAL PARAMETERS**

*Илюхин А.А., Тимошенко Д.В.*

Южный федеральный университет, Таганрог, E-mail: dmitrytim@yandex.ru

Рассматривается концептуальный подход к задаче управления пространственными конфигурациями молекул ДНК. Работа носит проблемный характер и является обобщением исследований авторов в области моделирования поведения и структуры ДНК методами механики деформируемого твердого тела. Предметом исследований в настоящей работе служит вопрос о применимости методов теории управления к объекту живой природы на примере молекулы ДНК. В работе рассматриваются как вопросы управляемости на примерах влияния параметров молекулы на ее конфигурацию, так и вопросы наблюдаемости и идентификации параметров молекулы, исходя из видимой конфигурации в естественной среде. Приводится краткий обзор

результатов авторов в части адаптации к объектам исследования существующих и разработке новых математических моделей деформируемых упругих объектов с учетом их внутренней структуры. В основу предлагаемого подхода положена концепция перехода с помощью известных методов молекулярной динамики от многоэлементной дискретной среды к континууму, содержащему моментные напряжения. С этой целью в предшествующих работах авторов получена зависимость компонентов тензоров деформаций, силовых и моментных напряжений от различных видов потенциалов межатомного взаимодействия (потенциал Ленарда-Джонса, потенциал Борна-Мейера и др.). Необходимость выбора в качестве базовой модели континуума, содержащего моментные напряжения, диктуется особенностями основного объекта исследования – молекул нуклеиновых кислот и биополимеров – обладающих несколькими степенями свободы вращательных движений. Также в качестве примера рассмотрен случай, для которого осуществлена редукция от трёхмерной задачи несимметричной теории упругости к одномерной посредством расщепления трёхмерной задачи на совокупность двумерной и одномерной задач. Указаны кинематические параметры, которые необходимо привлечь, чтобы вместе с системой дифференциальных уравнений Кирхгофа получить замкнутую систему уравнений одномерной моментной теории стержней. Остальные геометрические величины найдены из определяющих их соотношений. Предлагаемый подход согласуется с современными тенденциями в области молекулярного моделирования в биофизике и физико-химической биологии и представляется перспективным в решении задач управления генетическими и биохимическими процессами с участием ДНК.

---

## ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР ДНК PHOTOCHEMICAL PROBING OF THE G4 DNA

*Калюжный Д.Н., Чащина Г.В., Щелкина А.К., Бениаминов А.Д.*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, e-mail: uzhny@mail.ru

ДНК известна своим конформационным разнообразием. Образование альтернативных структур и конформационные перестройки в ДНК могут происходить в различных клеточных процессах и играть важную регуляторную роль. Одной из таких структур являются G-квадруплексы (G4) сложенные из однострессовой ДНК богатой гуаниновыми основаниями. Известно большое разнообразие конформаций G4 структур, зависящих от нуклеотидных последовательностей, а так же условиями растворителя. Например, конформация теломерного фрагмента ДНК GGG(TTAGGG)<sub>3</sub> зависит от множества факторов, включая условия раствора, длину и нуклеотидную последовательность фланкирующих областей, образования комплекса с низкомолекулярными соединениями.

Мы выбрали теломерную последовательность (TTAGGG)<sub>4</sub> в качестве объекта для разработки метода зондирования конформации G4 структур. Порфириновые соединения известны как фотосенсибилизаторы, а катионные производные порфиринов обладают повышенным сродством к G4 структурам ДНК. Уникальное свойство производного порфирина ZnP1, не изменять конформацию ДНК при связывании с теломерным квадруплексом, позволило использовать его как конформационный зонд. Фотоиндуцируемое окисление гуаниновых оснований формирующих G4 структуру позволило соотнести конформацию ДНК и положение окисленных оснований. Разработанный метод зондирования применен для моделей квадруплексных структур, конформация которых была ограничена последовательным замещением тринуклеотидных петель ТТА на однонуклеотиды Т. Мы показали, что структура параллельного квадруплекса наиболее подвержена окислительному действию порфиринового производного. Разработанный подход к определению конформации может быть применен не только на модельных структурах, но и на геномных последовательностях ДНК.

---

## МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ ДНК-ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ С ВКЛЮЧЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ MULTICOMPONENT STRUCTURES ON THE BASIS OF DNA – POLYMER COMPLEXES WITH THE INCLUSION OF NOBLE METAL NANOPARTICLES

*Касьяненко Н.А.<sup>1</sup>, Бакулев В.М.<sup>1</sup>, Андреева А.А.<sup>1</sup>, Лиходеева М.Н.<sup>1</sup>, Барышев А.В.<sup>1</sup>, Ролич В.И.<sup>1</sup> Назарова О.В.<sup>2</sup>, Панарин Е.Ф.<sup>2</sup>* Санкт - Петербургский гос. университет, физический факультет, Санкт - Петербург, n.kasyanenko@spbu.ru <sup>2</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Создание многокомпонентных систем, сочетающих функции комплексного воздействия на очаги патологий с возможностью контроля отклика организма на проводимое лечение, может кардинально изменить лечение и мониторинг прогрессирования заболеваний. Успех использования нанотехнологических разработок,

к которым относятся многофункциональные наноплатформы, в области здравоохранения обусловлен способностью таких систем работать в одном масштабе с биологическими полимерами, внедряться в клеточные структуры, воздействовать на молекулярные механизмы важнейших процессов. Важную роль в создании таких структур играют наночастицы благородных металлов, которые сами проявляют биологическую активность, а также могут усиливать физическое и химическое воздействие на опухоль, являясь эффективными энхансерами и катализаторами. Многофункциональные наноплатформы, в частности, создаются для одновременной доставки нескольких лечебных препаратов, для применения эффективных комбинаторных схем лечения рака. Заметим, что при таких заболеваниях различные факторы препятствуют эффективному использованию монопрепаратов. В первую очередь это невозможность лечения без риска повреждения здоровых клеток. Главной проблемой при этом становится безопасная и эффективная адресная доставка лекарственного препарата к клетке-мишени. Средства доставки должны обладать малыми размерами и способностью проникать через мембраны. Наноматериалы, которые используются для создания многофункциональных наноструктур в медицине, включают полимерные носители, липосомы, мицеллы, золотые и серебряные наночастицы, углеродные структуры (нанотрубки, наноалмазы) и др. В работе рассматривается возможность создания наноразмерных многокомпонентных систем с участием наночастиц золота на базе ДНК-полимерных комплексов. Ранее была показана возможность формирования таких структур с участием наночастиц серебра и флуоресцирующих агентов, для которых наблюдалось увеличение квантового выхода люминесценции [1]. Серебряные наночастицы создавали без участия химических агентов и вводили в структуры путем их сопряжения с синтетическими полимерами, которые и восстанавливали серебро. Была также показана возможность металлизации ДНК в растворе [2, 3]. Золотые наночастицы занимают особое место в биомедицинских разработках, так как они, в частности, могут преодолевать гематоэнцефалический барьер и использоваться при лечении опухолей мозга. В работе проводится анализ конформации ДНК в формируемых структурах, сравнение комплексообразования ДНК с ионами золота и серебра в растворе, размеров и плазмонного резонанса золотых и серебряных наночастиц при сопряжении с ДНК и синтетическими полимерами. ДНК-полимерные комплексы широко изучали для создания невирусных генных векторов, однако, в связи с развитием технологии CRISPR-Cas9 их назначение стало трансформироваться в сторону создания систем для комбинаторных схем воздействия на очаги патологий. В данной работе рассматривается восстановление золота синтетическим полимером в водном растворе. Затем данные структуры без добавления химических реагентов используют для создания ДНК - полимерных комплексов с включением наночастиц. Альтернативный путь – восстановление золота на ДНК после формирования комплексов ДНК с ионами золота (ионы золота при этом образуют координационную связь с N7 гуанина в большой бороздке). Для характеристики молекулярных механизмов формирования изучаемых структур использовали методы УФ спектрофотометрии, кругового дихроизма, плавления ДНК, динамического светорассеяния, вискозиметрии, двойного лучепреломления в потоке, атомной силовой и сканирующей электронной микроскопии. Наблюдался эффект значительного увеличения измеряемой оптической анизотропии пары оснований ДНК в случае сопряжения золотых наночастиц с молекулой ДНК в растворе.

1. Kasyanenko N., Bakulev V., Perevyazko I., Nekrasova T., Nazarova O., Slita A., Zolotova Yu., Panarin E. Model system for multifunctional delivery nanoplatforms based on DNA-polymer complexes containing silver nanoparticles and fluorescent dye. / Journal of Biotechnology. 2016. Volume 236, Pages 78–87
2. Kasyanenko N., Qiushi Z., Bakulev V., Osolodkov M., Sokolov P., Demidov V. DNA binding with acetate bis(1,10-phenanthroline)silver(I) monohydrate in a solution and metallization of formed structures // Polymers, 2017, 9(6), 211-230
3. Kasyanenko N., Varshavskii M., Ikonnikov E., Tolstyko E., Belykh R., Sokolov P., Bakulev V., Rolich V., Lopatko K. DNA modified with metal nanoparticles: preparation and characterization of ordered metal-DNA nanostructures in a solution and on a substrate // Journal of Nanomaterials, 2016, 3237250. Doi:10.1155/2016/3237250

## СКРЫТЫЙ СТРУКТУРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ УОТСОН-КРИКОВСКИХ ПАР В ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА ЭУКАРИОТ

## HIDDEN STRUCTURAL POLYMORPHISM OF WATSON-CRICK PAIRS IN THE EUKARYOTIC GENOME FORMATION

*Комаров В.М., Самченко А.А., Кондратьев М.С.*

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, [komarov\\_vm@mail.ru](mailto:komarov_vm@mail.ru)

Успехи секвенирования геномов различных видов организмов про и эукариот все больше и больше указывают на необычный характер распределения Уотсон-Криковских пар в структуре молекулы ДНК. Хотя функции большинства из найденных повторяющихся или одиночных нуклеотидных треков до конца еще не выяснены, тем не менее повышенная встречаемость, например, последовательностей А/Т-типа во многих геномах уже

хорошо просматривается. И это вопреки распространенному мнению о ключевой роли GC комплементарного спаривания азотистых оснований, как наиболее термодинамически стабильного, в формировании основных структурно-функциональных свойств молекул нуклеиновых кислот.

Ранее, мы в своих квантово-химических исследованиях особенностей организации ДНК комплексов, с привлечением анализа накопленных структурных, спектральных и термодинамических данных, неоднократно указывали на важную роль учета в такого типа задачах скрытой специфики водородного связывания комплементарных пар. Как оказалось, исходное пирамидальное строение экзоциклических амино групп оснований с их инверсионной бистабильностью ориентации валентных связей у атома азота инициирует структурный полиморфизм водородного связывания Уотсон-Криковских пар. Для АТ-пары свойственным является 2-х кратный полиморфизм с образованием двух пропеллеро-подобных структур. Для GC-пары характерным оказывается 4-х кратный полиморфизм, с формированием двух пропеллеро-подобных и двух ступенко-образных конформаций. Такая изначальная множественность неплоского строения Уотсон-Криковских пар инициирует, по нашему мнению, и наблюдаемую высокую лабильность пространственной формы молекул нуклеиновых кислот, и реализацию общего широкого полиморфизма структуры двойной спирали.

В этой работе, в развитии идеи о нетривиальной роли скрытого полиморфизма пар теперь уже в формировании структурных особенностей геномной ДНК, обобщаются результаты наших теоретических исследований нуклеотидной организации генома у разных видов эукариот. На основе экспериментальных данных **GenBank**, обсуждается: как полиморфизм Уотсон-Криковских пар может определять в ДНК эукариот своеобразие частот появления А/Т- и G/C-треков сравнимой длины. На отдельном примере человеческого генома детализируются особенности встречаемости АТ- и GC-пар во всех его хромосомах. Изучается: как способность GC-пар к формированию повышенного числа спонтанных перестроек N-H связей пирамидальных амино групп оснований влияет на распределение А/Т- и G/C-треков в генных, межгенных, экзонных и интронных областях этих хромосом. Показано:

1) В ряду исследованных эукариот с разным GC-составом наблюдается общее доминирование в ДНК мононуклеотидных треков  $A_n$ - и  $T_n$ -вида, а также треков смешанной природы  $W(A/T)_n$ -типа ("W"=weak). Отмечено, что встречаемость треков  $S(G/C)_n$ -типа ("S"= strong) в организации геномов сильно «минимизирована» Природой. Вероятнее всего именно по причине повышенной неоднозначности геометрии комплементарного H-связывания GC-пар. Такой простой минимизацией участия GC-пар достигается большая надежность протекания в клетках генетических процессов и, в особенности, процесса репликации ДНК;

2) Нуклеотидное распределение в хромосомах человека в целом сохраняет превалирование треков А/Т-природы. В тоже время, «исходный дефицит» GC-состава накладывает свои ограничения на частотные характеристики появления А/Т- и G/C-треков в различных функциональных областях каждой из хромосом. Отличительным качеством оказывается повышенная концентрация GC-пар в экзонах;

3) Исходя из полученного GC(%)-состава экзонов и вида асимптотики локального доминирования в них  $S(G/C)_n$ -треков длиной до 35 нуклеотидных пар весь хромосомный набор генома человека, включая и митохондриальный геном (мтДНК), может быть сгруппирован всего в III различных типа:

- **I тип** – хромосомы **1, 6, 7, 8, 9, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22** с самым высоким GC-составом экзонов (52-58%) и доминированием в них  $S(G/C)_n$ -треков по всей длине (n от 1 до 35 пар). Можно предположить, что свойственная GC-парам высокая лабильность к спонтанным перестройкам своей исходной геометрии будет инициировать у этого типа хромосом довольно высокий фон частоты точечных спонтанных мутаций кодирующих областей;

- **II тип** – хромосомы **2, 3, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 18, X** с доминированием  $S(G/C)_n$ -типа треков длиной лишь n от 10 до 35 пар. Для них мы имеем пониженный GC-состав экзонных областей (47-51 %). Вполне вероятно, что фон частоты точечных спонтанных мутаций в генах этих хромосом будет уже умеренным;

- **III тип** – особый случай. Сюда отнесена Y-хромосома, где нет явного доминирования ни  $S(G/C)_n$ , ни  $W(A/T)_n$  треков. Это уникальное, консервативное образование очень малых размеров, где отсутствует межхромосомный обмен ДНК. Наблюдаемая, однако, необычно высокая активность этой хромосомы к точечным спонтанным мутациям реализуется за счет особенностей нуклеотидного состава её регуляторных областей. К этому же типу можно отнести и мтДНК. GC-состав её экзонов  $\approx 44\%$ .

## ЭКСИТОННЫЕ СОСТОЯНИЯ В ДНК

### EXCITON STATES IN DNA

*Кононов А.И.*

СПбГУ, Санкт Петербург, [a.kononov@spbu.ru](mailto:a.kononov@spbu.ru)

Солнечный свет, как известно, приводит к повреждениям ДНК, мутагенезу, канцерогенезу. Одним из самых серьезных повреждений является образование циклобутановых димеров [1], реакция образования которых происходит за время  $\sim 1$  пс [2]. Исследование спектра, природы и динамики низколежащих

возбужденных состояний ДНК чрезвычайно важно для прогнозирования путей фотохимических реакций в ДНК и определения потенциальных сайтов, наиболее подверженных фотоповреждению. Значительный прогресс достигнутый в развитии теоретических подходов и создании суперкомпьютеров, а также в экспериментальной техники временной спектроскопии вывел эти исследования на качественно иной уровень [3].

В данном докладе представлены наши результаты, полученные в последнее время по теоретическим расчетам электронно-возбужденных состояний для различных локальных конформаций оснований в ДНК [4], а также экспериментальные исследования динамики электронно-возбужденных состояний в *i-motif* конформации ДНК [5], а также в комплексах ДНК с нанокластерами серебра [6].

С помощью высокоуровневых *ab initio* методов мы рассчитали электронные спектры возбуждения димеров оснований ДНК в широком интервале конформационных параметров для конформаций различных форм ДНК, взятых из PDB базы, а также на основе молекулярной динамики [4]. Низко-энергетические электронно-возбужденные состояния экситонной природы, сдвинутые в длинноволновую сторону на величину до 0.6 эВ по сравнению с В-формой ДНК, были обнаружены в ряде конформаций ДНК с уменьшенным расстоянием между основаниями. Это приводит к значительному увеличению перекрытия спектра солнечного света со спектром поглощения ДНК, что в свою очередь значительно увеличивает эффективность взаимодействия ДНК с УФ частью солнечного спектра и делает данные конформации наиболее вероятными мишенями фотохимических повреждений в ДНК. К таким конформациям относится и структура *i-motif* ДНК. Как показали наши расчеты [5], длинноволновый сдвиг спектра поглощения данной структуры также обязан экситонному взаимодействию оснований с величиной экситонного расщепления около 0.3 эВ. Экспериментально изученная динамика возбужденных состояний в *i-motif* ДНК методом ап-конверсии на фемтосекундной временной шкале показала, что экситонные (делокализованные) состояния являются относительно долгоживущими с временем затухания 2 пс и существуют наряду с локализованными на мономере состояниями, дезактивирующимися за время около 300 фс [5]. Делокализованные экситонные состояния, наиболее вероятно, являются ответственными за обнаруженный чрезвычайно эффективный перенос энергии по цепочке оснований на нанокластер серебра в комплексе с ДНК [6]. Чрезвычайно быстрый (<100 фс) перенос энергии на флуоресцирующий кластер серебра, являющийся акцептором возбуждения, наблюдается в области размером от 20 до 30 оснований. Данный результат указывает на возможность дальней миграции энергии в определенных структурах ДНК.

Обнаруженные особенности взаимодействия УФ света с ДНК, связанные с экситонными состояниями, представляют интерес как для понимания механизмов и прогнозирования эффективности фотохимических процессов в геномной ДНК, так и для создания различных наноконструкций на основе ДНК.

Результаты получены при поддержке грантов: РФФ (16-13-10090), РФФИ (18-33-01233), CRDF Global grant (FSCX-18-63875-0), СПбГУ (11.38.221.2014).

1. Besaratinia A. et al. Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight // *FASEB J.* 2011. Vol. 25. P. 3079.
2. Schreier W. J. Thymine Dimerization in DNA Is an Ultrafast Photoreaction // *Science.* 2007. Vol. 315. P. 625.
3. Middleton C. T. et al. DNA Excited-State Dynamics: From Single Bases to the Double Helix // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2009. Vol. 60. P. 217.
4. Ramazanov R. R., Maksimov D. A., Kononov A. I. Noncanonical Stacking Geometries of Nucleobases as a Preferred Target for Solar Radiation // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137. P. 11656.
5. Reveguk Z. V. et al. Exciton Absorption and Luminescence in *i-Motif* DNA // *Sci. Rep.* 2019. Submitted.
6. Volkov I. L et al. DNA as UV light-harvesting antenna // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. P. 3543.

## СТАТИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНСАМБЛЯ ОТКРЫТЫХ СОСТОЯНИЙ ДНК STATISTICAL PROPERTIES OF THE ENSEMBLE OF OPEN DNA STATES

***Краснобаева Л.А., Якушевич Л.В.<sup>1</sup>***

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, E-mail: kla1983@mail.ru

ГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук, г. Пущино, E-mail: yakushev@icb.psn.ru

Для моделирования внутренней динамики молекулы ДНК исследователи часто используют инструменты теоретической физики и нелинейной математики, включая представление о кинках, антикинках и бризерах, которые имитируют нелинейные конформационные возмущения, возникающие в двойной спирали ДНК в результате воздействия температуры, столкновений с молекулами раствора, радиации, взаимодействия с белками [1-4]. В частности, локально расплетенные участки двойной спирали, называемые также открытыми состояниями ДНК и играющие важную роль в процессах транскрипции, репликации, и денатурации ДНК, в



«нерелятивистском» приближении часто моделируют как квазичастицы – кинки, обладающие определенной массой, скоростью и энергией покоя. Если в молекуле ДНК образовалось не одно, а  $N$  открытых состояний, то правомерно поставить вопрос о статистике ансамбля из  $N$  кинков ДНК. Статистические свойства такого ансамбля до сих пор остаются малоизученными. В настоящей работе мы исследуем эти свойства, опираясь на полученные нами недавно данные о динамических характеристиках кинков ДНК.

Предположив, что число открытых состояний – кинков, фиксировано, взаимодействие между ними мало и все кинки одинаковые, мы рассчитали статистическую сумму ансамбля:

$$Z = \frac{L^N}{N!} \left( e^{-\frac{E_0}{k_B T}} \sqrt{\frac{m_0 k_B T}{2\pi\hbar^2}} \right)^N. \quad (1)$$

Здесь  $L$  – длина последовательности,  $T$  – температура,  $k_B$  – постоянная Больцмана,  $\hbar$  – постоянная Планка,  $E_0$  и  $m_0$  – энергия и масса покоя кинка, которые определяются формулами:

$$E_0 = 8\sqrt{K'V}, \quad (2)$$

$$m_0 = \frac{8\sqrt{K'V}}{C^2}, \quad (3)$$

где  $I$  – момент инерции,  $K'$  – константа, характеризующая крутильную жесткость сахаро-фосфатной цепочки,  $V$  – константа, характеризующая взаимодействие между основаниями внутри пар,  $C = (K'a^2/I)^{1/2}$  – скорость звука,  $a$  – расстояние между ближайшими парами оснований.

Мы рассчитали также свободную энергию ( $F$ ), функцию распределения скоростей ( $\rho(v)$ ), среднюю энергию ( $\epsilon$ ), теплоемкость ( $C_v$ ) и энтропию ( $S$ ) ансамбля. Графики температурной зависимости этих характеристик построены для четырех однородных последовательностей: *poly*·(A), *poly*·(T), *poly*·(G), *poly*·(C), и для последовательности плазмиды pBR322.

Результаты расчетов показали, что для всех пяти последовательностей с ростом температуры свободная энергия, средняя энергия и энтропия ансамбля возрастают, причем при любой фиксированной температуре  $T$  самые высокие значения этих характеристик наблюдаются в случае *poly* (G), а самые низкие – в случае *poly* (T). Как показали расчеты, теплоемкость ансамбля не зависит от температуры и от вида последовательности, а функция распределения скоростей имеет форму колокола, высота которого достигает максимума для кинков с нулевой скоростью. Самое большое значение высоты колокола наблюдается в случае последовательности *poly* (G), а самое низкое – в случае *poly* (T).

1. Якушевич Л.В. Методы теоретической физики в исследованиях свойств биополимеров ОНТИ НЦБИ АН СССР, Пушино, 1990.
2. Peyrard M. Nonlinear dynamics and statistical physics of DNA // Nonlinearity 2004. Vol. 17. P. 1.
3. Peyrard M. Nonlinear Excitations in Biomolecules. Springer, Berlin 1995.
4. Scott A. Encyclopedia of Nonlinear Science. Frances and Taylor, New York 2005.

## КОНДЕНСАЦИЯ НУКЛЕОИДА БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

## CONDENSATION OF NUCLEOID IN BACTERIA AT STRESS CONDITIONS

**Крупянский Ю.Ф., Лойко Н.Г.<sup>1</sup>, Терешкина К.Б., Терешкин Э.В., Коваленко В. В., Моисеенко А. В.<sup>2</sup>, Соколова О.С.<sup>2</sup>, Попов А.<sup>3</sup>**

Институт химической физики им. Н.Н.Семенова Российской академии наук, Москва

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва<sup>3</sup>

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва

<sup>3</sup>European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France.

Выживание живых организмов в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды возможно благодаря универсальным наследственным стратегиям адаптации к различным видам стресса, основанным на структурных, биохимических и генетических перестройках. Одна из таких стратегий, реализуемая в бактериальных клетках, связана с защитой нуклеоида от неблагоприятных воздействий с помощью связывания со специфическими гистоноподобными белками. Следствием этой стратегии, видимо, является конденсация ДНК в комплексе с белками, основным из которых является белок Dps (DNA binding protein from starved cells), в квазинанокристаллическую структуру, не так давно обнаруженную у подверженных 48-часовому голоданию клеток грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*. Можно предположить, что механизмы конденсации (включая квазинанокристаллизацию) нуклеоида обеспечивает как его защиту от повреждений, так и потенциальную способность возобновления метаболической активности бактериальных клеток в свежей среде. Резистентность бактериальных клеток к воздействию многих антибактериальных препаратов значительно

усиливается в конденсированной фазе нуклеоида, оказываясь серьезной проблемой для современной медицины. Перспективным направлением преодоления этой устойчивости к антибиотикам является изучение клеточных механизмов, способствующих бактериальной резистентности к антибактериальным препаратам

Впервые проведена серия дифракционных экспериментов по изучению структурного ответа на стресс в бактериях *E. coli*, спорообразующих бактериях *Bacillus cereus*, в клетках и спорах мицелиального гриба *Umbelopsis ramanniana*. В клетках *E. coli* после 48-часового голодания зоны повышенной интенсивности с периодами 90 Å и 44 Å свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего квазинанокристаллической) нуклеоида бактерий. Для голодающих бактерий *Bacillus cereus* пик с периодом 45 Å, видимо, также связан с наличием квазинанокристаллических комплексов ДНК с белком SASP. Споры гриба *Umbelopsis ramanniana* ВКМ F-582, как и споры *Bacillus cereus* образуют упорядоченные комплексы молекул ДНК с конденсирующими кислотнo - растворимыми белками SASPs. Голодающие, обезвоженные мицелиальные клетки гриба *Umbelopsis ramanniana*, образуют упорядоченные структуры с периодом от 27 Å до 55 Å. Серия пиков отражает образование ряда белковых упорядоченных образований, возможно с ДНК, с непрерывно меняющимся характерным размером межплоскостных расстояний.

Методы электронной микроскопии и рентгеновской дифракции использованы для более тщательного исследования и выявления различных форм конденсации нуклеоида в клетках *E. coli*, подвергнутых стрессу голодания в течение более длительного времени - до 7 месяцев. Обнаружены не только ранее наблюдаемые формы конденсации нуклеоида: квазинанокристаллическая, квазижидкристаллическая и спороподобная. Был обнаружен новый тип конденсации нуклеоида в покоящихся клетках - свернутая нуклеосомоподобная форма.

Согласно признанной концепции бактериальной популяции как многоклеточного организма, их гетерогенность позволяет гибко реагировать на изменения окружающей среды и выживать в стрессовых ситуациях. Гетерогенность является причиной, почему мы наблюдаем несколько типов конденсации нуклеоида в покоящихся клетках *E. coli*. Гетерогенность клеток повышает способность всей популяции выживать в различных стрессовых условиях. Наблюдаемые результаты проливают новый свет как на явление конденсации нуклеоида в прокариотических клетках, так и на общую проблему развития реакции на стресс.

Исследования проводились в рамках государственного задания для ИХФ РАН 0082-2014-0001 (гос. Регистрационный № АААА-А17-117040610310-6) и 0104-2018-0029. Авторы благодарны финансовой поддержке Минобрнауки России, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61616X0070. Авторы благодарят Европейский центр синхротронного излучения (European Synchrotron Radiation Facility) за предоставление возможности проведения экспериментов и МСЦ РАН (проект chph2), за доступ к компьютерным кластерам для проведения расчётов при подготовке и обработке результатов экспериментов. Данные электронной микроскопии были получены в Центре пользователей «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

## FUNCTIONAL ANNOTATION OF REGULATORY POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH ONCOLOGICAL DISEASES

Леберфарб Е.Ю.<sup>1,2</sup>, Дегтярева А.О.<sup>1</sup>, Брусенцов И.И.<sup>1</sup>, Ефимова Е.Г.<sup>2</sup>, Меркулова Т.И.<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>ФИЦ ИЦиГ СО РАН, РФ, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

<sup>2</sup>ГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, РФ, г. Новосибирск, Красный пр., 52

<sup>3</sup>Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 1

Согласно современным данным, основным фактором фенотипического изменения сложных признаков и восприимчивости к болезням является Cis-эффекты некодирующих вариантов на экспрессию генов[1]. Ранее нами был разработан новый биоинформатический подход для выявления регуляторных полиморфизмов (rSNP), основанный на анализе полногеномных данных по аллель-асимметрии связывания белков хроматина и транскрипционных факторов и аллель-асимметрии экспрессии генов [2]. С помощью разработанного подхода и использования данных ICGC (International Cancer Genome Consortium) было выявлено 32 rSNP, потенциально связанных с развитием онкологических заболеваний.

По 6 полиморфизмам было проведено генотипирование на 160 пациентах с колоректальным раком, 140 пациентах с раком молочной железы и 185 здоровых людях в возрасте 50-80 лет. Для трех полиморфизмов (rs2072580, rs4796672, rs590352) была установлена связь с заболеванием. Для rs590352 гена *ATXN7L3B* было показано, что люди с генотипом CC (CC vs GG + GC) имеют повышенный риск развития колоректального рака (OR=1,7, p-value=0.02). Более выраженная взаимосвязь генотипа с риском заболевания выявлена у мужчин (OR=2, p-value=0.02). Что касается rs4796672 гена *KRT15*, повышенный риск развития колоректального рака (в 3,93 раза; p = 0,04) наблюдался у женщин, гомозиготных по минорному аллелю (C / C). Для полиморфизма rs2072580 гена *SART3* выявлена взаимосвязь генотипа (p-уровень<0,05) и аллеля (p-уровень<0,01) с развитием



рака молочной железы. Повышенный риск возникновения рака молочной железы наблюдался у женщин при генотипе А/Т (АТ vs ТТ/АА) (OR=4,87, p-value<0,001).

Регуляторный потенциал изучаемых гSNP оценивали с помощью метода задержки ДНК в геле (EMSA - Electromobility shift assay), проведенный с ядерными экстрактами четырех клеточных линий (HepG2, HeLaS3, CaCo2, и K562). Ярко выраженное изменение картины связывания олигонуклеотидов, содержащих аллельные варианты полиморфизмов, с белками наблюдалось для всех изучаемых гSNP. Это говорит о том, что рассматриваемые гSNP могут разрушать сайты связывания для некоторых транскрипционных факторов (TF) и / или создавать сайты связывания для других TF и влиять на регуляцию экспрессии генов при транскрипции.

Поиск TF, сайты связывания которых меняют изучаемые полиморфизмы, проводился с использованием пакета “motifbreakR” для R[3]. Анализ данных ChIP-seq экспериментов из проекта ENCODE [4] показал присутствие пиков связывания предсказанных TF в областях локализации rs2072580, rs590352 и rs4796672.

Таким образом, мы идентифицировали 3 полиморфизма, связанные с риском развития онкологических заболеваний на примере колоректального рака и рака молочной железы.

Работа выполнена при поддержке грантов 18-29-09041 Российского фонда фундаментальных исследований и государственного бюджетного проекта 0324-2019-0042.

[1]. Merkulov V. M., Leberfarb E. Y., Merkulova T. I., Regulatory SNPs and their widespread effects on the transcriptome. // J. Biosci. 2018. Vol. 43, no. 5, pp. 1069–1075.

[2]. Korbolina E.E. et al., Novel approach to functional SNPs discovery from genome-wide data reveals promising variants for colon cancer risk. // Hum Mutat. 2018. V.39 (6), pp.851-859.

[3]. Coetzee S. G., Coetzee G. A., Hazelett D. J. motifbreakR: an R/Bioconductor package for predicting variant effects at transcription factor binding sites. // Bioinformatics. 2015. V. 31, pp. 3847–9.

[4]. Davis C. A., Hitz B. C., Sloan C. A., et al. The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. pp. 794–801.

## КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ СТРУКТУРА В СПЕКТРАХ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ТИМИНА

## VIBRATIONAL STRUCTURE IN THYMINE LUMINESCENCE SPECTRUM

*Малкин В.М.<sup>1,2</sup>, Тулина Т.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Михайловская военная артиллерийская академия, Санкт-Петербург, vlmalkin@yandex.ru

<sup>2</sup>Военно-морская академия, Военно-морской политехнический институт, город, Санкт-Петербург

Структура энергетических уровней многоатомных молекул осложнена расщеплением электронных уровней на колебательные и вращательные подуровни [1, 2]. Теоретически, такой структуре уровней должны соответствовать линейчатые спектры испускания и возбуждения люминесценции, дающие информацию как о процессах внутри молекулы, так и о межмолекулярных взаимодействиях. Но, в растворах при комнатной температуре, спектры молекул представляют собой широкие полосы [3-16].

При понижении температуры (77К), в спектрах люминесценции молекул проявляется колебательная структура (эффект Шпольского) [2, 7, 8], однако, данный метод практически неприменим для исследования колебательной структуры спектров имеющих биологическое значение молекул в наиболее естественном для них окружении — водных растворах.

Структуру колебательных подуровней молекул в водном окружении трудно получить и методами ИК-спектроскопии, т. к. вода практически не пропускает свет в ИК-области [9].

Мы предположили, что кажущиеся случайными “шумами” плечики и мелкие “пички” спектров люминесценции, распределены не случайным образом. Проведён анализ спектров люминесценции тимина в водных растворах, построены гистограммы распределения пиков и плечиков, оказалось, что они распределены не случайным образом, а наиболее часто наблюдаются на 295нм (33898 см<sup>-1</sup>), 303нм (33003 см<sup>-1</sup>), 312нм (32051 см<sup>-1</sup>), 319нм (31348 см<sup>-1</sup>), 327нм (30581 см<sup>-1</sup>), 336нм (29762 см<sup>-1</sup>), 344нм (29068 см<sup>-1</sup>), 353 нм (28329 см<sup>-1</sup>), 363 нм (27548 см<sup>-1</sup>), 372 нм (26882 см<sup>-1</sup>). Мы полагаем, что статистика действительно позволяет наблюдать проявления колебательной структуры основного энергетического уровня тимина в водном растворе, и что каждая полоса в гистограмме распределения “шумов” соответствует переходу с нулевого или первого колебательного подуровня возбуждённого состояния на один из колебательных подуровней основного состояния. Исходя из полученных нами данных нам удалось получить частоты колебаний ИК спектра тимина 895 см<sup>-1</sup> (близко к 889 см<sup>-1</sup>, полученным экспериментально в неводном растворе [10] и теоретическому 907см<sup>-1</sup> [11]), 952 см<sup>-1</sup> (ср. 959 см<sup>-1</sup>[10] и 965см<sup>-1</sup> [11]), 1655 см<sup>-1</sup> (ср. 1668 см<sup>-1</sup>[10] и 1696 см<sup>-1</sup> [11]), 767 см<sup>-1</sup> (ср. 763 см<sup>-1</sup>[10] и 767 см<sup>-1</sup> [11]), 739 см<sup>-1</sup> (ср. 727 см<sup>-1</sup>[10] и 733 см<sup>-1</sup> [11]), 781 см<sup>-1</sup>, 666 см<sup>-1</sup> (ср. 662 см<sup>-1</sup>[10] и 667 см<sup>-1</sup> [11]), 704 см<sup>-1</sup> и т.д.

1. А.Н.Теренин «Фотоника молекул красителей». М-Л, 1967

2. С. Паркер «Фотолюминесценция растворов». М., 1972

3. Malkin V.M., Rapoport V.L. Luminescence of aqueous thymine solutions at room temperature // Biophysics. 1999 V.44 (6) pp. 992-996
4. Kononov A.I., Bakulev V.M., Rapoport V.L. Exciton effects in dinucleotides and polynucleotides // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1993 V.19 pp. 139-144
5. Bukina M.N., Bakulev V.M., Barmasov A.V., Zhakhov A.V., Ischenko A.V. Luminescence diagnostics of conformational changes of the Hsp70 protein in the course of thermal denaturation // Optics and Spectroscopy. 2015 V. 118 (6) 899-901
6. Kononov A.I., Bakulev V.M. Red-shifted fluorescence from polyguanylic acid in aqueous solution at room temperature // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1996 V.24 (2-3) pp. 211-216
7. Шпольский Э.В. «Успехи физических наук» 1960 Т. 71, стр. 215
8. Шпольский Э.В. «Успехи физических наук» 1959 Т. 68, стр. 51
9. А. Смит «Прикладная ИК-спектроскопия». М. 1982
10. Степаньян С.Г., Е.Д. Радченко, Г.Г. Шеина и др. // Биофизика. 1988 Т. 34 вып. 5 стр. 753-758
11. Г.Н. Тен, В.В. Нечаев, А.Н. Панкратов и др. // Журнал структурной химии. 2010 Т. 51 № 5 стр. 889-895

### ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК И АЗОСОДЕРЖАЩЕГО ПАВ В РАСТВОРЕ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

### GENERATION OF DNA-SURFACTANT COMPACT COMPLEXES IN SOLUTION: INVESTIGATION BY MOLECULAR DYNAMICS METHOD

*Мамонтова В.В.*

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, [st048848@student.spbu.ru](mailto:st048848@student.spbu.ru)

В генной инженерии и нанотехнологиях широко используются компактные комплексы ДНК. Важным свойством таких соединений является обратимость компактизации с сохранением вторичной структуры. Под компактизацией макромолекулы ДНК подразумевается любое резкое уменьшение её линейных размеров в растворе.

Высокомолекулярная цепочка ДНК в водном растворе представляет собой набухший клубок, что обусловлено наличием фосфатных групп, заряженных отрицательно, поэтому для конденсации ДНК необходима компенсация заряда цепочки [1]. В качестве активных компонентов могут использоваться многозарядные ионы, некоторые поверхностно-активные вещества, в частности, катионные соли, и т.д. Механизмы взаимодействия последних с фрагментом ДНК являются предметом данного исследования. В данной работе рассматривалась соль, имеющая органический катион (4-бутил-4'-гексокси-триметиламмония-азобензин, С4-Azo-ОС6ТМА) и неорганический анион. Положительный заряд катиона обеспечивала гидрофильная голова (триметиламмоний). Противоположная часть (гидрофобная) представляла собой углеводородный хвост. Особенностью указанного соединения являлось наличие в составе азобензольной группы, меняющей свою конформацию при облучении светом в ультрафиолетовом диапазоне от более гидрофобной транс- до гидрофильной цис-конформации. Транс-конформер способен образовывать структуры, называемые мицеллами, и взаимодействовать с ДНК. Взаимодействие цис-конформера с ДНК минимально [2].

Взаимодействие соли С4-Azo-ОС6ТМА и ДНК ранее исследовалось экспериментально с использованием методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, динамического рассеяния света и атомно-силовой микроскопии [3]. Целью данной работы являлось изучение взаимодействия ДНК с азотсодержащим поверхностно-активным веществом (ПАВ) в водном растворе методом молекулярной динамики. Для получения информации о взаимодействии веществ на атомарном уровне проводилось моделирование трех систем, содержащих ДНК и ПАВ в солевом растворе. Заряд ДНК компенсировался ПАВ наполовину, полностью и превышал заряд ПАВ в 2 раза. Проводилась дополнительная компенсация заряда системы ионами натрия или хлора.

Моделирование проводилось при помощи самописной программы АКМД. Использовались периодические граничные условия. Ячейка была создана при объединении трех или четырех исходных ячеек, каждая из которых содержала один из типов веществ: цепочку ДНК, состоящую из 18 пар оснований, ионы азотсодержащего поверхностно-активного вещества, ионы соли, молекулы воды. Подготовленная система приводилась к температуре 21 С, «нулевому» давлению и объему, соответствующему минимуму полной энергии. Моделирование проводилось с шагом 2 фс. Для описания взаимодействий атомов были использованы потенциалы OPLSAA, задающие частичный заряд атомов и иные параметры.

Процесс образования агрегатов во время моделирования не рассматривался. Анализ траекторий проводился после установления равновесия в системе, было получено распределение групп атомов поверхностно-активного вещества и атомов соли относительно пар оснований ДНК (аденин-тимин, гуанин-цитозин). При анализе исключались ионы ПАВ, находящиеся возле концевых пар оснований ДНК.

Автор выражает благодарность к. ф.-м. н., доценту Комолкину Андрею Владимировичу за возможность

использования программы AKMD для расчетов, к. ф.-м. н., ассистенту Силантьевой Ирине Александровне за предоставление данных об исследованиях изучаемого вещества. Расчеты были проведены с использованием вычислительных ресурсов Ресурсного Центра "Вычислительный центр СПбГУ" (<http://cc.spbu.ru>).

1. Касьяненко Н.А. Компактизация ДНК в растворе, индуцированная её связыванием с поликатионами и многовалентными ионами / Н.А. Касьяненко, В.В. Сморгы // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 4. Физика. Химия. – СПб, 2007. – Вып. 2. – С. 10-16.
2. Kasyanenko N. DNA Interaction with Head-to-Tail Associates of Cationic Surfactants Prevents Formation of Compact Particles / N. Kasyanenko, I. Unksov, V. Bakulev, S. Santer. // *Molecules*. – 2018. – Том 23, Вып. 7. – 1576.
3. Zakrevskyy Yu. DNA compaction by azobenzene-containing surfactant / Yu. Zakrevskyy, A. Kopyshev, N. Lomadze, E. Morozova, L. Lysyakova, N. Kasyanenko, S. Santer // *PHYSICAL REVIEW E*. – 2011. – Том 84, Вып. 2. – 021909.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИПОХЛОРИТА НАТРИЯ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК

### STUDY OF THE MOLECULAR MECHANISM OF THE INTERACTION OF SODIUM HYPOCHLORITE WITH BACTERIAL DNA

Морошкина Е.Б., Осинникова Д.Н., Афиногенов Г.Е., Афиногенова А.Г.<sup>1</sup>, Спиридонова А.А.<sup>1</sup>,  
Шамова О.В.<sup>2</sup>, Жаркова М.С.<sup>2</sup>, Орлов Д.С.<sup>2</sup>

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург,

<sup>1</sup>ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

В настоящее время остро стоит проблема резистентности бактерий к антибиотикам. В составе биопленок устойчивость бактерий к антибиотикам возрастает многократно. Одним из путей решения этой проблемы является использование противомикробных препаратов другой природы, в частности антисептиков. Известно, что небактерицидные концентрации антисептиков предупреждают формирование и разрушают сформированные биопленки, в том числе антибиотико-резистентных микроорганизмов. ДНК является основой системы Quorum Sensing при формировании микробных биопленок и может служить мишенью антисептиков при их воздействии на биопленки.

При взаимодействии различных противомикробных препаратов с ДНК может происходить образование обратимых и необратимых комплексов, вызывающее различные изменения в структуре макромолекулы. При обратимом, равновесном связывании низкомолекулярных соединений с ДНК наблюдаются локальные изменения в ее вторичной и третичной структурах. Соединения, способные образовывать с элементами нуклеиновой кислоты (азотистые основания, сахара, фосфатные группы) валентные связи в процессе реакций окисления, восстановления, алкилирования и т.д., вызывают более серьезные необратимые нарушения в структуре ДНК. Среди них наблюдаются: денатурация при разрыве водородных связей, деструкция при расщеплении фосфодиэфирных связей, преобразование и разрушение азотистых оснований в результате реакций алкилирования или окисления.

В настоящей работе изучена способность гипохлорита натрия разрушать сформированные (48 ч) микробные биопленки клинических штаммов антибиотико-устойчивых *Klebsiella pneumonia* и *Pseudomonas aeruginosa*, продуцирующих ферменты – инактиваторы антибиотиков. Показано, что в наших опытах наблюдается снижение КОЕ на  $2 \log_{10}$  по сравнению с контролем.

Для определения возможного молекулярного механизма действия гипохлорита натрия на биопленки было изучено его взаимодействие с ДНК из различных источников *in vitro* методами спектрофотометрии, гидродинамики и электрофореза. При этом использовалась как плазмидная бактериальная ДНК штамма *Escherichia coli* DH5-Alpha, так и ДНК из тимуса телят с мол. массой  $15 \cdot 10^6$  Да. Для определения роли вторичной структуры ДНК в ее взаимодействии с гипохлоритом были проведены аналогичные исследования с использованием синтетических полинуклеотидов (polyA и polyU), а также отдельных нуклеотидов (аденозин-5'-тетрафосфорная кислота и гуанозин-2',3'-циклофосфорная кислота). Были получены концентрационные и временные зависимости влияния гипохлорита на ДНК, полинуклеотиды и нуклеотиды в водно-солевых растворах.

Полученные результаты позволили сделать следующие выводы. Происхождение и состав ДНК мало влияют на характер ее взаимодействия с гипохлоритом. При взаимодействии с гипохлоритом натрия происходит как разрушение вторичной структуры ДНК (денатурация), так и химическая модификация азотистых оснований, предположительно хлорирование. Наличие стабильной двуспиральной структуры ДНК замедляет химическую реакцию гипохлорита натрия с азотистыми основаниями ДНК.

Авторы признательны за финансовую поддержку РФФИ (грант № 18-08-01500).

## МЕХАНОХИМИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК И СВОЙСТВА РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОМА

## DNA MECHANOCHEMICAL CLEAVAGE AND PROPERTIES OF GENOMIC REGULATORY SITES

*Нечипуренко Ю.Д.<sup>1</sup>, Урошлев Л.А.<sup>2</sup>, Абдуллаев Э.Т.<sup>3</sup>, Ходыков М.В.<sup>1</sup>, Полозов Р.В.<sup>4</sup>, Панченко Л.А.<sup>5</sup>, Ильичева И.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, [nec99@mail.ru](mailto:nec99@mail.ru)

<sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва

<sup>3</sup>Институт Молекулярной Генетики им. Макса Планка, Берлин

<sup>4</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

<sup>5</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва.

При облучении молекул ДНК ультразвуком происходят двухцепочечные разрывы её нитей, и относительные частоты разрывов в фрагментах ДНК зависят от типа динуклеотида, в котором происходит разрыв. Ранее мы оценили частоты разрывов в каждом из 16-ти динуклеотидов на основании собственных экспериментальных данных. Было обнаружено, что межнуклеотидные связи, следующие за цитозином, расщепляются чаще, чем другие [1-4]. При подготовке образцов для секвенирования нового поколения (NGS) в ДНК тоже происходят двухцепочечные разрывы. Анализ данных по фрагментации геномной ДНК, которая проводится при помощи различных механохимических методов, даёт соотношения частот расщепления, близкие к полученным нами ранее экспериментально [5]. Различие частот расщепления в разных позициях нуклеотидной последовательности ДНК связано с механохимическим механизмом её расщепления. и свидетельствует о локальных характеристиках двойной спирали ДНК [4]. Мы предложили использовать для анализа локального конформационного состояния ДНК ряд параметров (индексов), характеризующих расщепление ДНК [6-8].

Мы построили профили различных физико-химических и структурных характеристик ДНК, которые зависят от нуклеотидной последовательности, включая профили индексов ультразвукового расщепления, на участках промоторов РНК полимеразы II животных, растений и одноклеточных грибов. Эти последовательности были взяты из базы EPDnew [9]. Оказалось, что профили индексов ультразвукового расщепления имеют характерные квазипериодические изменения, идущие в противофазе в комплементарных цепях ДНК на участке между ТАТА боксом и началом сайта инициации транскрипции (TSS). Эти индексы могут свидетельствовать о том, что интенсивность конформационных движений в комплементарных нитях изменяется в противофазе. Наиболее выраженным этот эффект оказался на профилях индексов расщепления в регуляторных областях ДНК из клеток млекопитающих [7,8].

На интенсивность расщепления динуклеотида CpG существенно влияет метилирование цитозина по 5-му положению пиримидинового кольца. Мы оценили частоты расщепления различных динуклеотидов в тканях человека. Были получены показатели расщепления динуклеотидов в CpG-островах в нормальных и раковых тканях (лимфоме, гепатокарциноме и др.). Оказалось, что на участках скопления метилированных CpG молекула ДНК расщепляется значительно чаще, чем на аналогичных участках с низким уровнем метилирования. Кроме того было выявлено явное отличие картин расщепления CpG-островов в образцах из раковых и здоровых тканей, которое связано с отличиями уровней их метилирования [10]. Поэтому появляется возможность, используя базы NGS-секвенирования, выявлять предраковые состояния тканей на основании оценки уровня расщепления CpG островов в генах различных клеточных линий.

1. Гроховский С.Л. и др. Локальные неоднородности структуры и динамики двухспиральной ДНК: исследование при помощи ультразвука // Биофизика. 2008. Т.53. С. 417-425.
2. Нечипуренко Ю.Д. и др. Характерные особенности расщепления ДНК ультразвуком // Журнал структурной химии. 2009. Т. 50. С. 1040-1047.
3. Grokhovsky S. L. et al. Sequence-Specific Ultrasonic Cleavage of DNA // Bioph. J. 2011. Vol. 100. P. 117-125.
4. Нечипуренко Д.Ю. и др. Моделирование механохимического расщепления ДНК под действием ультразвука // Биофизика. 2014. Т. 59. С. 1061-1070.
5. Poptsova M. et al. Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing // Sci. Rep. 2014. V.4. P. 4532.
6. Нечипуренко Ю.Д. и др. Конформационно-динамические свойства ДНК и подходы к физическому картированию генома // Компьютерные исследования и моделирование. 2010. Т. 2 С. 419-428.
7. Il'icheva I.A. et al. Structural features of DNA that determine RNA polymerase II core promoter // BMC genomics. 2016. Vol. 17. P. 973.
8. Нечипуренко Ю.Д. и др. Физико-химические свойства ДНК в регуляторных участках генома // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2017. Т. 2. С. 339-340.
9. Dreos R. et al. The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43. D92-96.
10. Нечипуренко Ю.Д. и др. Физические характеристики регуляторных участков генома, эпигенетика и канцерогенез // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2018. Т. 3. С. 884-887.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ ИЗОХИНОЛИНОВОГО РЯДА С  
МОЛЕКУЛОЙ ДНК СПЕКТРАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ И КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИМ  
МОДЕЛИРОВАНИЕМ**

**THE STUDY OF INTERACTION OF ISOQUINOLINE ANALOGUES WITH DNA MOLECULE  
USING SPECTRAL AND QUANTUM-CHEMICAL APPROACHES**

*Осинникова Д.Н., Морошкина Е.Б., Рамазанов Р.Р., Поляничко А.М.*

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, d.osinnikova@spbu.ru

Молекула ДНК является мишенью многих биологически активных соединений. Одним из примеров таких веществ являются алкалоиды, представляющие собой обширный класс биологически активных соединений, многие из которых содержат в своей структуре изохинолиновое ядро (папаверин, берберин, морфин, кодеин и др.) и успешно применяются в качестве лекарственных препаратов. Поиск путей повышения эффективности лекарственных средств очень часто основан на синтезе аналогов уже известных и хорошо зарекомендовавших себя препаратов. Одним из этапов выявления потенциальной биологической активности новых соединений является исследование их ДНК-связывающих свойств. В данной работе исследовали комплексы индольных производных изохинолина с молекулой ДНК методами ИК-спектроскопии и квантово-химического моделирования.

Методами УФ спектроскопии, микрокалориметрии, вискозиметрии и ДПП установлено, что данные соединения взаимодействуют в растворе с молекулой ДНК. Определены основные термодинамические параметры связывания, в том числе константа связывания, количество мест связывания, энтальпия и энтропия комплексообразования. Анализ полученных результатов показал, что наиболее вероятным является внешнее связывание, не приводящее к заметным изменениям макромолекулярных параметров ДНК. Анализ спектров ИК поглощения позволил установить в спектре соединений полосы наиболее чувствительные к связыванию с ДНК. Окончательное отнесение спектральных полос колебаниям химических групп в составе соединений было проведено на основе квантово-химических расчетов колебательного спектра с использованием теории функционала плотности (функционал B3LYP, волновой базис 6-31G\*).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-08-01500).

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С КАТЕХИНОМ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ  $Mg^{2+}$  И  $Cu^{2+}$**

**INTERACTION OF DNA WITH CATECHINE IN THE PRESENCE OF  $Mg^{2+}$  AND  $Cu^{2+}$  IONS**

*Пастон С.В., Вергасова Е.О.*

Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет, кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров, Санкт-Петербург, svpaston@list.ru

Катехины – наиболее восстановленная группа флавоноидных соединений. Они содержатся во многих продуктах растительного происхождения и входят в ежедневный рацион человека. В частности, биологическая активность чайных экстрактов обусловлена присутствием в их составе катехинов и кофеина. Во всем мире активно изучаются антиоксидантные свойства катехинов и возможности для их применения в лекарственных препаратах. Многие исследователи отмечают, что в присутствии ионов переходных металлов биофлавоноиды могут приобретать прооксидантные свойства в клетках и *in vitro*, в частности, индуцировать разрывы ДНК [1,2]. В данной работе изучается взаимодействие катехина с молекулой ДНК в растворе и влияние ионов магния и меди на этот процесс.

Исследования проводили методами спектроскопии УФ поглощения и кругового дихроизма (КД), спектрофотометрического плавления ДНК и молекулярного докинга. Катехин в растворе активно окисляется при  $pH > 6$ , этот процесс можно проследить по изменениям в его спектре поглощения. Максимум в спектре поглощения катехина находится на 280 нм, при окислении фенольных гидроксильных групп наблюдается появление полосы в области 300-500 нм вследствие увеличения системы сопряженных связей. С ростом pH раствора, а также при нагревании и в присутствии ионов меди интенсивность окислительных процессов усиливается.

Результаты, полученные спектральными методами позволяют заключить, что происходит комплексообразование катехина со свободным нуклеозидом тимидином и с двуспиральной ДНК в растворе, при этом вторичная структура ДНК не нарушается. Температура плавления ДНК в комплексе с катехином, а также с катехином и ионами магния в пределах погрешности совпадает с температурой плавления нативной ДНК. Взаимодействие с катехином регистрируется в разностных спектрах поглощения на полосе поглощения катехина. В присутствии ионов  $Cu^{2+}$  эти признаки комплексообразования менее ярко выражены в разностных спектрах поглощения, однако заметно проявляются в спектрах КД, а также сопровождаются некоторой

дестабилизацией вторичной структуры ДНК. Можно предположить, что в комплексообразовании с катехином и двухвалентными катионами принимают участие азотистые основания ДНК. Исследования методом молекулярного докинга показали, что вероятный способ взаимодействия ДНК с катехином – внешнее бороздочное связывание с образованием 1 или 2 водородных связей между молекулой катехина и азотистыми основаниями.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества".

1. Kumamoto M., Sonda T., Nagayama K., Tabata M. Effects of pH and Metal Ions on Antioxidative Activities of Catechins // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, V. 65, №1, P. 126-132.
2. Farhan M., et.al. Mobilization of copper ions in human peripheral lymphocytes by catechins leading to oxidative DNA breakage: A structure activity study // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, V. 580, P. 31–40.

---

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ДНК В ПЛЕНКАХ МЕТОДОМ ИК ФУРЬЕ СПЕКТРОСКОПИИ STUDY OF DNA STRUCTURE IN FILMS BY THE METHOD OF FTIR SPECTROSCOPY

*Пастон С.В., Поляничко А.М., Шуленина О.В.<sup>1</sup>*

Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет, кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров, Санкт-Петербург, svpaston@list.ru

<sup>1</sup>ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Санкт-Петербург

Вторичная структура ДНК является ключевым фактором ее функционирования. В-А переход происходит в ходе многих внутриклеточных процессов, например, при репликации и транскрипции. Изменения вторичной структуры ДНК можно наблюдать *in vitro* при варьировании активности воды и типа противоиона.

В данной работе исследовали В-А переход в высокомолекулярной ДНК при уменьшении влажности в пленке с помощью метода ИК-Фурье спектроскопии НПВО. ИК спектр ДНК весьма чувствителен к состоянию ее вторичной структуры, одним из главных маркеров является положение полосы, соответствующей антисимметричным колебаниям фосфатной группы [1]. Кроме того, этот метод позволяет оценить количество связанной воды в образце, и таким образом получить информацию о степени гидратации ДНК. Обнаружено, что с ростом концентрации ионов  $\text{Na}^+$  количество воды в плёнке уменьшается, что свидетельствует о внедрении катионов в первичную гидратную оболочку ДНК. ДНК, содержащая дефекты первичной и вторичной структуры (частично денатурированная, облученная УФС светом), напротив, содержит больше сильно связанной воды, чем нативная ДНК, и при этом также наблюдаются признаки перехода в А-форму. Взаимодействие ДНК с низкомолекулярными соединениями оказывает влияние на ее вторичную структуру и В-А переход при снижении влажности. Так, в присутствие ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , которые образуют комплексы с фосфатными группами и с азотистыми основаниями ДНК, отмечается концентрационная зависимость формы и интенсивности полос, соответствующих колебаниям А, Г и Т, а положение полосы колебаний фосфатной группы при соотношении  $[\text{Cu}]/[\text{ДНК}(\text{Р})]$  при низкой влажности плёнки выходит за пределы, характерные для А-формы ДНК. При этом количество сильно связанной воды заметно не изменяется. Взаимодействие ДНК с кофеином регистрируется по изменению интенсивности симметричных колебаний фосфатной группы и колебаний сахаро-фосфатного остова. Комплекс ДНК-кофеин-медь характеризуется большим по сравнению с нативной ДНК количеством воды в гидратной оболочке и снижением частоты асимметричных колебаний фосфатных групп.

Таким образом, исследование пленок низкой влажности позволяет изучать взаимодействие ДНК с различными низкомолекулярными соединениями, роль воды в этих взаимодействиях, сайты связывания, а также влияние различных факторов на В-А переход во вторичной структуре ДНК.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества".

1. M. Banyay, M. Sarkar, A. Graslund. A library of IR bands of nucleic acids in solution // *Biophysical Chemistry*, 2003, V. 104, P. 477–488.

**МНОГООБРАЗИЕ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК.  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ И КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ**

**DIVERSITY OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURES OF DNA DOUBLE HELIX.  
EXPERIMENTAL DATA AND COMPUTER MODELING**

*Полтев В.И., Анисимов В.М.<sup>1</sup>, Дерябина А., Домингес В., Гонсалес Э., Гарсиа Д., Ривас Ф.*

Автономный Университет Пуэблы, Пуэбла, 72570, Мексика, E-mail: poltev@fcfm.buap.mx

<sup>1</sup>Национальный центр суперкомпьютерных приложений, Университет штата Иллинойс, Урбана-Шампэйн, Иллинойс, 61820, США

ДНК, главная биомолекула, представляет собой линейный сополимер четырех типов нуклеотидов, каждый из которых состоит из трех субъединиц - одного из четырех азотистых оснований, дезоксирибозы и фосфатной группы. Основания, два из которых – пурины (PUR) и два другие – пиримидины (PYR), – являются единственными переменными субъединицами нуклеотидов, тогда как остатки дезоксирибозы и фосфатные группы образуют химически однородный сахаро-фосфатный остов (СФО). Такая, на первый взгляд, простая химическая структура обеспечивает хранение, воспроизведение, реализацию и эволюционные изменения генетической информации всех живых организмов. Выполнение молекулой ДНК этих функций обеспечивается ее уникальным молекулярным строением, позволяющим формирование разнообразных пространственных структур. Кроме наиболее изученных правоспиральных Уотсон-Криковских А- и В-семейств конформаций дуплексов, полинуклеотидные цепи могут образовывать левоспиральные Z-конформации, дуплексы с другими конфигурациями пар оснований (параллельные, Хугстиновские), а также триплексы, квадруплексы, структуры (соединения) Холлидея.

Данная работа является продолжением исследований (см., например, [1-3]), начатых нами более 10 лет назад и направленных на выяснение закономерностей формирования пространственной структуры ДНК с помощью расчетов ее минимальных фрагментов методами квантовой механики (КМ) и молекулярной механики (ММ). Расчеты КМ методом теории функционала плотности (ТФП) дезоксидинуклеозид монофосфатов (dDMP), как минимальных фрагментов одной цепи ДНК, и минимальных фрагментов двойной спирали (комплементарных dDMP, cdDMP) показали, что многие важные особенности А- и В-семейств ДНК, в частности, зависимость ее пространственной структуры от последовательности оснований, предопределены в конформационных характеристиках локальных минимумов энергии dDMP. В частности, в этих минимумах всегда имеет место существенное перекрытие колец соседних по цепи оснований в последовательностях PUR–PUR и PUR–PYR, тогда как в последовательностях PYR–PUR и PYR–PYR такого перекрытия практически нет. Эта биологически важная и соответствующая экспериментальным данным закономерность, наблюдается в расчетах разнообразными методами КМ и, во многих случаях, ММ, но только если обе цепочки СФО cdDMP принадлежат одному и тому же семейству А- или В-конформаций. Факторами, определяющими эту закономерность, являются отличия геометрии пуринов от пиримидинов, направленность цепи СФО и области его торсионных углов, соответствующих этим семействам конформаций.

Важно отметить, что для дуплексов с другими конфигурациями нуклеозидных пар эта закономерность не выполняется. К настоящему времени в банке структурных данных нуклеиновых кислот, Nucleic Acid Database (NDB), депонировано большое количество (более 10000) фрагментов ДНК и комплексов этих фрагментов с другими соединениями. Среди них имеются структуры, содержащие cdDMP с Уотсон-Криковскими нуклеозидными парами, одна или обе цепочки СФО которых принадлежат другим конформационным семействам, то есть имеют торсионные углы СФО в других областях, чем VI, VII, AI и AII семейства конформаций. Для выяснения причин и закономерностей формирования пространственной структуры таких «минорных» конформаций мы проанализировали конформационные параметры некоторых из этих семейств и провели оптимизацию геометрии cdDMP, составляющих их dDMP и соответствующих фрагментов СФО разными расчетными методами. Были обнаружены семейства конформаций, для которых оптимизированные разными методами структуры cdDMP существенно отличаются от экспериментальных данных, а экспериментальные конформации СФО не соответствуют минимуму энергии. Конформации СФО других «минорных» семейств соответствуют локальным минимумам энергии, существенно отличающимся от минимумов для А- и В-семейств конформаций. Анализ зависимости конформационных параметров от последовательности оснований для экспериментальных и оптимизированных структур, а также расчет изменений вклада энергии взаимодействия отдельных субъединиц при оптимизации геометрии позволяют понять общие принципы формирования разных пространственных структур ДНК.

Авторы благодарят за поддержку Автономный Университет Пуэблы (Грант 100261355-V1EP2019) и Национальную Суперкомпьютерную Лабораторию Юго-Востока Мексики (Грант 201901015C).

1. Poltev V. et al. DFT Study of B-like Conformations of Deoxydinucleoside Monophosphates // J Biomol Struct Dyn. 2008. Vol. 25. P. 563.
2. Полтев В.И. и др. Анализ конформационных особенностей фрагментов уотсон-криковских дуплексов методами молекулярной механики и квантовой механики // Биофизика 2016. Т. 61. С. 259.
3. Poltev V. et al. Biologically important conformational features of DNA as interpreted by quantum mechanics and molecular mechanics computations of its simple fragments // J Molec Model. 2018. Vol. 24. P. 46.



**АНАЛИЗ ДИССОЦИАЦИИ ЦИТОЗИНОВЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК, ОПОСРЕДОВАННЫХ ИОНАМИ СЕРЕБРА****ANALYSIS OF THE DISSOCIATION OF CYTOZINE FRAGMENTS OF DNA, MEDIATED BY SILVER IONS***Рамазанов Р.Р., Клюев П.Н.*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург  
r.gamazanov@spbu.ru

Разработка структурированных молекулярных систем на основе каркаса из нуклеиновых кислот учитывает способность одноцепочечной ДНК к образованию стабильной двухспиральной структуры за счет стэкинг-взаимодействий и водородных связей комплементарных пар нуклеотидов. Для увеличения стабильности двойной спирали ДНК и расширения температурного диапазона в протоколах гибридизации предложили использовать более стабильные металл-опосредованные комплексы пар нуклеотидов в качестве альтернативы Уотсон-Криковским водородным связям между комплементарными нитями ДНК [1]. Один из наиболее часто рассматриваемых вариантов — это использование ионов серебра для стабилизации пары цитозинов из противоположных нитей ДНК [2]. Ионы серебра с высокой аффинностью связываются с атомами N3 цитозинов вдоль оси спирали с образованием, как считается, прочной связи  $N_3-Ag^+-N_3$ , относительно которой, может образоваться два вращательных изомера — цис- и транс- конфигурации цитозин- $Ag^+$ -цитозин ( $C-Ag^+-C$ ). Методами структурного ЯМР и кристаллографии было выявлено, что ДНК в присутствии ионов серебра может образовывать дуплексы с параллельной и антипараллельной укладкой цепей, соответствующих транс- и цис- конфигурациям ( $C-Ag^+-C$ ) [3, 4]. Несмотря на достаточно большое количество структурных экспериментов до сих пор так и не сложилась четкая картина понимания, в каких условиях образуется цис- или транс- конфигурация, приводящие к разным укладкам нитей ДНК. В настоящей работе мы провели теоретическое исследование и сравнительный анализ профиля изменения свободной энергии (ПСЭ) диссоциации двух изомеров в мономерной форме  $C-Ag^+-C$  и димерной форме  $(C-Ag^+-C)_2$  с использованием комбинированного метода молекулярной механики и квантовой химии (КМ/ММ).

Для расчета профиля изменения свободной энергии диссоциации цитозинов в комплексе с ионами серебра использовалась комбинированная схема квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ) с аддитивным гамильтонианом. Комбинированная схема позволила разделить систему на квантовую часть (КМ), где происходила непосредственно реакция с участием серебра в рамках теории функционала плотности (ТФП), и молекулярно-механическую часть (ММ), которая оказывала влияние посредством валентного и электростатического взаимодействия на квантовую часть со стороны рибозы нуклеотидов и водного растворителя. Для процесса диссоциации проводилась молекулярная динамика с наложением потенциала на коллективную переменную, ассоциированную с расстоянием между центрами масс цитозинов. Расчет с наложением потенциала КМ/ММ МД проводился с шагом интегрирования 0.5 фс в NVT ансамбле со смещением от 4.2 Å до 9 Å между N3 атомами цитозинов со скоростью 0.005 Å/фс. Затем из траектории вырезались фреймы с шагом 0.1 Å, для каждого фрейма проводилась ограниченная КМ/ММ МД длиной в 1 пс с фиксированием коллективной переменной алгоритмом Shake. В результате этих расчетов с использованием алгоритма Shake в каждом окне траектории с шагом в 0.1 Å были получены множители Лагранжа и построены профили изменения свободной энергии, как зависимость потенциала средней силы от расстояния между атомами N3.

В результате расчетов профилей диссоциации было выявлено существенное различие в механизмах диссоциации  $C-Ag^+-C$  и  $(C-Ag^+-C)_2$ . Относительно одной изолированной пары цитозинов транс-конфигурация обладает меньшей выгодностью по энергии, чем цис-конфигурация. В случае димера  $(C-Ag^+-C)_2$  наблюдается обратная ситуация – транс-конфигурация становится более выгодной. В случае димера для транс-конфигурации образуются дополнительные межплоскостные водородные связи, стабилизирующие комплекс. Результаты показывают, что модель стабилизации ионами серебра дуплекса ДНК должна учитывать не только непосредственное связывание ионов серебра с цитозинами, но и наличие сопутствующих факторов, таких как стэкинг-взаимодействие в протяженной ДНК, межплоскостные водородные связи, а также металлофильное взаимодействие соседних ионов серебра.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 17-73-10070.

1. Jash B., Müller J. Metal-Mediated Base Pairs: From Characterization to Application // Chemistry - A European Journal. 2017. № 68 (23). С. 17166–17178.
2. Linares F. [и др.]. Multifunctional behavior of molecules comprising stacked cytosine–Ag I –cytosine base pairs; towards conducting and photoluminescence silver-DNA nanowires // Chemical Science. 2019. (10). С. 1126–1137.
3. Müller J. Metal-mediated base pairs in parallel-stranded DNA // Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2017. (13). С. 2671–2681.
4. Ono T. [и др.]. Synthesis of covalently linked parallel and antiparallel DNA duplexes containing the metal-mediated base pairs T-Hg(ii)-T and C-Ag(i)-C // Chemical Communications. 2011. № 5 (47). С. 1542–1544.



**МАТРИЧНОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ СТЭКИНГ-АГРЕГАТОВ АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ  
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ВОДЕ ВЫЗВАННОЕ ЦИКЛИЧЕСКИМ ИЗМЕНЕНИЕМ  
ТЕМПЕРАТУРЫ**

**MATRIX REPLICATION OF STACKING AGGREGATES OF NITRIC BASES OF NUCLEIC  
ACIDS IN WATER CAUSED BY CYCLIC CHANGING OF TEMPERATURE**

*Рапопорт В.Л.<sup>1</sup>, Малкин В.М.<sup>2,3</sup>, Крауклис И.В.<sup>1</sup>, Горючко В.В.<sup>1</sup>,  
Зорина С.В.<sup>1</sup>, Решетова К.И.<sup>1</sup>, Сафаргалеева Е.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Михайловская военная артиллерийская академия, Санкт-Петербург, vlmalkin@yandex.ru

<sup>3</sup>Военно-морская академия, Военно-морской политехнический институт, Санкт-Петербург

Нами проводилось моделирование последних стадий предбиологической химической эволюции исходя из предположения о возможности матричного воспроизведения стэкинг-агрегатов нуклеиновых кислот при циклических нагревах и охлаждениях их водных растворов (2–12<sup>0</sup>С). На возможность такого воспроизведения указывало то, что ранее люминесцентным методом были обнаружены стопочные агрегаты азотистых оснований, нуклеотидов и нуклеозидов в водных растворах, стабильные даже при 85<sup>0</sup>С, для которых характерны полосы люминесценции с максимумами в области 400–500 нм, и экситонные спектры возбуждения с расщеплением 3000–4000 см<sup>-1</sup> [1]. Были исследованы процессы размножения таких димеров аденина и тимина в их смешанных водных растворах (концентрации аденина и тимина по 1·10<sup>-3</sup>–3·10<sup>-3</sup> М, рН 7.0). Аналогичные результаты получены для смешанных водных растворов аденина и урацила. При циклических нагревах и охлаждениях в большинстве случаев наблюдается рост концентрации прочносвязанных стопочных агрегатов, но иногда наблюдалось падение концентрации. Природа невоспроизводимости знака эффекта исследована на примере смешанных растворов аденина и урацила. Рассмотрены три возможные причины невоспроизводимости результатов: старение образцов, влияние буфера и влияние постоянного освещения светом, возбуждающим люминесценцию, на знак эффекта. Оказалось, старение образцов и присутствие буфера не влияет на воспроизводимость. Исключение длительного освещения (образцы освещались лишь на короткое время для измерения концентрации стопочных агрегатов) привело к тому, что отрицательный эффект был исключен, наблюдался лишь монотонный рост концентрации стопочных агрегатов с выходом на насыщение. Следует отметить, что, помимо полос люминесценции, характерных для стэкинг-димеров, нами наблюдалось и появление полос агрегатов большего размера.

Были проведены квантово-химические расчёты геометрии и электронных характеристик мономеров и стопочных димеров тимина в воде. Расчет показал наличие в спектре поглощения димеров длинноволновой полосы поглощения.

Работа выполнена при поддержке Программы №28 фундаментальных исследований Президиума РАН «Проблемы происхождения жизни и становления биосферы».

1. Luminescence Detection and Study of Tightly Bound Stacking Aggregates of Nitrogen Bases of Nucleic Acids, Nucleosides, and Nucleotides in Water and on the Quartz Surface as Candidates for the First Genetic Templates (Chapter 12) / V. L. Rapoport, V. M. Malkin, N. A. Bykov, V. V. Goryuchko // Problems of Biosphere Origin and Evolution. Volume 1/ Ed. E. M. Galimov. — NY: Nova Science Publishers, Inc., 2013. — Vol. 1, — 481, 239-250 P.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И СТАТИСТИЧЕСКОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ РЕЗОНАНСНОЙ  
ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА В ГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ**

**MOLECULAR MECHANISMS AND STATISTICAL EVIDENCE OF RESONANT SIGNAL  
TRANSMISSION IN GENOMIC SEQUENCES**

Савельев И.В., Мякишев М.В.

LLC Localized Therapeutics, Сан-Диего, США / Ялта, Крым,

[savella.417@yandex.ru](mailto:savella.417@yandex.ru), [max.rempel2@gmail.com](mailto:max.rempel2@gmail.com)

Концепция морфогенного поля отвечающего за развитие организма была предложена Гурвичем А.Г. в 1922 году. Им же экспериментально было доказано существование митогенетического излучения. Идея о ключевой роли геномной ДНК в формировании морфогенного поля была предложена Миллером Р.А. и соавтором в 73-ом году. Многими исследованиями экспериментально подтверждено, что ДНК является хорошим изолированным проводником. Бурлаковым А.Б. и соавторы экспериментально показано, что манипуляция морфогенным полем вызывает радикальные изменения в эмбриональном развитии позвоночных. Многие исследователи экспериментально продемонстрировали наличие удалённых сигнальных взаимодействий между клетками и организмами не опосредованных химической передачей сигналов. Левиным

М. показана важность электрической передачи сигнала в биологическом развитии. Несмотря на вышеперечисленные успехи в области изучения морфогенного поля, роль резонансов ДНК в развитии и поддержании формы организмов не доказана. Роль резонансной передачи сигнала в работе генома изучалась методами структурной биологии и вычислительной геномики.

Авторы предположили, что сиквенс-специфический резонанс между фрагментами ДНК используется организмами для передачи сигнала в геноме, регуляции структуры хроматина и экспрессии генов (1). В поисках механизмов возможной передачи сигнала геномными последовательностями авторы обратились к идее химического резонанса и молекулярных орбиталей. Был проведен обзор возможных резонансных структур размером 2-800 нуклеотидов. Сфокусировали внимание на колебаниях электронов и протонов внутри двойной цепи ДНК, которые не приводят к существенным перемещениям ядер крупных атомов. Были предложены модели электронных и протонных колебаний в структурах 1-2 витка ДНК, а также тетра-нуклеосомных структуры с мономером ~750 нуклеотидов (2). Полученные модели позволили авторам разработать упрощающие алгоритмы перекодировки последовательностей ДНК. Авторы предположили, что резонирующие участки ДНК будут отличаться повышенной консервативностью в геноме, что геном будет обогащен подобными повторяющимися последовательностями. Авторы предположили, что большая часть последовательностей находящихся в резонансе друг с другом будут иметь одинаковую последовательность и, таким образом будут относиться к классу геномных повторов, имеющих различные первичные структуры, но обладающими идентичными особенностями пространственной структуры. Подобные последовательности ДНК, различающиеся первичной структурой, но обладающие общими особенностями пространственной структуры назвали Хайдерами (от HIDER - homologous if decoded elements, repetitive).

Поиск Хайдеров был проведен методами вычислительной геномики. Найденные варианты хайдеров были систематизированы и классифицированы. Рассматривались такие отличия как: количество колец (пурины/пиримидины) и количество водородных связей в паре оснований (сильный/слабый). Особое внимание уделялось отличиям структур охватывающим более чем одну пару оснований. Предположительно ряд последовательно расположенных пуринов, объединяется в единую резонансную структуру и прерывается внедрением пиримидинов. Также было предложено участие в резонансах продольных водородных связей. Было предположено что последовательности, соединенные продольными водородными связями образуют единые резонаторы и что прерывания водородных связей определяет длину резонатора. Код был формализован и назван Гидрокодом. Особенностью Гидрокода является то, что он учитывает водородные связи между последовательно стоящими основаниями и таким образом определяется динуклеотидами. Для проверки были выбраны участки длиной  $5 \cdot 10^5$  оснований из различных хромосом геномов человека, мыши, дрозофилы, арабидопсиса и дельфина. Участки были перекодированы, найдены хайдеры, обчислены и охарактеризованы. Были посчитаны частоты Хайдеров длиннее 19 п.о. для пуринового, сильного и гидро-кодов, и обнаружено, что они существенно обогащены в выбранных геномах ( $P < 0.001$ ) по сравнению с рандомизированными последовательностями; и законсервированы в эволюции ( $P < 0.001$ ). Обнаружено, что свойства хайдеров существенно различаются между далеко отстоящими видами. Таким образом, геномный анализ подтвердил правильность предложенных резонансных структур ДНК.

Дальнейшее развитие этого направления открывает возможности для механистического объяснения функции нетранскрибируемых последовательностей в геномах и расшифровки роли резонансов ДНК в морфогенезе.

1. I. V. Savelyev et al., On The Existence of The DNA Resonance Code. Neuroquantology. 17 (2019),
2. O. Poleskaya et al., DNA electrostatics in chromatin. Prog. Biophys. Mol. Biol. 134, 50–54 (2018).

## ЧАСТОТНЫЙ АНАЛИЗ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ДИНУКЛЕОТИДОВ В СТРУКТУРЕ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

## FREQUENCY ANALYSIS OF DINUCLEOTIDES APPEARANCE IN THE HUMAN GENOME STRUCTURE

*Самченко А.А., Кондратьев М.С., Комаров В.М.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (подразделение ИБК РАН), г.Пушино, samchenkoa@mail.ru

Накопленные данные в ходе реализации международного проекта по секвенированию генома человека выявляют широкий спектр частот встречаемости относительно коротких нуклеотидных последовательностей в его структуре. Установлены определенные корреляции между GC-составом, CpG-островками и различными процессами, играющими важное значение в метилировании нуклеотидов, активации промоторов и канцерогенезе клеток. [1,2]

Основной целью данной работы было выявить особенности спектра встречаемости самых коротких нуклеотидных последовательностей, а именно динуклеотидов, как в полном геноме человека, так и в отдельных хромосомах.

Опираясь на данные секвенирования из GenBank мы, с помощью разработанного собственного алгоритма анализа частот встречаемости любых комбинаций нуклеотидов в структуре комплементарных нуклеотидных последовательностей, установили общие особенности распределения уотсон-криковских АТ и GC пар в ДНК генома человека. Определили отличия в частотах встречаемости динуклеотидов разной природы в составе полного генома и отдельных его хромосом. Оценили особенности частот появления динуклеотидов в экзонах и в интронах. С использованием методов полуэмпирической квантовой химии (молекулярный пакет MORAC2016) попытались связать найденные частотные различия в появлении динуклеотидов разного состава в геномной ДНК с особенностями структурной организации отдельных, изолированных комплементарных дуплексов из этих динуклеотидов.

Используемый подход позволил выявить заметное неравноправие вклада динуклеотидов в организацию структуры геномной ДНК. Так, например, при анализе первой хромосомы человека, было выявлено следующее распределение пар: AA = 9,98%, TT = 9,55%, CC = 5,42%, GG = 5,43%, AT = 8,07%, TA = 6,92%, AC = 5,03%, CA 7,28%, AG = 7,13%, GA = 6,01%, TC = 6,01%, CT = 7,14%, TG = 7,29%, GT = 5,04%, CG = 1,04%, GC = 4,41%. Подобного рода неравноправие встречаемости динуклеотидов оказалось характерными и по всему геному человека, хотя и с некоторыми отличиями у разных хромосом. Из приведенного примера уже видно, что CG-динуклеотид встречается в геноме реже всего. В тоже время, частота встречаемости GC-динуклеотида, как ни странно, оказывается значительно выше. В определенной мере все это хорошо коррелирует с другими известными наблюдениями о том, что «СрG-островки» в ДНК по сути являются примером «горячих точек» и подвержены в повышенной степени к точечным спонтанным мутациям. Так, что минимизация их встречаемости – закономерное явление. Наши квантово-химические полуэмпирические исследования конформаций одиночных комплементарных дуплексов показали, что наиболее «редко встречающиеся» динуклеотиды, по своему строению являются наименее компактными, не предрасположенными к стекинговой укладке молекулярными комплексами.

Полученные в работе результаты нацеливают на дальнейшее исследование статистической картины встречаемости уже три- и тетрануклеотидов не только в геноме человека, но и в геномах других эукариот.

1. Дьяченко О. В., Шевчук Т. В., Бурьянов Я. И. Структурно-функциональные особенности распределения 5-метилцитозина в эукариотическом геноме //Молекулярная биология. – 2010. – Т. 44. – №. 2. – С. 195-210.
2. Razin S. V., Gavrilov A. A., Ulyanov S. V. Регуляторные элементы эукариотического генома, контролирующие транскрипцию //Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49. – №. 2. – С. 212-223.

## **БАЗАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕНОМНОЙ ДНК И КОЛИЧЕСТВО МИТОХОНДРИЙ В ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КЛЕКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА**

### **BASAL LEVEL OF GENOMIC DNA DAMAGE AND AMOUNT OF MITOCHONDRIA IN THE INDIVIDUAL EHRLICH CARCINOMA CELLS**

*Сирота Н.П., Кузнецова Е.А.*

Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, г. Пущино, [sirota@iteb.ru](mailto:sirota@iteb.ru)

Молекулярно-цитологические исследования, ориентированные на изучение генотоксических свойств новых факторов, проводятся в образцах, состоящих из большого количества биологического материала - от нескольких десятков тысяч до миллионов клеток. Хорошо известно, что клетки в таких образцах представляют собой неоднородную популяцию, различающуюся по стадиям клеточного цикла, антиоксидантному статусу, количеству внутриклеточных органелл, функциональной активности митохондрий, ферментативной активности, количеству рецепторов на поверхности клеточной мембраны и т.д. Существующие методы исследований в большинстве случаев не позволяют проводить прямую оценку взаимозависимости, например, между количеством/функциональным состоянием митохондрий и уровнем поврежденности ДНК в норме и при генотоксическом воздействии. Для такого рода оценок используют статистический анализ результатов, полученных разными методами на не идентичных образцах биологического материала.

Новые методы, дающие возможность оценивать в одной и той же клетке как количество/функциональное состояние митохондрий, так и поврежденность геномной ДНК открыли бы перспективу для понимания причин и механизмов, лежащих в основе индивидуальной чувствительности к генотоксическому воздействию. Такие методы должны, например, позволять проводить прижизненную оценку количества митохондрий внутри единичной клетки, а после воздействия внешним фактором на клетку оценить в ней же уровень поврежденности ДНК в разные времена после воздействия. Таким образом, задача состоит в разработке технологии, позволяющей изучать одну и ту же клетку в разные временные моменты до и после

генотоксического воздействия. Для достижения этой цели, в первую очередь, необходима пространственная фиксация исследуемой клетки с сохранением ее жизнеспособности.

В качестве объекта исследований мы использовали перевиваемую культуру клеток асцитной карциномы Эрлиха. Первоначально клетки окрашивали Митотреккером Зеленым. Затем промывали однократно физ. раствором, забуференным фосфатом. Далее готовили препараты для микроскопии, согласно протоколу Comet assay. Препараты анализировались на флуоресцентном микроскопе с захватом изображений клеток, находящихся на разных полях зрения. После чего препараты подвергались обработке, согласно процедуре Comet assay, по окончании которой снова проводили микроскопический анализ препаратов, находили ранее сфотографированные поля зрения и проводили их фотографирование. Оценку количества митохондрий и уровня поврежденности ДНК в одних и тех же клетках проводили путем оцифровки изображений индивидуальных клеток и ДНК-комет на микрофотографиях, полученных на разных этапах исследований, с помощью программного обеспечения, разработанного нами.

Проведенные исследования показали, что в экспериментах, когда происходит существенное изменение формы изучаемых клеток, необходимо иметь возможность проводить визуальный контроль идентичности фотографируемых полей зрения на разных этапах работы с препаратами.

В настоящей работе мы показали, что использование технологии Comet assay, в которой происходит пространственная фиксация жизнеспособных клеток, в сочетании с витальными флуоресцентными красителями позволяет определять как количество митохондрий, так и уровень повреждений геномной ДНК в одной и той же клетке. Полученные нами данные демонстрируют отсутствие корреляции между количеством митохондрий и базальным уровнем структурных повреждений геномной ДНК в индивидуальных клетках асцитной карциномы Эрлиха.

## СОБСТВЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР INTRINSIC FLUORESCENCE OF G-QUADRUPLEX STRUCTURES

Тевонян Л.Л.<sup>1</sup>, Бениаминов А.Д.<sup>2</sup>, Щелкина А.К.<sup>2</sup>, Калюжный Д.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет) Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН Москва, Россия

E-mail: liantevonyan@gmail.com; uzhny@mail.ru

G-квадруплексы (G4) – неканоническая структура нуклеиновых кислот, интерес к которой появился несколько десятков лет назад и не пропадает по настоящее время. Последовательности, потенциально способные образовывать G4 структуры, широко представлены в геномах высших организмов. Структуры образованные такими последовательностями обладают высокой стабильностью и конформационным разнообразием [1].

G4 структуры нуклеиновых кислот обладают уникальными спектроскопическими характеристиками поглощения и кругового дихроизма. Благодаря этим свойствам разработано множество подходов изучения G4 структур *in vitro* на олигонуклеотидных моделях. Для некоторых последовательностей ДНК было обнаружено явление собственной ультрафиолетовой флуоресценции, которое связывают с определенной конформацией ДНК и образованием комплексов с ионами калия [2].

Существует множество методов выявления квадруплексов с использованием экзогенных флуорохромов. Такой подход может оказывать влияние на стабильность альтернативных структур ДНК. Изучение свойств собственной флуоресценции G4 структур ДНК может послужить толчком к развитию новой методики исследования альтернативных структур *in vitro*, а также их обнаружения *in vivo*.

В данной работе исследованы флуоресцентные свойства параллельной квадруплексной структуры образованной нуклеотидной последовательностью (G<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>. Получены спектральные характеристики собственной флуоресценции и возбуждения в зависимости от концентрации ионов калия в растворе. Оказалось, что при возбуждении УФ светом с длиной волны около 260-280 нм наблюдается флуоресценция с максимумом в 390 нм. Интенсивность флуоресценции зависит от концентрации ионов калия в растворе. Обнаружено, что интенсивность флуоресценции чувствительна к наличию фланкирующих нуклеотидов на 5'-конце квадруплексной последовательности (GGGT)<sub>3</sub>GGG. Наибольшую флуоресценцию проявляют последовательности, у которых отсутствуют нуклеотиды на 5'конце квадруплексной последовательности. Вне зависимости от фланкирующих нуклеотидов все последовательности образуют структуру параллельного квадруплекса, что отражают спектры кругового дихроизма. Склонность квадруплексных структур к межмолекулярному взаимодействию, обнаружена по замедленной электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле для структур образованных последовательностями со свободным 5' концом. Димеризация G-квадруплексов может происходить за счет взаимодействия квартетов гуанинов из каждой квадруплексной субъединицы димера стабилизированного ионом калия. По всей видимости, взаимная

ориентация крайних квартетов в димере квадруплексов играет ключевую роль в изменении спектральных характеристик гуаниновых квартетов и появлению наблюдаемой собственной флуоресценции G4.

Настоящая работа вносит вклад в исследование альтернативных структур геномных нуклеотидных последовательностей, а так же в способы их обнаружения.

1. Patel DJ, Phan AT and Kuryavyi V. Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: Diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. // *Nucleic Acids Res.* 35, 7429–7455.
2. Dao NT, Haselsberger R, Michel-Beyerle M-E, Phan A T. Following G-quadruplex formation by its intrinsic fluorescence. // *FEBS Letters* 585 (2011) 3969–3977.

## ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ПРИ СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ DNA DAMAGE WITH COMBINED ACTION PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS

*Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Рябова И.*

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» Министерства образования и науки РФ,  
Россия, г. Краснодар, e-mail: tekytska@mail.ru

Известными проявлениями стресс-реакции в клетках являются повреждения биологически значимых молекул и, прежде всего, ДНК. Нарушение или недостаточность процессов репарации и возникающие при этом мутации могут иметь катастрофические последствия. Ранее в ряде работ [1-3] было показано, что образование активных форм кислорода (АФК) приводит к повреждению первичной структуры ДНК и накоплению однонитевых разрывов при воздействии на лимфоциты периферической крови человека низкочастотного электромагнитного поля (ЭМП).

Одним из ключевых биомаркеров окислительных повреждений нуклеиновых кислот, опосредованных с генерацией АФК, является образование 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG) в ДНК. Уровни содержания 8-OHdG и его аналогов 8-гидроксигуанозина и 8-гидроксигуанина связаны со многими дегенеративными заболеваниями. Так, взаимосвязь АФК и использование 8-OHdG в качестве маркера окислительного стресса были исследованы при многих заболеваниях, включая рак простаты, муковисцидоз, атопический дерматит и ревматоидный артрит.

С помощью иммуноферментного анализа определено содержание повреждений азотистых оснований 8-OHdG в ДНК лимфоцитов периферической крови человека после воздействия на них ЭМП в диапазоне частот от 3 до 50 Гц. Было показано, что с увеличением частоты ЭМП содержание 8-оксогуанина изменяется сложным образом. Обработка ЭМП с частотой 50 Гц не приводит к увеличению количества 8-оксогуанина в ДНК, как при воздействии ЭМП с частотой 3 Гц. Такое изменение количества 8-оксогуанина в ДНК не может быть вызвано депуринизацией модифицированного основания, так как данная модификация приводит не к ослаблению, а к повышению устойчивости гликозидной связи. Поскольку 8-оксогуанин имеет более низкий окислительно-восстановительный потенциал, чем природные основания, он в большей степени подвержен дальнейшему окислению. Возможно, что под действием ЭМП с частотой 3 Гц происходит дальнейшее окисление 8-оксогуанина до таких продуктов, как оксазолон, гуанидиногидантоин и спироиминодигидантоин. Таким образом, при воздействии ЭМП с низкими частотами от 3 до 30 Гц скорость доокисления 8-оксогуанина сопоставима со скоростью окисления нативных гуанинов ДНК. Показано, что скорость образования продуктов окисления азотистых оснований под действием ЭМП зависит от концентрации кислорода в растворе.

Полученные результаты показали, что после обработки ЭМП водных растворов ДНК в присутствии ионов тяжелых металлов (кадмия, меди и др.) наблюдается значительное увеличение интенсивности их флуоресценции по сравнению с контролем, что свидетельствует о встраивании ионов тяжелых металлов в двойную спираль ДНК в качестве интеркалирующих агентов и о нарушении обмена нуклеиновых кислот.

Клетки обладают многочисленными механизмами защиты от окислительного повреждения АФК. При этом модифицированные липиды и белки удаляются с помощью механизмов обмена липидов и белков. Однако модифицированная ДНК не может быть заменена, а должна быть восстановлена с помощью процессов репарации.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации, проект № 6.5882.2017/БЧ.

1. Текуцкая Е.Е., Василиади Р.В. Структурные повреждения ДНК лимфоцитов периферической крови человека при воздействии физических факторов // *Экология человека.* 2017. №.12. С. 9-14.
2. Текуцкая Е.Е. и др. Генерация активных форм кислорода под влиянием СВЧ-излучения и их генотоксическое действие // *Авиакосмическая и экологическая медицина.* 2018. Т.52, №1. С. 56-61.
3. Tekutskaya E.E., Barishev M. G. Study of influence of the low-frequency electromagnetic field on DNA molecules in water solutions // *Odessa astronomical publications XIII Odessa astronomical GAMOW'S conf. Editor-in-Chief S.M. Andrievsky.* 2013. P. 303–306.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В СТРУКТУРЕ ДНК ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С  
КООРДИНАЦИОННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ПЛАТИНЫ МЕТОДОМ ИК -СПЕКТРОСКОПИИ В  
РАСТВОРАХ И ТВЕРДОЙ ФАЗЕ**

**INVESTIGATION OF STRUCTURAL CHANGES IN DNA INDUCED BY PLATINUM  
COORDINATION COMPOUNDS USING FTIR SPECTROSCOPY IN SOLUTIONS AND SOLID  
PHASE**

***Тымченко Е. Е.<sup>1</sup>, Солдатова А. А.<sup>1</sup>, Глова В. И.<sup>1</sup>, Чихиржина Е. В.<sup>2</sup>, Поляничко А.М.<sup>1,2</sup>***

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, 7-9 Университетская наб., Санкт-Петербург, Россия, 199034,

<sup>2</sup> ИИЦ РАН, 4 Тихорецкий просп., Санкт-Петербург, Россия, 194064 Эл. почта: e.tymchenko@yandex.ru

Изучение механизмов взаимодействия противоопухолевых препаратов с биологическими молекулами имеет большое значение как в прикладном аспекте, так и с точки зрения фундаментальной науки.

*Цис*-дихлородиамминплатина(II) (ДДП) – одно из наиболее широко применяемых в противоопухолевой терапии соединений [1]. В основе биологической активности *цис*-ДДП лежит его способность связываться с молекулой ДНК [2], [3]. В данной работе изучали изменения во вторичной структуре ДНК в комплексах с *цис*- и *транс*-ДДП методом ИК-Фурье-спектроскопии. Применение ИК-спектроскопии водных растворов ДНК сопряжено с рядом методологических трудностей, а длительная пробоподготовка часто сказывается на структуре изучаемых биомолекул. В данной работе мы проводили сравнительный анализ спектров ИК поглощения, полученных для образцов в водных растворах и в таблетках КВг.

На основе произведенной декомпозиции и последующего анализа спектров комплексов ДДП-ДНК было показано, что при взаимодействии с ДНК, ДДП предпочтительно связывается с гуаниновыми основаниями. При данном связывании также происходят изменения поглощения характеристических полос в составе сахарофосфатного остова (1013, 1065, 1094 и 1239 см<sup>-1</sup>, отвечающие, вероятно, колебаниям групп (-C-O-C)<sub>v<sub>as</sub></sub>, (-C-O-P)<sub>v</sub>, (-PO<sub>2</sub>)<sub>v<sub>s</sub></sub> и (-PO<sub>2</sub>)<sub>v<sub>as</sub></sub> соответственно, [4]), которые могут свидетельствовать об образовании внутримолекулярных перекрестных сшивок. Таким образом, полученные нами данные о структуре комплексов ДНК-ДДП в растворах и в твердой фазе, хорошо соотносятся между собой и с литературными данными [2], [5], [6], что позволяет нам сделать вывод о возможности исследования комплексов ДНК в таблетках КВг.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-08-01500). Часть работ была выполнена с использованием оборудования Научного парка СПбГУ (Оптические и лазерные методы исследования вещества, Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники, Криогенный отдел).

[1] Wong E. and Giandomenico C. M. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs// *Chem. Rev.*, 1999, vol. 99, no. 9, pp. 2451–2466.

[2] Sherman S. E. and Lippard S. J. Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA// *Chem. Rev.*, 1987., vol. 87, no. 5, pp. 1153–1181.

[3] Jamieson E. R. and Lippard S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts// *Chem. Rev.*, 1999, vol. 99, no. 9, pp. 2467–2498.

[4] Жижина Г. П. and Олейник Э. Ф. Инфракрасная спектроскопия нуклеиновых кислот// *Успехи химии*, 1972, vol. XLI, no. 3, pp. 474–500.

[5] Mansy S., Rosenberg B., and Thomson A. J. Binding of cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to nucleosides. I. Location of the binding sites.// *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, vol. 95, no. 5, pp. 1633–40.

[6] Roos I. A. G., Thomson A. J., and Mansy S. Interaction of platinum compounds with dinucleotides// *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, vol. 96, no. 20, pp. 6484–6491.

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ САЙТОВ ОКИСЛЕНИЯ ГУАНИНОВ В ПРОМОТОРЕ ОНКОГЕНА**

**TERT DETECTION OF GUANINE OXIDATION SITES IN TERT ONCOGENE PROMOTER**

***Чащина Г.В.<sup>1,2</sup>, Калюжный Д.Н.<sup>1</sup>, Бениаминов А.Д.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, Москва

<sup>2</sup>Московский физико-физический институт, г. Долгопрудный

G-квадруплексы представляют собой альтернативный тип укладки ДНК, где четыре гуаниновых основания, удерживаемые парными взаимодействиями гуанин-гуанин, формируют плоскую структуру (G-квартет). G-квартеты способны укладываться друг на друга, формируя четырехспиральную структуру или G-квадруплекс (G4). В геноме человека найдено более 700 тыс. потенциальных квадруплексных последовательностей [1]. Такие последовательности часто встречаются в теломерах, некодирующих областях

онкогенов, горячих точках рекомбинации, а также в промоторах генов. В настоящее время G-квадруплексные структуры рассматриваются как новые регуляторные элементы в функционировании клетки и являются перспективными мишенями действия противоопухолевых препаратов.

Промотор онкогена *TERT* богат потенциальными квадруплексными последовательностями. G-квадруплексные структуры, промотора *TERT* в настоящее время широко изучаются физико-химическими методами *in vitro*. Однако способность образования и структурные свойства этих G4-структур в присутствии комплементарной нити в двойной спирали ДНК исследованы недостаточно.

Участок промотора *TERT* длиной 400 п.н. был амплифицирован методом ПЦР из геномной ДНК человека. Для индуцирования образования G-квадруплексных структур в двойной спирали ДНК использовался 40% полиэтиленгликоль, который моделирует клеточные условия молекулярной скученности. Нагрев и медленное охлаждение (отжиг) приводят к сдвигу равновесия в сторону образования G4-структуры в двойной спирали ДНК.

Ранее было показано, что взаимодействие с порфириновым производным ZnP1 и последующее освещение синим светом приводит к специфическому окислению некоторых гуанинов в G4-структурах, в то время как двойная спираль менее восприимчива к окислению [2]. Окисление гуанинов в квадруплексной структуре вызывает конформационные перестройки, которые могут помочь в выяснении функциональной роли таких структур. Окисление с обработкой порфирином и гликозилазой привело к расщеплению нитей на гуанинах, принадлежащих к G4-структурам. Разрывы нитей ДНК были определены методом удлинения праймера. Это дало возможность определить положение нуклеотидов, подверженных окислению, то есть участвующих в образовании G4-структур. Для промотора *TERT* известно две квадруплексные структуры, и для каждой из них определены гуанины, формирующие G4-структуры, которые доступны для окисления порфирином.

В результате получена модель сворачивания квадруплексных структур в промоторной области онкогена *TERT* в контексте двойной спирали ДНК. Полученные результаты и отработанные методики дают возможность прояснить конформационные перестройки ДНК в геномных последовательностях.

1. Chambers, V. S., G. Marsico, J. M. Boutell, M. Di Antonio, G. P. Smith and S. Balasubramanian. High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome // *Nat Biotechnol.*, 2015, Vol. 33, № 8, P. 877-881.
2. Beniaminov, A. D., R. A. Novikov, O. K. Mamaeva, V. A. Mitkevich, I. P. Smirnov, M. A. Livshits, A. K. Shchyolkina and D. N. Kaluzhny. Light-induced oxidation of the telomeric G4 DNA in complex with Zn(II) tetracarboxymethyl porphyrin // *Nucleic Acids Res.*, 2016, Vol. 44, № 21, P. 10031-10041.

## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКА HMGB1 И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА СВЯЗЫВАНИЕ С ДНК

### THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE HMGB1 PROTEIN AND ITS EFFECT ON DNA BINDING

***Чихиржина Е.В., Старкова Т.Ю., Поляничко А.М.<sup>1</sup>***

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, e.chikhirzhina@incras.ru

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, a.polyanichko@spbu.ru

Ядерный белок HMGB1 относится к большому семейству белков с высокой электрофоретической подвижностью (High Mobility Group). На сегодняшний день HMGB-доменные белки являются наиболее многочисленными из изученных негистоновых белков хроматина. Представители этого семейства были обнаружены в хроматине всех исследованных эукариот, однако до сих пор нет однозначного представления о выполняемых ими функциях. Большинство авторов придерживаются мнения, что HMGB-доменные белки функционируют, прежде всего, как архитектурные элементы при сборке различных ДНК-белковых комплексов. Эти белки имеют в своем составе гомологичные структурно-консервативные ДНК-связывающие домены (т.н. HMGB-домены). Как и линкерные гистоны H1, белок HMGB1 (также как и гомологичный ему HMGB2) взаимодействует с межнуклеосомными участками ДНК в точке входа/выхода ее из нуклеосомы. Белок HMGB1 принимает активное участие в регуляции основных генетических процессов, в частности, транскрипции, репликации, рекомбинации и репарации ДНК. В составе многих транскрипционных факторов в качестве ДНК-связывающих доменов выступают именно HMGB-домены. Представителями сайт-специфичных однодоменных HMGB-белков являются транскрипционные факторы TCF и LEF-1, белки, определяющие пол SRY и SOX, факторы перестройки хроматина VAF57 и PB1 и т. д. Среди многодоменных белков данного семейства можно выделить белки HMGB1-4, митохондриальные факторы mtTF1 и ABF2, транскрипционный фактор РНК-полимеразы I UBF и т.д.

В течение ряда последних лет неоднократно предпринимались попытки определения структуры комплексов ДНК с различными HMGB-доменами методами ЯМР и рентгеноструктурного анализа. Однако все они неизбежно сталкивались с ограничениями на размер комплексов, и имеющиеся на сегодняшний день

данные описывают структуру комплексов отдельных НМGB-доменов с короткими олигонуклеотидными последовательностями ДНК. В рамках данной работы нами была предпринята попытка изучения структуры комплексов белка НМGB1 с высокомолекулярной ДНК методами УФ и ИК спектроскопии, спектроскопии КД и атомной силовой микроскопии (АСМ). Для выяснения роли отдельных доменов белка, и в частности заряженного С-концевого фрагмента НМGB1, нами была проведена серия экспериментов с рекомбинантным белком НМGB1-(А+В). Этот белок отличается от НМGB1 отсутствием С-концевого домена, и был получен в штамме *E.coli*. Неупорядоченный С-концевой участок белка НМGB1 представляет собой отрицательно заряженную последовательность 30 остатков глутаминовой и аспарагиновой аминокислот.

Нами установлено, что рекомбинантный белок НМGB1-(А+В) образует с ДНК комплексы, обладающие высокой степенью упорядоченности с аномально высокой оптической активностью, которая возрастает почти в 25 раз по сравнению со значениями, типичными для ДНК в В-форме. Следует отметить, что указанный рост оптической активности наблюдается в достаточно узком интервале соотношений белок/ДНК. В аналогичных условиях в комплексе ДНК с полноразмерным белком НМGB1 таких изменений в спектре КД не наблюдается. Методом АСМ показано, что для комплексов ДНК с рекомбинантным белком характерно формирование своего рода «жгутов», сплетенных из нитей ДНК-белкового комплекса. Это говорит о доминирующей роли межмолекулярных взаимодействий в такой системе. Мы полагаем, что важную роль в формировании комплексов играют взаимодействия белок-белковой природы. С-концевой фрагмент НМGB1 понижает эффективность связывания белка с ДНК. В его отсутствие во взаимодействии с ДНК принимают участие оба ДНК-связывающих домена. Связывание двух доменов белка с ДНК приводит к образованию межмолекулярных «скрепок» на ДНК и стимулирует формирование надмолекулярного порядка в системе, что влияет на прочность связывания белка с ДНК, а также на структуру и стабильность образующихся комплексов.

Авторы благодарят за финансовую поддержку Российский Фонд Фундаментальных Исследований (гранты №№ 18-04-01199, 18-08-01500).

## ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ЛИГАНДАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

### STUDY OF DNA COMPLEXES WITH LIGANDS OF DIFFERENT NATURE

*Вардеванян П.О., Парсаданян М.А., Антонян А.П., Шагинян М.А.*

Ереванский Государственный Университет, Ереван, Армения, m.shahinyan@ysu.am

В последние десятилетия интенсивное развитие и применение получили биосенсоры, которые играют важную роль в аналитической биологии и медицине. Более того, биосенсоры проникают в более широкие области применения. Среди различных типов биосенсоров особое значение приобрели геносенсоры, основанные на использовании нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) в качестве зондов. Это связано с тем, что НК обладают широким спектром физической, химической и биологической активности и сохраняют эти свойства при различных длинах молекулы. Сенсорным элементом в биосенсорах и биочипах являются короткие олигонуклеотиды, короткие или длинные фрагменты ДНК или РНК с известными нуклеотидными последовательностями. В основе действия геносенсоров лежит высокоспецифичная гибридизация комплементарных нитей ДНК/РНК, или специфическое взаимодействие этих биомолекул с анализируемыми биологически активными соединениями. Эти вещества можно обнаружить в зависимости от их средства к одноцепочечным (оц-) или двухцепочечным (дц-) НК. Необходимо отметить, что в основе большинства геносенсоров лежит взаимодействие молекул НК с низкомолекулярными биоактивными веществами. Так, некоторые ДНК-сенсоры построены на принципе внедрения какого-либо вещества в структуру двойной цепи ДНК. Зачастую в качестве таких веществ применяются различные интеркаляторы, такие, как метиленовый синий, бромистый этидий, акридиновые красители и др. С этим связан тот факт, что в последние годы возрос интерес к взаимодействию различных интеркаляторов с НК.

Проведенные нами исследования по взаимодействию МС, БЭ, АО с ДНК и РНК выявили, что БЭ с двухцепочечной (дц-) формой НК связывается по крайней мере тремя – интеркаляционным, полуинтеркаляционным и элестростатическим, АО связывается двумя – интеркаляционным и элестростатическим, МС – полуинтеркаляционным и элестростатическим способами. Нами также выявлено, что основные способы связывания БЭ практически не зависят от некоторых физических факторов окружающей среды, в числе которых – ионная сила или кислая реакция раствора ( $pH < 7.0$ ). Примечательно, что такая мультимодальность БЭ проявляется также в присутствии других лигандов, непосредственно связывающихся с дц-НК, в то время как являющийся основным интеркаляционным способ, в случае АО и полуинтеркаляционным, в случае МС, угнетаются при совместном с БЭ взаимодействии с дц-ДНК [1]. С другой стороны, при совместном связывании БЭ и желобкового лиганда Hoechst 33258 с дц-ДНК, при низких заполнениях центров адсорбции на макромолекуле, может угнетаться также интеркаляционный способ связывания БЭ, однако полуинтеркаляционный и элестростатический способы при этом опять же проявляются. Эти данные указывают на то, что при определенных условиях может возникать конкурентность за те же центры



связывания между двумя лигандами. В случае интеркаляционного способа и в отсутствие специфичности к определенным последовательностям, конкурентность обусловлена одинаковостью механизмов связывания двух различных лигандов. В случае интеркаляционного и желобкового механизмов связывания конкурентность возникает в тех случаях, когда некоторые участки НК становятся обобщенными для обоих лигандов. В случае Hoechst 33258 конкурентность также возникает вследствие того, что этот лиганд может связываться с дц –ДНК также интеркаляционным способом.

1. Vardevanyan P., Antonyan A., Parsadanyan M., Torosyan M., Karapetian A. Joint interaction of Ethidium Bromide and Methylene Blue with DNA. The effect of ionic strength on binding thermodynamic parameters // J of Biomol Struct and Dyn. 2016. Vol. 34. P. 1377.

## СТРУКТУРА И ДИНАМИКА ДНК В НУКЛЕОСОМЕ: КОМБИНАЦИЯ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОДХОДОВ

### STRUCTURE AND DYNAMICS OF DNA IN NUCLEOSOME: COMBINING SIMULATIONS WITH EXPERIMENTAL APPROACHES

*Шайтан А.К., Армеев Г.А., Поспелова Ю., Князева А.С.*

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, alex@intbio.org

Нуклеосома является базовой единицей хроматина эукариотических клеток и состоит из гистонового белкового ядра, вокруг которого накручена двойная спираль ДНК длиной около 147 пар оснований в форме левой суперспирали. Нуклеосомы осуществляют не только компактизацию ДНК в клетке, но и активно участвуют в процессах регуляции экспрессии генов и репарации ДНК. Нуклеосомы являются полиморфными структурами, как с конформационной точки зрения, так и с точки зрения своего состава [1]. Одной из главных структурных особенностей нуклеосомы является положение ДНК на нуклеосоме. Само по себе наличие нуклеосомы на том или ином участке ДНК конкурентным образом изменяет доступность этого участка ДНК для связывания с различными белковыми факторами, что в свою очередь влияет, например, на экспрессию генов. Некоторым транскрипционным факторам приходится дожидаться события, когда ДНК отвернется от нуклеосомы, чтобы связаться со своей последовательностью. В то же время существуют белки, которые могут узнавать последовательность ДНК, которая намотана на нуклеосому. Однако в таком случае ДНК должна быть развернута правильным образом, чтобы белок мог провзаимодействовать с основаниями ДНК. ДНК накручивается на нуклеосому как на шестеренку, в которой роль зубцов играют боковые цепи аминокислотных остатков аргининов, заглубленные в малую бороздку ДНК. Таким образом, перемещение ДНК вокруг нуклеосомы неизбежно связано с ее вращением относительно оси двойной спирали. Вращение ДНК относительно гистонового октамера в свою очередь модулирует доступность различных участков последовательности ДНК для считывания белковыми факторами. Специальные белковые комплексы АТФ-зависимые ремоделлеры нуклеосом способны перемещать ДНК вдоль гистонового октамера или заменять отдельные димеры гистонов в нуклеосоме, однако механизм их работы до конца не ясен. Таким образом, вопрос изучения положения, динамики и перемещения ДНК на нуклеосоме является весьма актуальным, но не до конца изученным.

В данном докладе будут обсуждаться полученные нами результаты по использованию комбинированных вычислительных и экспериментальных подходов для изучения динамики нуклеосом, а также положения, динамики и перемещения ДНК на нуклеосомах. В частности, будет показано, как используя данные гидроксильного футпринтинга и молекулярного моделирования можно определить точно положение ДНК на нуклеосоме [2,3], а также определить места взаимодействия белковых комплексов с нуклеосомами [4]. Будут обсуждаться подходы к молекулярному моделированию динамики нуклеосом для описания процессов, происходящих в миллисекундном диапазоне. Будет проиллюстрировано применение методов адиабатически смещенной динамики и мета-динамики для изучения динамики ДНК и гистоновых димеров в нуклеосоме. На основании результатов моделирования сформулированы возможные модели функционирования АТФ-зависимых ремоделлеров нуклеосом.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант №18-74-10006).

1. G.A. Armeev et al. Linking chromatin composition and structural dynamics at the nucleosome level. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2019. Vol. 56 P. 46.
2. A.K. Shaytan et al. Structural interpretation of DNA-protein hydroxyl-radical footprinting experiments with high resolution using HYDROID // Nature Protocols. 2018. Vol. 13. P. 2535.
3. A.K. Shaytan et al. Hydroxyl-radical footprinting combined with molecular modeling identifies unique features of DNA conformation and nucleosome positioning, Nucleic Acids Res. 2017. Vol. 45. P. 9229.
4. H. Xiao et al. (2017) Molecular basis of CENP-C association with the CENP-A nucleosome at yeast centromeres, Genes Dev. Vol. 31. P. 1958.

## МЕХАНИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОННЫЕ МОДЕЛИ ДНК MECHANICAL AND ELECTRONIC DNA MODELS

*Якушевич Л.В.*

Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пушкино, Московская область,  
E-mail: kind-@mail.ru

Механические, электронные и другие физические модели живых систем, включая целостные организмы, отдельные органы, клетки и даже биологические молекулы, - важнейший инструмент изучения природы этих систем. Цель данной работы – показать, как можно построить электронную и механическую модели ДНК, используя методы математического моделирования. Мы опишем кратко историю вопроса, начиная с первых работ Скотта [1] и Инглэндера [2], обсудим основные математические уравнения, имитирующие внутреннюю подвижность молекулы ДНК, а также механические и электронные аналоги этих уравнений.

В качестве примера мы рассмотрим уравнение синус-Гордона, имитирующее угловые колебания оснований в однородной ДНК,

$$MR^2\varphi_{TT} - KR^2b^2\varphi_{ZZ} + V\sin\varphi = 0, \quad (1)$$

где  $\varphi(Z, T)$  - угол отклонения основания от положения равновесия,  $M$  – масса оснований,  $R$  – расстояние от центра масс основания до сахара-фосфатного остова,  $K$  – жесткость сахара-фосфатного остова,  $b$  - расстояние между ближайшими парами оснований,  $V$  – коэффициент, характеризующий взаимодействие между комплементарными основаниями внутри пар.

Тогда математическая часть задачи по созданию механической модели ДНК сведется к поиску преобразования

$$z = \alpha_1 Z, \quad t = \beta_1 T, \quad (2)$$

переводящего уравнение (1) в уравнение для угловых колебаний маятников, подвешенных на горизонтальной нити и связанных друг с другом пружинками,

$$mr^2\varphi_{tt} - kr^2a^2\varphi_{zz} + mgr\sin\varphi = 0. \quad (3)$$

Здесь  $\varphi(z, t)$  – угловое отклонение маятника,  $m$  и  $r$  – масса и длина маятника,  $k$  – жесткость пружин на растяжение,  $a$  – расстояние между маятниками,  $g$  – гравитационная константа, а коэффициенты преобразования (2) определяются формулами  $\alpha_1 = \frac{a}{b} \sqrt{\frac{V}{mgr} \frac{k}{K}}$ ,  $\beta_1 = \sqrt{\frac{V}{Mgr}}$ .

В то же время математическая часть задачи по созданию электронной модели ДНК решается в два этапа. Первый сводится к получению уравнения (3) с помощью преобразования (2). Второй - к поиску другого преобразования

$$\xi = \alpha_2 z, \quad \tau = \beta_2 t, \quad (4)$$

позволяющего аналогичным образом перейти от уравнения (3) к уравнению электронной модели

$$C \left( \frac{\Phi_0}{2\pi} \right) \varphi_{\tau\tau} - \frac{d^2}{L} \left( \frac{\Phi_0}{2\pi} \right) \varphi_{\xi\xi} + I_0 \sin\varphi = 0, \quad (5)$$

где  $\varphi(\xi, \tau)$  – джозефсоновская фаза,  $I_0$  – максимальное значение тока через Джозефсоновский контакт,  $C$  – емкость,  $L$  – индуктивность,  $d$  – размер ячейки,  $\Phi_0$  – квант магнитного потока, а формулы  $\alpha_2 = \sqrt{\frac{2\pi}{\Phi_0} \frac{LI_0}{mg} \frac{kr}{mg}}$  и

$\beta_2 = \sqrt{\frac{2\pi}{\Phi_0} \frac{I_0}{C} \frac{r}{g}}$  определяют коэффициенты преобразования (4).

Такой подход позволил нам рассчитать значения коэффициентов преобразований и получить параметры механической и электронной моделей ДНК как в случае однородной (синтетической) ДНК [3-4], так и в случае неоднородной (нативной) ДНК.

1. Scott A. C. A nonlinear Klein-Gordon equation // Am. J. Phys., 1969, Vol. 37, No.1, P. 52–61.
2. Englander S.W., Kallenbach N.R., Heeger A.J., Krumhansl J.A., Litwin S. Nature of the open state in long polynucleotide double helices: possibility of soliton excitations // PNAS, 1980, Vol. 77, No.12, P. 7222–7226.
3. Yakushevich L.V. On the mechanical analogue of DNA // J. Biol. Phys., 2017, Vol. 43, No. 1, P. 113–125.
4. Якушевич Л.В. Электронный аналог однородной ДНК // Компьютерные исследования и моделирование, 2017, Том 9, № 5, Стр. 787–796.

**Секция 3. Биофизика клетки.  
Мембранные процессы.**

**ВИТАМИН В12 КАК ГЕНЕРАТОР АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И СУЛЬФОКСИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ИНДУЦИРУЮЩИХ РЕГУЛИРУЕМУЮ КЛЕТОЧНУЮ ГИБЕЛЬ**

**VITAMIN B12 AS A GENERATOR OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND SULPHOXIDE COMPOUNDS INDUCING REGULATED CELL DEATH**

*Акатов В.С., Соловьева М.Е., Шаталин Ю.В., Шошина О.О.<sup>1</sup>, Фадеев Р.С.*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, akatov.vladimir@gmail.com

<sup>1</sup>Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Хорошо известна важная роль витамина В12 в гемопоэзе, в поддержании репродуктивной функции организма и состояния нервной системы. В частности, недостаток витамина В12 вызывает пернициозную анемию в организме человека. Известно, что природные формы витамина В12 аденозилкобаламин и метилкобаламин являются коферментами метилмалонил-КоА-мутазы и метионинсинтазы. Снижение активности фермента метионинсинтазы приводит к недостатку метионина и потере ключевой функциональной формы фолата. Фолиевая кислота участвует в синтезе тимидина и необходимого для полноценной репликации ДНК. В случае её недостатка страдают, в первую очередь, наиболее активно делящиеся клетки организма – костного мозга, кишечника, клетки развивающегося плода в случае беременности, клетки-предшественники сперматозоидов в мужском организме.

Однако возможности витамина В12 в биологических системах могут не ограничиваться его функцией кофактора ферментативных реакций в клетках. В последние годы выявляются новые возможности витамина В12 как катализатора генерации активных форм кислорода и окисленных форм тиольных соединений, способных оказывать ингибирующее действие на клеточные ферменты. Инициация работ по выяснению таких возможностей связана с работами акад. М.Е. Вольпина и акад. Д.Г. Кнорре и их соавторов, которые в конце 80-х – начале 90-х годов прошедшего столетия предложили использовать сочетание гидроксикобаламина и аскорбата как потенциальный противоопухолевый препарат, который способен инициировать гибель опухолевых клеток путем каталитической генерации витамином В12 активных форм кислорода в присутствии молекулярного кислорода. В дальнейшем молекулярно-клеточные механизмы синергизма цитотоксического действия сочетания гидроксикобаламина и аскорбата на опухолевые клетки активно изучались в ИТЭБ РАН с участием авторов доклада в рамках онкологической программы, финансируемой правительством г. Москвы и выполняемой медицинскими онкологическими центрами и академическими Институтами.

В докладе приводятся примеры каталитической генерации активных форм кислорода гидроксикобаламином, одной из форм витамина В12, в присутствии молекулярного кислорода и восстановителей, таких как аскорбат натрия, ди- и монотиолы (дитиотреитол, глутатион, ацетилцистеин.), полученные в результате собственных исследований авторов. Приводятся данные о синергизме и о механизме цитотоксического действия таких систем на опухолевые клетки. Рассматриваются потенциальные возможности и проблемы применения таких каталитических систем в онкологии.

Также приводится пример катализа формирования гидроксикобаламином окисленных производных диэтилдитиокарбамата, сульфоксидов дисульфирама, способных вызывать стресс эндоплазматического ретикулума и параптозоподобную гибель опухолевых клеток. Индукция параптозоподобной гибели клеток была сопряжена с ингибированием этими продуктами каталитической реакции апоптоза и аутофагии в клетках, мощной вакуолизацией эндоплазматического ретикулума, которая предшествует нарушению функций митохондрий, снижению уровня АТФ и глутатиона в клетках. Обсуждаются потенциальные практические приложения этого класса каталитических систем, в частности, в онкологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства РФ (Договор №14.Z50.31.0028), РФФ (№19-75-20145) с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

1. Solovieva, M.E. et al. Vitamin B<sub>12b</sub> increases the cytotoxicity of short-time exposure to ascorbic acid, inducing oxidative burst and iron-dependent DNA damage. *Eur. J. Pharmacol.* 2007. Vol. 566. P. 206-214.
2. Solovieva M.E. et al. Vitamin B<sub>12b</sub> enhances the cytotoxicity of dithiothreitol. *Free Rad Biol Med*, 2008. 44(10). P. 1846-1856.
3. Solovieva M.E. et al. Hydroxycobalamin catalyzes the oxidation of diethyldithiocarbamate and increases its cytotoxicity independently of copper ion. *Redox Biology*, 2019. Vol. 20. P. 28-37.
4. Фасхутдинова А.А. и соавт. Механизм цитотоксического действия ацетилцистеина в сочетании с витамином В<sub>12b</sub>. *ДАН*, 2008. Т. 422. № 4. С. 366-369.

**ВЛИЯНИЕ ГУАНИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ****THE INFLUENCE OF GUANIDINE COMPOUNDS ON THE STRUCTURAL STATE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES**

Ананян А.А., Милютин Н.П., Плотников А.А., Внуков В.В.

ФГАОУ ВПО "Южный федеральный университет", Академия биологии и биотехнологии им. Д.И.Ивановского, кафедра биохимии и микробиологии, Ростов-на-Дону, e-mail:aananyan@sfsedu.ru

Гуанидинсодержащие соединения благодаря разнообразным биологическим и фармацевтическим эффектам представляют собой важнейший класс веществ для разработки новых лекарственных средств, предназначенных для лечения широкого круга заболеваний.

Цель работы - исследование в модельных экспериментах влияния ряда гуанидиновых соединений - L-аргинина, аргининовой (L- $\alpha$ -гидрокси- $\delta$ -гуанидинвалериановой) кислоты, канаванина, гомоаргинина, N- $\alpha$ -ацетиларгинина,  $\alpha$ -кето- $\delta$ -гуанидиновалериановой кислоты, гуанидиномасляной и гуанидиноянтарной кислот (в концентрациях, близких к физиологическим) на структурные параметры мембран эритроцитов человека. К суспензии эритроцитов добавляли одно из соединений в концентрации 1 мкмоль/мл и инкубировали при 25°C в течение 30 мин. Контролем служили суспензии эритроцитов, инкубированные в аналогичных условиях без гуанидиновых соединений. Структурное состояние мембран эритроцитов исследовали методом латеральной диффузии гидрофобного зонда пирена. Коэффициент эксимеризации пирена  $F_3/F_M$ , равный отношению интенсивности флуоресценции эксимеров и мономеров пирена, находится в прямой зависимости от текучести липидного бислоя и в обратной зависимости от его относительной вязкости. Текучесть липидного бислоя мембран эритроцитов  $F_3/F_M(334)$  оценивали при длине волны возбуждения 334 нм, а текучесть зон белок-липидных контактов  $F_3/F_M(282)$  – при максимуме возбуждения 282 нм, максимумы длин волн флуоресценции составляли для мономеров пирена – 393 нм, для эксимеров – 470 нм. Эффективность безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения с остатков триптофана мембранных белков на пирен оценивали по тушению флуоресценции суспензии эритроцитов при длине волны возбуждения 282 нм и длине волны флуоресценции 330 нм в отсутствие пирена и после инкубации проб с зондом. Полярность липидного бислоя мембран эритроцитов оценивали по соотношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм  $F_{372}/F_{393}$  в тонкой структуре пирена при длине волны возбуждения 334 нм.

Проведенные эксперименты *in vitro* показали, что гуанидиновые соединения существенно влияют на структурные параметры мембран эритроцитов. Методом латеральной диффузии флуоресцентного зонда пирена установлено, что введение в суспензию эритроцитов аргинина приводит к умеренному повышению параметра  $F_3/F_M$ , что свидетельствует об увеличении текучести гидрофобных доменов липидного бислоя мембран. Вместе с тем, применение канаванина,  $\alpha$ -кето- $\delta$ -гуанидиновалериановой, гуанидиномасляной и гуанидиноянтарной кислот приводит к снижению текучести липидного бислоя и повышению текучести зон белок-липидных контактов эритроцитарных мембран. Инкубация суспензии эритроцитов в присутствии аргининовой кислоты и гомоаргинина не оказывает влияния на текучесть липидного бислоя, но приводит к повышению вязкости аннулярных липидов мембран эритроцитов. Следует отметить высокую латеральную гетерогенность биомембран и существование двух различных жидкокристаллических фаз – жидкой упорядоченной ( $L_o$ ) (характерной для рафтов) и жидкой неупорядоченной ( $L_d$ ), которые находятся в определенном соотношении, зависящем от различных факторов как внешней, так и внутренней среды организма. Можно полагать, что при инкубации эритроцитов в присутствии гуанидиновых соединений происходит как изменение соотношения  $L_o/L_d$  фаз, так и модификация жидкокристаллической упорядоченной фазы  $L_o$  вследствие образования крупных рафтовых платформ, что относится к важным механизмам поддержания и оптимизации структурно-функционального гомеостаза биомембран. Инкубация эритроцитов с большинством из исследованных гуанидиновых соединений, за исключением аргинина и  $\alpha$ -кето- $\delta$ -гуанидиновалериановой кислоты, приводит к увеличению эффективности переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков мембранных белков на пирен. Эти изменения могут быть следствием различных причин, среди которых увеличение степени погружения мембранных белков в липидный матрикс, модификация белок-липидных взаимодействий, адсорбция на поверхности мембран веществ пептидной природы, олигомеризация мембранных белков и др. Структурные перестройки мембран эритроцитов при инкубации в присутствии канаванина,  $\alpha$ -кето- $\delta$ -гуанидиновалериановой, гуанидиномасляной и гуанидиноянтарной кислот сопровождаются увеличением коэффициента  $F_{372}/F_{393}(334)$ , что свидетельствует о повышении полярности липидного бислоя по сравнению с контролем.

Полученные результаты позволяют заключить, что не только наличие гуанидиновой группы, имеющейся у всех исследованных веществ, не только размер, форма и функциональные группы, но и, по всей вероятности, конформация молекулы влияют на ее взаимодействие с биологическими мембранами. Обнаруженные изменения структурных параметров мембран эритроцитов под влиянием гуанидиновых соединений, по-видимому, следует рассматривать как позитивные, способные оптимизировать функциональные возможности мембран эритроцитов, в том числе вследствие повышения эффективности функционирования ферментативных и рецепторных механизмов.

**ЭФФЕКТЫ ПОВЫШЕНИЯ ВНУТРЕКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ  $Ca^{2+}$  И БЛОКАДЫ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ  $Ca^{2+}$ -КАНАЛОВ  $Ca^{2+}$ -ЗАВИСИМЫХ  $K^+$ -КАНАЛОВ НА ВОЗБУДИМОСТЬ ПРЕМОТОРНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ ОБУЧЕННЫХ УЛИТОК**

**THE EFFECTS OF INCREASE OF INTRACELLULAR CONCENTRATION OF  $Ca^{2+}$  WITH BLOCKADE OF THE VOLTAGE-DEPENDENT  $Ca^{2+}$ -CHANNELS AND  $Ca^{2+}$  DEPENDENT  $K^+$  CHANNELS ON THE EXCITABILITY OF THE PREMOTOR INTERNEURONS IN TRAINING SNAILS**

*Андреанов В.В.<sup>1</sup>, Богодвид Т.Х.<sup>1,2</sup>, Силантьева Д.И.<sup>1</sup>, Гайнутдинов Х.Л.<sup>1</sup>*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; E-mail: kh\_gainutdinov@mail.ru

<sup>2</sup>Поволжская академия физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия

Известно, что в формировании условных рефлексов важную роль играют ионы кальция. Ранее было показано, в премоторных интернейронах оборонительного рефлекса виноградной улитки при выработке условного оборонительного рефлекса происходит снижение мембранного и порогового потенциалов (Гайнутдинов, 2011). Причем на фоне повышения внеклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  данные параметры обученных улиток не изменялись, в то время как у интактных улиток происходило увеличение значения порогового потенциала и смещение величины критического уровня деполяризации в сторону положительных значений (Силантьева, 2004). Изменения во внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  приводили к одинаковым изменениям как у интактных так и обученных улиток (Гайнутдинова 2010). В рамках настоящей работы была поставлена цель исследовать изменения параметров нейрональной мембраны премоторных интернейронов при внутриклеточном повышении концентрации  $Ca^{2+}$  в условиях блокады потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов верапамилом и  $Ca^{2+}$ -зависимых  $K^+$ -каналов хинином.

Эксперименты были проведены на изолированном препарате нервной системы моллюска *Helix lucorum*. Условный оборонительный рефлекс на постукивание по раковине вырабатывали за три дня в результате предъявления около 180–200 сочетаний условного и безусловного стимулов. Регистрация электрических характеристик производилась на премоторных интернейронах оборонительного рефлекса LPa3 и RPa3, для вызова потенциала действия через регистрирующий электрод подавали прямоугольный импульс тока длительностью в одну секунду. Анализировались величины мембранного потенциала, порога генерации и амплитуды потенциала действия. Для увеличения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  в раствор, омывающий препарат нервной системы моллюска, добавляли кофеин в концентрации 2 ммоль. В первой серии экспериментов для блокады потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов применяли верапамил в концентрации 0,5 ммоль, во второй серии экспериментов блокаду добавляли кофеин в сочетании с верапамилом блокатором, во второй серии экспериментов блокаду  $Ca^{2+}$ -зависимых  $K^+$ -каналов производили при помощи добавления в омывающий раствор хинина в концентрации 0,2-ммоль.

Было найдено, что при совместном действии кофеина и верапамила величина мембранного потенциала достоверно снижалась как в группе интактных, так и в группе обученных улиток по сравнению со значениями в физиологическом растворе. Величина порога генерации потенциала действия достоверно снижалась только в группе интактных улиток, а величина амплитуды потенциала действия достоверно снижалась только в группе обученных улиток. В серии экспериментов по изучению эффектов повышения внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в условиях блокады  $Ca^{2+}$ -зависимых  $K^+$ -каналов было найдено что величина мембранного потенциала достоверно уменьшается как в группе интактных улиток, так и в группе обученных улиток. В группе интактных улиток уменьшается величина порога генерации потенциала действия, однако в группе обученных улиток порог генерации потенциала действия достоверно не изменялся.

Общее снижение мембранного потенциала нейронов в обеих группах улиток при повышении внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  как при блокаде  $Ca^{2+}$ -каналов так и без нее, что было описано нами ранее (Гайнутдинова 2010), свидетельствует о том что данные каналы не принимают непосредственного участия в сохранении пластических изменений после обучения. В то же время эффект кофеина на порог генерации потенциала действия в группе обученных улиток при добавлении хинина или верапамила отменялся, что позволяет предположить участие исследуемых каналов в механизмах возникновения возбуждения после обучения.

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-015-00274).

1. Гайнутдинов Х.Л. и др. Изменение возбудимости нейрональной мембраны как клеточный механизм обучения и памяти // Успехи физиологических наук. 2011. Т. 42. № 1. С. 33-52.

2. Силантьева Д.И. и др. Влияние изменения концентрации внеклеточного кальция на электрические характеристики командных нейронов после выработки оборонительного условного рефлекса у улитки // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2004. Т. 54. № 6. С. 801-805

2. Гайнутдинова Т.Х. и др. Влияние увеличения и снижения содержания внутриклеточного кальция на электрические характеристики командных нейронов у обученных улиток // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. 2010. Т. 152. № 2. С. 29-40.

## ПРЕДЕЛЫ ТЕМПЕРАТУРНОЙ АДАПТАЦИИ ЭКТОТЕРМОВ LIMITS OF TEMPERATURE ADAPTATION FOR ECTOTHERMAS

Асланиди К.Б.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, kbaslanidi@gmail.com

Почти 20 лет назад Дмитрием Петровичем Харакозом было высказано предположение об обратимых фазовых переходах липидов пресинаптической мембраны под влиянием входящего кальция из жидкого состояние в твёрдое и обратно в каждом отдельном цикле синаптического экзоцитоза [1]. В этих представлениях липидная мембрана должна находиться в жидкокристаллическом состоянии вблизи температуры фазового перехода, а адаптация к разным температурам должна осуществляться изменением липидного состава мембраны. При этом необходимо было учитывать и изменения внутриклеточного содержания ионов  $Ca^{2+}$ , которые были показаны ранее на простейших моделях [2]. Современные модели, учитывающие наличие уникальных белковых компонентов на везикулярной и пресинаптической мембранах признают важное значение температуры фазового перехода липидов на всех этапах синаптического экзоцитоза.

Прямое экспериментальное подтверждение фазовых переходов в мембранных липидах было получено на эктодермах, которые не контролируют температуру своего тела и должны непрерывно адаптировать липидный состав своих мембран при изменениях температуры окружающей среды. Резкие изменения температуры приводили к нарушению нервной проводимости между нейронами или между нейроном и мышцей и регистрировались по нарушениям координации и подвижности у рыбок *Danio rerio*. Регистрация температур, при которых в течении 1 минуты происходила потеря координации и подвижности (*loss of righting reflex*) позволила определить диапазон толерантных температур [3]. Этот диапазон температур хорошо соответствует диапазону жизнедеятельности многих эктотермальных организмов, включая и даже человека в раннем постнатальном онтогенезе.

Зависимости температур  $T_T$  и  $T_X$  от времени адаптации к новой температуре регистрировали в диапазоне от 5 минут до 12 суток. Для *Danio rerio* ( $T_X$ )<sub>min</sub> = 6,5°C, ( $T_T$ )<sub>max</sub> = 43°C, а оптимальная температура ( $T_T$ )<sub>min</sub> = ( $T_X$ )<sub>max</sub> = 27°C совпадает таковой у планарии *Gigardia nigrina* [4]

Температуры, при которых происходила потеря координации и подвижности, отличались от температур, полученный для *Danio rerio* посредством методологии критических термальных максимумов и минимумов, а также методологии хронических летальных максимумов и минимумов. Максимальные различия для теплового шока возникали в области низких температур, а для холодового шока - в области высоких температур. Это означает, что потеря координации и подвижности при тепловом шоке может быть обратима при низких температурах акклимации, а при холодовом шоке - обратима при высоких температурах.

В диапазоне толерантных температур (20°C <  $T_A$  < 30°C) температуры как теплового, так и холодового шока линейно зависели от логарифма времени адаптации. При переводе животных из 20°C в 30°C линии тренда имели вид:  $T_T = 0,4357 \ln(t) + 38,013$  при  $R^2 = 0,9609$  и  $T_X = 0,5209 \ln(t) + 12,93$  при  $R^2 = 0,9833$ . При возвращении из 30°C в 20°C имели вид:  $T_T = -0,4892 \ln(t) + 38,175$ ,  $R^2 = 0,9156$  и  $T_X = -0,5714 \ln(t) + 12,31$ ,  $R^2 = 0,9575$ . Все кинетики характеризовались плавным выходом температур шока на новый стационарный уровень. При этом, температурные кинетики при переводе из 30°C в 20°C являли собой зеркальное отражение перевода животных в обратном направлении.

Изменения  $T_T$  и  $T_X$  в течении первого часа после резкой смены температуры составляли около половины всего диапазона изменений температур шока и определяются, по-видимому, в основном изменениями содержания внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Действительно, ранее было показано, что мембранный потенциал фибробластов человека после часа инкубации в присутствии 1 мкМ убаина уменьшался с -38 мВ до -6 мВ [5]. Такая деполяризация соответствовала охлаждению от 37°C до 15°C и увеличению внутриклеточного  $Ca^{2+}$  от  $10^{-4}$  mM до  $10^{-1}$  mM [2]. Процессы синтеза новых липидов и смены липидного состава синаптических везикул являются, по-видимому, более медленными и их действие может растягиваться на несколько суток.

Значительная часть этой работы была выполнена при непосредственном участии Дмитрия Петровича Харакоза. Автор выражает благодарность за помощь в работе аспирантке Института молекулярной биологии и биофизики Академии наук Грузии Владе Авсаркисовой и аспирантке Университета PARIO VII Emmanuelle Le Ray, а также заведующему лабораторией механизмов природных гипометаболических состояний ИБК РАН Надежде Михайловне Захаровой за участие в обсуждении полученных результатов.

1. Харакоз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода "жидкое-твёрдое" в биологических мембранах. // Успехи биологической химии. 2001, 41. С.333-364.
2. Асланиди К.Б. и др. Модель ионно-осмотического гомеостаза клетки при охлаждении. ДАН РАН, 1994, т.338, № 2, С. 251-254.
3. Асланиди К.Б. и др. Температурный шок и адаптация у рыб. ДАН РАН, 2008, т. 422. № 5. С. 694-695.
4. Тирас Х.П., Асланиди К.Б.. Две популяции плюрипотентных стволовых клеток у планарии *Gigardia nigrina*. Биологические мембраны. 2015, том 32, № 5 - 6, стр. 1 - 8.
5. Potapova T.V. et all. Energy transfer via cell-to-cell junctions. Oubain-resistant cells maintain a membrane potential in oubain-sensitive cells. FEBS Letters. 1990.v.262.N.1. p.p. 69-71.

**СВОЙСТВА КОМБИНИРОВАННЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ, ФОРМИРУЕМЫХ  
МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ В  
КЛЕТОЧНЫХ И ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ**

**PROPERTIES OF COMBINED ION CHANNELS FORMED BY MACROCYCLIC COMPOUNDS  
OF DIFFERENT CHEMICAL STRUCTURE IN CELL AND LIPID MEMBRANES**

*Багирова А.А.*

Институт Ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку.

e-mail: arifabaghirova@gmail.com

Изучены свойства ионных каналов, формируемых мембраноактивными полиеновыми антибиотиками (ПА) макроциклической структуры в клеточных и модельных мембранах. ПА являются продуцентами лучистых грибов – актиномицетов. Основные представители класса ПА – это нистатин, амфотерицин В, трихомицин, леворин, пимарицин и кандидин, которые применяются в клинической медицине в качестве противогрибковых препаратов. Использование ПА различного строения в качестве основного фактора для подобного рода исследований важно также потому, что это дает возможность изучить механизмы функционирования ионных каналов в зависимости от структуры молекул, формирующих канал [1]. Все ПА в той или иной степени увеличивают проницаемость клеточных мембран для ионов и низкомолекулярных соединений по каналному механизму. Проводимость клеточных мембран представлена в виде интегральной проводимости и одиночных ионных каналов. Молекула ПА представляет собой макролактонное кольцо с определенным количеством двойных связей, ОН-групп, карбонильных групп и аминокислот. Различия в химической структуре молекул оказывают влияние на величину проводимости и избирательности ионных каналов. Исследование каналообразующих ПА с различной гидрофильной и гидрофобной цепями молекул на БЛМ дает уникальную возможность для выяснения взаимосвязи структуры и функции внутри данного класса соединений. Зафиксировано увеличение проводимости ряда ПА на фосфолипидных бислойных мембранах, а также одиночные ионные каналы. Как оказалось, амфотерициновый ионный канал имеет проводимость 6,5 пСм, нистатиновый канал 2 пСм. Проводимость микогептинового и кандидинового канала составляет 0,5 пСм, а леворинового 0,2-0,3 пСм [1]. Сборка амфотерициновых каналов происходит при более низких концентрациях, чем нистатиновых. Разница между молекулами нистатина и амфотерицина В в количестве двойных связей в гидрофобной части молекулы. В молекуле нистатина существует разрыв между двойными связями. Формирование одиночных ионных каналов для амфотерицина В происходит при концентрации  $2 \cdot 10^{-8}$  М, а для нистатина – при  $2 \cdot 10^{-8}$  М. Очень большая проводимость зафиксирована для одиночных каналов нейтрального ПА-филипина – 15-20 пСм [2]. Ранее считалось, что этот антибиотик разрывает мембраны клеток. Одиночные ионные каналы для филипина были получены при концентрации  $2 \cdot 10^{-8}$  М в 2М КСl. Были зафиксированы также комбинированные или гибридные ионные каналы между ПА с различной химической структурой при добавлении их с разных сторон мембраны. В частности, это комбинированные ионные каналы филипин-амфотерицин В. Комбинированные ионные каналы образуются в бислойных фосфолипидных мембранах при концентрации для каждого из антибиотиков  $2 \cdot 10^{-8}$  М с обеих сторон мембраны. Проводимость гибридных ионных каналов 25-30 пСм. Взаимодействие между антибиотиками филипин-нистатин или филипин-амфотерицин В имеет место при концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М для каждого из антибиотиков. Результаты экспериментов позволяют предположить, что сборка этих каналов происходит в результате образования водородной связи между ПА и фосфатными группами молекул фосфолипидов. Сам ионный канал состоит из двух полупор. Толщина мембраны больше длины полупоры, поэтому для создания проводящего канала необходимо взаимодействие двух полупор с обеих сторон мембраны. При определенных условиях возможно образование проводящей полупоры при одностороннем введении амфотерицина В и леворина к мембранам. Наблюдается прямая зависимость между числом двойных связей и биологической активностью антибиотика. Чем больше двойных связей, тем выше биологическая активность антибиотика. Таким образом, исследуя свойства одиночных и гибридных каналов, можно установить структурно-функциональную зависимость ПА в клеточных мембранах, что позволит осуществить более целенаправленный поиск лекарственных препаратов путем модификации и трансформации молекул.

1. Касумов Х.М. – Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков - Баку-Москва, изд. «Элм»- Наука, 2009, 511 с.
2. Самедова А.А., Таги-заде Т.П., Касумов Х.М. – Зависимость свойств ионных каналов, образуемых в мембранах молекулами полиеновых антибиотиков, от структуры их лактонного кольца // .Биоорганическая химия, 2018, т.44, №3, с. 333-342.



## **ВЛИЯНИЕ ДОКСИЦИКЛИНА И ОКСИДА УГЛЕРОДА (II) НА ЦИТОАРХИТЕКТониКУ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

### **THE EFFECT OF DOXYCYCLINE AND CARBON MONOXIDE ON CYTOARCHITECTONICS OF THE HUMAN RED BLOOD CELLS**

*Баева Е.С.<sup>1</sup>, Тюнина О.И.<sup>1</sup>, Артюхов В.Г.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, galaxy1985@mail.ru

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО ВГУ, Воронеж, artyukhov@bio.vsu.ru

Эритроциты представляют собой уникальную модель для исследования различных процессов, протекающих в организме человека в условиях нормы и патологии. Изменение проницаемости их мембран для различных веществ во многом определяет течение патологического процесса, а варьирование формы имеет диагностическую значимость. При снижении санологического потенциала эритроцитов наблюдается преобладание в крови трансформированных клеток с локальными дефектами плазмалеммы и внутриклеточных компонентов. Целью настоящей работы явилось исследование цитоархитектоники красных клеток крови в присутствии доксициклина и монооксида углерода. Несмотря на различие в стереохимии молекул, доксициклин, как и монооксид углерода, образующийся в результате распада гемсодержащих белков, обладают общностью черт действия. Данные соединения способны вызывать не только нежелательные эффекты в отношении различных физиологических систем организма, но и проявлять противовоспалительную, антипролиферативную и антиапоптотическую активности.

Для детального анализа поверхностной архитектоники красных клеток крови мы использовали метод сканирующей электронной микроскопии. Изучение рельефа поверхности эритроцитов, модифицированных доксициклином гиклатом ( $7.8 \times 10^{-5}$  моль/л,  $7.8 \times 10^{-6}$  моль/л), показало дозозависимое снижение количества дискоцитов и увеличение доли морфологически измененных эритроцитов относительно контроля ( $\approx$  на 60%,  $p \leq 0,05$ ) [1]. Изменение геометрии тора эритроцитов, модификация пеллора с образованием условно-полиморфных стом свидетельствуют о низком уровне стерических ограничений для взаимодействия антибиотика с клетками. Выявленное с помощью гематологического анализатора Drew Scientific EX2280 (Великобритания) снижение степени анизоцитоза эритроцитов в присутствии доксициклина ( $7,8 \times 10^{-5}$  моль/л) с 13,60 % контрольного образца (кровь доноров) до 12,85 % ( $p \leq 0,05$ ) косвенно подтверждает изменение цитоархитектоники эритроцитов в присутствии антибиотика.

Предварительная экспозиция эритроцитов в атмосфере оксида углерода (II) в течение 60, 75 и 90 мин (0,58%, 0,75% и 0,86% соответственно) позволила установить зависимое от времени увеличение степени морфологических изменений клеток. Так, 60-минутное воздействие CO на эритроциты приводит к образованию межклеточных контактов, и в конечном результате – к агрегации эритроцитарных клеток. Среди переходных форм эритроцитов увеличивалось количество эллипсов (на 20,2%), дискоцитов с одним (на 17,6%) и множественными выростами (на 4,67%) [2]. С увеличением времени экспозиции эритроцитов в атмосфере CO до 75 и 90 мин наблюдали повышение доли клеток в виде «спущенного мяча», а также степени агрегации клеток с еще большим отклонением от нормы. Таким образом, выявленные гетерогенные изменения поверхностной архитектоники эритроцитов в присутствии монооксида углерода и доксициклина указывают на нарушение эластичности их мембран, а, следовательно, и способности к упругой деформации в микроциркуляторном русле.

1. Baeva E.S., Artyukhov V.G. Study of the Surface Architectonics of Human Erythrocytes by the Method of Scanning Electron Microscopy in the Presence of Doxycycline // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2014, 157(3), 386-389.

2. O.I., Artyukhov V.G. Carbon Monoxide (CO) Modulates Surface Architectonics and Energy Metabolism of Human Blood Erythrocytes // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2018, 165(3), 803-807.

## **ЭФФЕКТ СКОРОСТИ ТЕПЛОВОЙ АККЛИМАЦИИ НА СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ТЕРМОТРОПНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ГЛАВНЫХ ЛИПИДОВ МЕМБРАН ULVA LACTUCA**

### **EFFECT OF WARM-ACCLIMATION RATE ON FATTY ACID COMPOSITION AND THERMOTROPIC BEHAVIOR OF MAJOR MEMBRANE LIPIDS OF ULVA LACTUCA**

*Баркина М.Ю., Помазенкова Л.А., Чопенко Н.С., Веланский П.В., Костецкий Э.Я., Санина Н.М.*

Дальневосточный федеральный университет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии,

Владивосток, Россия, [marybarkin@yandex.ru](mailto:marybarkin@yandex.ru)

*Ulva lactuca* L. (Chlorophyta) – самый распространенный вид зелёных водорослей в прибрежных морских экосистемах, отличающийся высокой экологической пластичностью, и перспективный объект марикультуры. Растения относятся к группе эктотермных организмов, рост и развитие которых зависит, в первую очередь, от

температуры окружающей среды. Ключевым механизмом термоадаптации эктотермных организмов является изменение ненасыщенности жирнокислотных остатков полярных липидов, направленное на поддержание оптимального для функционирования жидкокристаллического состояния биологических мембран [1]. Согласно прогнозам, глобальное изменение климата будет сопровождаться усилением частоты и амплитуды колебаний температуры в Мировом океане. Поэтому необходимо понимание адаптационных возможностей морских макрофитов приспособлять липидный матрикс мембран в новых условиях существования.

Целью настоящей работы было исследование адаптационных изменений в главных липидах мембран морской макроводоросли *U. lactuca* в зависимости от скорости ее тепловой акклимации. Водоросли, собранные в Японском море зимой при температуре 4 °С, помещали в аквариум, где повышали температуру морской воды до 20 °С со скоростью 16 °С/сут (быстрая акклимация) или 2 °С/сут (медленная акклимация). Затем исследовали составы жирных кислот (ЖК), молекулярных видов и калориметрические переходы кристалл – жидкий кристалл гликоглицеролипидов (моногалактозилдиацилглицерола (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерола (ДГДГ) и сульфохиновозилдиацилглицерола (СХДГ)), а также бетаинового липида 1,2-диацилглицерол-О-4'-(N,N,N-триметил)-гомосерина (ДГТС) *U. lactuca* методами ГЖХ, ВЭЖХ-МС и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) соответственно.

Показано, что при быстрой тепловой акклимации значения общих параметров ненасыщенности ЖК полярных липидов *U. lactuca* (индекс ненасыщенности (ИН) и соотношение ненасыщенные/насыщенные ЖК), как правило, снижались, но не достигали летних уровней [2]. Замедление скорости акклимации в 8 раз приводило к меньшим изменениям в МГДГ, а также ДГТС, и практически не давало эффекта в ДГДГ и СХДГ. Наиболее выраженные изменения ЖК состава наблюдались в бетаиновом липиде ДГТС. Уже при быстрой акклимации общие параметры и содержание главных ЖК (16:0 и 18:4 *n*-3) соответствовали летним значениям, причём в большей степени, чем после медленной. Быстрая тепловая акклимация также приводила к снижению соотношения *n*-3/*n*-6 полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) во всех полярных липидах, что характерно для тепловой акклиматизации [2]. Но при медленной акклимации наблюдались противоположные изменения.

Быстрая и медленная акклимация *U. lactuca* сопровождалась одинаковым понижением температуры максимума теплопоглощения ( $T_{max}$ ) при фазовом переходе главного гликолипида МГДГ. В результате  $T_{max}$  смещалась в сторону летних значений [2], что противоречит классическим представлениям о механизме гомеовязкостной адаптации, согласно которым при повышении температуры компенсаторные изменения направлены в сторону повышения вязкости липидного матрикса [1]. Сложный профиль термограмм был характерен для всех гликолипидов, что обусловлено фазовым разделением гетерогенных систем их молекулярных видов. Анализ состава молекулярных видов МГДГ из *U. lactuca* показал, что причиной понижения  $T_{max}$  при тепловой акклимации могло быть замещение одной из двух главных молекулярных форм – мононенасыщенные ЖК (МНЖК)/ПНЖК на более ненасыщенную молекулярную форму ПНЖК/ПНЖК. Изменения термотропного поведения ламеллярных гликолипидов ДГДГ и СХДГ были направлены на подгонку профиля термограмм этих гликолипидов к таковым летних образцов путем перераспределения следующих молекулярных форм. В ДГДГ *U. lactuca* возрастало содержание форм ПНЖК/ПНЖК и одновременным снижался уровень МНЖК/ПНЖК, тогда как в СХДГ падало содержание НЖК/МНЖК, а уровень формы насыщенные ЖК (НЖК)/НЖК повышался. Как и при тепловой акклиматизации [2], наибольшую пластичность проявил ДГТС *U. lactuca*, который является составной частью липидного матрикса экстрапластидных мембран некоторых зелёных водорослей. В результате тепловой акклимации  $T_{max}$  калориметрического перехода ДГТС достигала значения летнего образца, независимо от скорости прогрева морской воды, что согласуется с концепцией гомеовязкостной адаптации [1].

В целом, способность *U. lactuca* быстро перестраивать ЖК состав мембранных липидов, возможно, связана с особыми условиями ее существования в прибрежной зоне приливов и отливов. Экологическая пластичность *U. lactuca*, коррелирующая с высокой адаптационной пластичностью ЖК состава липидов, может способствовать устойчивости данной водоросли в условиях вариабельности температуры обитания.

1. Ernst R., Ejsing C.S., Antonny B. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids // *J Mol Biol.* 2016. Vol. 428. P. 4776-4791.
2. Sanina N., Goncharova S., Kostetsky E. Seasonal changes of fatty acid composition and thermotropic behavior of polar lipids from marine macrophytes // *Phytochemistry.* 2008. Vol. 69. P. 1517-1527.

## ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОФУНГИЦИДОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ МЕМБРАН ТЮЛЬПАНА В СРЕЗКЕ

## THE AFTEREFFECT OF BIOFUNGICIDES APPLYING ON THE MEMBRANES STABILITY OF THE CAT TULIPS

*Белошапкина О.О., Панфилова О.Ф.*

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва  
E-mail: panfilova.of@yandex.ru

Одна из главных задач современного промышленного цветоводства состоит во внедрении экологически чистых технологий, в частности, за счет использования биологических препаратов для защиты растений от болезней. В условиях защищенного грунта показана эффективность ряда биопрепаратов: Фитоспорин-М, Бинорам, Ж, Трихоцин, СП, Фитолавин, комбинации препаратов Инбио-Фит, сопоставимая по результатам с химическим препаратом Максим против комплекса микозов луковиц тюльпана. В отличие от эталонного фунгицида Максим, испытываемые биопрепараты положительно влияли на товарное качество продукции и биометрические показатели тюльпанов [1].

Важным коммерческим свойством цветочной продукции является ее долговечность, определяемая жизнью в вазе. Активно развиваемым направлением современной биологии является физиология послеуборочного периода срезки цветов. Молекулярная биология позволила установить характерные перестройки в функционировании генов при старении. Однако, изучение генной регуляции недостаточно для воссоздания картины старения, для этого необходимы знания изменений в физиологических процессах и их структурной организации. Целью настоящей работы явилось изучение сортовых особенностей и влияния средств и способов защиты от микозов, поражающих растения в период выгонки в защищенном грунте, на физиологические особенности старения и утраты декоративных качеств тюльпанов. В исследованиях использованы перспективные выгоночные сорта тюльпана (*Tulipa*): Стронг голд и Династия. Исследование проводили в весенние периоды 2016-2018 годов в лаборатории с естественным рассеянным светом. Температура воздуха составляла 18-20°C, влажность – 63-65 %.

Индекс стабильности мембран лепестков определяли путем регистрации выхода электролитов из дисков тканей лепестков и листьев (0,1 г), помещенных в бидистиллят (10 мл) при комнатной температуре ( $C_1$ ) и после 15 мин экспозиции при 100 °C ( $C_2$ ). Электропроводность регистрировали с помощью кондуктометра Эксперт - 002. Индекс стабильности мембран =  $(1 - C_1 / C_2) \times 100 \%$  [2].

Установлено, что ключевые события повреждения мембран происходят до появления видимых признаков завядания. Индекс стабильности мембран у обоих сортов мало изменялся до 3-й стадии развития цветка (окрашенный бутон) и составлял 82 – 84 %, на 4 стадии развития (установление циркадного ритма открывания цветка) происходило резкое увеличение выхода электролитов, и к 6-й стадии индекс стабильности снижался до 35%. У опадающих лепестков индекс стабильности мембран изменялся уже незначительно. Подобные результаты получены ранее на альстромерии и гвоздике. Показано, что дестабилизация мембран, сопровождающая старение, является следствием перекисного окисления липидов в условиях снижения антиоксидантной активности клетки [3].

Лепестки у сорта Династия не отличались по стабильности мембран на соответствующих стадиях развития цветка от сорта Стронг Голд но 4-я фаза, фактически переломная в развитии, происходила на 2-3 дня раньше. Сорт Династия характеризуется и меньшим временем сохранения декоративных качеств растений в вазе. Обработка биопрепаратами при выращивании тюльпанов достоверно не изменила время жизни в вазе.

При развитии растений наблюдался положительный эффект от препаратов Инбио-Фит+Биофит-1.0М+Биофит-2.0(консорциум микроорганизмов), Фитоспорин-М, Ж (*Bacillus subtilis*) и Фитолавин, ВРК (фитобактериомицин), который проявился и в более плавном снижении индекса стабильности мембран. Эти же препараты снижали вытягивание стеблей в первые 8 дней жизни в вазе, что обеспечивало лучшее сохранение декоративных качеств цветов.

Таким образом, определение индекса стабильности мембран служит надежным и достаточно просто регистрируемым показателем хода процессов развития и старения цветка. Его определение может иметь значение не только при изучении послеуборочной физиологии, но и для оценки качества цветочной продукции при хранении и транспортировке к потребителю.

Авторы признательны И.Н. Калембет и Л.Г. Серой за предоставление тюльпанов для исследований.

1. Белошапкина О.О., Калембет И.Н., Дрожжева А.И., Серая Л.Г. Эффективность биопрепаратов при выгонке тюльпанов в условиях защищенного грунта / Мат. междунар науч.-практ. конф. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Становление и перспективы развития органического земледелия в РФ» 11-13 сентября 2018г., Краснодар, 2018, Вып.18, С. 533-537.

2. Ezhilmathi K. et al. Effect of 5-sulfosalicylic acid on antioxidant activity in relation to vase life of *Gladiolus cut flowers* // Plant Growth Regul. 2007. Vol. 51. P. 99-108. DOI 10.1007/s10725-006-9142-2.

3. Панфилова О.Ф., Пильщикова Н.В. Физиологические подходы задержки старения лепестков в связи с жизнью в вазе срезанных цветов // Субтропическое и декоративное садоводство. 2019 № 68. С. 190-196. DOI 10.31360/2225-3068-2019-68-190-196.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИЕНОВЫХ  
АНТИБИОТИКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СУБСТРАТНОГО ОКРУЖЕНИЯ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН**  
**RESEARCH OF EFFICIENCY ACTION OF DERIVATIVE POLYENE ANTIBIOTICS ON THE  
DEPENDING ON THE SUBSTRATE ENVIRONMENT OF LIPID MEMBRANES**

*Бехбудова Г.М.*

Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, gunel2581@mail.ru

Полиеновые антибиотики (ПА) являются самыми эффективными соединениями, используемые в борьбе с грибковой инфекцией [1]. ПА являются незаменимыми препаратами в борьбе с глубокими системными микозами. В течение многих лет ведется поиск новых антибиотиков и на их основе проводится химическая модификация структуры молекул с целью получения антибиотиков, обладающие целенаправленным действием и имеющие низкую степень токсичности. В связи с этим необходим поиск и синтез новых производных ПА для увеличения биологической активности и уменьшения их токсичности. Для ПА возникает проблема быстрого выведения антибиотика из организма, ввиду их относительной токсичности при высоких концентрациях. Так, например, некоторые ПА, в том числе и амфотерицин В, обладают нефротоксичностью и гемолитической активностью. Отмывка ПА из мышечных клеток идет с большей скоростью, чем из липидных мембран [2]. В связи с этим необходим поиск и синтез новых производных ПА для увеличения биологической активности и уменьшения их токсичности. Степень повреждения клеток зависит от концентрации антибиотика. С ее ростом увеличивается число показателей повреждения клетки. Очевидно, эффект антибиотика на клетку тем больше, чем выше уровень индуцированной проницаемости (проводимости) мембраны. Но, как следует из экспериментальных данных, эта величина не является единственной характеристикой биологической эффективности ПА. В самом деле, проводимость, индуцированная в бислойных липидных мембранах (БЛМ) производным амфотерицина В метамфоцином, сравнима с проводимостью, индуцированной исходным амфотерицином В. Токсичность же последнего велика по сравнению с метамфоцином. При прочих равных условиях эффект ПА тем сильнее, чем дольше он связан с клеточной мембраной. В условиях организма, который является проточной системой, происходит постепенная отмывка клеток от антибиотика. Это приводит к конечному времени существования его в мембране. Чем быстрее идет отмывка, тем менее токсичен антибиотик. Это предположение согласуется с более быстрой релаксацией проводимости БЛМ при отмывке антибиотика. Отсюда можно сделать заключение, что одним из параметров, характеризующих биологическую эффективность ПА, является индуцируемый антибиотиками уровень проводимости, измеряемых на БЛМ, и постоянная времени релаксации проводимости при отмывке антибиотика. Процесс выведения антибиотика из мембран резко усиливается при введении ПА в комплексе с диметилсульфоксидом (ДМСО). Это приводит к уменьшению коэффициента распределения антибиотика между мембраной и водой. Использование ПА в комплексе с ДМСО повышает эффективность действия полиенов на липидные мембраны. Важным параметром, определяющим токсичность антибиотика, является время нахождения антибиотика в мембране. Основная цель использования производных леворина (Na-соли, алкильных аналогов) состоит в регулировании времени нахождения антибиотика в мембране. Модифицируя мембраны алкильными производными с разной длиной углеводородной цепи - R=CH<sub>3</sub> - метил; R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> - этил; R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> - пропил; R = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> - бутил; R = C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> - амил можно точно контролировать время нахождения антибиотика в мембране. Проведенные эксперименты на липидных мембранах показали, что с увеличением длины алкильной цепи производных леворина время нахождения их в мембране по сравнению с исходным леворином уменьшается. Время пребывания антибиотика в мембране определялось по постоянной времени релаксации проводимости мембран после отмывки антибиотика из окружающего мембрану раствора. Используя алкильные производные, можно резко уменьшить время пребывания антибиотика в мембране и тем самым уменьшить степень его токсичности. Необходимо отметить еще одну важную особенность. Степень избирательного воздействия ПА на патогенные микроорганизмы связана с различным стеринным составом грибковых клеток и клеток хозяина. В мембранах грибковых клеток содержится эргостерин, а в мембранах клеток хозяина – холестерин. Клетки патогенных грибов, содержащие эргостерин, в 10-100 раз более чувствительны к действию ПА, чем клетки хозяина, содержащие холестерин [1]. Более того, показано что ПА, прочно связываются с эргостеринсодержащими мембранами микробных клеток и практически не отмываются из них. Учитывая то, что основным стеринным компонентом мембран патогенных микроорганизмов является эргостерин, можно, варьируя концентрацию алкильных производных ПА, резко увеличить активность и избирательность действия антибиотиков в отношении патогенных микроорганизмов.

1. Gray K.C., Palacios D.S., Dailey I. et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2012, v. 109, p. 2234-2239.
2. Shvinka N. 2001. Channel-formation in muscle fibre membrane compared to artificial bilayer membranes. Proc. Latv. Acad. Sci., v. 56. p. 57-60.

**ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЦИТОХРОМА С В  
ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ МИТОХОНДРИЯХ ПРИ ПОМОЩИ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО  
КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ**

**APPLICATION OF SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY FOR THE  
INVESTIGATION OF CONFORMATIONAL CHANGES IN CYTOCHROME C IN  
FUNCTIONAL MITOCHONRIA**

*Nadezda A. Brazhe*, *Evelina I. Nikelshparg*<sup>1</sup>, *Adil A. Baizhumanov*<sup>1</sup>, *Vera G. Grivennikova*<sup>2</sup>, *Anna A. Semenova*<sup>3</sup>,  
*Sergiy N. Novikov*<sup>4</sup>, *Valentin Volkov*<sup>4,5</sup>, ..., *Olga Eremina*<sup>6</sup>, *Eugene A. Goodilin*<sup>3,6,7</sup>, *Georgy V. Maksimov*<sup>1</sup>, *Olga V.  
Sosnovtseva*<sup>8</sup>

Department of biophysics, Biological Faculty, Moscow State University, Russian Federation,  
nadezda.brazhe@biophys.msu.ru

<sup>1</sup> Department of biophysics, Biological Faculty, Moscow State University, Russian Federation

<sup>2</sup> Department of biochemistry, Biological Faculty, Moscow State University, Russian Federation

<sup>3</sup> Faculty of materials sciences, Moscow State University

<sup>4</sup> Center for Photonics and 2D Materials, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny 141700, Russia

<sup>5</sup> SDU Nano Optics Mads Clausen Institute University of Southern Denmark Campusvej 55, DK-5230, Odense,  
Denmark

<sup>6</sup> Faculty of Chemistry, Moscow State University, Russian Federation

<sup>7</sup> Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

<sup>8</sup> Biomedical Institute, Faculty of health and material sciences, Copenhagen University, Denmark

Неинвазивные исследования биомакромолекул, функционирующих вблизи биологических мембран в естественном клеточном микроокружении, представляют огромный интерес, поскольку процедура изолирования примембранных молекул приводит к нарушению их взаимодействия с мембранными структурами, что вызывает артефактные конформационные и функциональные изменения. Цитохром С – это единственный межмембранный переносчик электронов в дыхательной цепи (электронтранспортной, ЭТЦ) митохондрий, который диффундирует в пространстве между митохондриальными мембранами и переносит электроны между комплексами III и IV, постоянно испытывая изменение локальных концентраций ионов  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ , поверхностного заряда внутренней митохондриальной мембраны и проч. Конформация гема цитохрома С является важной для его правильной ориентации относительно донора и акцептора электронов и может влиять на скорость переноса электронов, изменяя, таким образом, общую активность ЭТЦ, скорость поглощения  $O_2$  и активность АТФ-синтазы. Исследование конформационных изменений гема цитохрома С является важным для понимания физиологических способов регуляции активности переноса электронов в ЭТЦ и механизмов возможных патологических изменений.

Впервые нами был предложен методический подход, основанный на спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, англ. SERS) с использованием плазмонных наноструктур серебра для неинвазивного высокочувствительного исследования конформационных изменений гема цитохрома С при работе ЭТЦ в интактных функционирующих митохондриях. Предложенный методический подход мы также протестировали на инвертированных субмитохондриальных частицах и изолированном цитохроме С. Мы показали, что спектры ГКР суспензии митохондрий, помещенной на серебряные наноструктуры, представляют собой сочетание пиков, характерных для окисленного цитохрома С (с гемом  $Fe^{3+}$ ) и соответствуют колебаниям связей гема ( $Fe^{3+}$ ). Основные пики имеют положения максимумов 1130, 1170, 1313, 1371, 1580 и 1638  $cm^{-1}$  и связаны с колебаниями метиновых радикалов, пиррольных колец и метиновых мостиков гема С. Мы показали, что деполяризация внутренней митохондриальной мембраны, вызванная внесением протонофора СССР или К-ионофора валиномицина, приводит изменению конформации гема окисленного цитохрома С, проявляющейся как увеличение относительной интенсивности колебаний метиновых мостиков по сравнению с пиррольными кольцами. Выявленное изменение конформации свидетельствует об увеличении подвижности гема С, которое может способствовать более быстрому принятию оптимального расположения гема С относительно гема цитохрома С1 для туннельного переноса электрона.

Мы предполагаем, что в условиях, требующих ускорения работы ЭТЦ с увеличением потребления  $O_2$ , и/или при деполяризации внутренней мембраны митохондрий гем цитохрома С изменяет свою конформацию, что приводит к увеличению его подвижности и ускорению переноса электрона от гема цитохрома С1 к гему цитохрома С, в результате чего ускоряется работа всей ЭТЦ, способствуя увеличению потенциала внутренней митохондриальной мембраны.

## ОБРАЗОВАНИЕ ПОР В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМ C-ФОСФАТИДНАЯ КИСЛОТА

## FORMATION OF PORES IN THE LIPOSOMAL MEMBRANE MEDIATED BY CYTOCHROME C-PHOSPHATIDIC ACID COMPLEX

*Кирилина И.В., Степанов Г.О., Буравлев Е.А.<sup>1</sup>, Осипов А.Н.*

РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, kirilina-irina@bk.ru

<sup>1</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Апоптоз играет важную роль в функционировании организма, начиная от периода эмбрионального развития и продолжаясь в течение всей жизни, а его нарушения лежат в основе развития широкого круга заболеваний, включая онкологические, иммунные и заболевания связанные с нарушением кроветворения. Важнейшим этапом апоптоза, переводящим его в необратимую стадию, является выход цитохрома *C* из митохондрий в цитоплазму в результате образования пор в наружной мембране митохондрий, опосредованное апоптотическими белками семейства Bcl-2 – Bax и Bak. Ранее нами было показано, что комплекс цитохрома *C* с кардиолипином обладает пероксидазной активностью и может окислять липиды мембран с образованием пор [1, 2]. Пероксидазная активность появляется у цитохрома *C* не только в составе комплекса с кардиолипином, но и с другими анионными фосфолипидами, среди которых особое место занимает фосфатидная кислота. Фосфатидная кислота в митохондриях образуется с помощью фермента фосфолипазы *D*, посредством гидролиза фосфоэфирной связи фосфатидилхолина с удалением холиновой группы [3].

Целью нашей работы было обнаружение пор в мембранах липосом, опосредованное комплексом цитохрома *C* с фосфатидной кислотой. Для решения этой задачи мы нагружали липосомы 5,6-карбоксифлуоресцеином в концентрации 100 мМ (при которой флуоресценция потушена) и наблюдали выход карбоксифлуоресцеина из липосом, что приводило к сильному разбавлению флуорофора и появлению флуоресценции.

В результате проведенных экспериментов были получены следующие результаты: 1) образование фосфатидной кислоты под действием фосфолипазы *D* приводило к увеличению пероксидазной активности комплекса цитохрома *C* с фосфатидной кислотой более чем в 4 раза по сравнению с контролем; 2) скорость выхода карбоксифлуоресцеина из липосом, через образовавшиеся поры в мембране при взаимодействии с комплексом цитохром *C*-фосфатидная кислота (которая определялась по тангенсу угла наклона нарастания флуоресценции) была почти в 2 раза больше, чем в контроле.

Полученные результаты позволяют предположить, что наряду с механизмом выходы цитохрома *C* из митохондрий с участием белков Bax и Bak, может существовать и альтернативный механизм, при котором выход цитохрома *C* из митохондрий осуществляется через поры в мембране, образующиеся в результате окисления липидов комплексом цитохром *C*-фосфатидная кислота по пероксидазному механизму.

1. Firsov A.M. et. al. Peroxidative permeabilization of liposomes induced by cytochrome *c*/cardiolipin complex // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015. Vol. 1848(3). P. 767–774.
2. Puchkov, M.N. et. al. Cytochrome *c* produces pores in cardiolipin-containing planar bilayer lipid membranes in the presence of hydrogen peroxide // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013. Vol. 1828(2). P. 208-212.
3. Geng D., Chura J., Roberts M.F. Activation of phospholipase D by phosphatidic acid. Enhanced vesicle binding, phosphatidic acid-Ca<sup>2+</sup> interaction, or an allosteric effect? // *J Biol Chem*. 1998. Vol. 273(20). P. 12195-12202.

---

## THE DANDELION AND BURDOCK PHYTOCOMPOSITION INFLUENCE ON ELECTROPHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF THE PRIMARY ACTIVE TRANSPORT SYSTEM OF PLASMA MEMBRANE OF CHARA FRAGILIS INTACT CELLS

*Hasanova A.E., Musayev N.A.<sup>1</sup>, Abdullayev A.S.<sup>2</sup>*

Institute of Botany ANAS, Baku, E-mail: ahasanova89@gmail.com

<sup>1</sup>Baku State University, Baku, E-mail: [nagi.musayev@hotmail.com](mailto:nagi.musayev@hotmail.com)

<sup>2</sup>[Institute of Radiation Problems ANAS, Baku](http://Institute of Radiation Problems ANAS, Baku), E-mail: [asimsa@rambler.ru](mailto:asimsa@rambler.ru)

Generally, the search for effective ways to improve the radioresistance of bio-objects based on testing of the synthetic-chemical and/or natural plant-origin products. In this aspect, plant-origin products look preferable in terms of their mild, long-lasting effect, without the toxic side effects. On the other hand, they are widespread in nature. These plants can be attributed the Dandelion ordinary (*Taraxacum officinale*), the roots of Dandelion (*Radix Baradanae*), the Burdock (*Baradanae*), the roots of Burdock (*Radix Baradanae*). The primary target of any exogenous effect on bio-objects is their plasma membrane. Therefore, the investigation of the above factors influence on the components of the primary active transport system of the plasma membrane (K<sup>+</sup> - channels, H<sup>+</sup> - pumps) could establish the biophysical

mechanisms for their modification for further use to increase the effectiveness of their phytoprotective action. For this purpose, the patterns of change in the potential ( $\varphi_m$ ), resistance ( $R_m$ ) of the plasma membrane (PM) of *Chara fragilis* cells under the influence of phytochemical solutions Dandelion-Burdock (DBC) investigated by us. The continuous measurement of these parameters was carried out by using microelectrode technology under conditions of complete intactness of the experimental cell. In this work *Chara fragilis* cells were used for the first time in the practice of electrophysiological research.

The average value of the above mentioned parameters were  $-183 \pm 4,9$  mV and  $9 \pm 1,2$  Ohm·m<sup>2</sup> under the standard conditions. The distribution of  $\varphi_m$  by cell number obeyed normal distribution law with the significance level of 0,01. By the using of dependencies  $\varphi_m$  and  $R_m$  from the external concentration of K<sup>+</sup> the activation ranges of K<sup>+</sup> - channels in the inward and outward rectification were  $130 \pm 50$  and  $-300 \pm 162$  mV respectively. The cytosolic activity of K<sup>+</sup> - ions was determined graphically from the above mentioned dependences, which was 61,6 mM/l.

The electrophysiological reactions of PM were qualitatively and quantitatively determined by the initial level of  $\varphi_m$  and the concentration of DBC. For the action of low concentrations of DBC (0.01 mg/ml) in the range of activation of the KCOR was characterized by depolarization of PM within 15-40 mV. The depolarization of PM occurred at a constant level of  $R_m$ . The low concentrations of DBC in the range of activation of KCIR were ineffective. The main result of the increased concentration of DBC's (1 mg/ml) in the range of activation of the KCIR was hyperpolarization of the PM, which was accompanied by a decrease of  $R_m$  within 20-25%. The magnitude of the hyperpolarization of  $\Delta\varphi$  depended on the absolute value of the initial level of  $\varphi_m$ . By analyzing the scattering diagram between  $\Delta\varphi_m$  and  $\varphi_m$  the linear dependence  $\Delta\varphi_m = 14 + 0,308|\varphi_m|$  was established by us. The correlation coefficient in this case was 0,94.

As follows from the above data on the effect of phytochemical on the parameters of the of primary active transport system of PM, the electrophysiological plasma membrane reactions can be summarized as inhibition of ion transport at low concentrations and, conversely, as stimulation of transport processes through PM at high concentrations of DBC. We detected the inhibition of ion transport in the cells,  $\varphi_m$  which were in the range of activation Ca<sup>2+</sup> - channels, when the membranes have a gradient of electrochemical potential of  $\sim 20$  kJ/mol along Ca<sup>2+</sup>, directed inside the cells. Probably, the low concentrations of DBC initiate the transition of Ca<sup>2+</sup> - channels to the open state, leading to the increase of the cytoplasmic concentration of cations with the further activation of oxidation enzymes of membrane lipids. It could destroy the structure-functional state of components of the primary transport system, which is detected as the depolarization of PM.

On the other hand, the stimulating effects of high concentrations of DBC were detected in cells,  $\varphi_m$  which were in the range of activation KCIR, when the gradient of electrochemical potential of Ca<sup>2+</sup> is understated or is completely absent due to the interaction of cations with the organic components from the constitution of DBC. The formed complexes can be adsorbed on the surface of lipid phase of PM. This can lead to changes of the physical state of the lipids of PM, which can lead to the stimulation of proton pumps.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СОСТОЯНИЯ ЦИТОХРОМОВ В КЛЕТКАХ ПРИ ИНДУКЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

## INVESTIGATION OF CHANGES IN CYTOCHROMES IN CELLS UNDER INFLAMMATION USING RAMAN SPECTROSCOPY

*Глуханюк Е.В.<sup>1</sup>, Никельшпарг Э.И.<sup>2</sup>, Браже Н.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва, evgengluhanuk@gmail.com

<sup>2</sup>МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, evelinanel@gmail.com

Цитохромы являются одними из ключевых компонентов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. Их конформация и редокс-состояние зависит от состояния ЭТЦ. Кроме того, нарушения работы ЭТЦ на уровне цитохромов могут приводить к образованию большого количества свободных радикалов, активных форм кислорода, разобщению дыхания и синтеза АТФ, снижению потенциала на внутренней мембране митохондрий и т.д., что, в свою очередь, может провоцировать апоптоз.

Одним из методов, позволяющих детально исследовать цитохромы в целых митохондриях внутри живых клеток и тканей, является спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР). В зависимости от экспериментальных условий можно селективно исследовать либо цитохромы типа *a* (используя длину волны возбуждения 633нм), либо *b* и *c* (532 нм), либо все вместе (785 нм). В настоящей работе мы фокусировались на исследовании цитохромов типа *b* и *c* в интактных прогениторных клетках слизистой ротовой полости.

Было исследовано влияние двух провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли (TNF $\alpha$ ) и интерферона гамма (IFN $\gamma$ ) на цитохромы митохондрий данных клеток. Известно, что при действии данных факторов повышается уровень продукции АФК и вероятность апоптоза [1,2]. Следовательно, есть основания полагать, что они будут оказывать влияние на состояние ЭТЦ митохондрий.

Мы показали, что действия разных провоспалительных цитокинов на цитохромы различны. Так, IFN $\gamma$



вызывал увеличение доли восстановленных цитохромов типа *c* по отношению к контрольным клеткам, тогда как TNF $\alpha$  не оказывал влияние на редокс-состояние цитохромов типа *c*. Однако мы наблюдали противоположные эффекты для цитохромов типа *b*: TNF $\alpha$  вызывает достоверное увеличение доли восстановленных цитохромов *b* по сравнению с контрольными клетками, тогда как IFN $\gamma$  не менял редокс-состояние цитохромов *b*.

Таким образом, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  оказывают различное влияние на состояние ЭТЦ митохондрий, несмотря на то, что оба являются провоспалительными цитокинами. Схожий эффект на митохондрии клеток, вызванный TNF $\alpha$ , мы наблюдали ранее на скелетных миоцитах пациентов, страдающих ожирением [3]. Это может быть объяснено тем, что цитокин TNF $\alpha$  вырабатывается в больших количествах в мышечной и жировой ткани при ожирении, что может провоцировать развитие инсулиновой резистентности. Увеличение доли восстановленных цитохромов типа *b* может сопровождаться задержкой электронов в пуле хинонов, что может приводить к усиленному образованию активных форм кислорода.

Авторы выражают благодарность Lindsay Davies и Olga Sosnovtseva. Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 18-34-00503 мол\_a).

1. Issop L. et al. Translocator Protein-mediated stabilization of mitochondrial architecture during inflammation stress in colonic cells // PLoS One. 2016. Vol. 11, № 4. P. 1–23.
2. Yang D. et al. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells // Exp. Eye Res. 2007. Vol. 85, № 4. P. 462–472.
3. Brazhe N.A. et al. Raman probing of lipids, proteins, and mitochondria in skeletal myocytes: a case study on obesity // J Raman Spec. 2017. Vol.48, №9.

## АКТИВАЦИЯ КАНАЛОВ NAV 1.5 ПРИ БЛОКИРОВАНИИ НИФЕДИПИНОМ CA<sup>2+</sup> - ТОКА L – ТИПА В ПРЕДСЕРДИЯХ КУРИНОГО ЭМБРИОНА СПОСОБСТВУЕТ СОХРАНЕНИЮ АВТОМАТИЗМА

### ACTIVATION OF NAV 1.5 CHANNELS DURING THE INHIBITION OF CA<sup>2+</sup> - L – TYPE CURRENT BY NIFEDIPINE SUPPORTS AUTOMATISM IN THE ATRIA OF THE CHICK EMBRYO HEART

*Головко В. А., Лебедева Е. А.*

Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

**Введение.** Основным пусковым механизмом автоматизма клеток сердца эмбрионов считают внутриклеточные осцилляции ионов кальция и протекающий ток по каналам Ca<sup>2+</sup> - L type. Однако на стволовых клетках предшественниках кардиомиоцитов человека показано, что нифедипин не блокирует электрическую активность и вызывает положительный хронотропный эффект. Мы предположили, что существует механизм, компенсирующий блокируемый Ca<sup>2+</sup> - ток L – типа, что позволяет клеткам эмбрионального сердца сохранять электрическую активность при аппликации нифедипина. **Цель работы** заключалась в выявлении вклада кальциевого тока L- типа и тока протекающего по Na – каналам Nav 1.5 в генерации потенциалов действия у полосок правого предсердия куриного эмбриона.

**Материалы и методы.** Опыты проводили на оплодотворенных яйцах кур породы Белый Леггорн (*White Leghorn*). Потенциалы действия (ПД) регистрировали со стороны субэндокарда при аппликации специфического блокатора кальциевых каналов нифедипина (0.1 и 10 мкМ) и ингибитора каналов Na- тока Nav 1.5 – лидокаина (50 и 500 мкМ). Полученные Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm s.d.$ ). Значимость различий ( $p < 0.05$ ) находили по U – критерию Манна-Уитни.

**Результаты.** В контрольном солевом растворе полоски спонтанно сокращались и генерировали ПД с фазой медленной диастолической деполяризации (ДД) и частотой  $177 \pm 32$  имп  $\times$  мин<sup>-1</sup> ( $n$  зародышей = 50). Параметры ПД были следующими:  $E_{\max} = -76 \pm 7$  мВ; пороговый потенциал =  $-68 \pm 8$  мВ; ПД =  $102 \pm 9$  мВ; длительность пика ПД на уровне 20% реполяризации (ДПД20) =  $43 \pm 17$  мс; ДПД50 =  $72 \pm 17$  ( $52 \div 114$ ) мс; ДПД90 =  $93 \pm 20$  ( $68 \div 154$ ) мс; длительность медленной ДД =  $228 \pm 62$  мс;  $dV/dt_{\max} = 98 \pm 35$  ( $27 \div 168$ ) В/с; скорость медленной ДД =  $36 \pm 13$  мВ/с.

Апликация нифедипина (0.1 мкМ) вызывала повышение частоты генерации ПД на 35 % (от 170 до 230 имп/мин) за счет уменьшения длительности пика ПД (ДПД100) в среднем на 24% и длительности фазы медленной ДД на 30%. Параметры амплитуды ПД оставались на прежнем уровне. Повышение концентрации нифедипина до 10 мкМ увеличивало частоту генерации на 70% по сравнению с контролем. Величина овершута ПД снижалась на 10 mV, а  $E_{\max}$  увеличивалась на 6 mV. Длительность ДД снижалась на 50%. Таким образом, нифедипин в концентрации 0.1 и 10 мкМ вместо ожидаемого снижения и ингибирования ПД способствовал значительному повышению частоты генерации ПД.



Снижение внеклеточного кальция в солевом растворе оказывало воздействие сходное с эффектом блокатора кальциевых каналов L-типа нифедипина. Длительность фазы диастолы укорачивалась на 33%, ДПД20 и ДПД50 уменьшались в среднем на 50%. Частота спонтанных импульсов возрастала в 1.5 раза.

Добавление хелатора ионов  $\text{Ca}^{2+}$  ЭГТА (1 мМ) в солевой раствор «без  $\text{Ca}^{2+}$ » полностью связывало микромолярные количества  $\text{Ca}^{2+}$  и блокировало его внутриклеточные осцилляции. В результате частота ПД повышалась, но в меньшей степени, чем при аппликации нифедипина. Изменение частоты ПД было обусловлено в основном уменьшением длительности ДД. Зарегистрировано также увеличение длительности ДПД20. Наблюдаемые эффекты нифедипина, раствора «без  $\text{Ca}^{2+}$ » с ЭГТА обратимы.

Установлено, что пороговая концентрация лидокаина – специфического блокатора каналов тока  $\text{Nav} 1.5$  для клеток эмбрионального сердца составила около 50 мкМ. При повышении концентрации лидокаина от 100 до 500 мкМ регистрировали монотонное снижение амплитуды ПД от 108 до 40 mV и  $dV/dt \text{ max}$  от 110 до  $21 \pm 4$  В/с. Длительность ДД увеличивалась на 24% уже на первой минуте экспозиции. Амплитуда порогового потенциала возрастала на 4 mV. В результате скорость ДД достоверно не изменялась. Длительность ДПД20, ДПД50 и ДПД100 монотонно увеличивалась в 2-3 раза по сравнению с контролем. Частота генерации импульсов снижалась на 30% перед блоком ПД. Ингибирование генерации ПД у 56% препаратов отмечали на 10-12 минуте экспозиции лидокаина. Остальные препараты сохраняли электрическую активность. Впервые зарегистрирован эффект блокирования лидокаином и восстановления ПД в одной и той же клетке в солевом растворе.

**Вывод.** Лидокаин подавлял, а нифедипин повышал частоту генерации импульсов. Другими словами, эффекты лидокаина и нифедипина были противоположными. Полученные данные позволяют заключить, что способность нифедипина вызывать положительный хронотропный эффект в клетках правого предсердия куриного зародыша связана с существованием механизма, компенсирующего ингибирование тока  $\text{I}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{L}$ . Наиболее вероятно, что таковым механизмом является активация каналов  $\text{Nav} 1.5$  и усиление тока  $\text{Nav} 1.5$ .

Работа поддержана грантом РФФИ мол\_а № 18-34-00654, Фондом программы УрО РАН № ГР АААА-А18-118012290365-2 (2018-2020 гг.) и НИР № ГР АААА-А17-117012310152-2.

## СТРУКТУРНЫЙ ПЕРЕХОД В ДВАЖДЫ НЕНАСЫЩЕННОМ ЛИПИДЕ ПО ДАННЫМ ЭПР СПИНОВЫХ МЕТОК

### STRUCTURAL TRANSITION IN DOUBLY-UNSATURATED LIPID OBSERVED BY PULSED EPR OF SPIN LABELS

*Гольшешва Е. А., Дзюба С. А.*

Институт химической кинетики и горения им. Воеводского, Новосибирск, elenabiochem@gmail.com

Криоконсервация тканей проводится при низких температурах (80-240К), поэтому динамические и структурные свойства биологических систем в данном диапазоне температур являются объектом интенсивных исследований. Морфология и подвижность мембраны являются важными факторами для восстановления ее функций. Движения при столь низких температурах могут быть только ограниченными – колебания или малоугловые вращения (либрации, ангармонические колебания) вблизи положения равновесия. Происходят такие движения в микро- и наносекундном временном диапазоне. Импульсный электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) спиновых меток чувствителен к ориентационным движениям спиновых меток в данном временном диапазоне и позволяет исследовать либрации окружающей матрицы [1]. Более того, поскольку подвижность матрицы связана с ее жесткостью, структурные свойства также могут быть исследованы методом импульсного ЭПР [2].

В данной работе молекулярная подвижность в модельных мембранах, состоящих из DPPC (насыщенный липид), POPC (липид с одной ненасыщенной  $\text{C}=\text{C}$  связью) и DOPC (дважды ненасыщенный липид), исследовалась методом импульсного ЭПР спиновых меток. Использовалась двухимпульсная последовательность, позволяющая полечить скорость анизотропной релаксации, которая, в свою очередь, пропорциональна среднеквадратичному угловому отклонению, умноженному на время корреляции. Таким образом, двухимпульсная ЭПР методика позволяет исследовать интенсивность либрационных движений [3]. Для исследования подвижности матрицы модельные мембраны были приготовлены с небольшим (молярное соотношение 1:250) содержанием стеариновой кислоты (DSA), спин-меченой в пятом (5-DSA) или в шестнадцатом (16-DSA) положении, что позволяет исследовать подвижность мембраны на различной ее глубине. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации для модельной мембраны POPC демонстрирует больший рост, чем для мембраны DPPC. Данное отличие можно объяснить большей жесткостью мембраны DPPC, поскольку в мембранах POPC формируется свободный объем из-за изгиба хвоста после ненасыщенной  $\text{C}=\text{C}$  связи [4].

Липид DOPC имеет две ненасыщенные  $\text{C}=\text{C}$  связи, однако его скорость анизотропной релаксации демонстрирует схожее поведение, что и для модельной мембраны POPC до 120К. Выше этой температуры рост

скорости анизотропной релаксации модельной мембраны DOPC замедляется с ростом температуры и начинает совпадать с температурной зависимостью, наблюдаемой при исследовании жесткой модельной мембраны DPPC, приблизительно выше 180К. Стоит отметить, что наблюдаемый эффект больше для модельных мембран, содержащих 16-DSA. В таких модельных мембранах спиновая метка находится в глубине мембраны, вблизи хвостов липидов, в то время как спиновая метка в модельных мембранах с 5-DSA находится вблизи поверхности мембраны.

Наблюдаемое поведение температурной зависимости скорости анизотропной релаксации можно объяснить возникновением структурного перехода в температурном диапазоне 120-180К, где концевые фрагменты хвостов DOPC упаковываются параллельно друг другу. Стоит отметить, что такой структурный переход не возможен для мембраны, состоящей из POPC, в связи с наличием у молекулы только одного хвоста с ненасыщенной связью.

1. Golysheva E. A., Shevelev G. Y., Dzuba S. A. Dynamical transition in molecular glasses and proteins observed by spin relaxation of nitroxide spin probes and labels // *The Journal of chemical physics*, 2017, 147, 6, Vol. 9, P. 064501.
2. Ivanov M. Y., Krumkacheva O. A., Dzuba S. A., Fedin, M. V. Microscopic rigidity and heterogeneity of ionic liquids probed by stochastic molecular librations of the dissolved nitroxides // *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, 19, 38, P. 26158-26163.
3. Isaev N. P., Dzuba S. A. Fast stochastic librations and slow rotations of spin labeled stearic acids in a model phospholipid bilayer at cryogenic temperatures // *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112, 42, P. 13285-13291.
4. Surovtsev N. V., Ivanisenko N. V., Kirillov K. Y., Dzuba S. A. Low-temperature dynamical and structural properties of saturated and monounsaturated phospholipid bilayers revealed by Raman and spin-label EPR spectroscopy // *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116, 28, P. 8139-8144.

## СЕПТИНЫ И ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЙ ВЕЗИКУЛЯРНЫЙ ЦИКЛ В ДВИГАТЕЛЬНОМ НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ

### SEPTINS AND SYNAPTIC VESICLE CYCLE IN MOTOR NERVE ENDING

*Григорьев П.Н., Хисамиева Г.А., Зефирова А.Л.*

ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань

Известно, что цитоскелет вовлечен в механизмы разнообразных клеточных процессов: деление, внутриклеточный транспорт, пресинаптический везикулярный цикл и др. Одним из элементов цитоскелета служат септины, которые, подвергаясь динамической полимеризации/деполимеризации, способны формировать филаменты, кольца, сети и другие структуры. Несмотря на обнаруженные многочисленные взаимодействия септинов с различными белками, принимающими участие в процессах экзоцитоза, эндоцитоза и транспорта синаптических везикул, роль септинов в механизмах пресинаптического везикулярного цикла остается малоизученной. В экспериментах на двигательных нервных окончаниях нервно-мышечного препарата диафрагмы мыши с использованием микроэлектродного отведения постсинаптических потенциалов и флуоресцентной конфокальной микроскопии исследовались процессы секреции медиатора, экзоцитоза и эндоцитоза синаптических везикул в условиях стимуляции полимеризации септинов форхлорфенуоном (50 мкМ). Обнаружено, что экспозиция форхлорфенуона снижала частоту миниатюрных потенциалов концевой пластинки, а, в условиях высокочастотного раздражения двигательного нерва, приводила к углублению динамики депрессии потенциалов концевой пластинки. Раздражение двумя короткими высокочастотными пачками импульсов показало, что форхлорфенуон вызывает снижение скорости восполнения запаса готового к освобождению медиатора. Раздражение двигательного нерва в присутствии флуоресцентного красителя FM 1-43 вызывало захват красителя процессами эндоцитоза синаптических везикул, что выражалось в увеличении интенсивности свечения двигательных нервных терминалей; на фоне действия форхлорфенуона загрузка FM 1-43 усиливалась. Раздражение предварительно окрашенных FM 1-43 препаратов приводило к выгрузке красителя процессами экзоцитоза синаптических везикул и быстрому падению интенсивности свечения нервных терминалей; однако, в присутствии форхлорфенуона динамика падения свечения замедлялась. Полученные данные свидетельствуют, что нарушение функции септинов в двигательных нервных окончаниях приводит к замедлению рециклирования синаптических везикул. Исследование поддержано грантом РФФИ 17-04-01870-а.

**ПРОНИЦАЕМОСТЬ ДЛЯ КИСЛОРОДА МОНОСЛОЙНЫХ МЕМБРАН ИЗ ЛИПИДОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА****OXYGEN PERMEABILITY OF MONOLAYER MEMBRANE FROM HUMAN RED BLOOD CELL LIPIDS***Гуськова Р.А., Васильев Н.С., Локтюшкин А.В., Иванов И.И.*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, город Москва

За время круговорота крови в организме человека (продолжительностью 23-25 сек) происходит интенсивный перенос кислорода от легких ко всем органам, тканям и клеткам организма. Содержание кислорода в крови достигает 18-20% ее объема, причем на долю растворенного кислорода приходится лишь около 0,3%. Высокую кислородную емкость циркулирующей крови обеспечивают специализированные клетки крови – эритроциты, способные концентрировать  $O_2$  в своей цитоплазме до 20-22 мМ в результате быстрого обратимого связывания  $O_2$  с гемоглобином. Пополнение эритроцита кислородом в капиллярах легких и освобождение кислорода в тканевых капиллярах происходит за доли секунд. Столь высокая интенсивность этих реверсивных потоков означает, что в нормальных условиях мембрана эритроцита легко проницаема для кислорода.

Для объяснения высокой проницаемости мембран эритроцитов для  $O_2$  существуют две основные точки зрения. Первая и наиболее распространенная в настоящее время основана на высокой диффузионной проницаемости липидного бислоя мембраны эритроцитов для  $O_2$  (базальная проницаемость). Согласно второй, базальная диффузия через липидный бислой идет с малой скоростью, а высокую проницаемость мембраны эритроцитов для  $O_2$  обеспечивают белковые поры (каналы) плазматической мембраны клетки.

Сравнительно недавно для исследования базальной диффузионной проницаемости липидных пленок был разработан метод сканирующей электрохимической микроскопии (СЭХМ) и сконструированы соответствующие установки - сканирующие электрохимические микроскопы с инвертированными открытыми платиновыми/ртутными электродами[1]. Микроскопы интегрированы с ванной Ленгмюра, оборудованной весами Вильгельми. Приборный комплекс позволяет получать монослойные мембраны из липидов заданного состава на границе раздела фаз воздух/вода, создавать и контролировать поверхностное давление в пленке, измерять плотность трансмембранного диффузионного потока  $O_2$  из газовой фазы к электроду через липидный монослой и микрослой водной фазы контролируемой толщины от поверхности раздела фаз (мембрана/вода) до электрода. Применяемые в нашей лаборатории модификация условий экспериментов и алгоритм обработки результатов позволяет полностью учитывать градиент концентраций кислорода между газовой фазой и поверхностью работающего электрода. Это дает возможность путем сравнения проницаемости мембраны с диффузионной проницаемостью для  $O_2$  слоя воды известной толщины, прямо вычислять коэффициенты проницаемости монослойных мембран (монослоев) для  $O_2$  в заданных условиях[2].

Результаты, полученные нами методом СЭХМ для синтетических и природных липидов, показали, что проницаемость монослойных мембран зависит от длины цепей липидных молекул, плотности упаковки молекул в монослой (величины поверхностного давления), разветвленности углеводородной цепи, размеров полярной головки липидной молекулы. Так коэффициент проницаемости для  $O_2$  монослоев длинноцепочечных спиртов, имеющих линейную углеводородную цепь и маленькую полярную головку, что позволяет достичь плотной упаковки и высокого поверхностного давления в слое (порядка 60 мН/м), существенно снижается в ряду C16-C18-C19-C20-C22 от  $(1,12 \pm 0,04) \cdot 10^{-3}$  м/с до  $(1,77 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$  м/с, причем этот эффект зависит от величины поверхностного давления в слое. Аналогичные результаты мы получили для монослоев длинноцепочечных жирных кислот. Монослойные мембраны из дипальмитоилфосфатидилхолина более проницаемы по сравнению с длинноцепочечными спиртами и кислотами (коэффициент проницаемости составляет  $(2,5 \pm 0,18) \cdot 10^{-3}$  м/с при 30 мН/м. Монослои дифитаноилфосфатидилхолина, доксилстеарата или их смесей с длинноцепочечными спиртами хорошо проницаемы для  $O_2$ , даже при предельных значениях поверхностного давления в слое. Смешанные монослойные мембраны из арахидоновой кислоты, содержащие холестерин (до 10%), значительно более проницаемы для  $O_2$ , чем одна арахидоновая кислота, что является возможно результатом "разрыхляющего" действия молекул холестерина.

Для исследования транспорта  $O_2$  через липидный матрикс эритроцитарных мембран мы выделяли суммарные липиды мембран эритроцитов человека, формировали из них монослойные мембраны на границе раздела воздух/вода и методом СЭХМ измеряли их проницаемость. Как следует из полученных результатов, проницаемость для  $O_2$  монослойных мембран из эритроцитов человека не зависит от латерального давления в слое и достаточно высока  $(1,13 \pm 0,32) \cdot 10^{-2}$  м/с даже при максимальном поверхностном давлении (47 мН/м). Эти данные позволяют предположить, что высокая базальная проницаемость липидного матрикса для  $O_2$  обеспечивает высокую проницаемость эритроцитарной мембраны для кислорода независимо от участия специальных белковых каналов или пор в транспорте  $O_2$  и позволяет эритроцитам легко и быстро выполнять их главную функцию – снабжение организма необходимым количеством кислорода.

1. Amemiya S. et al. Scanning electrochemical microscopy // Annu. Rev. Anal. Chem. 2008. Vol. 1. P. 95-131.
2. Ivanov I.I. et al. Permeability of lipid membranes to dioxygen // Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, Vol. 322, P. 746-750.

**ИЗМЕНЕНИЕ МЕМБРАННОГО И ПОРОГОВОГО ПОТЕНЦИАЛОВ КОМАНДНЫХ НЕЙРОНОВ ПОСЛЕ ВЫРАБОТКИ УСЛОВНОГО ОБСТАНОВОЧНОГО РЕФЛЕКСА У ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ**  
**CHANGES OF MEMBRANE AND THRESHOLD POTENTIALS OF THE COMMAND NEURONS AFTER ELABORATION OF ENVIRONMENTAL CONDITIONED REFLEX IN TERRESTRIAL SNAIL**

*Дерябина И.Б.<sup>1</sup>, Андрианов В.В.<sup>1</sup>, Богодвид Т.Х.<sup>1,2</sup>, Муранова Л.Н.<sup>1</sup>, Гайнутдинов Х.Л.<sup>1</sup>*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; E-mail: kh\_gainutdinov@mail.ru

<sup>2</sup>Поволжская академия физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия

Внутренний, глубинный уровень процессов, лежащих в основе поведенческих реакций и их пластических изменений при обучении представляет большой интерес для нейробиологии [1]. Анализ клеточных механизмов, определяющих длительные модификации поведения, представляется принципиальным, так как биофизические и биохимические характеристики нервных клеток являются важным фактором, определяющим формирование долговременной памяти [1,2]. В последние годы появилось достаточное количество экспериментальных результатов, свидетельствующих о мембранных коррелятах обучения, которые показывают корреляцию поведенческих результатов обучения с возбудимостью нейрона [2,3,4]. Параметрами, через изменения которых выражается возбудимость нейронов, являются частота спайкирования, количество спайков в ответ на электрический стимул, мембранный и пороговый потенциал. В последнее время все большее внимание начинает привлекать проблема пластичности внутренней возбудимости нейрона как ключевого момента в функциях нейронной сети. Эффективность нейронных сетей повышается как за счет увеличения синаптической силы, так и за счет увеличения внутренней возбудимости нейрона [1,2].

Ранее нами были показаны мембранные корреляты (изменение мембранного и порогового потенциалов командных нейронов) для условных оборонительных рефлексов постукивания по раковине и аверзии к пище [2,3], а также при формировании долговременной сенситизации [5]. Поэтому возник вопрос – возможны ли подобные изменения при выработке других видов условных рефлексов. При изучении реконсолидации долговременной контекстуальной памяти, с предъявлением напоминания с последующей блокадой белкового синтеза, у виноградной улитки используют обучение условному оборонительному рефлексу на обстановку [6,7]. Для выяснения данного вопроса мы провели исследование электрических характеристик командных нейронов ЛПаЗ и РПаЗ виноградной улитки после выработки условного обстановочного рефлекса.

Для экспериментов была выбрана виноградная улитка *Helix lucorum*, нервная система которой хорошо описана. У всех животных вырабатывали обстановочный условный рефлекс по контекстуальной парадигме «на шаре» в ситуации, в которой животные находились на шаре плавающим в воде с сохранением свободы передвижения по поверхности шара. Животных каждый день на протяжении 5 дней помещали в экспериментальную обстановку (на шар) и предъявляли по 5 электрических раздражений в день. Тестирование обучения проводили в двух обстановках – при свободном передвижении животных на плоской поверхности (стеклянная крышка аквариума), а также в ситуации обстановки обучения (на шаре) [6,7]. Анализ электрических характеристик проводили на командных нейронах оборонительного рефлекса ЛПаЗ и РПаЗ [1,3]. Регистрировали следующие параметры нервных клеток: мембранный потенциал покоя –  $V_m$  (исходное значение перед началом серии тактильных раздражений или электрической стимуляции и его величина в ходе эксперимента) и порог генерации ПД -  $V_t$  (пороговый потенциал).

Было найдено, что после обучения в командных нейронах ЛПаЗ и РПаЗ происходит достоверное снижение мембранного и порогового потенциалов и, таким образом, повышение возбудимости исследованных нейронов. Можно предположить, что изменения электрических характеристик (возбудимости) постсинаптических нейронов оказывают влияние на условия, при которых синтез белка при обучении может облегчаться или, наоборот, затрудняться. Таким образом, имеющиеся результаты показывают существенную роль в механизмах ассоциативного обучения процессов, протекающих на уровне соматической мембраны нервных клеток.

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-015-00274).

1. Балабан П.М. Молекулярные механизмы модификации памяти. Журн. высш. нервн. деят. 2017. Т. 67. № 2. С. 131-140.
2. Гайнутдинов Х.Л. и др. Изменение возбудимости нейрональной мембраны как клеточный механизм обучения и памяти // Успехи физиологических наук. 2011. Т. 42. № 1. С. 33-52.
3. Гайнутдинов Х.Л. и др. Изменение электрических характеристик командных нейронов при выработке условного оборонительного рефлекса у виноградной улитки. Журн. высш. нервн. деят. 1996. Т.46. С.614-616.
4. Mozzachiodi R. et al. Changes in neuronal excitability serve as a mechanism of long-term memory for operant conditioning. Nature Neurosci. 2008. Vol. 11. P. 1146-1148.
5. Andrianov V.V. et al. Antibodies to calcium-binding S100 protein block the conditioning of long-term sensitization in the terrestrial snail. Pharmacology, Biochemistry and Behaviour. 2009. Vol. 94, № 1. P. 37-42.
6. Гайнутдинова Т.Х. и др. Зависимая от белкового синтеза реактивация обстановочного условного рефлекса у виноградной улитки // Журн. высш. нервн. деят. 2004. Т. 54, № 6. С. 795-800.
7. Deryabina I.B. et al. Impairing of serotonin synthesis by p-clorphenylalanine prevents the forgetting of contextual memory after reminder and the protein synthesis inhibitionю Front. Pharmacol. 2018. Vol. 9, Article 607.

**СБОРКА ИОННЫХ КАНАЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА**  
**THE ASSEMBLY OF ION CHANNELS ON DEPENDENCE OF THE MEMBRANE POTENTIAL***Джафаров А.Н.*

Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку, jafa66@mail.ru

Исследование молекулярного механизма избирательной проницаемости клеточных мембран для ионов и органических соединений является одной из ключевых проблем молекулярной биологии и биофизики мембранного транспорта. В настоящее время известно, что трансмембранный перенос ионов и органических соединений через биологические мембраны осуществляется в основном с помощью каналов. Существование ионных каналов было постулировано несколько десятков лет назад, в частности, при изучении механизма распространения нервного импульса по нервным волокнам животных, а также при исследовании механизма активного транспорта ионов через плазматические мембраны клеток. Натриевые и калиевые каналы возбудимых мембран, проницаемость которых зависит от величины и знака приложенного к мембране напряжения, имеют в своем составе селективные каналы, благодаря которым через каналы переносятся ионы. Управление работой каналов возбудимых мембран осуществляется при взаимодействии электрического поля с высокоспециализированными образованиями в клеточных каналах. Однако, учитывая взаимосвязь клеточного метаболизма трудно выявить молекулярную структуру нативных каналов. Несмотря на несомненные достижения в области выявления первичной структуры интегральных белков, формирующих ионные каналы, до настоящего времени остается неизвестной физическая природа потенциалзависимой сборки ионных каналов. Выяснение физических основ этого процесса на исключительно сложных по своей структуре нативных мембранных системах представляется крайне трудным. Однако в силу целого ряда методических трудностей невозможно было подойти к решению вопроса о молекулярных механизмах сборки каналов в зависимости от приложенного к мембране потенциала. Решение этой задачи стало возможным благодаря созданию бимолекулярного слоя липидных мембран, на которых хорошо моделируются селективные и возбудимые свойства клеточных мембран. Отсутствие информации о химическом составе и структуре каналов клеточных мембран стимулировало быстрое развитие исследований механизмов ионного транспорта на бислойных липидных мембранах, модифицируя их мембранотропными каналообразующими соединениями с известной структурой молекул. Прогресс, достигнутый в этой области, связан с каналообразующими полиеновыми антибиотиками [1].

Было обнаружено, что леворин, трихомицин и кандицидин в отличие от неароматических антибиотиков резко понижают сопротивление мембран из фосфолипидов мозга в том случае, если они вводятся в водный раствор с одной стороны мембраны. Проводимость при этом только в 50-100 раз ниже, чем в случае, когда антибиотики в одинаковых концентрациях находятся с обеих сторон мембраны. Предполагалось, что такое отличие от неароматических антибиотиков нистатина и амфотерицина В было связано с менее крутой зависимостью проводимости от концентрации антибиотиков с ароматической группой и с лучшей проницаемостью мембран для этих антибиотиков. Однако, методом изотопной метки было показано, что антибиотики меченные тритием оказались непроницаемыми через мембрану. Ароматические антибиотики обладают важным свойством – включение антибиотиков в мембрану зависит от величины и направления внешнего электрического поля. Когда антибиотик находится с одной стороны мембраны, проводимость зависит от знака потенциала на мембране. Когда ток идет из раствора, содержащего антибиотик, проводимость мембраны растет. При обратном направлении тока проводимость мембран уменьшается. Так, если в отсутствие внешнего поля с одной стороны мембраны находится леворин, то не наблюдается увеличение интегральной проводимости мембран. Для регистрации проводимости мембран на мембрану подавали тестирующие импульсы от электрического стимулятора амплитудой +25 мВ (с плюсом со стороны антибиотика) с частотой 0,15 Гц, задержкой 0,08 с и длительностью 0,16 с. В ответ на приложенное к мембране потенциала величиной +50 мВ (плюс со стороны антибиотика) не наблюдается роста проводимости. И только увеличение потенциала на мембране до +75 мВ приводит к слабому нарастанию проводимости. Скорость нарастания проводимости зависит от величины приложенного к мембране электрического потенциала. Введение ароматических антибиотиков с одной стороны мембраны в присутствии постоянного электрического поля (-100 мВ со стороны антибиотика) не изменяет проводимости мембран. При обратном направлении поля (+100 мВ со стороны антибиотиков) наблюдается резкое увеличение проводимости. Наличие в молекулах ароматических гептаенов дополнительной положительно заряженной группировки приводит к потенциалзависимому образованию проводящих единиц.

1. Samedova A.A., Tagi-zade T.P., Kasumov Kh.M. Dependence of ion channel properties formed by polyene antibiotics molecules on the lactone ring structure. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2018, v. 44, No. 3, p. 337–345.

**КОМПОНЕНТЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ГРАНИЦАХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН:  
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА И СВЯЗЬ СО СТРУКТУРОЙ БИОМЕМБРАН**

**ELECTRIC FIELD COMPONENTS AT THE LIPID MEMBRANE INTERFACES: THEIR  
MOLECULAR NATURE AND RELATION TO THE BIOMEMBRANE STRUCTURE**

*Ермаков Ю.А.*

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН, Москва, E-mail: yermakov@elchem.ac.ru

Электрическое поле на границах липидных мембран, граничный потенциал, имеет различную физическую природу в полярной области мембран и в водной среде вблизи ее поверхности. Ионы окружающей среды участвуют в экранировании поверхностного заряда и меняют его плотность, тем самым создавая падение потенциала в диффузной части двойного электрического слоя. Эти явления с достаточной точностью описываются в рамках теории Гуи-Чепмена, дополненной изотермой адсорбции Ленгмюра (модель ГЧШ). Однако взаимодействие ионов с поверхностью мембран не ограничивается их влиянием на поверхностный заряд и потенциал. Наши исследования показали, что адсорбция катионов металлов существенным образом отражается на падении потенциала в полярной области мембраны. Этот потенциал зависит от ориентации дипольных моментов фосфолипидов и ассоциированных с ними молекул воды, а также от положения плоскости адсорбции ионов и молекул, частично погруженных в полярную область. Поскольку эта дипольная компонента граничного потенциала определяется электрической структурой границ раздела липид/вода, она представляет особый интерес для изучения структурных факторов при взаимодействии биомембран с неорганическими ионами и амфифильными молекулами.

В данном сообщении приведены результаты, полученные на липидных моделях клеточных мембран при адсорбции на их поверхности неорганических катионов, ионизованных молекул хлорпромазина, лизина и полипептидов разной молекулярной массы на его основе. Совместное использование электрокинетических измерений, регистрация граничных потенциалов плоских БЛМ методом компенсации внутримембранного поля (КВП), а также техники липидных монослоев Ленгмюра, позволяет выделить поверхностную и дипольную компоненты граничного потенциала. Электрокинетические измерения в суспензии липосом в присутствии лизина и препаратов хлорпромазина количественно согласуются с моделью ГЧШ. Установлена прямая связь механохимических характеристик монослоя с зарядением его поверхности при встраивании в него молекул амфифильных молекул хлорпромазина. Вычислительные эксперименты на липидных моделях методами молекулярной динамики выявили реструктуризацию системы водородных связей молекулами лизина, которая объясняет двухфазную кинетику изменений граничного потенциала БЛМ при адсорбции полилизина, измеренную методом КВП. Предложена количественная модель для описания соответствующих электрокинетических данных [1]. Молекулярный механизм изменений Вольта-потенциала при фазовом переходе, который наблюдается при латеральном сжатии монослоя DMPS, установлен при анализе молекулярных моделей, которые верифицированы измерениями рассеяния рентгеновского излучения.

Экспериментально доказано, что адсорбция даже одновалентных катионов приводит к изменению дипольной компоненты этого потенциала. Однако наибольшие его изменения, до 150 мВ, инициируются многовалентными металлами с высокой афинностью к фосфолипидам (гадолиний  $Gd^{3+}$ ), бериллий,  $Be^{2+}$ ) при их связывании с поверхностью мембран, когда в их составе присутствуют молекулы фосфатидилсерина (PS). Этот факт подтверждается измерением Вольта потенциала липидного монослоя DMPS и согласуется с калориметрическими измерениями, что указывает на структурные изменения в липидном бислое и монослое, аналогичные фазовому переходу из жидкоупорядоченного в конденсированное состояние. Опыты с белком механочувствительных каналов E.Coli, встроенным в липидный бислой, обнаруживают блокирование этих каналов катионами  $Gd^{3+}$  только в том случае, когда в бислое присутствуют молекулы PS [2]. Это означает, что конденсация этого липида в окружении белка препятствует его конформационным изменениям в ответ на изменение натяжения мембраны. Электростатические эффекты в суспензии липосом, инициированные присутствием катионов  $Be^{2+}$ , проявляются и в суспензии синтетических микросфер, покрытых этим липидом, а также в присутствии эритроцитов. При этом существенно подавляется процесс узнавания этих объектов макрофагами. По всей видимости, адсорбция катионов бериллия маскирует процесс узнавания молекул PS, необходимый для нормального фагоцитоза на начальных этапах апоптоза [3].

Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-00242а

1. Молотковский Р.Ю. и др. Полипептиды на поверхности липидных мембран — теоретический анализ электрокинетических данных. Коллоидный журнал. // 2019. Т. 81. С.190.
2. Ermakov Y.A., et al. Gadolinium ions block mechanosensitive channels by altering the packing and lateral pressure of anionic lipids.// Biophys J. 2010. Vol. 98. P. 1018.
3. Ermakov Yu. et al. High-affinity Interactions of Beryllium (2+) with Phosphatidylserine Result in a Cross-linking Effect Reducing Surface Recognition of the Lipid.// Biochemistry. 2017. Vol.56. P 5457.

## **МЕСТНЫЕ АНЕСТЕТИКИ КАК РЕГУЛЯТОРЫ МЕМБРАННОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ**

### **LOCAL ANESTHETICS AS A REGULATORS OF THE MEMBRANE ACTIVITY OF PROTEINS AND PEPTIDES**

*Ефимова С.С., Захарова А.А., Чулков Е.Г., Малев В.В., Щагина Л.В., Остроумова О.С.*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ssefimova@mail.ru

Анестезирующие вещества используются в клинической медицине более 150 лет, обеспечивая успех выполнения большинства инвазивных процедур в хирургической практике, при этом точные молекулярные механизмы их действия до сих пор остаются относительно неизвестными. Побочные эффекты применения анестезии, такие как нейротоксичность, нейродегенерация и послеоперационная когнитивная дисфункция [1], по мнению некоторых авторов могут быть следствиями модификации физико-химических свойств клеточных мембран в присутствии анестетиков [2].

В работе дана количественная характеристика действия местных анестетиков группы амидов (лидокаина, прилокаина, бупивакаина и мепивакаина) и эфиров (бензокаина, прокаина и тетракаина) на физико-химические свойства мембраны: граничный потенциал и его компоненты (поверхностный и дипольный потенциалы), на проницаемость липосом для флуоресцентных маркеров, температуру и кооперативность главного фазового перехода насыщенных фосфолипидов.

Установлено, что, за исключением прокаина, практически все тестируемые анестетики влияют на электростатические свойства мембраны. Аминоамиды увеличивают граничный потенциал мембраны за счет изменения поверхностного заряда бислоя. Электростатические эффекты аминоэфиров, в основном, обусловлены модификацией дипольной компоненты граничного потенциала, причем бензокаин снижает, а тетракаин вызывает рост соответствующего параметра. Выдвинуто предположение о различии в ориентации дипольных моментов молекул аминоэфиров в полярной области мембраны. Выраженность влияния местных анестетиков на плотность упаковки липидов в мембране коррелирует с гидрофобностью их молекул, большими эффектами характеризуются бупивакаин и тетракаин. Их введение сопровождается ростом проницаемости липидных везикул для кальцеина, снижением фазовой сегрегации мембранных компонентов и падением температуры и кооперативности плавления насыщенных фосфолипидов.

Для изучения влияния местных анестетиков на процессы формирования и функционирования реконструированных в липидные бислои ионных каналов электрофизиологическим способом были протестированы порообразующие агенты, относящиеся к различным классам, обладающие выраженной потенциал- или механо-чувствительностью. Выявлено, что основными факторами, определяющими проницаемость грамицидиновых каналов в присутствии местных анестетиков, являются изменения поверхностного и дипольного потенциала мембраны. Установлено, что ключевая роль в липидопосредованной регуляции местными анестетиками каналобразующей активности мелиттина, магаинина, нистатина, синингомицина Е и цекропина А принадлежит модификации профиля латерального давления в бислое. Полученные в ходе выполнения проекта результаты расширяют представления о молекулярных механизмах действия местных анестетиков на ионные каналы и указывают на необходимость учета их мембраноассоциированных эффектов при клиническом применении.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (№ 18-34-20047) и Стипендии Президента РФ (СП-484.2018.4).

1. Lugli A. et al. Anaesthetic mechanisms: update on the challenge of unravelling the mystery of anaesthesia // Eur. J. Anaesthesiol. 2009. Vol. 26, P. 807-820.
2. e-Paula E. and Schreiber S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction // Braz. J. Med. Biol. Res. 1996. Vol. 29, P. 877-894.

## **ОБРАТНЫЙ ЗАХВАТ ГЛИЦИНА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ: МОДЕЛИРОВАНИЕ РАБОТЫ ПЕРЕНОСЧИКА**

### **GLYCINE REUPTAKE IN MAMMALIAN: COMPUTER SIMULATION OF TRANSPORTER PROTEINS**

*Зайцев К.С., Бороновский С.Е., Нарциссов Я.Р.*

НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, г. Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14.

Тел./факс: +7(495)327-49-87; e-mail: icmph@yandex.ru

Глицин является одним из основных ингибирующих нейромедиаторов центральной нервной системы (ЦНС). Ингибирующая функция, состоящая в активации специфичных лиганд-зависимых хлорных каналов, представляет собой важнейший аспект работы нервной системы млекопитающих. Поскольку передача торможения между нейронами, организованная в виде специализированных синапсов, подразумевает

возобновление пула нейромедиаторов, то мембранные транспортные системы играют существенную роль в регуляции активности как отдельных нейронов, так и всей нервной ткани в целом. К таким транспортным системам относятся специфические переносчики глицина в глиальные (GLYT1) и в нейрональные (GLYT2) клетки. Механизм, с помощью которого белки-переносчики осуществляют захват аминокислотной кислоты, включает также связывание и котранспорт ионов  $\text{Na}^+$  (2 иона для переносчика GLYT1 и 3 для GLYT2) и иона  $\text{Cl}^-$ . Целью данной работы является разработка симулятора функционирования мембранного переносчика аминокислотной кислоты. На основе имеющихся литературных данных сконструирована схема работы GLYT2 (глицинового переносчика 2 типа), по которой был составлен вероятностный механизм последовательности событий в ходе полного цикла конформационных изменений транспортера. Предложенный алгоритм был реализован в виде программного обеспечения Glucine Transporter (GT), которое позволяет моделировать единственный переносчик в зависимости от различных внешних (например, концентрации метаболитов в среде) и внутренних (характеристики конформационных переходов фермента) параметров. С помощью GT было изучено поведение системы в широком диапазоне константы равновесия (от 0.2 до 100), которая не определена экспериментально. Показано существенное влияние  $K_{eq}$  в диапазоне от 0.2 до 10 на процесс переноса глицина, при значениях константы вне указанного диапазона определяющими являются другие характеристики системы. Для значения  $K_{eq}$ , равного 2, зависимость скорости процесса переноса глицина белком GLYT2 от концентрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в межсинаптической щели описывается кривой с коэффициентом Хилла 1.8, что может указывать на наличие кооперативности связывания глицина с каким-то процессом. Можно предположить, что завершённый процесс последовательного связывания 4 молекул ионов с глициновым транспортером является необходимым условием присоединения молекулы глицина. Таким образом, коэффициент Хилла близкий к 2, говорит о кооперативности связывания глицина с произошедшим присоединением всех четырёх котранспортных ионов. GT позволяет получать величины потоков котранспортных ионов и глицина как в численном, так и в графическом виде. Сходство функциональных механизмов GLYT2 и GLYT1, а также гибкость представленного программного обеспечения позволяет расширить область применения разработанного алгоритма для полного описания транспорта глицина в нервных клетках.

## ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ IN VITRO И IN VIVO

### THE INFLUENCE OF ELECTROMAGNETIC FIELDS ON THE ELECTROKINETIC PROPERTIES OF ERYTHROCYTES IN VITRO AND IN VIVO

*Захарова О.А., Ананьева Ю.Е., Рохмистрова Е.Г., Лабынцева О.М., Голубев А.В.*

Федеральное Государственное Унитарное Предприятие Российский Федеральный ядерный центр –  
Всероссийский НИИ экспериментальной физики, Россия, 607190, г.Саров, Нижегородская обл.  
Тел. (83130) 6 96 13, факс(83130) 3 63 00, [olga@bfrc.vniief.ru](mailto:olga@bfrc.vniief.ru)

Факторы внешней среды оказывают постоянное воздействие на организм человека. Понимание механизмов их влияния на биологическую систему позволит вести целенаправленный поиск мер, направленных на защиту организма. Рецепторов, реагирующих на воздействие электромагнитного поля (ЭМП), не обнаружено. Существует несколько путей реализации влияния этого фактора на организм, в том числе и через мембранные структуры клетки, изменяя электрохимические свойства её поверхностных компонентов. Наиболее показательным методом, позволяющим исследовать прижизненное состояние клеток и оценить их электрокинетические свойства, является метод исследования электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ).

Проведено исследование действия электромагнитного поля радиочастотного диапазона на изменение ЭФПЭ крови крыс на моделях *in vitro* и *in vivo*. Воздействие ЭМП с ППЭ  $300 \text{ мкВт/см}^2$  осуществлялось в течение 30 минут. В эксперименте *in vitro* осуществляли обработку ЭМП суспензии крови объемом 1 мл. В экспериментах *in vivo* животные были разделены на две группы: подвергавшиеся воздействию ЭМП и интактные животные. Забор крови проводили через час после окончания воздействия путем декапитации. Электрокинетические свойства клеточной мембраны оценивали с помощью метода микроэлектрофореза.

Получено, что после воздействия ЭМП на модели *in vitro* наблюдалось снижение ЭФПЭ на 37 % ( $p < 0,001$ ), на модели *in vivo* - на 11 % ( $p < 0,001$ ). Данные изменения свидетельствуют о снижении отрицательного заряда на клеточной мембране, который обеспечивает ионную проницаемость, межклеточное взаимодействие и обеспечивает поддержание оптимального состояния гомеостаза.

Таким образом, ЭМП приводило к структурно-функциональным изменениям клеточной мембраны за счёт поглощения энергии излучения мембранными структурами вне зависимости от выбранной модели исследования.



## **ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МЕХАНИКОЙ МЕМБРАН И ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ БЕЛКА**

### **RELATIONSHIP BETWEEN MEMBRANE MECHANICS AND SECONDARY STRUCTURE OF PROTEIN**

***Ивченко Д. В., Кузьмин П. И., Варижук А. М., Башкиров П. В.***  
ФНКЦ ФХМ ФМБА

Морфогенез мембран посредством периферийных белков актуальная тема современных исследований, требующая новых экспериментальных и теоретических подходов [1]. Клатрин опосредованный эндоцитоз – один из ярких примеров сложных процессов, изучающийся в рамках обозначенной области знаний. Один из его важных участников – эпсин, взаимодействует с мембраной посредством специального фрагмента – амфифильной Н0 спирали и индуцирует в ней положительную кривизну [2]. Роль Н0 спирали в этом процессе является сегодня предметом дискуссии [3] и требует экспериментальных проверок и новых количественных моделей. Так же амфифильные участки встречаются во многих других белках, например в ArfGAP1, который инициирующий разборку COPI оболочки или в magainin 2, проявляющем антибактериальные свойства [4]. Поэтому изучение амфифильных пептидов поможет понять широкий круг биологических явлений.

В данной работе изучается взаимодействие Н0 пептида белка эпсина с липидным бислоем разного состава и разной кривизны. Были получены следующие экспериментальные результаты:

- уменьшение радиуса липидной нанотрубки вследствие встраивания спиралей (с 18нм до 11нм при ~ 1мкмоль Н0 в растворе);
- отсутствие тубуляции гигантских униламеллярных везикул (ГУВ) при концентрации > 3мкм Н0 пептида, несмотря на то, целый ENTH домен эпсина (который содержит Н0) тубулирует ГУВы при тех же концентрациях;
- методом кругового дихроизма показано увеличение вероятности перехода клубок-спираль при увеличении кривизны липидного бислоя.

1. Bassereau, P., Jin, R., Baumgart, T., Deserno, M., Dimova, R., Frolov, V.A., Bashkirov, P.V., Grubmüller, H., Jahn, R., Risselada, H.J. and Johannes, L., 2018. The 2018 biomembrane curvature and remodeling roadmap. *Journal of physics D: Applied physics*, 51(34), p.343001.
2. Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R. and McMahon, H.T., 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419(6905), p.361.
3. Stachowiak, J.C., Schmid, E.M., Ryan, C.J., Ann, H.S., Sasaki, D.Y., Sherman, M.B., Geissler, P.L., Fletcher, D.A. and Hayden, C.C., 2012. Membrane bending by protein-protein crowding. *Nature cell biology*, 14(9), p.944.
4. Drin, G. and Antonny, B., 2010. Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS letters*, 584(9), pp.1840.

## **ПРИМЕНЕНИЕ МНОГОКОМПАРТМЕНТНОЙ КИНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЛОКАЛИЗАЦИИ ИЗОФОРМ ГЛУТАМИНАЗЫ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАМАТА В АСТРОЦИТАХ**

### **APPLICATION OF MULTICOMPARTMENTAL KINETIC MODEL OF GLUTAMINASE ISOFORMS LOCALIZATION TO ANALYZE THE METABOLISM OF GLUTAMATE IN ASTROCYTES**

***Казмирук Н.В., Нарциссов Я.Р.***

Институт цитохимии и молекулярной фармакологии, Россия, Москва, kazmiruk@icmph.ru

Эффективность метаболизма глутамата и глутамина в головном мозге напрямую зависит от пространственного распределения и регуляции фосфат-активированной глутаминазы (ГА, Е.С. 3.5.1.2). Глутаминидаза участвует в синтезе нейротрансмиттера глутамата, играя важную роль в регуляции клеточной биоэнергетики. Данный фермент является преимущественно митохондриальным, поскольку его каталитически активная форма находится на внутренней митохондриальной мембране. Однако точная локализация активного центра глутаминазы на сегодняшний день остается неизвестной. В настоящее время существует две противоречащие друг другу экспериментальные гипотезы локализации мембраносвязанного активного центра глутаминазы. В первой гипотезе глутаминидаза располагается на внутренней мембране митохондрии, и её активный центр обращён в матрикс. Согласно альтернативной гипотезе фермент также расположен на внутренней мембране, однако его активный центр обращён в сторону межмембранного пространства, что делает производимый глутамат и аммоний доступными для различных метаболических процессов в митохондриях. Тем не менее, генерация большого количества аммония внутри небольшого митохондриального компартмента приводит к возникновению активных форм кислорода и индуцированию митохондриальной проницаемости, которые, в свою очередь, запускают каскад событий, приводящих к набуханию астроцита и

последующей астроглиальной дисфункции. Именно набухание астроцитов служит практически единственным показателем гистопатологических изменений и отличительным признаком возникновения гепатоэнцефалопатии. В нашем исследовании мы использовали многокомпонентное кинетическое моделирование для моделирования метаболизма глутамата и глутамина в астроцитах. Результаты моделирования показали высокую эффективность метаболизма глутамата в случае, если активный центр глутаминазы обращён в сторону межмембранного пространства, и низкую эффективность в случае, если он обращён в матрикс. Кроме того, обнаружено трёхкратное снижение производства аммония в матриксе астроцита.

## **ВЛИЯНИЕ ГИДРОФОБНЫХ И ГИДРОФИЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА МИКРОВЯЗКОСТЬ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ IN VITRO**

### **EFFECT OF HYDROPHOBIC AND HYDROPHILIC ANTIOXIDANTS ON THE LIPID BILAYER MICROVISCOSITY OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN VITRO**

***Канаши Ю.С., Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В.***

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”, Минск, jurakanash@rambler.ru

Известно, что структурно-функциональное состояние мембранных белков тесно связано с их липидным микроокружением, а фосфолипиды (ФЛ) играют значимую роль в поддержании нативной конформации мембранных белков. Показано, что изменение физико-химических свойств липидного бислоя мембран эритроцитов в значительной степени способно определять развитие определенных патологий, таких, как например, ишемическая болезнь сердца [1]. Степень тяжести при данной патологии определяется накоплением лизоформ ФЛ и свободных жирных кислот, которые влияют на плотность упаковки липидного бислоя [2] и повышают пассивный перенос ионов, что способно привести к нарушению ионного баланса в эритроцитах [3]. В таких условиях полезными могут оказаться антиоксиданты (АО). Некоторые из них (например, флавоноиды) помимо участия в клеточной сигнализации, способны увеличивать микровязкость липидного бислоя и снижать кооперативность плавления углеводородных цепей, тогда как другие способны в значительной степени снижать температуру плавления липидов и обеспечивать тем самым повышенную проницаемость плазматических мембран [4].

*Целью данной работы явилась оценка микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов при действии in vitro гидрофобных и гидрофильных антиоксидантов.*

**Материалы и методы.** Периферическая кровь была получена от условно здоровых доноров. Эритроциты инкубировали с различными концентрациями АО (N-ацетилцистеином (НАС), аскорбиновой кислотой (АК),  $\alpha$ -токоферолом ( $\alpha$ -Т) и кверцетинном) в течение 2 и 22 ч при 37°C, после чего изолировали эритроцитарные мембраны (получали “тени”). Для оценки микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов использовали флуоресцентный зонд 6-додеканол-2-диметиламинонафтален (лаурдан). При встраивании в мембрану он локализуется в гидрофильно-гидрофобной области липидного бислоя и позволяет оценить молекулярную динамику окружающих его фосфолипидов, а также степень их упаковки в мембране по величине изменения генерализованной поляризации (GP). Измерение параметров флуоресценции лаурдана проводили на спектрофлуориметре SM2203 («СОЛАР», Беларусь) при  $\lambda_{\text{возб/рег.}} = 340/440$  и 490 нм.

**Результаты.** Показано, что гидрофильный НАС в концентрациях 0,1 и 1 мМ не изменял GP лаурдана как при 2 ч инкубации, так и после 22 ч воздействия. В свою очередь НАС при концентрации 10 мМ приводил к увеличению микровязкости липидного бислоя мембран в среднем на 10-15%. АК в концентрациях 0,1; 0,5 и 1 мМ не оказывала влияния на параметры флуоресценции лаурдана. Полученные данные можно объяснить тем, что исследуемые АО поступают в клетку, в основном, путем активного транспорта и взаимодействуют с внутриклеточными молекулами или их гидрофильными участками.

Изучение влияния гидрофобных АО на микровязкость липидного бислоя мембран эритроцитов, позволило установить следующее: при действии  $\alpha$ -Т в концентрации 0,01 и 0,1 мМ в течение 2 ч значения GP лаурдана не отличались от таковых в интактных мембранах, тогда как увеличение времени инкубации до 22 ч приводило к снижению значений GP на 5-10 %, т.е. к увеличению текучести в гидрофильно-гидрофобной области липидного бислоя. С другой стороны, применение  $\alpha$ -Т в концентрации 1 мМ приводило к снижению текучести липидного бислоя в среднем на 10%. Полученные нами данные согласуются с работой [5], где выявили, что  $\alpha$ -Т способен увеличивать микровязкость ненасыщенных бислоев и снижать микровязкость насыщенных бислоев. Характер действия  $\alpha$ -Т определяется составом жирных кислот и липидов и не зависит от структуры полярных групп молекул ФЛ. При изучении влияния флавоноида кверцетина в концентрации 0,01 мМ не выявлено отличий в значениях GP от интактных мембран, как после 2 ч, так и после 22 ч инкубации с ним. Тогда как увеличение концентрации кверцетина до 0,1 мМ сопровождалось увеличением микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов в среднем на 10-15%. Известно, что характеристики упаковки липидов и латерального распределения могут зависеть от расположения молекул флавоноида в бислое, причем

молекулы флавоноида, расположенные в гидрофобной области липидного бислоя, могут инициировать образование рафто-подобных микродоменов, в то время как молекулы, расположенные в области полярной границы липидного бислоя, способны «разжижать» мембраны за счет разрушения рафтовых областей [4].

**Заключение.** Таким образом, установлено, что воздействие гидрофильных АО на эритроциты человека (НАС и АК) не приводит к модификации липидного бислоя их мембран. Тогда как воздействие гидрофобных АО на клетку ( $\alpha$ -Т и кверцетин) приводит к разнонаправленной модификации липидного бислоя мембран эритроцитов человека, которая зависит от концентрации АО и времени воздействия на клетки.

1. Revin VV et al. // Biomed Res Int. 2016. 2016:3429604.
2. Mills J.K., Needham D// Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes. 2005. Vol. 1716 (2). P. 77-96.
3. Ibarguren M. et al. // Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes. 2014. Vol. 1838 (6). P. 1518-1528.
4. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A // Mol Cell Biochem. 2008. Vol. 314 (1-2). P. 65-71.
5. Горбунов Н.В и др. // Научные доклады высшей школы биологической науки. 1987. Т. 7. С. 27-32.

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ РЯДА СИНТЕТИЧЕСКИХ СЕРУСОДЕРЖАЩИХ ДВУХОСНОВНЫХ КИСЛОТ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ МИТОХОНДРИЙ

## MOLECULAR MECHANISM OF ACTIONS OF A NUMBER OF SYNTHETIC SULFUR-CONTAINING DIBASIC ACIDS ON THE ENERGY PROCESSES OF MITOCHONDRIA

*Кожокару А.Ф.*

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Московская область, Пущино, aurelium@inbox.ru

Исследование 21 химических соединения группы ДОК<sub>2</sub> из класса двухосновных кислот (ДОК), являющихся ароматическими сульфидами, сульфоксидами и сульфонами, у которых два бензольных кольца соединены S, SO и SO<sub>2</sub> группами, соответственно, с гидроксильными OH-группами в четвертом положении бензольных колец, на электропроводность ( $G_m$ ) БЛМ при концентрациях  $10^{-7}$ - $10^{-3}$  М ранее показало значительно меньшую протонфорную активность по сравнению с соединениями ДОК<sub>1</sub>, имеющих OH группу во втором положении. На основании более высоких коэффициентов распределения для ДОК<sub>1</sub> ( $10^4$ - $10^5$ ) по сравнению с ДОК<sub>2</sub> ( $10^2$ -  $10^3$ ) эти различия можно объяснить намного меньшим сродством ДОК<sub>2</sub> к липидам, а также их слабой диссоциацией при исследованном физиологическом значении pH 7,5 ввиду того, что коэффициенты диссоциации  $pK_a$  этих веществ, определенные методом их титрования, находятся в сильно щелочной области, в отличие от ДОК<sub>1</sub>,  $pK_a$  которых находятся в области, близкой к значению pH, при котором проводились измерения  $G_m$  БЛМ [1].

При увеличении концентрации ДОК<sub>2</sub> полярографическим методом было показано увеличение стимуляции скорости дыхания митохондрий (Мх) печени крыс в состоянии 4, что свидетельствовало о разобщающем действии этих концентраций, затем наблюдалось существенное ингибирование дыхания. Зависимость скорости дыхания Мх от концентрации ДОК<sub>2</sub> отображается в виде колоколообразных кривых. Торможение дыхания частично снималось при увеличении концентрации Мх, что свидетельствует о связывании ДОК<sub>2</sub> с Мх.

Обнаружение разобщающей активности ДОК<sub>2</sub>, связанной со снятием мембранного потенциала при стимулирующих скорость дыхания Мх концентрациях препарата, являлось подтверждением протонфорной активности ДОК<sub>2</sub> на Мх. Ингибиторный эффект ДОК<sub>2</sub> и других разобщителей окислительного фосфорилирования (РОФ) на скорость дыхания Мх не был связан со снижением мембранного потенциала. Он может быть обусловлен ингибирующим действием РОФ на различные ферменты, находящиеся в дыхательной цепи, торможением протонной АТФазы [2]. Высокие концентрации  $> 10^{-3}$  М ДОК<sub>2</sub> с заместителями  $Vg^-$  в бензольных кольцах, необратимо ингибирующие скорость дыхания Мх, могут быть токсическими *in vivo*.

Исследование влияния большинства ДОК<sub>2</sub> на скорость дыхания Мх показало их незначительную активность, как и на БЛМ [1]. Препараты СД, СО, СН без заместителей в бензольных кольцах оказались неэффективными РОФ на Мх и неэффективными протонфорами на БЛМ. Они стимулировали дыхание Мх лишь на 20-30% при концентрациях  $10^{-5}$  –  $10^{-3}$  М за счет действия растворителя ДМСО. Слабо и средне эффективные препараты ДОК<sub>2</sub> увеличивали скорость дыхания на 50-60% и  $G_m$  БЛМ в 5-10 раз при  $10^{-4}$ -  $10^{-3}$  М. Наиболее эффективные препарата ДОК<sub>2</sub> увеличивали скорость дыхания Мх на 70 - 135% и  $G_m$  БЛМ на 1,5 - 2 порядка при  $8 \cdot 10^{-5}$  –  $5 \cdot 10^{-4}$  М. Активными оказались препараты МНСД, МНСО, МНСН и ТБСД, ТБСО, ТБСН с NO<sub>2</sub> и галогенными заместителями  $Vg^-$  в положениях 2, 2' и 5, 5' бензольных колец. Вероятно, отрицательно заряженные ионы кислорода SO, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> групп и  $Vg^-$ , оттягивая протоны от гидроксильных групп, увеличивают диссоциацию OH-групп и разобщающую эффективность активных соединений в большей степени, чем карбоксильные (COOH) и карбоксиметильные (COOCH<sub>3</sub>) группы, характерные для белков и аминокислот. Более высокой активности этих соединений на Мх способствовали также величины  $pK_a$ , не столь

существенно отличающиеся от рН 7,5, при котором проводились исследования. ДОК<sub>1</sub> с заместителями СГ оказались намного более эффективными РОФ, чем ДОК<sub>2</sub>: ДОК<sub>1</sub> ускоряли дыхание Мх на 250–360% при существенно меньших концентрациях  $2 \cdot 10^{-6}$  -  $2 \cdot 10^{-5}$  М. Протонофорная и разобщающая активность соединений ДОК<sub>2</sub> располагалась в ряд их подгрупп: сульфоны > сульфиды > сульфоксиды. Из полученных результатов следует, что положение и тип заместителя в бензольных кольцах влияет на коэффициенты диссоциации, распределения, подвижности диссоциирующих форм ДОК<sub>2</sub> в липидах и их разобщающую активность в Мх.

Была выявлена прямо пропорциональную зависимость концентрации препаратов ДОК<sub>2</sub> и других РОФ, ускоряющих дыхание Мх в 2 раза от их концентрации, увеличивающей электропроводность БЛМ от исходной  $10^{-9}$  См/см<sup>2</sup> до  $5 \cdot 10^{-9}$  См/см<sup>2</sup> с учетом коэффициентов распределения липид/вода. Полученная корреляция свидетельствует о том, что исследованные соединения проявляют протонофорную активность не только на БЛМ, но и на нативных мембранах Мх. Была получена прямая под углом 45°, отражающая ряд активностей следующих соединений: ДОК<sub>1</sub> > тегалид (класс замещенных салициланилидов) > ионол (антиоксидант) > ДНФ (классический разобщитель) > ДОК<sub>2</sub>. Полученные данные подтверждают хемиосмотическую гипотезу П.Митчела. Хемилюминесцентным методом на липосомах из яичного лецитина была показана высокая антиоксидантная активность для ряда соединений ДОК<sub>2</sub> с низкой протонофорной и разобщающей активностью, они могли бы оказаться эффективными терапевтическими препаратами при лечении последствий действия  $\gamma$ -радиации и УФ излучения, различных заболеваний (сердечно-сосудистых, неврологических, онкологических).

1. Кожокару А.Ф. Протонофорное и антиоксидантное действие природных флавоноидов, синтетических серусодержащих двухосновных кислот и других фенольных соединений. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 11. С. 39-49.

2. Скулачев В.П. Аккумуляция энергии в клетке. М. Наука. 1969. 440 с.

## МЕХАНИЗМ ВСТРАИВАНИЯ МЕМБРАНО-АКТИВНОГО ЦИТОТОКСИНА В ЛИПИДНЫЙ БИСЛОЙ: МОДЕЛИРОВАНИЕ IN SILICO

### BINDING OF MEMBRANE-ACTIVE CYTOTOXIN TO LIPID BILAYER: MOLECULAR MODELING IN SILICO

*Коншина А.Г.<sup>1</sup>, Крылов Н.А.<sup>1,2</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2</sup>.*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup>Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва

Изучение влияния мембранного окружения на работу различных белок-мембранных комплексов (трансмембранных каналов, рецепторов) является одним из актуальных направлений современной структурной биологии. Изменения в структурных параметрах бислоя, в частности, локальные возмущения геометрии, подвижности липидов при встраивании небольших мембрано-активных полипептидов могут представлять особый интерес с точки зрения контролируемого изменения активности рецепторных систем клетки. Подобная модуляция активности показана экспериментально на клетках, обработанных цитотоксинами [1]. Однако получить детальную информацию о механизме встраивания пептида-модулятора и локальных возмущениях мембраны на молекулярном уровне крайне сложно. В качестве альтернативы эксперименту при изучении динамического поведения липидных бислоев и белок-мембранных систем широко используют методы молекулярного компьютерного моделирования, в частности, расчеты молекулярной динамики (МД) в модельных мембранах.

Цитотоксины (ЦТ) Р-типа из яда змей непосредственно действуют на клеточные мембраны, не имея белковых мишеней [2]. Детальный механизм встраивания ЦТ в мембрану не ясен. ЦТ – это  $\beta$ -структурные белки, имеющие протяженный гидрофобный паттерн (гидрофобную подошву). Методом спектроскопии ЯМР установлена трех-петлевая мода встраивания ЦТ 2 (из яда *Naja oxiana*) в мицеллы детергента остатками гидрофобной подошвы. Однако, как показывают исследования модельных липидных систем, размер гидрофобных кластеров, спонтанно образующихся на поверхности бислоя, существенно меньше [3].

В настоящей работе проведено компьютерное моделирование взаимодействия (расчет 2мкс-МД в полноатомном приближении) ЦТ 2 с бислоем из молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина. Были поставлены следующие вопросы: 1) Каков механизм взаимодействия молекулы ЦТ, имеющей обширный гидрофобный паттерн, с преимущественно полярной поверхностью липидного бислоя? 2) Существует ли специфическое взаимодействие между ЦТ и молекулами липидов? 3) Каковы локальные изменения в поведении липидов при встраивании мембрано-активного ЦТ?

Получены следующие результаты:

- Впервые экспериментально подтвержденная мода взаимодействия ЦТ с мембраной (три гидрофобными петлями) воспроизведена в компьютерном эксперименте – расчете МД при старте из воды.
- Процесс встраивания является ступенчатым: петля 1, петли 1-2, петли 1-3 Токсин имеет специфические сайты связывания липидных головок. Один из таких сайтов предсказан независимыми методами молекулярного

докинга и расчетами свободной энергии взаимодействия: ЦТ – липид. Данные сайты могут быть якорями, удерживающими ЦТ не только на поверхности мембраны, но и в определенной ориентации, благоприятной для дальнейшего встраивания петлями 2 и 3.

- Периферически связанный с мембраной токсин оказывает влияние на структурно-динамические параметры бислоя: ограничивает подвижность липидов аннулярного слоя (близкого к белку), вызывает локальные изменения рельефа и гидрофобных свойств поверхности мембраны.

Таким образом, ЦТ (в субтоксических концентрациях) могут рассматриваться как потенциальные агенты влияния и управления работой крупных трансмембранных белков. В дальнейшем предполагается изучить изменения в структурно-динамических характеристиках данных белков в присутствии молекул ЦТ, взаимодействующих с липидным бислоем.

Работа подготовлена в рамках Программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ и с использованием средств субсидии в рамках государственной поддержки ведущих университетов РФ “5-100”.

- 1 Harwardt M.I.E. et al Membrane dynamics of resting and internalin B-bound MET receptor tyrosine kinase studied by single-molecule tracking. // FEBS Open Bio. 2017 Vol 7. P. 1422.
- 2 Konshina AG, Dubovskii PV, Efremov RG. Structure and dynamics of cardiotoxins // Curr. Protein Pept. Sci. 2012 Vol 13(6). P. 570.
- 3 Konshina A.G., Krylov N.A., Efremov R.G. Cardiotoxins: functional role of local conformational changes. // J Chem Inf Model. 2017 Vol 57(11). P. 2799.



## МОДЕЛИРОВАНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В СПЕРМАТОЗОИДЕ ЧЕЛОВЕКА

### MODELLING OF CALCIUM SIGNALLING IN HUMAN SPERM

*Коробкина Ю.Д.<sup>1</sup>, Балабин Ф.Н.<sup>1</sup>, Симоненко Е.Ю.<sup>1</sup>, Свешникова А.Н.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, ГСП-1, Ленинские горы, дом 1, строение 2, 119991, Москва, РФ e-mail: juliajessika@gmail.com

Ион кальция является одним из универсальных переносчиков сигналов внутри клетки, способным как активировать, так и инактивировать различные клеточные ферменты [1]. Концентрация свободных ионов кальция в цитоплазме большинства клеток зависит от работы десятков различных каналов, регулируемых активацией клеточных рецепторов.

В сперматозоидах прогестерон способен индуцировать несколько типов кальциевых ответов [2] (кратковременное повышение концентрации кальция или низкочастотные кальциевые осцилляции и т.д.). Известно, что у людей данный стероидный гормон опосредованно активирует локализованный в жгутике сперматозоида кальциевый канал CatSper, через который ионы кальция входят из внешней среды в цитоплазму [3]. Ионы кальция диффундируют в головку спермия, где находится фосфолипаза С, катализирующая гидролиз  $PIP_2$  и производящая другой важный вторичный мессенджер  $IP_3$ . В человеческих сперматозоидах присутствует несколько изоформ фосфолипазы С, однако существенно активной является только одна – изоформа фосфолипазы С  $\delta$ , активность которой существенно зависит от концентрации кальция в цитоплазме [4].

Целью настоящей работы является уточнение механизмов кальциевого ответа при активации человеческих сперматозоидов прогестероном.

Был построен набор компьютерных моделей, представляющих собой системы дифференциальных уравнений (в частных производных – интегрирование в VCell (<http://vcell.org>); обыкновенных – интегрирование в COPASI (<http://copasi.org>). Исследование динамики концентрации кальция было проведено с помощью чувствительных к концентрации свободных ионов кальция флуоресцентных меток Fura-2 и Fura-Red. Наблюдение динамики кальция в загруженных Fura-Red сперматозоидах, зафиксированных на покрытых поли-L-лизинном стеклах, производилось в режиме эпифлуоресценции с помощью микроскопа Nikon Eclipse TI. Дополнительно, был проведён анализ динамики концентрации ионов кальция в суспензии загруженных Fura-2 сперматозоидов на спектрофлуориметре. Активация производилась 5  $\mu$ M раствором разведенного в DMSO прогестерона.

Экспериментально было показано, что существует три возможных вида кальциевых ответов на активацию канала CatSper прогестероном: кальциевый пик с характерным временем активации и длительностью ответа порядка 60 секунд или постепенное поднятие концентрации кальция и осцилляции с характерным периодом колебаний концентрации кальция порядка 200 с. Пиковая концентрация кальция в каждом случае имела порядок 1  $\mu$ M. Только пространственно распределенная модель была способна описать низкочастотные осцилляции кальция, причем наблюдалась зависимость частоты осцилляций от коэффициента диффузии. На основании этого было установлено, что важную роль в формировании кальциевого пика и осцилляторного ответа играет пространственное разнесение кальциевого депо, места локализации фосфолипазы

С и кальциевой АТФазы РМСА. Увеличение коэффициента диффузии кальция или уменьшение коэффициента диффузии IP3 привело к исчезновению колебаний кальция, что отличается от физиологического состояния.

1. Okabe M. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2016;220:1-13. The Acrosome Reaction: A Historical Perspective.
2. Leah Armon, Michael Eisenbach, Plos One, December 7, 2011. Behavioral Mechanism during Human Sperm Chemotaxis: Involvement of Hyperactivation
3. Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Kirichok, Y., 2011. Nature 471 (7338), 387–391. Progesterone activates the principal  $Ca^{2+}$  channel of human sperm.
4. V. Allen, P. Swigart, R. Cheung, S. Cockcroft, and M. Katan. Biochem J. 1997 Oct 15; 327(Pt 2): 545–552. Regulation of inositol lipid-specific phospholipase C $\delta$  by changes in  $Ca^{2+}$  ion concentrations.

## МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ УФ-В ИЗЛУЧЕНИЯ

### MODIFICATION OF THE STRUCTURAL CONDITION OF PLASMATIC MEMBRANE OF YEAST CELLS UNDER THE INFLUENCE OF THE UV-B RADIATION

*Н.К. Кочарли, С.Т. Гумматова*

Бакинский Государственный Университет, Баку, sam\_bio@mail.ru

Все живые организмы подвергаются воздействию разных видов излучений и поэтому исследование воздействия этих излучений на живые организмы представляет большой интерес. Исследованиями последних лет однозначно доказано, что УФ-В облучение вызывает структурные перестройки в клетках, сохраняющиеся длительное время после облучения и приводящие к изменению функциональной активности клеток. Существенная роль в регуляции процессов, происходящих в мембранах, принадлежит их микро вязкости комплексному показателю, который отражает как структурные, так и функциональные аспекты липидной составляющей мембраны. Изменения микровязкости мембраны тесно связаны с метаболическими изменениями, происходящими в клетке.

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Источником УФ-В – излучения служила ртутная лампа ПРК-4, снабженная светофильтром УФС-2. Доза облучения составляла  $0,7 \cdot 10^4 - 4,5 \cdot 10^4$  эрг/мм<sup>2</sup>. Контролем служила необлученная суспензия. Для оценки структурного состояния мембран определяли микровязкость липидной фазы. Метод определения основан на способности флуоресцентного зонда пирена образовывать эксимеры в неполярной среде. Скорость латеральной диффузии и эксимеризации пирена в липидном слое мембран обратно пропорциональна вязкости среды. В суспензию клеток, добавляли  $10^{-3}$ М раствор пирена в этаноле, через 1 мин (время полного растворения пирена в липидной фазе мембран) измеряли флуоресценцию проб на спектрофлуориметре (*Fluorescence spectrophotometer Varian Cary Eclipse 2007*). Пик флуоресценции эксимера пирена  $F_3$  регистрировали при длине волны эмиссии 470 нм, а пик флуоресценции мономера  $F_m$  при длине волны эмиссии 393 нм. Коэффициент эксимеризации пирена  $F_3/F_m$  (334нм) отражающий микровязкость липидного бислоя, выражали отношением величины максимума флуоресценции эксимеров пирена  $F_3$  (в относительных единицах флуоресценции при (в относительных единицах флуоресценции при  $\lambda_{\text{эмиссии}} = 470$  нм) к величине максимума флуоресценции мономеров пирена  $F_m$  ( $\lambda_{\text{эмиссии}} = 393$  нм при  $\lambda$  возбуждения 334 нм). Отношение интенсивности флуоресценции эксимеров к мономерам  $F_3/F_m$  обратно пропорционально микровязкости липидного бислоя и прямо пропорционально его текучести.

Для определения полярности липидной фазы и зон белок-липидных контактов мембран клеток дрожжей, суспензию клеток содержащую раствор пирена (7 мкл/мл суспензии клеток) флуориметрировали при длине волны возбуждающего света 334 нм и длинах волн эмиссии 372 и 393 нм.

Полярность липидной фазы мембран ( $F_{372}/F_{393}(334)$ ) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм  $F_m$  пирена при длине волны возбуждения 334 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм. Полярность зон белок-липидных контактов ( $F_{372}/F_{393}(282)$ ) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм  $F_m$  в тонком спектре пирена при длине волны возбуждения 282 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм.

Установлено, что УФ-В облучение клеток дрожжей в дозе  $0,7 \cdot 10^4 - 4,5 \cdot 10^4$  эрг/мм<sup>2</sup> судя по коэффициенту эксимеризации, приводила к увеличению микровязкости (уменьшению текучести) общего липидного бислоя мембран. Аналогичные процессы отмечались также в областях аннулярных (при белковых) липидов. После облучения высокими дозами ( $3,0 \cdot 10^4 - 4,5 \cdot 10^4$  эрг/мм<sup>2</sup>) УФ-В излучения наблюдается значительное изменение параметров, характеризующих физическое состояние липидного бислоя и аннулярных липидов мембран клеток дрожжей. Данные полученные при использовании флуоресцентного зонда пирена свидетельствует об изменении исследуемых параметров структурного состояния клеточных мембран. На основании данных об изменении микровязкости мембран дрожжей после облучения можно предположить, что модификация структуры может приводить к изменению полярности липидного бислоя.

Полярность окружения зонда пирена в липидном слое мембран  $F_{272}/F_{393}(334)$  увеличивается при облучении клеток дозой  $0,7 \cdot 10^4 - 2,2 \cdot 10^4$  эрг/мм<sup>2</sup>. При оценке полярности общего мембранного липидного бислоя установлено, что при облучении в дозе  $3,0 \cdot 10^4 - 4,5 \cdot 10^4$  эрг/мм<sup>2</sup> наблюдалось незначительное увеличение полярности липидного компонента мембран клеток. В липидном слое мембраны и в зоне белок-липидных контактов полярность несколько возрастает, что согласуется с данными о накоплении в мембранах клеток первичных продуктов ПОЛ.

Известно, что при стимуляции ПОЛ в мембранах уменьшается содержание липидов, также меняется микровязкость и электростатический заряд. При более глубоком окислении фосфолипидов нарушается структура липидного бислоя и появляются дефектные зоны в мембранах клеток, а это нарушает функциональную активность. Ранее нами было установлено, что с ростом дозы УФ-В излучениям ( $0,7 \cdot 10^4 - 4,5 \cdot 10^4$  эрг/мм<sup>2</sup>) мембране клеток дрожжей происходит увеличение концентрации МДА, что свидетельствует о развитии процесса ПОЛ. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что после облучения клеток дрожжей изменение вязкостных характеристик, уменьшение текучести липидного компонента мембран, являются отражением адаптационных структурно-функциональных перестроек.

### **МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНВАЗИВНОЙ ПРОТОВОКОВОЙ КАРЦИНОМЫ (IDC): СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЕ КОЛЛЕКТИВНЫХ ФОРМ МИГРАЦИИ**

### **MATHEMATICAL MODELING OF INVASIVE DUCTAL CARCINOMA (IDC): PATTERN FORMATION OF COLLECTIVE FORMS OF MIGRATION**

*Красняков И.В., Брацун Д.А., Писмен Л.М.<sup>1</sup>*

Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Россия,  
614013, Пермь, ул. Профессора Поздеева 11,  
krasnyakov\_ivan@mail.ru, dmitribratsun@rambler.ru

<sup>1</sup> Технион – Израильский технологический институт, Израиль, 32000, Хайфа  
pismen@techunix.technion.ac.il

Согласно последним исследованиям, рак является развивающейся сложной экосистемой. Это означает, что опухолевые клетки хорошо дифференцированы и вовлечены в гетеротипические взаимодействия с их микроокружением, конкурируя за доступные ресурсы для размножения и выживания. В этой работе мы предлагаем хемомеханическую модель роста инвазивной протоковой карциномы (invasive ductal carcinoma – IDC), наиболее распространенного типа рака молочной железы. IDC относится к злокачественной аномальной пролиферации опухолевых клеток ткани эпителия, которые проникли через стенку протока в строму. Стромальная ткань в основном состоит из внеклеточного матрикса, содержащего клетки соединительной ткани. Функция соединительной ткани состоит в том, чтобы защитить паренхиматозную ткань и распределить механическое напряжение, для того, чтобы уменьшить локальное давление.

Модель предполагает, что карцинома представляет собой гетерогенное образование, состоящее из клеток разных фенотипов, которые выполняют разные функции в опухоли. Каждая клетка представлена упругим многоугольником, меняющим свою форму и размер под давлением ткани. Данная модель была предложена в работе [1] и в дальнейшем развита в работе [2] для исследования роста злокачественных новообразований. Механическая модель основана на потенциальной энергии упругости ткани, включая влияние сократительных сил внутри периметра ячейки и упругое сопротивление растяжению или сжатию ячейки относительно контрольной области. В модели предусмотрен обмен химическим сигналом между соседними клетками через общую границу. Ткань может развиваться посредством механизмов клеточного деления и интеркаляции. Фенотип каждой клетки определяется её окружением и может динамически изменяться в следствии эпителиально-мезенхимального перехода и обратного к нему мезенхимально-эпителиального перехода. Фенотип определяет адгезию клеток к прилегающей ткани и способность делиться.

В этой работе мы сосредоточимся на формах коллективной миграции злокачественных образований. Численное моделирование показывает различные структурные типы IDC. Для каждого вида структуры мы изучаем динамику клеточной популяции. Также приводим оценку сложности структур, методом, изложенным в работе [3]. Результаты численного эксперимента сравниваются с морфологическими структурами, ранее идентифицированными в клинических исследованиях [4].

Мы благодарим А.Р. Браже за то, что он поделился его открытым исходным кодом, основанным на Python, для расчёта сложности текстур.

1. Salm M., Pismen L. M. // Phys. Biol. 2012. Vol. 9, No. 2. P. 026009–026023.
2. Bratsun D. A., Krasnyakov I. V., Pismen L. M. // AIP Conference Proceedings. 2017. Vol. 1882. P. 020008.
3. Brazhe A. Shearlet-based measures of entropy and complexity for two-dimensional patterns // Physical Review E. 2018. Vol. 97(6). P. 061301.
4. Denisov E., Skryabin N., Gerashchenko T., et al. Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> stemness // Oncotarget. 2017. Vol. 8 P. 61163-61180.





## РОЛЬ МЕМБРАННОГО ОКРУЖЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ДИМЕРИЗАЦИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ СЕМЕЙСТВА ERBB

## THE ROLE OF MEMBRANE ENVIRONMENT IN THE DIMERIZATION PROCESS OF TRANSMEMBRANE SEGMENTS IN RECEPTOR TYROSINE KINASES OF ERBB FAMILY

*Кузнецов А.С.<sup>1,2,3</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2,3</sup>*

<sup>1</sup> Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, akuznecov@hse.ru

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10,

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Россия, 141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9

Рецепторные тирозинкиназы семейства ErbB — это белки, играющие ключевую роль в процессах деления и дифференцировки клеток. Их природными лигандами являются различные гормоны и факторы роста [1]. В то же время, выявлен ряд мутаций, приводящий к спонтанной активации рецепторов ErbB и развитию патологических состояний организма. В частности, рецептор ErbB2 также известен как Neu-онкоген, поскольку для многих видов рака выявлен повышенный уровень его экспрессии в клетках опухоли [2]. Известно, что трансмембранный (ТМ) домен данных рецепторов принимает непосредственное участие в процессе передачи сигнала внутрь клетки, а липидное окружение, в свою очередь, может модулировать активность белков [3]. В то же время, молекулярные механизмы взаимного влияния в системе белок-мембрана не до конца ясны, а экспериментальные методы не дают полного понимания картины межмолекулярных взаимодействий в мембранных системах. Поэтому целью настоящей работы стала количественная оценка влияния свойств липидной мембраны на формирование димеров трансмембранных доменов рецепторов семейства ErbB с помощью методов компьютерного моделирования. Были рассмотрены мономеры и димеры трансмембранных доменов белков EGFR и ErbB4 в модельных гидратированных мембранах из пальмитоилолеилфосфатидилхолина (ПОФХ), димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) и дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ).

Модели димеров построены на основе известных пространственных структур, представленных в PDB (2m20, 5lv6, 2lсх). Мономеры и димеры встраивали в уравновешенную модельную мембрану, используя ранее апробированный подход [4]. Для проведения расчётов молекулярной динамики применяли программный пакет Gromacs версии 5.1 [5], свободную энергию димеризации оценивали методом «зонтичной» выборки. Сайты белок-липидных взаимодействий определяли с помощью картирования средней плотности и соотносили с распределением гидрофильных-гидрофобных свойств на поверхности белка.

Показали, что в зависимости от параметров липидного окружения стабильность димеров различается, при этом зависимость нельзя объяснить с помощью концепции «гидрофобного мисматча». Так, димер ErbB4 наиболее стабилен в «тонкой» и «толстой» мембранах. Похожее поведение демонстрировал один из вариантов упаковки EGFR. Наблюдали перераспределение энергетических вкладов взаимодействий белок-белок и белок-липид в разных мембранах. Анализ сайтов белок-липидных контактов указал на формирование одинаковых сайтов связывания независимо от параметров липидного окружения. Стабильность данных контактов варьирует в зависимости от параметров мембраны. При этом наиболее значимый эффект наблюдали в области ацильных цепей липидов, они часто были локализованы вблизи малых гидрофильных остатков в последовательности ТМ доменов мономеров и вблизи интерфейса димеризации в случае димеров, соответственно.

В настоящей работе продемонстрирована зависимость стабильности димеров рецепторных тирозинкиназ семейства ErbB от параметров липидного окружения. При этом их поведение не объясняется известной концепцией «гидрофобного соответствия», а связано с перераспределением энергетических вкладов в системе. Таким образом, формирование стабильных белок-липидных взаимодействий оказывает влияние на стабильность димеров ErbB, что открывает возможность для поиска методов опосредованной модуляции работы рецепторов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 18-14-00375), авторы выражают благодарность суперкомпьютерному центру «Политехнический» СПбПУ за предоставленные вычислительные ресурсы.

1. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases // *Cell*, 2010, Vol. 141, Pp. 1117–1134
2. Mitri Z., Constantine T., O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. // *Chemother Res Pract.*, 2012, Vol. 2012, Pp. 743193.
3. Bocharov E.V., et. al. Helix-helix interactions in membrane domains of bitopic proteins: Specificity and role of lipid environment // *Biochim. Biophys. Acta*, 2017, Vol. 1859, No. 4, Pp. 561-576.
4. Кузнецов А.С., Волынский П.Е., Ефремов Р.Г. Роль липидного окружения в процессе димеризации трансмембранных сегментов гликофорина А. // *Acta Naturae (русскоязычная версия)*, 2016, Т. 7, № 4, Стр. 135.
5. Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., Lindahl, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from lap-tops to supercomputers. // *SoftwareX*, 2015, Vol. 1–2, Pp. 19–25.

## КОНЦЕНТРАЦИОННАЯ ДИНАМИКА АБСЦИЗОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТ В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОГО ТЕПЛОВОГО СТРЕССА

## CONCENTRATION DYNAMICS OF ABSCISIC AND JASMONIC ACIDS UNDER LOCAL HEAT STRESS

*Ладейнова М. М., Березина Е. В., Воденев В. А., Брилкина А. А.*

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород,  
[ladeynova.m@yandex.ru](mailto:ladeynova.m@yandex.ru)

Растения подвержены влиянию различных неблагоприятных факторов окружающей среды. Значительное негативное влияние на жизнеспособность и продуктивность растений оказывает повышенная температура. Повреждающее воздействие высоких температур индуцирует распространение стрессовых сигналов различной природы, среди которых электрические сигналы играют огромную роль. Одним из типов электрических сигналов растений, развивающихся в ответ на действие повреждающих стимулов, является переменный потенциал (ВП). ВП – это переходная деполяризация, распространяющаяся с затуханием на значительные расстояния от места раздражения к удалённым частям растения. Следствием распространения стрессовых сигналов является изменение функциональной активности в нераздражённых частях растительного организма – системный ответ на действие неблагоприятных факторов. В частности происходит изменение активности процессов фотосинтеза. Фотосинтетический ответ характеризуется наличием двух фаз: кратковременной и длительной. Кратковременная фаза вызвана изменением концентрации ионов при распространении ВП. Механизмы развития длительной фазы на данный момент неизвестны. Имеются основания предполагать, что длительная фаза фотосинтетического ответа может быть связана с изменением содержания фитогормонов: абсцизовой кислоты (АБК) и жасмоновой кислоты (ЖК), известные своим участием в адаптации растений к абиотическим стрессам. Целью работы явился анализ возможной роли изменения концентрации стрессовых фитогормонов в развитии длительных функциональных изменений при действии локальных стимулов.

Объектом исследования служили растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) 19-дневного возраста. В качестве локального стимула был выбран ожог открытым пламенем верхнего первого взрослого листа. Электрическую реакцию регистрировали внеклеточно с помощью макроэлектродов. Изменение активности транспирации и фотосинтеза в нераздражённых листьях исследовалось с помощью системы, включающей РАМ-флуориметр и инфракрасный газоанализатор. Измерение содержания фитогормонов проводилось методом хроматомасс-спектрометрии. Пробоподготовка включала фиксацию листьев растений жидким азотом через определённые интервалы времени после раздражения, затем их гомогенизацию в экстрагирующем растворе с последующей экстракцией в течение 15 ч при 4°C. Соотношение навески и раствора для первой экстракции составляло 1:15. Далее пробы центрифугировали, отбирали супернатант, а осадок подвергали повторной экстракции в течение 1 ч при 4°C с объёмом раствора, равным 1/3 от первоначального. Полученный гомогенат центрифугировали, отбирали супернатант, после чего объединяли надосадочные жидкости первой и второй экстракции. На следующем этапе растительный экстракт концентрировали в 2 раза и пропускали через шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм. Количественный анализ фитогормонов осуществлялся на жидкостном хроматомасс-спектрометре с тройным квадруполом Shimadzu LCMS-8040 методом внутреннего стандарта с использованием дейтерированных аналогов фитогормонов.

Локальное раздражение вызывает распространение ВП, амплитуда и скорость которого снижаются по мере удаления от места локального раздражения. Данную электрическую реакцию сопровождает снижение активности фотосинтеза и транспирации. Изменения функциональной активности более выражены в ближайших к раздражённому листьях. Для ответов фотосинтеза и транспирации характерно наличие двухфазности с максимумами около 10 мин и 45 мин после нанесения раздражающего стимула. Действие данного локального стимула вызывает также изменение концентрации АБК и ЖК в нераздражённых листьях, которое более выражено в ближайших к раздражённому листьях. Содержание фитогормонов изменяется по сравнению с контрольным уровнем через определённый временной интервал после локального раздражения. Кроме того, проявляется различная концентрационная динамика для АБК и ЖК. Таким образом, длительные изменения функциональной активности могут быть обусловлены изменением содержания стрессовых фитогормонов АБК и ЖК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (контракт № 6.3199.2017/ПЧ).

## ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНОГО СОСТАВА КЛЕТОК БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

### ESTIMATION OF MOLECULAR COMPOSITION OF BUCCAL CELLS EPITELIOCYTES OF HUMAN THROUGH RAMANOVSKY SPECTROSCOPY

*Калаев В.Н., Ларина А.В., Вахтель А.В., Вахтель В.М.*  
ФГБОУ ВО «ВГУ», г. Воронеж, larina.anyuta2010@yandex.ru

Рамановская спектроскопия представляет собой молекулярную спектроскопию для наблюдения за неэластично рассеянным светом и позволяет идентифицировать колебательные состояния молекул. Данный метод широко применяется в биологической и медицинской диагностике в связи с рядом преимуществ: простота пробоподготовки, возможность исследования биологических образцов без необходимости их разрушения, отсутствие влияния факторов внешней среды, большой объем получаемой информации. В свою очередь, исследование клеток буккальных эпителиоцитов представляется актуальным, так как микроядерный тест буккального эпителия человека позволяет оценить влияние внешних (антропогенное загрязнение, химические вещества, различные виды излучений) и внутренних (заболевания) факторов на стабильность генетического материала человека. В ходе исследований была поставлена задача: получить Раман спектры клеток ядра и мембраны и найти их спектральные отличия. Для опыта был приготовлен и окрашен по Романовскому - Гимзе препарат из буккальных эпителиоцитов человека. Измерения проводились на конфокальном Раман-микроскопе Xploa Plus при следующих параметрах:

- спектральное разрешение:  $1,5 \text{ см}^{-1}$ ;
- спектральный диапазон:  $100 \text{ см}^{-1} - 2\,400 \text{ см}^{-1}$ ;
- время измерений: 50 с;
- латеральное разрешение:  $\sim 1 \text{ мкм}$  (объектив 100x);
- лазер: 532 нм, макс. 20 мВт, мощность на образце  $\sim 10 \text{ мВт}$ .

Измерения проводились в трех разных точках: стекло, мембрана клетки и её ядро.

В результате проведенных измерений были сделаны следующие выводы:

1. спектры мембраны воспроизводимы, спектральных отличий от спектров подложки не обнаружено;
2. проведены измерения вертикального спектрального профиля ядер двух клеток. Спектральные особенности имеют максимум интенсивности в центре ядра. Результаты измерений воспроизводимы;
3. проведено предположительное отнесение линий ядер: проявление спектров жиров в области  $1300 \text{ см}^{-1}$ , нуклеиновых кислот в области  $1450 \text{ см}^{-1}$  и белков в области  $1650 \text{ см}^{-1}$ ;
4. планируются дальнейшие исследования по сравнению молекулярного состава нормальных клеток и клеток с аномалиями.

## ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ РИАНОДИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЯ 10-ДНЕВНОГО КУРИНОГО ЭМБРИОНА

### PECULIARITIES OF EFFECT OF RIANODINE ON ELECTRIC ACTIVITY OF RIGHT ATRIAL CELLS OF 10-DAY CHICKEN EMBRYO

*Лебедева Е.А., Гонотков М.А., Головки В.А.*

Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

**Введение.** Считается, что высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  через кальциевые рианодин-чувствительные каналы (RyR-каналы) способствует диастолической деполяризации и имеет решающее значение для генерации автоматизма сердца у взрослых амфибий и млекопитающих. Степень эффектов рианодина, агониста RyR-каналов, варьирует от снижения частоты генерации потенциалов действия (ПД) до полного прекращения электрической активности [1]. В то же время выявлено, что рианодин не оказывает влияния на спонтанную генерацию ПД в сердце у молодых лягушек [2]. Это позволяет предположить, что вклад RyR-каналов в инициацию электрических импульсов может меняться в процессе онтогенеза.

**Цель работы** заключалась в изучении вклада рианодин-чувствительных каналов (RyR-каналов) в генерирование электрических импульсов клеток водителя ритма правого предсердия куриного эмбриона.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили с помощью ингибиторного анализа и стандартной микроэлектродной техники на спонтанно сокращающихся препаратах правого предсердия куриного эмбриона (10 сутки,  $n=26$ ). Для оценки вклада RyR-каналов использовали рианодин. Значимость различий определяли по U-критерию Манна-Уитни ( $p < 0.05$ ). Данные приведены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ ).

**Результаты.** В контрольном солевом растворе (31° С) со стороны субэндокарда в области между нижней и верхней полыми венами регистрировали потенциалы действия (ПД) с медленной диастолической деполяризацией (МДД). Частота генерации ПД препаратов составила 168±17 имп/мин (n=11), а максимальный диастолический потенциал ( $E_{max}$ ) и амплитуда ПД – 75±6 мВ и 97±11 мВ соответственно. Скорость нарастания ПД в фазу 0 ( $dV/dt_{max}$ ) варьировала от 60 до 140 В/с и в среднем составила 93±25 В/с, а скорость фазы МДД ( $V_4$ ) – 50±14 мВ/с.

Анализ экспериментальных данных показал, что рианодин в концентрации 0,1 мкМ (n=7) у 70% препаратов правого предсердия куриного эмбриона вызывал повышение частоты генерации ПД в среднем на 13% ( $p<0.05$ ) за счет укорочения длительности потенциала действия (ДПД<sub>100</sub>; 11%) и фазы МДД (14%). Это позволяет принять данную концентрацию рианодина как близкую к пороговой.

Повышение концентрации рианодина от 0,1 до 1 мкМ (n=10) на пятой минуте экспозиции приводило к увеличению частоты генерации ПД на 15% ( $p<0.01$ ) за счет укорочения длительности потенциала действия (ДПД<sub>100</sub>; 7%) и МДД (17%,  $p<0.01$ ). Эффект сохранялся при продолжительной экспозиции рианодина (до 60 мин), при этом нарушений ритмической активности или прекращения генерации ПД у препаратов правого предсердия куриного эмбриона не зарегистрировано.

**Выводы.** Известно, что рианодин-чувствительные каналы экспрессируются у клеток сердца куриного эмбриона начиная с шестого дня эмбрионального развития [3]. Наши данные показывают, что эффект рианодина на генерацию ПД у 10-дневных куриных эмбрионов отличается от эффектов, полученных на синоаурикулярном узле мыши, морской свинки и кролика [1]. Заключаем, что функционирование RyR-каналов не является определяющим для поддержания автоматизма на данной стадии эмбрионального развития.

Работа поддержана грантом РФФИ мол\_а № 18-34-00654, комплексной программы УрО РАН №ГР АААА-А18-118012290365-2 (2018-2020), и НИР № ГР АААА-А17-117012310152-2.

1. Vinogradova T.M., Lakatta E.G. Regulation of basal and reserve cardiac pacemaker function by interactions of cAMP-mediated PKA-dependent Ca<sup>2+</sup> cycling with surface membrane channels // J Mol Cell Cardiol. 2009. Vol. 47 (4). P. 456.
2. Golovko V.A. Ryanodine does not show negative chronotropic effect on action potentials generation in pacemaking cells of heart of young frogs *Rana Temporaria* // Zh Evol Biokhim Fiziol. 2006. Vol. 42 (4). P. 335-339.
3. Dutro S.M. et al. Ryanodine receptor expression in embryonic avian cardiac muscle // Dev Biol. 1993. V.155(2). P.431.

## СТРУКТУРНАЯ ЛАБИЛЬНОСТЬ, ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *NITELLOPSIS OBTUSA* ПРИ ПОВЫШЕНИИ ЭКЗОГЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ

### THE STRUCTURAL LABILITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY of plasma membrane of *NITELLOPSIS OBTUSA* CELLS during increase of exogenic calcium concentration

Махмудова Ш.С.<sup>1</sup>, Мусаев Н.А.

<sup>1</sup>Институт Ботаники НАНА, Баку, dashqin.bsu@gmail.com

Бакинский Государственный Университет, Баку, [nagi.musayev@hotmail.com](mailto:nagi.musayev@hotmail.com)

Ионы кальция (Ca<sup>2+</sup>) являются универсальными посредниками многих внутриклеточных процессов, которые осуществляются вслед за попаданием катиона во внутрь клетки. Перенос Ca<sup>2+</sup> через плазматическую мембрану (ПМ) обеспечивается специализированными белковыми макромолекулами (Ca<sup>2+</sup>-помпа и Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> - транспортёры, селективные и неселективные катионные каналы). Однако практически не рассмотрен вопрос о возможном влиянии изменения физического состояния липидной фазы ПМ на функциональную активность этих макромолекул. В поисках ответа на этот вопрос, нами были рассмотрены закономерности изменения мембранного потенциала  $\phi_m$ , сопротивления  $R_m$ , мембранной емкости  $C_m$  ПМ клеток *Nitellopsis obtusa*, при повышении экзогенной концентрации Ca<sup>2+</sup>. Здесь предполагается, что  $\phi_m$  и  $R_m$  являются показателями функциональной активности транспортных белков, а  $C_m$  - показателем физического состояния липидной фазы мембраны, что было показано в многочисленных работах.

Непрерывную запись комплекса электрофизиологических характеристик осуществили с применением специально разработанной методики, на основе микроэлектродной техники, для клеток, имеющих цилиндрическую форму. Типичным представителем таких клеток является *Nitellopsis obtusa*.

В стандартных условиях среды ( $t=20\div 22^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6,8\div 7,2$ ) измеренные электрофизиологические характеристики ПМ опытных клеток составляли:  $\phi_m = -171\pm 0,4$  мВ,  $R_m = 3.8\pm 0,15$  Ом м<sup>2</sup>,  $C_m = 0,93\pm 0,12$  мкФ см<sup>-2</sup>, а наружная концентрация Ca<sup>2+</sup> - 10<sup>-4</sup> М. На основе анализа зависимостей  $\phi_m$  и  $R_m$  от концентрации K<sup>+</sup> в составе наружной среды было установлено, что в диапазоне мембранного потенциала -120 ÷ -170 мВ в проводящем состоянии находятся K<sup>+</sup>- каналы наружного выпрямления (ККНВ), а в диапазоне -170÷-270 мВ – K<sup>+</sup>- каналы внутреннего выпрямления (ККВВ).

ПМ клеток,  $\phi_m$  которых находились в диапазоне активации ККНВ оказались более чувствительными на ступенчатое увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в составе наружной среды. Эти клетки на увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в составе наружной среды реагировали гиперполяризацией ПМ, увеличениями  $R_m$ ,  $C_m$ . Величины изменения параметров  $\phi_m$ ,  $R_m$ ,  $C_m$  зависели от величины концентрации  $Ca^{2+}$  в составе наружной среды. Наибольшие изменения параметров  $\phi_m$ ,  $R_m$ ,  $C_m$  названных клеток выявили при 300-кратном увеличении концентрации  $Ca^{2+}$  в составе наружной среды. При этом величина гиперполяризации ПМ составляла 75-90 мВ, увеличение  $R_m$  – в 3 раза, а увеличение  $C_m$  – 25-30%. Следовательно, гиперполяризация плазматической мембраны происходило в условиях изменения её структурно-поляризационных свойств. Величина гиперполяризации под влиянием наиболее эффективной концентрации  $Ca^{2+}$   $10^{-2}$  М зависела от исходного уровня  $\phi_m$ . Для отмеченной зависимости с применением законов вариационной статистики нами установлена  $\Delta\phi = 74,16 - 0,607 \phi_m$ . Из этой зависимости следует, что при  $\phi_m = -242,34$  мВ  $\Delta\phi = 0$  мВ. Следовательно под влиянием  $10^{-2}$  М  $Ca^{2+}$  полностью инактивируется ККНВ, и начинают действовать ККВВ с диапазоном активации  $-170 \div -270$  мВ. Ощутимую электрофизиологическую реакцию ПМ,  $\phi_m$  которых находились в диапазоне активации ККВВ вызвало 100-кратное повышение концентрации  $Ca^{2+}$  в среде. При этом обнаружена деполяризация ПМ на 40 мВ, увеличение  $R_m$  на 60%,  $C_m$  на 10%. Вероятно в этих регуляторных процессах участвует также липидная фаза ПМ, т.к. изменения  $\phi_m$ ,  $R_m$  в этих опытах сопровождалось изменениями  $C_m$ . А 300-кратное повышение концентрации  $Ca^{2+}$  в среде приводило к двухкратному уменьшению  $R_m$  от отмеченного уровня, деполяризацию плазматической мембраны на 80-90 мВ. Зависимости электрофизиологических параметров исследуемых клеток  $\phi_m$ ,  $R_m$ ,  $C_m$  от логарифма концентрации катиона  $\lg [Ca^{2+}]$  характеризовались кривыми параболического характера с максимумами при  $10^{-2}$  М. Это также свидетельствует о тесной взаимосвязи функциональной активности и структурной лабильности ПМ исследуемых клеток. ПМ опытных клеток испытывает громадную величину градиента электрохимического потенциала. Это могло бы вызывать перенос катиона через ПМ. Повышение его внутриклеточной концентрации привела бы к активации ряда внутриклеточных процессов. Например в ряде авторитетных источников отмечается, что попадание  $Ca^{2+}$  во внутрь клетки через неселективные катионные каналы или  $Ca^{2+}$ - каналы, приводит к усилению генерации активных форм кислорода. Результатом этих процессов может явиться сборка  $K^+$ - и  $Ca^{2+}$ - каналов, приводящая к двухкратному уменьшению  $R_m$  и увеличение  $C_m$ , за счет окисления липидов ПМ. Установленные данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи между структурной лабильностью и функциональной активностью ПМ.

## О МЕХАНИЗМАХ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЙ ПРОГРАММЫ ЭМБРИОГЕНЕЗА НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ

### ON THE MECHANISMS THAT CONTROL THE SPACE-TIME PATTERN OF ANAMNIOTS EMBRYOGENESIS

*Мелехова О.П.*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,  
119234 г. Москва, ул. Ленинские Горы д.1 стр.12, e-mail: [muffs2013@gmail.com](mailto:muffs2013@gmail.com)

Ранее нами на примере амфибий выдвинута и экспериментально обоснована гипотеза «эпигенетической программы» эмбриогенеза, заложенной в цитоплазме зиготы соотношением субстратов, промоторов и ингибиторов свободнорадикального окисления. Согласно этой гипотезе, самоорганизация энергетических процессов в раннем развитии может определять формирование свойства компетенции и затем подготавливает бифуркационное поведение детерминирующихся зачатков. Параметром порядка, определяющим общую динамику этих процессов, может служить уровень свободнорадикальных окислительно-восстановительных реакций. Для выявления свободных радикалов применен метод привитой сополимеризации в сочетании с гистоавтордиографией и радиометрией. При выяснении вопроса о биохимических субстратах, выявленных в наших опытах СР-реакций путем химического фракционирования и радиоиндикации фракций подопытных зародышей мечены индикатором СР-реакций –  $AA^{-14}C$  – обнаружено, что значительная часть СР связана с фракцией кислых липидов, основную массу которых составляют фосфоинозитиды. Мембранные белки, принимающие сигнал, высокофосфорилированы (с участием ГТФ); они активируют усилительный фермент (фосфолипазу С), который расщепляет мембранный липид фосфатидилинозитол-4,5-фосфат на диацилглицерол и инозитолтрифосфат. Последний вызывает мобилизацию (высвобождение из депо) ионов кальция, которые активируют протеинкиназу, и этим актом начинается каскад фосфорилирования белков, ведущий к ответной реакции клетки.

Ингибитором фосфоинозитидной системы является литий. В наших опытах воздействие  $LiCl$  на зародыш лягушки в концентрации 0,15 мг/л, считающейся допустимой, приводило к двукратному снижению уровня СР в течение 90 мин инкубации, а затем – к 100% гибели в течение двух суток при содержании в чистой воде. Таким образом, слабые воздействия ингибитора фосфоинозитидов нарушают внутренние информационные процессы и необратимо дезорганизуют развитие. Известно, что автономная фосфоинозитидная система имеется и в ядре.

Проведен анализ свободнорадикальных процессов в липидах, выделенных из зародышей и личинок травяной и шпорцевой лягушек методом ПС и радиометрии. Липиды из зародышей и личинок лягушки

экстрагировали по методу Фолча. Фракцию липидов анализировали методом тонкослойной хроматографии (пластинки Мерк с накопителем) с использованием «метчика» фосфатидилинозитола. Таким образом, достигали разделения кислых липидов на пластинках в системе растворителей – хлороформ : метанол : аммиак (9 : 7 : 2). Радиоактивность полученных на пластинках фракций измеряли после их растворения методом жидкостной сцинтилляции. Весовые соотношения фракций фосфолипидов определяли методом денситометрического сканирования пластинок на приборе фирмы Джойс-Лейбл «Хромоскан-3» с автоматическим количественным расчетом фракций. Обнаружили, что свободнорадикальные процессы в липидах, выделенных из эмбрионов и личинок травяной и шпорцевой лягушек, развиваются активно во фракциях фосфоинозитидов, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина. Наиболее высокий уровень свободнорадикальных реакций характеризует фосфоинозитиды (до 50% общей радиоактивности выделенных липидов).

Исследовали возрастную динамику липидного обмена. Сравнили уровень СР-реакций в периодах активной пролиферации (бластула), детерминации (нейрула) и терминальной дифференцировки (личинки): обнаружили наиболее высокий уровень СР-реакций на стадии нейрулы.

Сравнение скорости обмена фосфатных групп в фосфоинозитидах, выделенных из зародышей и личинок лягушки, инкубированных в присутствии радиоактивного фосфора, показало, что соотношение фосфатидилинозитол-4,5-фосфата и фосфатидилинозитола также наиболее высоко в фазах эмбриогенеза (детерминация) и вдвое снижается в личиночном периоде (дифференцировка).

Таким образом, активность обмена фосфоинозитидов, как и общая интенсивность СР-реакций, характерна для стадий эмбриогенеза, когда инициируются процессы экспрессии генов (детерминация) и изменения структуры клеточных циклов, предшествующих началу цитодифференциации.

В тоже время к личиночному периоду пластичность мембран повышается, т.к. содержание фосфатидилхолина понижается, а содержание фосфатидилинозитола остается почти постоянным, но интенсивность фосфорного обмена в фосфатидилинозитоле наиболее высока в эмбриональном периоде.

## АНТАГОНИСТЫ СИГМА-1 РЕЦЕПТОРОВ ПОДАВЛЯЮТ ТРАНСПОРТ $\text{Na}^+$ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

### SIGMA-1 RECEPTOR ANTAGONISTS INHIBIT $\text{Na}^+$ TRANSPORT IN FROG SKIN EPITHELIUM

*Мельницкая А.В.<sup>1</sup>, Крутецкая З.И.<sup>1</sup>, Антонов В.Г.<sup>2</sup>, Крутецкая Н.И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы - классические модельные объекты для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикулума на границе с митохондриями. Эти рецепторы широко экспрессированы в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени [1]. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [2]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [3]. Однако роль сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта  $\text{Na}^+$  в эпителиальных тканях практически не изучалась. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать участие сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. В экспериментах использовали антагонисты сигма-1 рецепторов – типичные антипсихотические средства – нейролептик фенотиазинового ряда хлорпромазин (аминазин) и один из наиболее сильных нейролептиков, производное бутирофенона – галоперидол.

Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга («World Precision Instruments, Inc.», Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ). В интервалах между измерениями ВАХ трансэпителиальный потенциал ( $V_T$ ) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи  $V_{OC}$  ( $V_{OC} = V_T$  при трансэпителиальном токе  $I_T = 0$ ). Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания  $I_{SC}$  ( $I_{SC} = I_T$  при  $V_T = 0$ ),  $V_{OC}$  и трансэпителиальную проводимость  $g_T$ . Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Транспорт  $\text{Na}^+$  оценивали как амилорид-чувствительный  $I_{SC}$ .

Показано, что обработка кожи лягушки антагонистами сигма-1 рецепторов снижает транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. В среднем изменение электрических характеристик кожи лягушки (здесь и далее по тексту  $M \pm m$ , n (число опытов) = 10) после добавления 100 мкг/мл галоперидола к апикальной или базолатеральной поверхности кожи, было следующим:  $I_{SC}$  уменьшился на  $70,14 \pm 15,35$  или  $21,32 \pm 8,12$  %,  $V_{OC}$  уменьшился на  $48,34 \pm 9,17$  или  $8,48 \pm 2,87$  %, а  $g_T$  уменьшилась на  $40,24 \pm 7,35$  или  $14,39 \pm 4,08$  % при приложении



галоперидола со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно. В случае обработки кожи лягушки 50 мкг/мл хлорпромазина изменение электрических характеристик в среднем было следующим:  $I_{SC}$  уменьшился на  $10,91 \pm 2,09$  или  $40,48 \pm 6,34$  %,  $V_{OC}$  уменьшился на  $13,24 \pm 2,14$  или  $33,09 \pm 5,48$  %, а  $g_T$  не изменилась или уменьшилась на  $9,69 \pm 3,05$  % при приложении хлорпромазина со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что галоперидол и хлорпромазин по-разному модулируют трансэпителиальный транспорт  $Na^+$ , причем степень ингибирующего действия антагонистов сигма-1 рецепторов на транспорт  $Na^+$  различается в зависимости от приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Так, при приложении галоперидола и хлорпромазина к апикальной поверхности кожи, наибольшим ингибирующим действием на транспорт  $Na^+$  обладает галоперидол. В то же время, в случае добавления нейролептиков со стороны базолатеральной поверхности кожи, большим ингибирующим действием на транспорт  $Na^+$  обладает хлорпромазин. Можно предположить, что подобные различия обусловлены тем, что регуляция галоперидолом и хлорпромазином транспорта  $Na^+$  в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток.

Таким образом, нами показано, что два структурно различных антагониста сигма-1 рецепторов подавляют транспорт  $Na^+$ , что свидетельствует об участии сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта  $Na^+$  в коже лягушки.

1. Hellewell S.B., Bruce A., Feinstein G., et al. Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling // Eur. J. Pharmacol. 1994. Vol. 268. P. 9-18.
2. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., et al. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator // Trends Pharmacol. Sci. 2010. Vol. 31. P. 557–566.
3. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendán C.M., Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands // Curr. Neuropharmacol. 2008. Vol. 6. P. 344–366.

## ЛИГАНД СИГМА-1 РЕЦЕПТОРОВ ХЛОПРОМАЗИН ПОДАВЛЯЕТ ДЕПО-ЗАВИСИМЫЙ ВХОД $Ca^{2+}$ , ВЫЗЫВАЕМЫЙ ТАПСИГАРГИНОМ В МАКРОФАГАХ

### SIGMA-1 RECEPTOR LIGAND CHLORPROMAZINE INHIBITS STORE-DEPENDENT $Ca^{2+}$ -ENTRY INDUCED BY THAPSIGARGIN IN MACROPHAGES

*Миленина Л.С.<sup>1</sup>, Крутецкая З.И.<sup>1</sup>, Антонов В.Г.<sup>2</sup>, Крутецкая Н.И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Универсальным механизмом регулируемого входа  $Ca^{2+}$  в клетки эукариот является депо-зависимый, или “емкостной”, вход  $Ca^{2+}$ , активируемый при опустошении внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -депо [1]. Важными участниками процессов  $Ca^{2+}$ -сигнализации в клетках являются сигма-1 рецепторы – лигандрегулируемые шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, модулирующие широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии. Сигма-1 рецепторы связывают различные по структуре фармакологические агенты, такие как нейролептики, антидепрессанты, противосудорожные и противокашлевые средства [2, 3]. Обнаружено, что взаимодействуя с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата, рецепторы сигма-1 модулируют процессы  $Ca^{2+}$  сигнализации в клетках: мобилизацию  $Ca^{2+}$  из депо и вход  $Ca^{2+}$  из наружной среды [2, 3].

В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможное участие рецепторов сигма-1 в регуляции депо-зависимого входа  $Ca^{2+}$ , индуцируемого ингибитором эндоплазматических  $Ca^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином, в перитонеальных макрофагах крысы. В экспериментах использовали антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик фенотиазинового ряда хлорпромазин (аминазин), широко используемый для лечения шизофрении [4].

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс популяции Wistar при комнатной температуре 20-22°C через 1-2 сутки после начала культивирования клеток. Для измерения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ ,  $[Ca^{2+}]_i$ , использовали флуоресцентный  $Ca^{2+}$ -зонд Fura-2AM. Опыты проводили на автоматизированной установке для измерения  $[Ca^{2+}]_i$  на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B («Leica Microsystems», Германия). Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

В контрольных экспериментах было показано, что добавление 0,5 мкМ тапсигаргина к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -депо. При последующем введении в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$  наблюдался депо-зависимый вход  $Ca^{2+}$  в цитозоль.

Впервые обнаружено, что предварительная инкубация макрофагов с 25 мкг/мл хлорпромазина в номинально бескальциевой среде в течение 10 мин до введения 0,5 мкМ тапсигаргина вызывает значительное

подавление обеих фаз  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа, индуцированного тапсигаргином. Так, подавление фазы мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо составило  $59,3 \pm 8,2$  % (по данным 7 независимых экспериментов), а депо-зависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  -  $68,2 \pm 10,4$ % (по данным 7 независимых экспериментов).

Таким образом, мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что антагонист рецепторов сигма-1 хлорпромазин подавляет обе фазы  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, индуцируемых тапсигаргином в макрофагах. Результаты согласуются с данными исследований других авторов, которые обнаружили, что антагонист рецепторов сигма-1 хлорпромазин подавляет мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из депо и последующий депо-зависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , вызываемые АТФ или тапсигаргином, в клетках лейкемии человека (линия HL-60) [5] и ингибирует депо-зависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемый тапсигаргином в клетках феохромоцитомы (линия PC12) [6].

Полученные нами данные свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депо-зависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы и позволяют рассматривать рецепторы сигма-1 в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депо-зависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах.

1. Putney J.W. Store-Operated calcium entry: an historical overview // Adv. Exp. Med. Biol. 2017. Vol. 981. P. 205.
2. Rousseaux C.G., Geene S.F. Sigma receptors [ $\sigma$ Rs]: biology in normal and diseased states // J. Recept. Signal. Transduct. Res. 2016. Vol. 36. P. 327-388.
3. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R. Cendán C.M., Del Pozo E. Pharmacology and Therapeutic Potential of Sigma 1 Receptor Ligands// Curr. Neuropharmacol. 2008. Vol. 6. P. 344-366.
4. Itzhak Y., Ruhland M., Krahlting H. // Neuropharmacology. 1990. Vol. 29. P. 181-184.
5. Harper J.L., Daly J.W. // Drug Dev. Res. 1999. Vol. 47. P. 107-117.
6. Choi S.-Y., Kim Y.-H., Lee Y.-K., Kim K. -T. Chlorpromazine inhibits store-operated calcium entry and subsequent noradrenaline secretion in PC12 cells // Brit. J. Pharmacol. 2001. Vol. 132. P. 411-418.

## ВКЛАД ФОСФОЛИПИДОВ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ В ФОРМИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА

## THE CONTRIBUTION OF NUCLEAR MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS IN FORMATION OF ELECTROKINETIC POTENTIAL

*Минасбекян Л.А.*

Ереванский государственный университет, Факультет биологии, кафедра биофизики, НИИ «Биология», ул.А.Манукяна, 1, Армения, 0025, Ереван, E-mail: minlia@ysu.am

Исследовано воздействие мм-волн на электрокинетический потенциал (ЭКП или  $\xi$ -потенциал) интактных ядер проростков пшеницы. Цельные клеточные ядра проростков отграничены от цитоплазмы пористой двуслойной ядерной мембраной, состоящей из нейтральных и анионных фосфолипидов, белков и гликопротеидов, на внешней поверхности которой формируется электрокинетический потенциал. ЭКП оказывает существенное влияние на различные свойства системы доставки нано-препаратов в ядро. Отрицательный заряд анионных фосфолипидов в содержании ядерной мембраны, распределенный по поверхности ядра, играет важную роль в регуляции проницаемости ядерной мембраны, в процессах взаимодействия ядер с факторами внешней среды, в том числе с ионизирующим и неионизирующим излучениями. Нами было предположено, что разность в содержании анионных фосфолипидов в составе ядерной мембраны и содержимом ядра, предопределяет возникновение разности потенциалов на поверхности клеточных ядер, и таким образом, формируя определенную для данных условий величину ЭКП.

В исследовании показано увеличению величины электрокинетического потенциала интактных ядер проростков, обработанных в течение роста мм-волнами, и показана связь между величиной ЭКП, поверхностным зарядом и содержанием анионных фосфолипидов в ядерной мембране и матриксе ядра, и возникновением за счет этого разности потенциалов. Обсуждается взаимосвязь между изменениями в величине ЭКП и содержанием фосфолипидов в бислое ядерной мембраны под воздействием мм-волн [1]. Таким образом, получено возрастание ЭКП интактных ядер проростков пшеницы, обработанных мм-волнами, по сравнению с контрольными проростками и проростками семян, обработанных  $\gamma$ -облучением.

Ранее нами была предложена математическая модель ядерно-цитоплазматического транспорта. Согласно предложенной нами модели о механизме проницаемости ядерной мембраны [2], уменьшение поверхностного заряда ядерной мембраны вследствие понижения содержания анионных фосфолипидов приводит к сокращению разности потенциалов  $\Delta\phi$  между поверхностью ядра и его внутренними слоями, что, в свою очередь, может привести к уменьшению транспортной активности мембраны.

Сравнительное исследование ЭКП ядер проростков, обработанных в течение роста, в условия *in vivo*, и величиной ЭКП ядер, выделенных из контрольных проростков и обработанных в гомогенате (*in vitro* условия) выявило резкие различия между величинами ЭКП ядер.



На основании полученных экспериментальных данных будут обсуждены возможные механизмы воздействия мм-волн и  $\gamma$ -облучения на ядра и ядерную мембрану клеток проростков пшеницы и формирования в результате таких изменений ЭКП проростков пшеницы.

1. Минасбекян Л.А. Изменения содержания фосфолипидов ядерных субфракций проростков пшеницы под действием ЭМ волн мм-диапазона. // Биолог. журн. Армении, 2018, 3 (70), С.52-60.
2. Minasbekyan L.A., Badalyan H., Vardevanyan P.H. Correlation between aqueous pore permeability and surface charge of wheat seedlings nuclei. In: "Brilliant Light in Life and material Sciences"/ ED. Tsakanov V. & Wiedemann H. Dordrecht: Springer, 205-211. 2007.

## АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА В ПРОРОСТКАХ ГОРОХА ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗДРАЖИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

## ANALYSIS OF THE MECHANISMS OF PROPAGATION VARIATION POTENTIAL IN PEA SEEDLINGS UNDER THE ACTION OF THE STIMULUS OF VARIOUS NATURE

*Мудрилов М. А., Ладейнова М. М., Сухов В. С., Воденев В. А.*

Университет Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23 *mtengri@yandex.ru*

В высших растениях в ответ на разнообразные внешние стимулы активируется ряд сигнальных систем, среди которых особую роль играют электрические сигналы. На данный момент выделяют три типа электрических сигналов в растениях: потенциал действия (ПД), переменный потенциал (ВП) и системный потенциал (СП) [1]. Особый интерес представляет собой ВП, отличающийся тем, что он генерируется при действии повреждающих раздражителей [2][3][4], его параметры проявляют зависимость от природы и силы воздействия [3][5][6], что позволяет предположить участие ВП в передаче информации о раздражителях в растениях. Однако механизмы подобной изменчивости не до конца ясны. Целью работы является выявление механизмов генерации и распространения ВП, индуцированного различными раздражителями.

Объектом исследования выступали 2–3-х недельные проростки гороха (*Pisum sativum* L.). Раздражение наносилось путем локального ожога и постепенного нагрева участка листа, на втором взрослом листе от верхушки растения. Для оценки параметров переменного потенциала применялся метод внеклеточной регистрации электрической активности. Для определения механизмов генерации и распространения переменного потенциала применялся ингибиторный анализ. Хлорид гадолиния ( $GdCl_3$ ) выступал блокатором механочувствительных каналов, ортованадат натрия ( $Na_3VO_4$ ) - специфичным блокатором  $H^+$ -АТФазы, а каталаза удаляла внеклеточный пероксид водорода ( $H_2O_2$ ). Использовались растворы ингибиторов следующих концентраций: 10 мкМоль/л  $GdCl_3$ , 1 мМоль/л  $Na_3VO_4$  и 4 мкМоль/л каталазы.

Локальное воздействие вышеуказанных методов вызывало генерацию ВП и его распространение по стеблю растения. В ходе первой серии экспериментов оценивалось локальное действие ингибиторов. Было показано, что блокатор  $H^+$ -АТФазы подавлял ВП в равной степени, как в случае ожога, так и нагрева. В то же время, ингибирование механочувствительных каналов продемонстрировало снижение амплитуды лишь в случае ожога. Удаление пероксида водорода показало так же, как и для  $Na_3VO_4$ , подавление ВП в обоих случаях. При дальнейшем исследовании, во второй серии экспериментов, направленных на изучение распространения электрического сигнала, эффект подавления для каталазы проявился также в обоих случаях. Полученные результаты позволяют указать на различия в механизмах генерации и распространения ВП в случае ожога и нагрева. Так, по всей видимости, в случае ожога большую роль играют механочувствительные каналы. Возможной причиной таких отличий может являться различное соотношение гидравлической и химической компонент ВП.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки, проект № 6.3199.2017/ПЧ.

1. Huber A.E., Bauerle T.L. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge // J Exp Bot. 2016. Vol. 67(7). P. 2063-2079.
2. Koziol C., Gram T., Schreiber U. Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals // New Phytologist. 2004. Vol. 161(3). P. 715–722.
3. Roblin G. Analysis of the Variation Potential Induced by Wounding in Plants // Plant Cell Physiol. 1985. Vol. 26(3). P. 455–461.
4. Vian A., Davies E. Two Different Wound Signals Evoke Very Rapid, Systemic CMBP Transcript Accumulation in Tomato. // Plant Signal Behav. 2006. Vol. 1(5). P. 261–264.
5. Stankovic B., Zawadzki T., Davies E. Characterization of the Variation Potential in Sunflower // Plant Physiol. 1997. Vol. 115. P. 1083–1088.
6. Vodenev. V, Mudrilov M., Akinchits E., Balalaeva I., Sukhov V. Parameters of electrical signals and photosynthetic responses induced by them in pea seedlings depend on the nature of stimulus // Functional Plant Biology. 2018. Vol. 45(1-2). P. 160-170.

**СВЯЗЫВАНИЕ С ГЕПАРИНОВЫМ МАТРИКСОМ КАК ОСНОВНОЙ ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВ В МЕЖКЛЕТОЧНОМ ПРОСТРАНСТВЕ**

**BINDING TO HEPARIN MATRIX AS A MAJOR FACTOR AFFECTING PROTEIN MOBILITY IN THE INTERCELLULAR SPACES**

***Нестеренко А.М.<sup>1,2</sup>, Орлов Е.Е.<sup>1</sup>, Бородулин А.В.<sup>1</sup>, Паршина Е.А.<sup>1</sup>, Иванов И.И.<sup>1</sup>, Белозуров А.А.<sup>1</sup>, Голышев С.А.<sup>2</sup>, Зарайский А.Г.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва

<sup>2</sup>ИБХ им. ак. М.Ю. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

\*email: [comcon1@protonmail.com](mailto:comcon1@protonmail.com)

Эукариотический межклеточный матрикс представлен различными свободными полисахаридами, гликолипидами и гликопротеинами. Среди последних наиболее распространенными представителями являются гепаран-сульфат протеогликаны (HSPG) — белки, несущие на себе множество нитей гепариновых полисахаридов (ГП). ГП представляют собою нерегулярные полимеры, структура которых характеризуется большим составом сульфо- и карбокси-групп, придающих полимеру огромный отрицательный заряд. Очевидно, такие свойства способствуют связыванию с белками, наполняющими межклеточное пространство. Первые четкие указания на активное участие ГП в перцепции сигнальных белковых молекул появились в отношении фактора роста фибробластов, а через некоторое время был охарактеризован пептидный консенсус, обеспечивающий связывание белков с ГП [1]. На сегодняшний день известно множество факторов, чье связывание с ГП не вызывает сомнений — в их числе такие ключевые для эмбрио- и органогенеза факторы, как BMP/Dpp, Wnt/Wg, HB-EGF и Noggin (секретируемый ингибитор фактора BMP).

Ранее мы показали, что для двух гомологов Noggin шпорцевой лягушки — Noggin1 и Noggin4 — характерно существенное различие в диффузии, по-видимому, объясняемое наличием у первого и отсутствием у второго гепарин-связывающего мотива [2]. Для более детального анализа того, как связывание с ГП влияет на диффузию, мы создали несколько пробных конструкций, состоящих из флюоресцентного белка EGFP и гепарин-связывающих мотивов KKHRLSKKLRK («EGFP-hep») и KKHRLSKKHLRS («EGFP-hephep»). Способность данного отдельно взятого мотива связываться с гепарином была нами количественно охарактеризована ранее [3]. Конструкции EGFP-hep и EGFP-hephep и их связывание с ГП исследовались методами *in vitro*, а также *in vivo* в эмбрионах *X. laevis* на стадии средней и поздней гастрюлы.

Исследование *in vitro* включало в себя наработку конструкции EGFP-hep в *E. coli* и измерение кинетики десорбции с гепарин-агарозы как белка, так и отдельно-взятого мотива. Для этого использовалась специально спроектированная для этих целей перфузионная система. Дополнительно мы измеряли десорбцию гепарина и гепаран-сульфата с подложки, содержащей пептиды KKHRLSKKLRK методом плазмонного резонанса. Характерное время десорбции пептида с гепарин-агарозы, а также ГП с пептидной подложки оказалось сопоставимым и составляло всего 10 сек. В то же время, десорбция конструкции EGFP-hep оказалось существенно дольше — около 300 сек.

Исследование *in vivo* включало в себя наработку мРНК конструкции EGFP-hep с лидерным пептидом Noggin2 (обеспечивающим секрецию), инъекция мРНК в эмбрионы *X. laevis* и последующие микроскопические исследования. Конструкции EGFP-hep и EGFP-hephep хорошо задерживаются в межклеточных пространствах на всей глубине эмбриональных тканей: это хорошо видно на срезах фиксированных на стадии гастрюлы зародышей. При этом EGFP, не содержащий гепаринового сайта, не задерживается в межклеточном пространстве в концентрации, достаточной для измерения его диффузии. Диффузия конструкций с гепариновым сайтом измерялась методом восстановления флюоресценции после фотоотбеливания (FRAP). Полученные кривые FRAP хорошо описываются теоретически при помощи уравнений типа реакция-диффузия с использованием параметров связывания с ГП, полученных *in vitro* на предыдущем этапе.

Работа поддержана фондом РФФИ (18-34-00574 мол\_а, 18-34-00772 мол\_а) и фондом РФФ (№19-14-00098). Микроскопические исследования выполнялись в ЦКП ИБХ РАН и ЦКП НИИФХБ МГУ.

1. Fromm J.R., et al. Pattern and spacing of basic amino acids in heparin binding sites. // Arch. Biochem. Biophys. 1997. Vol. 343. pp. 92–100.
2. Eroshkin F.M., Nesterenko A.M., et al., Noggin4 is a long-range inhibitor of Wnt8 signalling that regulates head development in *Xenopus laevis*. // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. p. 23049.
3. Nesterenko A.M., et al., Affinity of the heparin binding motif of Noggin1 to heparan sulfate and its visualization in the embryonic tissues // BBRC. 2015. Vol. 468. p. 331.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И КОНФОРМАЦИИ ЛИПИДОВ В МЕМБРАНАХ КЛЕТОК, МИТОХОНДРИЙ И ЛИПОСОМ МЕТОДОМ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ**  
**INVESTIGATION OF LIPID COMPOSITION AND CONFORMATION IN CELL, MITOCHONDRIA AND LIPOSOME MEMBRANES WITH SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY**

***Никельшпарг Э.И.<sup>1</sup>, Гривенникова В.Г.<sup>1</sup>, Байжуманов А.А.<sup>1</sup>, Семёнова А.А.<sup>2</sup>, Гудилин Е.А.<sup>2,3</sup>, Максимов Г.В.<sup>1</sup> и Браже Н.А.<sup>1</sup>***

1. МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва
2. МГУ имени М.В.Ломоносова, факультет наук о материалах, Москва
3. МГУ имени М.В.Ломоносова, химический факультет, Москва, [evelinanikel@gmail.com](mailto:evelinanikel@gmail.com)

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) является мощным инструментом для изучения конформационных изменений различных биологических молекул в условиях *in vitro* и *in vivo*. Одной из модификаций метода КР является спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), заключающаяся в многократном увеличении интенсивности сигнала КР с помощью наноструктур благородных металлов, в частности серебра. Мы продемонстрировали, как спектроскопия ГКР с применением серебряных наноструктур может быть использована для изучения конформации липидов в искусственных и интактных биологических мембранах.

Мы использовали следующие препараты: (1) митохондрии сердца крысы, (2) тени эритроцитов, (3) липосомы, полученные из фосфатидилхолина (ФХ) и кардиолипина (КЛ) и (4) протеолипосомы из ФХ и КЛ (1:4) с цитохромом *c* (цитС) внутри. Для усиления сигнала КР были использованы плазмонные наноструктурированные серебряные поверхности (AgNSS), разработанные нами ранее [1-2].

Спектры ГКР митохондрий и теней эритроцитов в низкочастотном диапазоне (600-1800  $\text{cm}^{-1}$ ) при лазерном возбуждении 514 нм соответствуют спектрам ГКР гемов *c* в цитС и гемов *b* в примембранном Гб, соответственно. Липиды не вносят вклад в этот спектральный диапазон, что может быть объяснено перекрытием их низкоинтенсивного сигнала ГКР более интенсивным ГКР гемсодержащих белков. Однако мы продемонстрировали, что используемые наноструктурированные поверхности также обеспечивают усиление КР липидов в митохондриях и мембранах эритроцитов в высокочастотном диапазоне (2700-3100  $\text{cm}^{-1}$ ).

Для идентификации положений пиков на спектре мы регистрировали спектры от липосом, состоящих из чистых ФХ и КЛ. Спектр ГКР липосом из чистого ФХ содержит 3 основных пика: 2872, 2925  $\text{cm}^{-1}$  и самый интенсивный пик 2960  $\text{cm}^{-1}$ . Спектр ГКР КЛ также имеет широкий пик при 2925  $\text{cm}^{-1}$  с небольшим плечом с положением 3010  $\text{cm}^{-1}$ , относящимся к колебаниям ненасыщенных связей  $\text{C}=\text{C}$ , и менее интенсивный пик с положением 2860  $\text{cm}^{-1}$ . Пик 2960  $\text{cm}^{-1}$  при этом отсутствует. Пики при 2925 и 2960  $\text{cm}^{-1}$  соответствуют симметричным и асимметричным колебаниям боковых радикалов  $-\text{CH}_3$  в мембранных липидах и белках, а пик при 2872  $\text{cm}^{-1}$  относится к растяжению связей  $\text{CH}_2$ .

В случае всех трех типов мембран (теней эритроцитов, митохондрий и протеолипосом с цитС) основной вклад в спектр ГКР вносит ФХ, так как он является наиболее распространенным липидом данных биологических мембран и обладает наиболее интенсивным спектром КР. Тем не менее, на спектрах митохондрий и теней эритроцитов присутствовали и другие пики, а также интенсивности основных пиков отличались от липосом. Предположительно, это может быть связано с более сложным липидным составом мембран митохондрий и эритроцитов, чем липосом, что приводит к разнице в относительных интенсивностях их пиков ГКР. Следует также отметить, что в высокочастотном спектральном диапазоне пики от гемовых белков отсутствуют. Таким образом, данный экспериментальный подход можно применять для изучения конформации липидов в биологических мембранах.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 18-34-00503 мол\_а).

1. Brazhe N.A. et al. Probing cytochrome *c* in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy // Scientific reports. 2015. Vol. 5. P. 13793.
2. Sarycheva A.S. et al. New nanocomposites for SERS studies of living cells and mitochondria // Journal of Material Chemistry B. 2016. Vol. 4. PP. 539-546.

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ЛИПОДИСКОВ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ АМФИФИЛЬНЫМИ СОПОЛИМЕРАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ЗВЕНЬЯ МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И СТИРОЛА

### FORMATION OF LIPODISCS STABILIZED BY AMPHIPHILIC COPOLYMERS OF MALEIC ACID AND STYRENE: MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS

*Орехов Ф.С., Боздаганян М.Е., Шайтан К.В.*

Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, orekhov@mail.bio.msu.ru

Амфифильные сополимеры, состоящие из чередующихся звеньев малеиновой кислоты и стирола (SMA), привели в последние годы к важному методологическому прорыву в исследованиях мембранных белков. Соплимеры SMA способны напрямую солубилизовать мембранные белки из искусственных и природных мембран, формируя дискообразные частицы (SMALP). Эти наноразмерные частицы состоят из липидного или белок-липидного центрального участка, окруженного полимерным поясом, и имеют диаметр, в зависимости от экспериментального протокола, от 10 до 30 нм. В рамках конкретного протокола, образующиеся наночастицы SMALP обладают одинаковым размером, что делает их удобным инструментом для различных экспериментальных приложений, включая крио-электронную микроскопию и ЭПР-спектроскопию.

Хотя многочисленные экспериментальные работы указывают на большой потенциал применения SMALP для различных исследований биологических мембран и мембранных белков, механизм их образования и детальная картина их организации на атомном уровне не до конца ясны. В частности остаются неустановленными причины узкого распределения размеров SMALP, степень нативности липидов в них, а также влияние различных факторов (например, конкретный состав полимера SMA) на эффективности солубилизации.

Нами была разработана крупно-зернистая молекулярная модель полимеров SMA в рамках силового поля MARTINI. Полученная модель позволила изучить поведение сополимеров SMA с различным составом/зарядом/концентрацией в водном растворе, а также их взаимодействие с липидными мембранами. Во-первых, мы обнаружили, что SMA-сополимеры имеют тенденцию агрегировать в растворе в кластеры определенного размера, что, вероятно, является причиной гомогенности SMALP по размеру. Во-вторых, молекулярно-динамическое моделирование показало, что периодические сополимеры SMA с соотношениями стирол/малеиновая кислота 2:1 ( $[SSM]_n$ ) и 3:1 ( $[SSSM]_n$ ) по-разному взаимодействуют с липидными бислоями. В то время как кластеры 2:1 SMA-сополимеров индуцировали формирование трансмембранных пор, кластеры 3:1 SMA-сополимеров экстрагировали фрагменты бислоя из мембраны, формируя SMALP-подобные структуры. Аналогичный процесс наблюдался и при моделировании 3:1 SMA сополимеров с различной длиной и статистическим распределением звеньев стирола и малеиновой кислоты. Анализ траекторий молекулярной динамики и сравнение с экспериментальными данными позволили нам сделать вывод, что для образования SMALP необходимы молекулы сополимера, включающие блоки из более чем двух последовательных мономеров стирола [4].

Работа поддержана грантом РФФИ №18-504-12045.

1. Dörr, Jonas M., et al. The styrene–maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *European Biophysics Journal* 45.1 (2016).
2. Parmar, Mayuriben, et al. Using a SMALP platform to determine a sub-nm single particle cryo-EM membrane protein structure. *BBA-Biomembranes* 1860.2 (2018).
3. Voskoboynikova, N., et al. Characterization of an archaeal photoreceptor/transducer complex from *Natronomonas pharaonis* assembled within styrene–maleic acid lipid particles. *RSC Advances* 7.81 (2017).
4. Orekhov, Philipp S., et al. Styrene/Maleic Acid Copolymers Form SMALPs by Pulling Lipid Patches out of the Lipid Bilayer. *Langmuir* 35.10 (2019).

## РОЛЬ ЛИПИДНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЦИКЛИЧЕСКИХ ЛИПОПЕПТИДОВ

### THE ROLE OF LIPID MICROENVIRONMENT IN THE REGULATION OF PORE-FORMING ACTIVITY OF CYCLIC LIPOPEPTIDES

*Остроумова О.С., Ефимова С.С., Захарова А.А., Щагина Л.В., Малев В.В.*

ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, ostroumova@incras.ru

В последние десятилетия разработка инновационных антимикробных препаратов приобретает особую значимость в связи с проблемой растущей антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов. Одним из перспективных направлений поиска новых лекарственных препаратов является исследование циклических липопептидов, соединений с разнообразными биологическими функциями, включающими защиту одних

микроорганизмов от других. Химическая структура, состоящая из циклической пептидной головы и жирнокислотного хвоста и обеспечивающая амфифильность молекул липопептидов, предполагает их взаимодействие с клеточными мембранами. В ряде случаев взаимодействие приводит к росту проницаемости мембран клеток-мишеней. Этот факт считается доказанным для наиболее известного из липопептидных антибиотиков, применяемого в настоящее время для лечения инфекций, вызванных MRSA, даптомицина, а также некоторых антимикробных липопептидов бактериального происхождения, хотя тонкие механизмы увеличения проницаемости мембран остаются предметом дискуссий и требуют дальнейшего изучения. Как правило, в виду уникальности способа бактерицидного или фунгицидного действия, направленного на изменение проницаемости клеточной стенки, подобные препараты характеризуются значительно более медленным развитием резистентности к ним у микроорганизмов-мишеней по сравнению с другими классами антибиотиков, действие которых нацелено на потенциально элиминируемые специфические мишени.

Работа посвящена изучению порообразующей способности противогрибковых циклических липопептидов из *Pseudomonas syringae* и *Bacillus subtilis*, синрингомицина E и фенгицина, соответственно. Особое значение уделено регуляторным путям, опосредованным липидами мембраны, которые могут определять не только терапевтическую активность тестируемых агентов, но и их токсичность, а также возможные пути развития резистентности у патогенных микроорганизмов. Для решения поставленных задач применен электрофизиологический метод регистрации токов, протекающих через плоские липидные бислои при постоянном трансмембранном напряжении. В качестве факторов, инициирующих изменения физико-химических характеристик модельных липидных мембран, использованы низкомолекулярные амфифильные соединения – модификаторы: флавоноиды, алкалоиды, биологические красители, тиреоидные гормоны и местные анестетики. Обнаружено три варианта модулирования порообразующей активности синрингомицина E: посредством изменения распределения электрического потенциала в бислое (флавоноиды, стрилпиридиновые и ксантеновые красители, а также местные анестетики группы аминоэфиров), при модификации эластических свойств мембраны (гормоны щитовидной железы, некоторые алкалоиды), а также за счет потенциал-зависимого блокирования одиночных пор (местные анестетики амидного типа).

В ходе работы впервые показано, что при введении с одной стороны липидного бислоя, имитирующего состав мембран клеток-мишеней, фенгицин способен индуцировать ион-проницаемые поры, которые характеризуются преимущественно катионной селективностью, асимметричной вольт-амперной кривой и слабо выраженной потенциал-чувствительностью открывания-закрывания. Индуцированная липопептидом проводимость мембраны увеличивается пропорционально квадрату концентрации фенгицина в водном растворе, что позволяет предположить участие димеров в формировании проводящих субъединиц. Установлено, что способность к образованию пор фенгицином не зависит от молекулярной формы мембранообразующих липидов, но определяется наличием отрицательно заряженных липидов в бислое. Наблюдаемое увеличение фенгицин-индуцированной проводимости в присутствии некоторых модификаторов мембран, вероятно, связано с изменениями в плотности упаковки липидов в мембране.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 19-14-00110).

## МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

## MEMBRANE POTENTIAL OF WHEAT ROOTS AS AN INDICATOR OF PLANT RESISTANCE IN THE STRESS CONDITIONS

*Пахомова В.М.<sup>1</sup>, Даминова А.И.<sup>1</sup>, Великанов Г.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Казанский государственный аграрный университет, Казань, e-mail: pahomovav@mail.ru

<sup>2</sup>ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казанский институт биохимии и биофизики

Исследовалась резистентность растений яровой пшеницы определенных экологических групп в условиях автофагии. Функционирование проростков сорта Люба при отсутствии фотосинтеза и минерального питания (в условиях автофагии), регистрируемое микроэлектродным методом и по окрашиванию тканей корней тетразолом, совпадало (3 недели), что дало основание в дальнейшем использовать с этой целью для всех сортов и для всех вариантов более простой и доступный метод окрашивания тканей. Интересно, что время жизни проростков в условиях освещенности и темноты практически не отличалось. Одной из причин этого явления могло быть отсутствие в среде выращивания жизненно важных минеральных элементов, необходимых для нормального протекания различных физиологических процессов, в том числе фотосинтетических.

Мембранный потенциал клеток корней контрольного варианта (при сохранении фотосинтетической деятельности) сохранялся приблизительно на одном уровне до 18 суток выращивания. Затем наблюдалась деполяризация мембран к 20 суткам, и через 22 суток регистрировалось летальное состояние корней. В опытном варианте деполяризация мембран имела место уже через 10 суток выращивания. Следует

подчеркнуть, что мембранный потенциал считается одним из интегральных и наиболее чувствительных показателей функционального состояния клеток.

Наиболее высокой резистентностью в условиях эндогенного питания (автофагии) отличался сорт «Саратовская-68» (около 2,5 недель жизни); сорта других экологических групп («Люба» и «Омская-33») характеризовались меньшей резистентностью (1,5 недели).

Аналогичная закономерность регистрировалась в экспериментах с отсеченными корнями, инкубируемыми в отсутствие элементов минерального питания (в условиях автофагии). Мембранный потенциал отсеченных корней сорта Люба оставался на стационарном уровне 7 суток (на уровне Em интактных корней). После 7 суток инкубации происходила деполяризация мембран, а к 10 суткам (судя по мембранному потенциалу) регистрировалось летальное состояние клеток. Экспериментальные исследования показали, что продолжительность жизни отсеченных корней проростков сорта Люба, регистрируемая по окрашиванию тканей тетразолом и микроэлектродным методом, также совпала. В связи с этим время жизни отсеченных корней других сортов в условиях субстратного голодания определяли, как и в случае с интактными корнями, по окрашиванию тканей красителем.

Функционирование клеток отсеченных корней ростков пшеницы продолжалось 2 недели (14 суток) у сорта «Саратовская-68» и менее 1,5 недель (9-10 суток) у других изучаемых нами сортов.

Таким образом, в условиях автофагии наиболее высокая резистентность характерна для пшеницы степной экологической группы по сравнению с лесостепной и западносибирской группами.

---

## **ДЕЙСТВИЕ НИСТАТИНА И АМФОТЕРИЦИНА В НА ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

### **THE ACTION OF NYSTATIN AND AMPHOTERICIN B ON THE LIPID MEMBRANES AND ITS PRACTICAL USE**

*Pashazade T.C.*

Institute of Botany of Azerbaijan National Academy of Sciences turkan303@mail.ru

The polyene antibiotics (PA) nystatin and amphotericin B are known to increase the ion and nonelectrolyte permeability of sterol-containing biological and artificial membranes. Amphotericin B and nystatin are principally known as major antifungal drugs as well as one of the first model systems for trans-membrane ionic channel structures [1]. The effects of polyene antibiotics on thin lipid membranes are consistent with their action on biological membranes. The biological effect of PA is the formation in the membranes of structural ion channels which permeable for ions and organic substrates. The PA have high affinity to biological membranes, which there are sterols of definite structure. Nystatin and amphotericin B create aqueous pores in thin lipid membranes; the effective radius of these pores is approximately 4 Å. There is a marked correlation between the permeability of a nystatin- or amphotericin B-treated membrane to water and small hydrophilic solutes and the permeability of the human red cell membrane to these same particles. Amphotericin B or nystatin may interact with membrane-bound sterols to produce multi molecular complexes which greatly enhance the permeability of such membranes for anions, and, to a lesser degree, cations. Although both nystatin and amphotericin B greatly increased the conductance of cholesterol-containing membranes, they also expanded cation conductance to a considerable degree. Additionally, the effect of amphotericin B on the electrical properties of the membranes occurred over a moderately narrow concentration range. In this scale, there was no detectable effect on membrane stability. Possibly the many hydroxyl groups in nystatin and amphotericin B are capable for anion selectivity. Nystatin and amphotericin B induce a cation-selective conductance when added to one side of a lipid bilayer membrane and an anion-selective conductance when added to both sides. The concentrations of antibiotic required for the one-sided action are comparable to those employed on plasma membranes and are considerably larger than those required for the two-sided action. The one-sided action of the polyene antibiotic amphotericin B on phospholipid bilayer membranes formed from phosphatidylcholines and sterols have been investigated. The properties of ion channels formed in membranes by PA with various chemical structure of hydrophilic and hydrophobic chain of molecules are investigated. Small differences in a hydrophilic chain with the changed number of hydroxyl and carbonyl groups significantly influence on the size of conductivity and selectivity of the channel. The more number of double bounds in a hydrophobic part of polyene molecules leads to the higher biological activity of antibiotics. Measurement anion - cationic selectivity of the channels formed by polyenes showed that anionic selectivity, as well as conduction of channels, decreases among antibiotics: amphotericin B – nystatin. Research of physical and chemical properties of the single ion channels on the bilayer lipid membranes in the presence of PA makes possible to create theoretically reasonable recommendation to purposeful synthesis of new antibiotics with the known properties of molecule. However, despite the presence of large amounts of PA and their derivatives, none of them on the effectiveness of its action can't be compared with amphotericin B and levorin in the treatment of systemic fungal infection. In recent years, the efforts of scientists aimed at getting new dosage forms PA and development of new ways their delivery to the affected organs and tissue. Interest in the antifungal drugs has increased even more due to the high prevalence of HIV

infection, [De Marie et al., 1994]. There is evidence with about 90% of HIV patients infected amazed fungal infection, due to a sharp weakening of the immune system [Mamidi et al., 2002]. Furthermore transplantation of different organs and bone marrow of patient are assigned immunosuppressive drugs. However, they are creating conditions for the emergence of HIV patients and fungal infections [Sepkowitz, 2002]. Growing interest noof scientists to study the mechanism of action has stimulated PA on our side parties need even more in-depth study of PA mechanism of action at the molecular level. This was large contributed PA deciphering the chemical structures and the development of ways to modify the polyene molecule. The use of antibiotics with known molecular structure makes it possible to study at the molecular level. The basic idea of this work is that by examining the physico-chemical properties of PA conjunction with DMSO to determine the degree of enhancement of the biological activity of the PA.

1. Samedova A.A., Tagi-zade T.P., Kasumov Kh.M. Dependence of ion channel properties formed by polyene antibiotics molecules on the lactone ring structure. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2018, v. 44, No. 3, p. 337.

## ЭФФЕКТЫ H<sub>2</sub>S И СО НА ИОН-ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ EFFECTS OF H<sub>2</sub>S AND CO ON ION-TRANSPORTING SYSTEMS OF ERYTHROCYTE MEMBRANES

*Петрова И.В., Бирулина Ю.Г., Казакова Н.А., Рыдченко В.С., Ковалев И.В.*

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г.Томск,  
ivpetrova57@yandex.ru

В настоящее время установлено, что NO, CO, H<sub>2</sub>S, ранее рассматриваемые лишь как токсические вещества, образуются в клетках организма с помощью специальных ферментов и осуществляют как межклеточную, так и внутриклеточную регуляцию различных физиологических функций [1]. Одной из мишеней для реализации эффектов газовых трансммиттеров могут быть ион-транспортные системы мембраны клеток. Мембрана эритроцитов содержит Ca<sup>2+</sup>-зависимые K<sup>+</sup>-каналы (K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналы) промежуточной проводимости, которые участвуют в программируемой гибели эритроцитов (эриптозе) и изменении объёма клеток [2]. Кроме того, важную роль в физиологии красных клеток крови играют Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup>-котранспортер (NKCC) и анионный обменник, поскольку поддерживают ионные градиенты на мембране эритроцитов, обеспечивая формирование мембранного потенциала, а также регулируют объем клеток.

Цель настоящего исследования: изучение влияния H<sub>2</sub>S и СО на развитие гиперполяризации мембраны эритроцитов, обусловленной открытием Ca<sup>2+</sup>-зависимых калиевых каналов, в присутствии блокаторов Na,K,2Cl-котранспортера и анионного обменника.

В работе использовались осажденные эритроциты, полученные из венозной крови 20 здоровых добровольцев. Стимуляция K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов эритроцитов осуществлялась добавлением экзогенных доноров электронов аскорбата натрия (10 мМ) и феназинметосульфата (ФМС) (0,1 мМ) [3]. Для регистрации изменений мембранного потенциала эритроцитов в присутствии системы аскорбат – ФМС использовался метод [4], основанный на том, что в присутствии протонофора карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона (20 мкМ) распределение ионов водорода зависит от мембранного потенциала E<sub>m</sub> как E<sub>m</sub> = RT/F (pH<sub>i</sub> – pH<sub>o</sub>). В работе использовались донор сероводорода гидросульфид натрия (10 мкМ, 100 мкМ), донор СО tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer (CORM-2) (1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ), а также блокатор NKCC буметанид (5 мкМ) и блокатор анионного обменника SITS (100 мкМ). Все эксперименты проводились в изоосмотической среде (150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ глюкоза).

NaHS, также как и CORM-2, вызывал достоверное снижение амплитуды редокс-стимулированной гиперполяризации мембраны эритроцитов, причем увеличение концентраций использованных доноров приводило к более выраженному эффекту. Это свидетельствует о снижении активности K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов, что может быть связано с влиянием H<sub>2</sub>S или СО на белки канала или белки, образующие электронно-транспортную цепь в мембране эритроцита, которые играют важную роль в регуляции Ca<sup>2+</sup>-зависимых K<sup>+</sup>-каналов.

Блокатор котранспортера NKCC – буметанид уменьшал амплитуду редокс-стимулированной гиперполяризации мембраны эритроцитов, возможно из-за изменения градиента ионов калия. Совместное действие буметанида и NaHS или буметанида и CORM-2 привело к более существенному снижению исследуемого параметра по сравнению со значениями в отсутствие блокатора. Инкубация эритроцитов с блокатором анионного обменника SITS, напротив, вызывала существенный рост амплитуды редокс-стимулированной гиперполяризации мембраны эритроцитов. Добавление CORM-2 или NaHS на фоне SITS вызывало снижение амплитуды редокс-стимулированных ответов, по сравнению с параметрами, полученными только в присутствии только SITS, но не достигало значений ответа в присутствии донора СО или H<sub>2</sub>S.

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что газовые трансммиттеры H<sub>2</sub>S и СО снижают редокс-зависимую гиперполяризацию мембраны эритроцитов, воздействуя скорее всего на белки канала или его регуляторные белки. Кроме того, СО и H<sub>2</sub>S модулируют активность Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup>-котранспортера и

анионного обменника, что вносит определенные изменения в развитие гиперполяризации мембраны эритроцитов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00395.

1. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? //FASEB J. 2002. Vol. 13. P. 1792–1798.
2. Lang F. et al. Mechanisms and significance of eryptosis // Antioxid. Redox Signal. 2006. Vol. 8. С. 1183–1192.
3. Гюльханданян А.В., Геокчакян Г.М. Ca<sup>2+</sup>-зависимый выход K<sup>+</sup> из эритроцитов, индуцированный окислительными процессами // Биофизика. 1991. Т. 36. С. 169–171.
4. Орлов С.Н. с соавт. Ca<sup>2+</sup>-активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca<sup>2+</sup>-индуцированных изменений мембранного потенциала // Биол. мембраны. 1992. Т. 9. С. 885.

## **ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА НА СОСТАВ И СОСТОЯНИЕ ЛИПИДОВ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ**

### **EFFECT OF RESVERATROL ON THE COMPOSITION AND CONDITION OF LIPIDS DURING THE EXCITATION AND REGENERATION OF SOMATIC NERVES**

***Пиняев С.И., Ревин В.В.***

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва» факультет биотехнологии и биологии, г. Саранск, komrad.pinyaev2009@yandex.ru

За последние годы появилось значительное количество работ, которые показывают, что мембранный липидный бислой оказывает влияние, а в некоторых случаях определяет функционирование различных рецепторов, ион-транспортующих систем, и практически всех структур, расположенных в мембране.

Принимая во внимание тот факт, что липидный бислой может находиться в разных фазовых состояниях, которые в свою очередь зависят от многих показателей: индивидуального состава фосфолипидов, от жирных кислот, формирующих гидрофобные участки, то можно предположить, что исследуя их можно оценить их вклад как в процессы нормального функционирования, так и в первичные механизмы развития патологических процессов.

Особый интерес вызывает изучение их роли в таких важных направлениях нейробиологии, как проведение нервного импульса и восстановление функциональной активности в поврежденных соматических нервах.

Нами показано, что в липидной фазе соматических нервов при проведении возбуждения, так и при их механической травме происходят выраженные изменения липидов, как в их индивидуальном составе фосфолипидов, так и фазовом состоянии всего бислоя. Важнейшую роль в изменении состава липидов играет фермент фосфолипаза A<sub>2</sub>, при развитии дегенерационных процессов следует отметить, при перерезке нерва активируется как Ca<sup>2+</sup>-зависимая, так и Ca<sup>2+</sup>-независимая форма фермента. Зарегистрированные изменения в составе ФИ и ДАГ при проведении электрического импульса и перерезке нерва так же свидетельствуют об участии фосфоинозитидного цикла в этих процессах. Происходящие изменения свидетельствуют о том, что липидная фаза принимает участие не только в нормальном функционировании периферических нервов, но и является средой возникновения первичных патологических процессов, лежащих в основе глубоких функциональных и структурных нарушений.

Так же продемонстрировано влияние ресвератрола на регенерационные процессы в поврежденном седалищном нерве крысы. Одним из механизмов действия ресвератрола является проявление его антиоксидантной способности, поскольку он является отличным акцептором гидроксила, супероксида и других радикалов и защищает клеточные мембраны от перекисного окисления липидов и повреждения ДНК, вызванные генерацией активных форм кислорода. Однако, изменение содержания ФИ и ДАГ, а также перераспределение жирных кислот в составе различных липидных фракций говорит о влиянии на организацию и регулирование текучести мембраны клетки.

Стабилизирующее действие ресвератрола на фосфолипидный состав мембран нервного волокна можно объяснить тем, что молекула ресвератрола липофильна. Кроме этого возможен транспорт ресвератрола через липидные рафты, что способствует проникновению больших количеств молекул, а значит и большая выраженность эффекта данного вещества, оказываемого на поврежденное нервное волокно. Ресвератрол может играть ключевую роль в некоторых мембранных процессах, а именно в локализации, функционировании, и активности ряда мембранных белков, регулирующих клеточную сигнализацию. Следовательно, ресвератрол может быть вовлечен в управление активностью трансмембранных белков, таких как G-белки, фосфолипаза С и протеинкиназа С, тем самым регулируя передачу сигнала, клеточную пролиферацию и восприимчивость к апоптозу, путем организации и регулирования текучести клеточной мембраны.



## ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛЛЕКТИВНЫХ ДВИЖЕНИЙ ЛИПИДОВ В МОДЕЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ

### THE SPATIAL-TEMPORARY PARAMETRES OF COLLECTIVE LIPID MOTIONS IN A MODEL MEMBRANE

***Покровский В.И.<sup>1,2,3</sup>, Кузнецов А.С.<sup>1,2</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2</sup>***

<sup>1</sup> Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Россия, 101000, Москва, ул. Мясницкая, д. 20,

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10,

<sup>3</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские горы, д.1.

Клеточная мембрана – сложно организованная гетерогенная среда, включающая в себя липидный бислой и мембранные белки, являющиеся мишенями действия многих лекарственных препаратов [1]. Известно, что даже в простых модельных системах, таких как одно- и двухкомпонентные липидные бислои, наблюдается формирование неоднородностей и нанокластеров [3]. Детали указанных процессов не до конца понятны, но при этом ясно, что структурно-динамические параметры окружения могут модулировать функционирование белков. Целью настоящей работы стал поиск коллективных движений липидов в модельной мембране и описание структурно-динамических параметров согласованно движущихся кластеров липидных молекул.

В компьютерном эксперименте изучали поведение гидратированного липидного бислоя (128 молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина (ПОФХ) и около 4500 молекул воды) с помощью метода молекулярной динамики (МД). Для проведения расчётов использовали программный пакет Gromacs [2]. Для липидов применяли модифицированную параметризацию Бергера [4], для воды — модель SPC. Рассчитывали траектории МД длительностью 200 нс. Поиск динамических кластеров плотности и согласованных движений липидов в модельной водно-липидной системе производили путём обработки данных МД. Для этого разработан новый вычислительный метод анализа данных МД, позволяющий извлекать информацию о положении и скорости полярных головок липидов и выявлять скоррелированные движения в различных пространственно-временных диапазонах.

Обнаружили наличие как согласованно движущихся, так и геометрически сближенных молекул липидов в мембране. Наличие геометрических кластеров иллюстрирует неоднородность физических свойств модельной липидной мембраны и соответствует ранее описанным данным. Характерные размеры геометрических кластеров составляют 2-10 липидов для системы, состоящей из 64 молекул липидов в монослое, времена жизни варьируют в пределах от 100 до 1000 пс. В то же время, в системе наблюдаются группы согласованно движущихся молекул. Согласованные группы – «потoki» могут включать в себя от нескольких до десятков молекул липидов в монослое. Времена жизни «потокoв» от 0,1 до 100 пс. Наблюдали переходы системы между двумя состояниями: «активным», в котором наблюдается согласованное движение большей части липидов, и «неактивным», где смещения молекул незначительны. Таким образом, показано, что в липидном бислое на разных характерных временах существуют нанокластеры и согласованные потоки, что приводит к высокой гетерогенности свойств даже в однокомпонентной модельной системе.

Понимание динамики движения липидов может быть использовано для создания методов направленного воздействия на трансмембранные домены белков путём модулирования свойств их мембранного окружения.

Работа подготовлена в рамках Программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ и с использованием средств субсидии в рамках государственной поддержки ведущих университетов РФ «5-100».

1. Yin H., Flynn A.D., Drugging membrane protein interactions. // *Annu Rev Biomed Eng.* 2016. Vol. 18, Pp. 51-76.
2. Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., Lindahl, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from lap-tops to supercomputers. // *SoftwareX*, 2015, Vol. 1–2, Pp. 19–25.
3. Pyrkova D.V., Tarasova N.K., Krylov N., Nolde D.E., Pentkovsky V.M., Efremov R., Dynamic clustering of lipids in hydrated two-component membranes: results of computer modeling and putative biological impact. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2013. Vol. 31. No. 1. P. 87-95.
4. Berger O., Edholm O., Jähnig F., Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. // *Biophys J.* 1997. Vol. 72(5), Pp. 2002–2013.

**ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛОБИНОВ С ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ****ELECTROSTATIC INTERACTION OF GLOBINS WITH PHOSPHOLIPID MEMBRANES***Постникова Г.Б., Шеховцова Е.А., Сивожелезов В.С.*

Институт биофизики клетки РАН, 142290 Пущино, Московская область

Мы впервые показали, что вопреки давно сформированным и вошедшим в учебники представлениям, для отщепления кислорода от оксимиоглобина ( $MbO_2$ ) необходимо не только снижение парциального давления кислорода ( $p_{O_2}$ ) в клетке, но и активное взаимодействие его с дышащими митохондриями (МХ) [1]. Проведенное нами изучение механизма миоглобин-митохондриального взаимодействия с привлечением различных физико-химических методов, природных митохондриальных и искусственных бислойных фосфолипидных мембран показало, что на внешней мембране МХ белки, специфичные к миоглобину отсутствуют, а  $MbO_2$  неспецифически связывается с мембранными фосфолипидами. Зависимость миоглобин-мембранного взаимодействия от ионной силы указывает на важный вклад кулоновской электростатики. В результате взаимодействия миоглобина с фосфолипидной мембраной имеет место изменение конформации белка, в первую очередь, нативной конформации гемовой полости (без заметного изменения третичной структуры), что приводит к уменьшению сродства миоглобина к лиганду и облегчает отщепление  $O_2$  от  $MbO_2$  при физиологических значениях  $p_{O_2}$  в клетке.

Все исследования проводились на миоглобине кашалота и его модифицированных производных с МХ из печени крысы с сукцинатом в качестве дыхательного субстрата [2]. Позднее была изучена дезоксигенация в присутствии МХ из сердца голубя шести других мономерных и димерных оксиглобинов, в десятки и сотни раз различающихся по кинетическим и равновесным параметрам их реакции с  $O_2$  в растворе. Для них, однако, в присутствии митохондрий регистрировалась одинаковая скорость дезоксигенации оксиглобина, которая также соответствовала, как и для  $MbO_2$  кашалота, скорости дыхания МХ, что свидетельствует в пользу взаимодействия всех изученных глобинов с митохондриями.

Из детального изучения функциональных свойств и пространственных структур миоглобинов млекопитающих и глобинов из других организмов был сделан вывод, что электростатическая стабилизация является общим механизмом контроля лигандного связывания. В данной работе проанализирована роль электростатических взаимодействий в стабилизации нативной конформации гемовой полости в структуре миоглобинов кашалота и лошади, моллюсков *Busyon canaliculatum* и *Aplysia limacina*, леггемоглобина сои, а также мономерных и димерных гемоглобинов HbI и HbII моллюска *Lucina pectinata* и насекомых, HbI *Gasterophilus intestinalis*, *Drosophila melanogaster* Hb и *Chironomus thummi thummi* HbIII, а также возможной ее дестабилизации при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами и/или их полем. Показано, что нативная конформация проксимальной части гемовой полости определяется системой водородных связей с участием проксимального лиганда HisF8, соседних с ним аминокислот (Ser, His, Lys), а также одной из двух пропионовокислых групп гема, как правило, А-пропионата. От этого зависит положение атома Fe внутри или вне плоскости протопорфирина, влияющее на эффективность связывания лиганда.

В миоглобинах животных важнейшую роль в регуляции сродства к лиганду играет инвариантный дистальный HisE7, который за счет образования водородной Н-связи с лигандом  $O_2$  препятствует его быстрой диссоциации. Замена HisE7 в миоглобине остатками, неспособными к Н-связыванию, приводит к значительному снижению сродства к  $O_2$ , главным образом, из-за роста константы диссоциации (при замене на Gly в 100 раз). Заметный вклад в стабилизацию нативной конформации дистальной части гемовой полости  $MbO_2$  вносят также электростатические взаимодействия между гем-D-пропионатом и Arg45(CD3), который образует Н-связь с дистальным HisE7. Сеть водородных связей, образованная Arg45(CD3), Asp60(E3) и гем-D-пропионатом блокирует вращение дистального HisE7, донирующего водород лиганду  $O_2$ . В то же время водородная связь между N-дельта HisE7 и карбонильным кислородом Asp60(E3) может стабилизировать «открытую» коформацию этого гистидина. В глобинах моллюсков и насекомых, где дистальный His64(E7) часто заменен на другой остаток, неспособный к образованию Н-связи с лигандом  $O_2$ , также реализуется система водородных связей с участием этого остатка и одной или обеих пропионовокислых групп гема для стабилизации связанного лиганда. Так, в Mb *Aplysia limacina*, где дистальный His64(E7) замещен на Val63(E7), связывание молекулы  $O_2$  с атомом Fe гема стабилизируется водородной связью с Arg66(E10), «аргининовые ворота» вместо «гистидиновых ворот» в миоглобинах позвоночных, боковая цепь которого способна формировать Н-связь с гем-А-пропионатом, а с другой стороны к нему примыкает NH-группа Arg70(E14). Найденные сети водородных связей в проксимальной и, в особенности, дистальной части гемовой полости глобина могут нарушаться под влиянием отрицательно заряженной мембраны (головки фосфолипидов или поле мембраны), и измененного локального pH вблизи нее, приводя к существенному изменению сродства к лиганду  $O_2$ .

[1] Г.Б. Постникова, С.В. Целикова. Миоглобин и митохондрии: изучение кинетики отщепления кислорода от оксимиоглобина в суспензии митохондрий. Биофизика, 2005, т.50, №2, С. 297-306.

[2] Г.Б. Постникова и Е.А. Шеховцова. Миоглобин: кислородное «депо» или переносчик кислорода к митохондриям? Новый механизм дезоксигенации миоглобина в клетке. Биохимия, 2018, т.83, № 2, с.267-285.

## **О ВЛИЯНИИ НЕКОТОРЫХ НИТРАТНЫХ ВАЗОДИЛАТАТОРОВ НА ЦИТОАРХИТЕКТониКУ ЭРИТРОЦИТОВ**

### **ABOUT THE INFLUENCE OF CERTAIN NITRATE VASODILATATORS ON ERYTHROCYTES CYTOARCHITECTONIC**

*Путинцева О.В., Артюхов В.Г.*

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж  
[biophys66@mail.ru](mailto:biophys66@mail.ru)

Нитратные вазодилататоры – лекарственные препараты, активно используемые в медицинской практике для коррекции нарушений на уровне микроциркуляторного русла при развитии сердечно-сосудистой патологии. При внутривенном введении и сублингвальном приеме они вступают в непосредственный контакт с эритроцитами крови, а продукты их распада способны проникать внутрь клеток и оказывать влияние на их структурную целостность и форму. Целью нашей работы стало изучение цитоархитектоники эритроцитов человека после контакта с некоторыми нитратными вазодилататорами в течение разного временного периода.

Исследования проводили на суспензии эритроцитов в 0,01 моль/л Na-фосфатном буфере ( $1,34 \cdot 10^{12}$  клеток/л), полученной из крови доноров в день взятия пробы, к которой добавляли лекарственные препараты нитроглицерина – НГ (ГУ «Институт новых технологий» Отделения медицинских наук РАН, Россия) или «Изокет» (ЮСБ Фарма ГмбХ, Германия) в концентрации 5 нг/мл. Образцы инкубировали в течение 1 и 24 ч при 37 °С в суховоздушном термостате в стерильных условиях, а затем исследовали их поверхностную цитоархитектонику с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL (Japan Electron Optics Laboratory) JSM – 6510 LV (Япония) при ускоряющем напряжении 10 кВ в лаборатории ЦКПНО Воронежского государственного университета.

Было установлено, что морфологическая картина нативной суспензии эритроцитов соответствовала таковой здорового человека и не менялась в течение 1 ч. Однако через 24 ч количество дискоцитов уменьшилось до 53,4 %, число обратимо деформированных форм возросло до 36,4 %, а необратимо деформированных эритроцитов – до 10,2 %. После модификации суспензии эритроцитов человека НГ и «Изокет» в течение 1 ч снижается количество двояковогнутых дискоцитов до 83,2 и 85,2 %, возрастает число обратимо деформированных клеток до 14,2 и 12,2 % и необратимо деформированных эритроцитов до 2,6 % соответственно. Суточная инкубация с исследуемыми вазодилататорами сопровождается значительными изменениями содержания отдельных морфологических форм в популяции эритроцитов: количество дискоцитов уменьшается до 42,8 и 37,2 %, а общее число деформированных клеток превышает число нормоцитов и достигает 57,2 и 62,8 % соответственно. Ответные реакции эритроцитов на 1- и 24-часовое воздействие «Изокет» и НГ были аналогичными. В обоих случаях с увеличением времени взаимодействия эритроцитов с нитратными вазодилататорами наблюдалось появление и накопление клеток с глубокими морфологическими изменениями. Обнаруженная нами модификация эритроцитарных клеток лекарственными препаратами указывает на нарушение эластичности мембран, а, следовательно, и на снижение способности эритроцитов к упругой деформации в микроциркуляторном русле, что влечет за собой затруднение в полноценном насыщении клеток кислородом и накопление в них метформы гембелка. В итоге организм испытывает острую нехватку кислорода, что представляет серьезную угрозу для его здоровья. Выявленные особенности взаимодействия НГ и «Изокет» с эритроцитарными клетками свидетельствуют о необходимости строгого соблюдения режима приема и дозирования нитратных вазодилататоров и контроля морфологической картины эритроцитов для минимизации отклонений в степени резистентности организма к их приему и получения максимально благоприятного эффекта.

---

## **КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИСЛОЕВ НЕНАСЫЩЕННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ: СВОЙСТВА ЖИРНОКИСЛОТНЫХ ЦЕПЕЙ**

### **COMPUTER SIMULATIONS OF BILAYERS OF UNSATURATED PHOSPHOLIPIDS: PROPERTIES OF FATTY ACID CHAINS**

*Рабинович А.Л., Любарцев А.П.<sup>1</sup>*

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, [rabinov@krc.karelia.ru](mailto:rabinov@krc.karelia.ru)

<sup>1</sup>Stockholm University, Stockholm, Sweden, [alexander.lyubartsev@mink.su.se](mailto:alexander.lyubartsev@mink.su.se)

Одна из проблем биофизики мембран – установить взаимосвязи между химическим строением компонентов биомембран, физическими свойствами этих компонентов и функциональными особенностями биомембран и мембранных систем. Изучить требуется молекулы из состава мембран, кластеры различных полиморфных образований, гетерогенные структуры с включениями, иерархические образования гетерогенных структур. Результаты, полученные уже при изучении свойств основных компонентов мембран – молекул

фосфолипидов и кластеров липидных бислоев, важны для понимания ряда общих “мембранных” проблем.

В работе приведены результаты сравнения свойств жирнокислотных (углеводородных) цепей, входящих в состав молекул фосфатидилхолинов (ФХ) в гидратированных бислоях в жидкокристаллической фазе, и свойств невозмущенных цепей. Свойства рассчитаны на основе компьютерного моделирования [1-3]. Изучены насыщенные цепи 16:0 и 18:0 (содержащие 16 и 18 атомов углерода), а также ненасыщенные цепи 18:1(n-9)*cis*, 18:2(n-6)*cis*, 18:3(n-3)*cis*, 18:4(n-3)*cis*, 18:5(n-3(n-*cis*), 20:4(n-6)*cis*, 20:5(n-3)*cis*, 22:6(n-3)*cis* (содержащие 18, 20, 22 атома углерода и от 1 до 6 двойных связей *cis*). Моделирование цепей проведено методом Монте-Карло (МК). Энергия  $U$  цепи вычислена с учетом взаимозависимости каждых трех последовательных вдоль по цепи торсионных углов, которые изменяли непрерывно в диапазоне 0 –360 град. При генерировании конформаций использована существенная выборка по энергии  $U$ . Строение всех цепей воспроизведено в полноатомном приближении. Моделирование бислоев ФХ проведено методом молекулярной динамики (МД); каждая молекула ФХ содержала в положении *sn*-1 цепь 16:0 или 18:0, а в положении *sn*-2 – одну из перечисленных выше ненасыщенных цепей. Строение всех молекул ФХ и воды также воспроизведено в полноатомном приближении. Во всех вариантах МК и МД моделирования использованы одни и те же структурные параметры и параметры силового поля, одна температура ( $T=303$  К). В молекулах ФХ бислоев (МД моделирование) жирнокислотная цепь у глицеринового основания имела группу  $\text{CO=O}$ , а в свободных цепях в невозмущенном состоянии (МК моделирование) эта концевая группа заменена группой  $\text{CH}_3$  [2].

Рассчитана совокупность равновесных характеристик (свойств) каждой цепи, в том числе удельная конформационная теплоемкость  $C_v/N'_\phi$  цепей в невозмущенном состоянии. Здесь  $C_v=(\langle U^2 \rangle - \langle U \rangle^2)/(k_B \cdot T^2)$  - это конформационная теплоемкость всей цепи;  $k_B$  - постоянная Больцмана;  $N'_\phi=N-d-3$  – это количество углов внутреннего вращения вокруг простых связей цепи ( $N$  – количество атомов углерода,  $d$  – количество двойных связей); два угла, отвечающие вращениям концевых  $\text{CH}_3$ -групп вокруг связей  $\text{CH}_2-\text{CH}_3$ , не учитывали, поскольку эти вращения не меняют конформацию основной цепи и поэтому почти не влияют на энергию  $U$ . Оказалось, что с ростом количества двойных связей в цепи величина  $C_v/N'_\phi$  уменьшается, в итоге  $C_v/N'_\phi$  является наименьшей в предельно полиненасыщенных цепях (в которых все простые связи являются примыкающими к двойным). При изменении температуры углеводородная цепь, содержащая наибольшее количество метиленпрерывающихся двойных связей *cis*, способна принять или передать наименьшее количество тепла. Молекулы интегральных белков в биомембранах находятся в окружении липидов, которые, согласно экспериментальным данным, содержат значительное количество полиненасыщенных цепей. Чем больше двойных связей содержат цепи жирных кислот липидов в аннулярных слоях, тем эффективнее они могут выполнять термостабилизирующую роль для белков.

Показано также, что соотношения между строением и свойствами невозмущенных цепей можно в первом приближении (качественно) использовать вместо соотношений “структура – свойства” для цепей в молекулах липидов в биомембранах. Эти соотношения можно использовать для анализа экспериментальных данных, для интерпретации ряда процессов, происходящих в биомембранах, - например, при изменениях жирнокислотного состава липидов биомембран, вызванных изменениями внешних условий.

Работа выполнена при поддержке средств бюджета РФ (гос. задание КарНЦ РАН № 0218-2019-0076, № гос. рег. АААА-А17-117031710039-3) – для А.Л.Р., the Swedish Science Research Council (Vetenskapsrådet, грант 621-2013-4260) – для А.П.Л., и программы FP7 (грант No.310465 MembraneNanoPart) – для А.Л.Р. и А.П.Л.

1. Lyubartsev A.P., Rabinovich A.L. Force Field Development for Lipid Membranes Simulations // Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes. 2016. V.1858. No.10. P.2483-2497.
2. Rabinovich A.L., Lyubartsev A.P., Zhurkin D.V. Unperturbed Hydrocarbon Chains and Liquid Phase Bilayer Lipid Chains: Computer Simulation Study // Eur. Biophys. J. with Biophys. Lett. 2018. V.47. No.2. P.109-130.
3. Lyubartsev A.P., Rabinovich A.L. Force fields in membrane simulations // In: "Biomembrane simulations. Computational Studies of Biological Membranes (Series in Computational Biophysics)". University of North Carolina at Chapel Hill, USA. 2019, in press.

## НЕКРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЕ СИММЕТРИЙНЫЕ ИНВАРИАНТЫ В СТРУКТУРЕ УГЛЕВОДОРОДНЫХ ЦЕПЕЙ ФОСФОЛИПИДОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

## NON-CRYSTALLOGRAPHIC SYMMETRY INVARIANTS IN STRUCTURE OF HYDROCARBON CHAINS OF PHOSPHOLIPIDS OF BIOLOGICAL MEMBRANES

*Рабинович А.Л., Талис А.Л.<sup>1</sup>*

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ “Карельский научный центр РАН”, Петрозаводск, rabinov@krc.karelia.ru

<sup>1</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, talishome@mail.ru

В составе жирнокислотных цепей молекул фосфолипидов биологических мембран значительную долю составляют ненасыщенные и полиненасыщенные цепи, они играют важную роль в функционировании мембран. Если молекулы определенного строения выполняют в мембранной системе некоторые функции, то последние должны быть связаны с надлежащими физическими свойствами этих молекул, т.е. существует

молекулярная основа возникновения данных свойств у молекул такого строения. Наиболее распространенные жирнокислотные (углеводородные) цепи в фосфолипидах биомембран характеризуются общими особенностями строения. Количество  $N$  атомов углерода в цепях – четное ( $N \sim 12 - 24$ ); конфигурация двойных связей - *cis* (двойные связи в полиненасыщенных цепях – метиленпрерывающиеся); первая двойная связь расположена у 3-го, 6-го или 9-го атома углерода от концевой группы  $\text{CH}_3$  [1]. Причины существования этих закономерностей ранее в литературе не обсуждались.

Эффективным методом получения данных о взаимосвязях “структура – свойства – функции” для цепей различного строения является компьютерное моделирование [2]; понимание этих взаимосвязей становится более глубоким при сочетании разных уровней анализа. В настоящей работе показано, что важную роль при этом играет учет некристаллографической симметрии цепей, которая может отображаться целочисленными осями, отличающимися от осей 1-го, 2-го, 3-го, 4-го и 6-го порядков; нецелочисленными осями и осями, порядок которых иррационален; дробно-линейными преобразованиями (комбинациями сдвигов, поворотов, инверсий и растяжений).

Насыщенные участки цепей можно считать тетракоординированными. Тетракоординированную цепь можно представить в виде объединения тетраэдрических цепей (т.е. цепей из тетраэдров с общими гранями). Показано, что некристаллографические симметрии подобных структур можно определить симметриями фрагментов высокосимметричных структур, которые отображаются из неевклидовых пространств. Выполнить эту задачу можно с помощью симметричной структурной единицы: линейного объединения по граням четырех правильных тетраэдров (“тетраблока”) [3].

Тетраблок пространственно реализуется в линейном (правом и левом) и плоском вариантах. Выявлены теоретико-групповые соотношения, отображающие симметрии тетраблока и цепей, полученных сборкой тетраблоков. Показано, что аналогом тетраблока для тетракоординированных цепей является комбинированный тетраблок; он обладает наибольшей возможной симметрией и реализуется в виде составного и декорированного тетраблоков. Выявлены высокосимметричные “шаблоны”, отвечающие насыщенной углеводородной цепи и фрагменту с двойной связью “ $\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$ ” в ненасыщенной углеводородной цепи.

Соответствие строения цепей (входящих в состав молекул липидов, образующих основу биологических мембран) некристаллографическим симметричным требованиям является необходимым (хотя и не достаточным) условием их наибольшей распространенности в природе. Это позволяет объяснить преимущественное наличие лишь некоторых (определенных) вариантов строения таких цепей (например, существование  $\omega_3$  и  $\omega_6$  семейств жирнокислотных цепей фосфолипидов) и проливает свет на возможные причины единообразия таких типов цепей для подавляющего большинства известных организмов.

Понимание “мембранных” явлений при этом достигается не только на структурном уровне, но и на обобщенном симметричном (абстрактно-математическом) уровне, а это позволяет выявить симметричные инварианты в строении жирнокислотных компонентов молекул липидов, и место цепей соответствующей структуры среди всех теоретически возможных вариантов, их роль в общей картине взаимосвязей “структура – свойства – функции”. Вследствие наличия общности симметричных закономерностей в строении рассматриваемых жирнокислотных цепей можно ожидать также проявления определенной общности функций, которые осуществляются соответствующими совокупностями таких цепей в разных мембранных системах.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Гос. зад. КарНЦ РАН № 0218-2019-0076 (гос. пер. АААА-А17-117031710039-3) - для А.Л.Р.

1. Mouritsen O.G., Bagatolli L.A. Life - As a Matter of Fat. Lipids in a Membrane Biophysics Perspective (The Frontiers Collection). Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer. 2016. 298 p.
2. Рабинович А.Л. В кн.: Методы компьютерного моделирования для исследования полимеров и биополимеров. Отв. ред. В.А. Иванов, А.Л. Рабинович, А.Р. Хохлов. М.: "ЛИБРОКОМ". 2009. С.409-454.
3. Talis A.L., Rabinovich A.L. Symmetry of structures that can be approximated by chains of regular tetrahedra // Crystallography Reports 2019. V. 64. No. 3. P. 367-375.

**ВЛИЯНИЕ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В ФЕНИЛЬНОМ КОЛЬЦЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ ИОНОВ НА СКОРОСТЬ ИХ ФЛИП-ФЛОПА ЧЕРЕЗ БИСЛОЙНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ****THE EFFECT OF SUBSTITUENTS IN THE PHENYL RING OF THE LIPOPHILIC IONS ON THE RATE OF THEIR FLIP-FLOP THROUGH BILAYER LIPID MEMBRANES*****Рокицкая Т.И., Лужков В.Б.<sup>1,2</sup>, Коршунова Г.А., Ташлицкий В.Н.<sup>3</sup>, Антоненко Ю.Н.***

НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, г. Москва, E.mail: rokitskaya@genebee.msu.ru

<sup>1</sup>Институт Проблем Химической Физики РАН, г. Черноголовка<sup>2</sup>Факультет фундаментальной физико-химической инженерии МГУ имени М.В.Ломоносова, г. Москва<sup>3</sup>Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, г. Москва

В настоящее время проникающие катионы широко применяются для создания митохондриально-направленных соединений. Для этого биологически важные молекулы посредством липофильного линкера ковалентно пришиваются к различным катионам, при этом чаще всего используется додецилтрифенилфосфоний ( $C_{12}TRP$ ) [1]. Оказалось, что додецил является оптимальным линкером для проявления активности большинства таких соединений на биологических объектах. Нами ранее было показано, что  $C_{12}TRP$  хорошо сорбируется на поверхности модельных бислойных липидных мембран (БЛМ) в отличие от тетрафенилфосфония. Это позволяет определить константы скорости трансмембранной диффузии ( $k_i$ ) таких соединений с помощью метода измерения релаксации электрического тока БЛМ после прикладывания напряжения.

Поскольку проникновение липофильных катионов через гидрофобный слой липидной мембраны зачастую является лимитирующей стадией процесса их накопления в клетках и митохондриях, мы синтезировали ряд аналогов  $C_{12}TRP$  с различными заместителями в фенильном кольце для выявления наиболее проникающих аналогов. Оказалось, что введение одного метильного заместителя в *para* положении фенильного кольца значительно ускоряет процесс флип-флопа проникающего катиона. Увеличение количества метильных групп привело к дальнейшему ускорению проникновения катиона. С другой стороны, галогенирование замедлило проникновение катиона через гидрофобный слой, что противоположно действию галогеновых заместителей в липофильных анионах. Ранее Рональд Бенц методом скачка заряда показал [2], что замены водорода в молекуле тетрафенилбората на фтор и хлор в *para* положении фенильного кольца приводят к увеличению константы скорости флип-флопа на несколько порядков. Галогенирование другого липофильного аниона дикарболлида кобальта также приводило к значительному ускорению процесса проникновения иона через БЛМ. Авторы предположили, что это ускорение связано с увеличением размера иона, в результате чего происходит уменьшение энергетического барьера процесса перехода с одного на другой монослой липидной мембраны. Однако этот вывод нельзя сделать для аналогов липофильного катиона  $C_{12}TRP$ . Например, введение метильной группы в *para* положении увеличивает константу скорости флип-флопа приблизительно в 30 раз, а введение метоксигруппы в этом же месте увеличивает лишь в 2.5 раза. Можно предположить, что при модификации  $C_{12}TRP$  происходит изменение гидрофобности катионов, и этот параметр определяет скорость их флип-флопа. Коэффициент распределения в октанол-воде изучаемых катионов был определен методом, основанном на корреляции этой величины с временем удерживания соединения в обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Оказалось, что для некоторых аналогов увеличение гидрофобности коррелирует с увеличением  $k_i$ , однако полного соответствия не наблюдается. С помощью теории функционала плотности и модели поляризуемого континуума для растворителя мы рассчитали энергии сольватации аналогов метилтрифенилфосфония и метилтрифенилбората. Следует отметить, что хорошая корреляция наблюдается между разницей свободных энергий сольватации ионов в воде и октане и величиной центрального барьера свободной энергии в липидной мембране, которая была вычислена из экспериментальных данных. По-видимому, именно взаимодействие липофильных ионов с молекулами воды в основном определяет их способность проникать через липидные мембраны.

Таким образом, мы показали, что для улучшения скорости флип-флопа липофильных катионов через липидные мембраны необходимо заместить один или несколько водородов в фенильном кольце метильными группами. Можно предположить, что конъюгаты с такими аналогами  $C_{12}TRP$  будут проявлять более высокую активность на биологических моделях.

1. Zielonka J. et al. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications // Chem Rev. 2017. Vol.117, P.10043.

2. Benz R. Structural requirement for the rapid movement of charged molecules across membranes. Experiments with tetraphenylborate analogues // Biophys J. 1988. Vol.54, P.25.



**РОЛЬ НЕЛОКАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ В ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ОТКЛИКЕ ВОДЫ В ТРАНСПОРТЕ ИОНОВ МЕЖДУ МЕМБРАНАМИ ПЛОТНЫХ КОНТАКТОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК****ROLE OF NONLOCAL EFFECTS IN WATER DIELECTRIC RESPONSE IN ION TRANSPORT BETWEEN MEMBRANES OF TIGHT JUNCTIONS OF EPITHELIAL CELLS***Рубашкин А.А., Исерович П.<sup>1</sup>, Воротынцев М.А.<sup>2</sup>*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, andrey.rubashkin@gmail.com

<sup>1</sup>Государственный университет центра медицины, Нью-Йорк<sup>2</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, [mivo2010@yandex.com](mailto:mivo2010@yandex.com)

Описание воды как нелокальной диэлектрической среды [1] использовано для расчета высоты энергетического барьера для проникновения ионов в плотные контакты (ПК) между эпителиальными клетками. Белки клаудина в ПК (см. [2]), несущие ионогенные группы, влияют на этот процесс как за счет своих зарядов [2-4], так и за счет изменения структуры воды внутри ПК, влияя на корреляционную длину  $\Lambda_2$  в ПК [4]. Последний эффект приводит к изменению энергий сольватаций ( $W_{Na}$  и  $W_{Cl}$ ) ионов  $Na^+$  и  $Cl^-$  в ПК по сравнению с объемной водой. Эти энергии сольватации ионов как в свободном растворе, так и в ПК, были рассчитаны по формулам предложенного нами в [1] подхода обратного диэлектрического приближения. В отличие от широко используемого «приближения неограниченной среды» (см. ссылки на статьи по нелокальной электростатике в [1] и [4]), которое предполагает, что полярная среда (вода) занимает все пространство (включая пространственную область, занятую ионом), процедура [1] должным образом учитывает специфические диэлектрические свойства внутри полости иона. В то же время наша процедура [1] позволяет получить простые аналитические выражения как для распределения потенциала, так и для электростатического вклада в энергию сольватации ионов. На основе этого подхода были рассчитаны значения изменений энергий сольватации ионов  $\Delta W_{Na}$  и  $\Delta W_{Cl}$  при их переходе в ПК. При этом использовалась модель (см. [1]) для плотности заряда иона  $\rho_{ext}(r)$  за пределами борновской сферы иона радиуса  $r_i$ , которая является функцией от расстояния от центра иона:

$$\rho_{ext}(r) = \rho_0 (4 \pi \eta)^{-1} \exp[-(r - r_i) / \eta], \quad \rho_0 = q_{ext} (r_i^2 + 2 r_i \eta + 2 \eta^2)^{-1} \quad \text{for } r > r_i, \quad (1)$$

$$\Delta W = (1/p) \int_0^\infty [1/\epsilon_1(k, \Lambda_1) - 1/\epsilon_2(k, \Lambda_2)] [q_{cav} \sin kr_i / kr_i + (4p/k) \int_{r_i}^\infty r c_{ext}(r) \sin kr dr]^2 dk \quad (2)$$

Зависимость  $\Delta W$  от  $\Lambda_2$ , рассчитанная по формуле (2), возникает из-за отличия обратных диэлектрических функций в свободном растворе и в ПК. В (2)  $q_{cav}$  – часть заряда внутри борновской сферы,  $k$  – волновой вектор. В расчете использовались как формула (3) для трехмодовой модели  $\epsilon(k)$  без учета эффекта переэкранирования (OS), так и (4) с учетом OS эффекта. Для воды  $\epsilon_2 = 4.9$ ,  $\epsilon_3 = 78$ ,  $C_3 = (1/\epsilon_2 - 1/\epsilon_3)$ , корреляционная длина  $\Lambda_1 = 3 \text{ \AA}$ .

$$1/\epsilon_1^{3M}(k) - 1/\epsilon_2^{3M}(k) = -C_3 \{1/[1+(k\Lambda_1)^2] - 1/[1+(k\Lambda_2)^2]\}, \quad (3)$$

$$1/\epsilon_1^{OS}(k) - 1/\epsilon_2^{OS}(k) = k^2 C_3 \{ \Lambda_1^2/[1+(k\Lambda_1)^2] - \Lambda_2^2/[1+(k\Lambda_2)^2] \} / [1+(k\lambda)^2]. \quad (4)$$

Формула для  $Na^+/Cl^-$  селективности в ПК, в которой  $D_{Na}/D_{Cl}$  – отношение коэффициентов диффузии, имеет вид:  $S_{Na/Cl} = (D_{Na}/D_{Cl}) \exp\{F[\Delta W_{Cl} - \Delta W_{Na} - 2F\Delta\phi]/RT\}$ . Это выражение связывает  $S_{Na/Cl}$  с плотностью заряда белков внутри поры, от которой зависит скачок потенциала  $\Delta\phi$  в ПК [3,4]. Также выражение для селективности связывает  $S_{Na/Cl}$  с диэлектрической функцией объемной воды, распределением заряда внутри иона и  $\Lambda_2$  в ПК, от которых зависят энергии пересольватации ионов  $\Delta W_{Na}$  и  $\Delta W_{Cl}$ , рассчитанные по формулам (1)-(4). Численные оценки  $S_{Na/Cl}$  на основе наших модельных результатов были использованы для интерпретации экспериментальных данных, полученных в [2] для  $Na^+/Cl^-$  селективности в ПК клеток MDCK (клетки Мадин-Дарби почки собаки). Расчетное значение  $S_{Na/Cl} = 4.5$  совпадает с экспериментальным для NaCl раствора концентрации  $c = 0.15 \text{ M}$  при значениях параметров:  $\Lambda_2/\Lambda_1 = 1.49$ , концентрации зарядов в ПК  $0.06e$ , а также  $q_{cav} = 0.51e$ . Выбор модели для  $\epsilon(k)$  ((3) или (4)) не влияет на величину селективности. Возникновение  $Na^+/Cl^-$  селективности в ПК обусловлено главным образом существенным снижением концентраций обоих ионов внутри ПК из-за достаточно больших отрицательных значений энергий пересольватации, а также наличием в ПК отрицательных зарядов макромолекул клаудина. Эти экспериментальные данные нельзя объяснить в рамках локальной электростатики [3], даже если предположить нереально сильное уменьшение локальной диэлектрической проницаемости воды внутри ПК. Это подразумевает, что нелокальные эффекты в диэлектрическом отклике воды играют важную роль в транспорте ионов внутри ПК.

1. Vorotyntsev M.A., Rubashkin A.A. Uniformity ansatz for inverse dielectric function of spatially restricted nonlocal polar medium as a novel approach for calculation of electric characteristics of ion-solvent system // Chem. Phys. 2019. Vol. 521. P. 14-24.
2. Colegio O.R. et al. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2002. Vol. 283. P. C142-C147.
3. Rubashkin A.A. et al. Epithelial fluid transport: protruding macromolecules and space charges can bring about electro-osmotic coupling at the tight junctions // J. Membr. Biol. 2005. Vol. 208. P. 251-263.
4. Рубашкин А.А., Исерович П. Расчет  $Na^+/Cl^-$  селективности в плотных контактах между эпителиальными клетками методами нелокальной электростатики с полюсными моделями диэлектрической функции без эффекта переэкранирования // Цитология. 2018. Т. 60. С. 136-143. (Cell Tiss. Biol. 2018. Vol. 12. P. 323-330.)

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ ЛИПОСОМ В ПРОЦЕССЕ ИХ ИНИЦИИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ. ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ И БЕЛКОВ

### PHYSICAL AND CHEMICAL CHANGES OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOMES IN THE COURSE OF THEIR INITIATED OXIDATION. INFLUENCE OF PLANT ANTIOXIDANT AND PROTEINS

*Сажина Н.Н., Пальмина Н.П., Богданова Н.Г., Каспаров В.В., Плащина И.Г., Семенова М.Г.*

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334, e-mail: Natnik48s@yandex.ru

Липосомы из фосфатидилхолина (РС) широко используются в науке как модель биологических мембран для изучения в них различных биохимических процессов, в частности перекисного окисления липидов (ПОЛ), и регулирования окисления различными субстанциями. В процессе ПОЛ меняются физико-химические свойства мембран и их важные функции, что приводит к старению клеток и появлению различных болезней, и липосомная модель мембраны клетки дает возможность изучить кинетические характеристики окисления и изменения структуры липидного бислоя липосом в процессе ПОЛ. В настоящей работе проведено исследование кинетики инициированного 2,2'-азобис (амидинопропан) дигидрохлоридом (ААРН) окисления липосом из соевого РС и липосом с добавлением в них  $\alpha$ -линоленовой кислоты (ALA), эфирного масла гвоздики (ЭМГ) и инкапсулированием их казеинатом натрия (Cas-Na) при разных температурах. Была изучена динамика изменения структурного состояния мембран липосом, размеров и z-потенциала липосом в процессе окисления.

Для приготовления липосом использовали суспензию соевого РС марки Lipoid S100 (фирмы Lipoid GmbH, Германия) в фосфатном буфере (pH=7.2, 1 мМ). Липосомы формировали ультразвуком, используя гомогенизатор VCX-130 (Sonics & Materials). Окисление липосом проводили в пробирках, термостатированных при температурах 37<sup>0</sup> и 60<sup>0</sup>С, а степень развития ПОЛ регистрировали на спектрофотометре по накоплению диеновых конъюгатов (ДК,  $\lambda=233$ нм) [1]. Параметры, характеризующие структуру мембран, рассчитывали из спектров, полученных при температуре 293К на ЭПР-спектрометре Bruker 200D (ФРГ) методом спинового зонда, в качестве которого, для изучения микровязкости глубоколежащих областей липидного бислоя (~20 Å), использовали 16-доксилстеариновую кислоту (C<sub>16</sub>). Микровязкость мембраны в области локализации зонда C<sub>16</sub> оценивалась на основании временнóй корреляции зонда  $\tau_{C1}$  и  $\tau_{C2}$ , которые определяли по формулам для быстрого анизотропного вращения радикалов. Измерения гидродинамического диаметра липосом проводились на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) в режиме регистрации интенсивности рассеянного на липосомах под углом 173<sup>0</sup> лазерного излучения с  $\lambda$  633 нм. Концентрация ФХ в суспензии липосом составляла 1 мг/мл, температура 25<sup>0</sup>С. Для измерения z-потенциала в суспензии липосом использовался этот же анализатор в режиме регистрации распределения электрофоретической подвижности (ЭФП) частиц при определении их скорости по лазерному эффекту Доплера. Поскольку z-потенциал связан с ЭФП, анализатор рассчитывает его по скорости частиц по уравнению Смолуховского.

Результаты исследований показали, что инициированное ААРН окисление РС-липосом при температуре 37<sup>0</sup>С можно эффективно (80-90%) ингибировать ЭМГ. При повышении температуры до 60<sup>0</sup>С в 3-4 раза увеличивается скорость окисления, и ингибирование образования ДК существенно уменьшается. Добавление в РС-липосомы ALA приводит к заметному ускорению окисления. Инкапсулирование липосом Cas-Na снижает накопление ДК на 70%, а совместное действие Cas-Na и ЭМГ – на 90%. С повышением температуры эффективность защитной функции «казеиновой» капсулы существенно уменьшается даже в присутствии ЭМГ.

Установлено, что инициированное окисление липосом во всех случаях сопровождается увеличением микровязкости глубоко лежащих слоёв липидов, которое прямо пропорционально накоплению ДК. Этот эффект обусловлен, главным образом, увеличением относительного содержания насыщенных жирных кислот в липидах липосом, но некоторый вклад в него могут вносить и новые структурные формы окисленных липидов.

В процессе окисления размер РС-липосом увеличивается примерно в 5 раз. Введение в липосомы ALA значительно влияет на динамику изменения их размеров и z-потенциала: средний гидродинамический диаметр увеличивается на 30% к концу окисления, а абсолютные значения отрицательного z-потенциала уменьшаются. Присутствие в липосомах ЭМГ сглаживает эти закономерности и стабилизирует размеры и для РС-липосом, и для липосом с ALA. Комплекс РС-липосом с Cas-Na существенно снижает накопление ДК в процессе окисления и приводит к стабилизации размеров и z-потенциала комплексов.

Изменения z-потенциала и размеров при окислении липосом зависят, главным образом, от окисления содержащихся в них фосфолипидов, перестройки в конфигурации их ацильных цепей и, как следствие, от последующей перегруппировки полярных головок на поверхности мембраны. Это может сыграть важную роль в возникновении *in vivo* различных заболеваний.

Sazhina N.N. et al. Initiated oxidation of phosphatidylcholine liposomes with some functional nutraceuticals // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2019. Vol. 45. P. 34.



**ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА TYLOPEPTIN В НА СТРУКТУРУ МОДЕЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ  
МЕМБРАНЫ ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

**THE INFLUENCE OF PEPTIDE TYLOPEPTIN B ON MODEL BIOLOGICAL MEMBRANE BY  
ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY**

*Санникова Н.Э.<sup>1,2</sup>, Матвеева А.Г.<sup>1,2</sup>, Сырямина В.Н.<sup>1,2</sup>, Де Зотти М.<sup>3,4</sup>, Тониоло К.<sup>3,4</sup>,  
Формаджо Ф.<sup>3,4</sup>, Дзюба С.А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт химической кинетики и горения, Новосибирск, e-mail: paihuten@gmail.com

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, физический факультет, Новосибирск

<sup>3</sup>Department of Chemical Sciences, University of Padova, Padova, Italy

<sup>4</sup>Institute of Biomolecular Chemistry, Padova Unit, CNR, Padova, Italy

В связи с растущим развитием устойчивости патогенных организмов к антибиотикам поиск антимикробных препаратов нового типа является важной фундаментальной и прикладной задачей биомедицинской физики. Перспективной заменой антибиотиков являются антимикробные пептиды – небольшие белковые молекулы. Считается, что основным механизмом воздействия пептидов на структуру и свойства мембран является формирование ими трансмембранных проводящих каналов. Однако формирование каналов происходит при высоких концентрациях пептида, что может требовать высоких доз лекарственных препаратов и приводит к токсическим эффектам. В то же время изменения локальной структуры мембраны могут происходить и при малых концентрация пептида. Например, изменение латеральной организации и подвижности липидов в мембране могут приводит к нарушению нормального функционирования мембраны – процессам образования липидов, связывания белков, транспорта мембранных компонент в липидной мембране. В связи с этим изучение различных механизмов воздействия пептида на свойства мембраны является актуальной задачей.

В работе было изучено: топология пептида Tylopeptin B (Ac-Trp-Val-Aib-Aib-Ala-Gln-Ala-Aib-Ser-Aib-Ala-Leu-Aib-Gln-Lol) в мембране в широком концентрационном диапазоне – соотношение пептид/липид варьировалось в диапазоне 1/1500 – 1/200, влияние пептида на локальную структуру мембраны. В работе были использованы нативный и спин-меченый аналоги пептида, спин-меченая стеариновая кислота, липид ПОФХ (1-пальмитоил-2-олеоил-глицеро-3-фосфохолин). Исследования проводились методами Электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

В работе было установлено, что независимо от концентрации в мембране пептид имеет планарную ориентацию относительно поверхности липидного бислоя. Самоассоциация пептида наблюдается при концентрациях пептида П/Л >1/1000. Изменения градиента воды в мембране при наличии пептида незначительно. Обнаружено повышение локальной концентрации гостевых молекул стеариновых кислот при наличии пептида в мембране (П/Л=1/200), что свидетельствует об образовании локальных нанокластеров этих кислот. Данный эффект означает перераспределение жирных кислот в мембране, что может приводить к нарушению липидного гомеостаза и поэтому может являться дополнительным механизмом нарушения функционирования мембраны. Также образование нанокластеров жирных кислот может замедлять процессы латеральной диффузии в мембране, что также будет нарушать ее функционирование. В работе также предположено, что перераспределение стеариновых кислот в мембране может быть связано с самоассоциацией пептида.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда №15-15-00021.

**СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СВЕЖЕВЫДЕЛЕННОГО И  
КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА ОТ GFP<sup>+</sup> ДОНОРОВ ОБЛУЧЕННЫМ  
РЕЦИПИЕНТАМ**

**COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF SYNGENEIC TRANSPLANTATION OF  
FRESHLY ISOLATED AND CRYOPRESERVED BONE MARROW FROM GFP<sup>+</sup> DONORS TO  
IRRADIATED RECIPIENTS**

*Сергиевич Л.А., Богданенко Е.В.<sup>1</sup>, Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А., Карнаухов В.Н.*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Россия

<sup>1</sup>ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, г. Москва, Россия

Целью данной работы явилось изучение динамики восстановления морфофункциональных свойств органов системы крови (костного мозга, крови, тимуса, селезенки, кишечника) у сублетально облученных мышей-реципиентов на разных этапах после трансплантации свежесыведенных или криоконсервированных клеток сингенного костного мозга (КМ). В качестве доноров КМ использовали мышей, несущих ген улучшенного зеленого флуоресцентного белка (GFP<sup>+</sup> мыши). Использование GFP<sup>+</sup> клеток КМ в эксперименте

является удобным средством для флуоресцентной визуализации восстановления исследуемых органов реципиента и позволяет однозначно связать процессы гистогенеза с донорскими клетками.

Клетки криоконсервировали с помощью методики, применяемой в клинической практике для аутотрансплантации КМ при лечении онкологических больных. В качестве криопротектора использовали растворенный в полиглюкине диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 5 %. Трансплантацию размороженного КМ проводили без отмывания от криопротектора.

В суспензии миелокариоцитов наряду со стволовыми кроветворными клетками находятся и стволовые некроветворные клетки (в частности, мезенхимальные), которые могут принимать участие в процессах гистогенеза стромы органов и способствуют восстановлению их морфофункциональных свойств. Было показано, что через 5-7 дней после трансплантации как свежeweделенных, так и криоконсервированных клеток КМ в крови реципиентов присутствовали донорские GFP<sup>+</sup> лейкоциты и тромбоциты. Эти клетки сохранялись в организме вплоть до смерти животного (от 4 до 12 месяцев после трансплантации КМ). В селезенке таких животных уже на 5 сутки после трансплантации обнаруживались лимфоидные колонии GFP<sup>+</sup> клеток, а также расположенные на поверхности органа фибробластоподобные клетки донора. Через 2 недели после трансплантации морфология селезенки реципиентов не отличалась от таковой GFP<sup>+</sup> доноров. Количество GFP<sup>+</sup> клеток (в процентах) в это время в селезенке и КМ приближалось к количеству этих клеток у интактных GFP<sup>+</sup> мышей.

В кишечнике на 14 сутки после трансплантации выявлялась сосудистая сеть и единичные Пейеровы бляшки, состоящие из GFP<sup>+</sup> клеток донора. К концу исследуемого периода уже наблюдаются многочисленные Пейеровы бляшки и яркая ячеистая структура основания ворсин.

Т.к. после облучения происходит почти полная инволюция тимуса, именно применение GFP<sup>+</sup> мышей в качестве доноров КМ позволяет анализировать такие процессы как адгезия и миграция клеток к доле тимуса на самых ранних стадиях развития органа. Гистологическое строение тимуса после трансплантации как свежeweделенных, так и криоконсервированных клеток КМ доноров начинало заметно восстанавливаться уже к 14 суткам. Тем не менее, восстановление тимуса происходило медленнее, чем КМ и селезенки. Было также показано, что при изменении режима замораживания (уменьшении времени охлаждения) донорского КМ у облученных реципиентов тимус не восстанавливался, а в КМ и селезенке восстановление происходило в меньшей степени и не достигало уровня восстановления органов мышей, которым трансплантировали свежeweделенный КМ.

Таким образом, проведенные исследования показали, что криоконсервированный по указанной методике КМ оказался достаточно эффективным для гистогенеза исследованных органов у облученных мышей и может быть применим в клеточной терапии при аутотрансплантации пациентам.

1. Карнаухов А.В. и др. Информационная модель старения: основные факторы, определяющие продолжительность жизни // Биофизика 2017. Том 62, вып. 5. С. 1008.
2. Сергиевич Л.А. и др. Исследование регенеративного потенциала клеток костного мозга мышей-доноров, несущих ген *egfp*, у облученных мышей // Биофизика 2018. Том 63, вып. 1. С. 115.
3. Сергиевич Л.А. Влияние криоконсервирования клеток костного мозга мышей-доноров, несущих ген *egfp*, на продолжительность жизни мышей при сингенной трансплантации // Биофизика 2018. Т63, вып.3. С. 517.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТЕ

### THE STUDY OF THE CONDITION AND DISTRIBUTION OF HEMOGLOBIN IN RED BLOOD CELLS

**Максимов Г.В., Слатинская О.В., Паршина Е.Ю., Тхор Е.С., Лулева О.Г., Юсипович А.И., Браже Н.А.**

ФГАОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»,

Москва, ул. Ленинские горы 1 стр. 12, 119892, gmaksimov@mail.ru

Исследованы молекулярно-клеточные свойства эритроцитов, важные для осуществления их кислород-транспортной функции. Установлено, что диффузия молекул кислорода и оксида азота через плазматическую мембрану эритроцита зависит от упорядоченности жирнокислотных хвостов фосфолипидов плазматической мембраны и состояния цитоскелета эритроцита, а способность гемоглобина (Гб) связывать и сбрасывать эти молекулы — от его локализации в примембранной области и цитоплазме клетки. В частности, об этом свидетельствуют данные о различном состоянии конформации гема и глобина Гб в различных областях эритроцита.

В настоящее время широко обсуждается вопрос о роли структурных изменений цитоплазмы («краудинг») в регуляции объема и гемодинамики эритроцитов в сосудах. В связи с этим, на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова был разработан подход оценки состояния эритроцитов *in vitro*, с использованием таких методов, как спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), и ее разновидности гигантской КР (ГКР), атомно-силовой микроскопии (АСМ) и лазерной интерференционной

микроскопии (ЛИМ), электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), а также ряд стандартных биохимических методов.

С помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что при изменении объема эритроцита, меняется нанорельеф поверхности плазматической мембраны клетки (оцениваемый по величине шероховатости) с образованием глобулярных структур 40-50 и 1-2 нм. Вероятно, объем-зависимые изменения рельефа мембраны эритроцитов обусловлены реорганизацией спектрин-актиновой сети, способствующей изменению активности ряда ионных переносчиков (например,  $K^+$ ,  $Cl^-$  котранспортера), а также преинкубацией эритроцитов при 50°C.

Методом ГКР было показано, что в присутствии наночастиц серебра можно существенно усилить КР гемопорфирина, от гемоглобина в примембранной области клетки. Установлено, что кислород-связывающие свойства интактных эритроцитов и конформация гемов в молекулах примембранного и цитоплазматического Гб существенно отличаются. Предполагается, что изменение  $O_2$ -связывающих свойств примембранного Гб играет роль при насыщении эритроцита  $O_2$ .

Методом спектроскопии КР установлено, что изменения симметричных колебаний молекулярных связей -С-Н- метиленовых групп аминокислот и пиррольных колец гема Гб (в отличие от конформации глобина и величины поверхностного заряда эритроцита) характеризуются различной динамикой в диапазонах 20–38°C (при этих условиях мембрана клетки находится в жидком состоянии), но не коррелируют с удельной растворимостью  $O_2$  раствора при изменении температуры. Дальнейшее увеличение температуры может приводить к разрушению цитоскелета и изменению конформации Гб, связанной с олигомеризацией молекул Гб, которая также зависит от температуры инкубации эритроцитов.

По мнению авторов, изменения объема или активация рецепторов эритроцита стимулирует процессы изменения конформации в белковых молекулах как в мембране (при изменении вязкости), так и примембранного и цитоплазматического гемоглобина, связанного с цитоскелетом и упорядоченностью гемоглобина в цитоплазме, что способствует эффективному перераспределению кислорода в эритроците.

## **ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ**

### **THE EFFECT OF ADDING CHOLESTEROL TO THE CRYOPROTECTOR ON THE SURVIVAL OF SPERMATOOA AFTER CRYOPRESERVATION**

*Смоленцева Д.А.<sup>1</sup>, Миронова А.Г.<sup>2</sup>, Симоненко Е.Ю.<sup>1</sup>, Сыбачин А.В.<sup>3</sup>, Яковенко С.А.<sup>1</sup>*

1 - Физический факультет Московского государственного университета им.М.В.Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.2, ksimonenko@inbox.ru

2 – Институт химической физики им. Н.Н. Семенова 119334, Москва, ул. Косыгина, д.4

3 –Химический факультет МГУ им.М.В.Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.3

В настоящее время все более широкое применение находят методы криобиологии, поскольку криоконсервация является надежным способом сохранения биологических объектов. Несмотря на применение специальных сред, криопротекторов, предохраняющих клетки от гибели, неизбежно происходят процессы, негативно влияющие на клетки, такие как образование кристаллов льда, осмотический шок, апоптоз, вызванный низкими температурами во время заморозки-разморозки. Одним из наиболее подверженных повреждениям при криоконсервации компонентов клетки является плазматическая мембрана. При фазовом переходе жидкий кристалл-гель пластичность и текучесть мембраны резко уменьшаются, а вязкость увеличивается и, как следствие, изменяется проницаемость мембраны для ионов, что приводит к сдвигу рН, появлению градиента осмотического давления, что приводит к стремительной дегидратации клетки [1]. Современные криопротекторы состоят из нескольких компонент: проникающих в клетку (глицерин, ДМСО), а также непроницающих (белки, дисахариды), однако, существующие комплексные криопротектанты чаще всего не содержат веществ, направленных на стабилизацию мембран. В связи с этим и выживаемость некоторых типов клеток, таких как сперматозоиды, после криоконсервации остается на невысоком уровне (около 50%). Одним из наиболее эффективных методов, описанных в литературе на клетках животных и в наших ранних работах, является модификация криопротектантов суспензией яичного желтка. Однако для криоконсервации гамет человека применение сред, имеющих животное происхождение, нежелательно. Поэтому целью работы была разработка модификации существующего комплексного криопротектанта компонентом яичного желтка холестерином и определение влияния холестерина на выживаемость сперматозоидов после криоконсервации.

В работе было предложено три различных механизма модификации криопротектора SpermFreeze холестерином. В начале были разработаны протоколы модификации криопротектора холестерином в различных неполярных растворителях, таких как н-октан, декан и до-декан. Были проведены тесты на цитотоксичность данных веществ, исходя из которых, октан был выбран для дальнейшей работы в качестве растворителя холестерина. На основании серии экспериментов было показано, что данный способ

модификации не является эффективным, выживаемость клеток не улучшается, при этом  $n$ -октан все же проявляет цитотоксичность. Поэтому был предложен способ доставки холестерина в мембраны клеток с помощью циклодекстринов [2] и липосом. В экспериментах использовались гидроксипропил-бета-циклодекстрины, комплексы циклодекстрин-холестерин и липосомы из лецитина с холестерином. Все соединения оказались нетоксичными для клеток. Криоконсервация сперматозоидов со всеми комплексами показала, что только комплексы циклодекстрин-холестерин дали положительный эффект и улучшили показатели подвижности сперматозоидов по сравнению с коммерческим криопротектором. Стоит отметить, что «пустые» циклодекстрины, не находящиеся в комплексе с холестерином, не дали положительного результата, что свидетельствует о том, что именно холестерин, а не сами циклодекстрины, обладает криопротекторными свойствами. Для подтверждения встраивания холестерина в мембрану, был использован тест Либермана-Бурхарда. Нами была построена калибровочная прямая для определения концентрации холестерина этим методом. С помощью метода Либермана-Бурхарда, по поглощению света с длиной волны  $\lambda=650$  нм в работе были определены концентрации холестерина в контрольных сперматозоидах без инкубации и сперматозоидов, инкубированных с комплексами циклодекстрин-холестерин.

В результате работы было показано, что при модификации криопротектора комплексами циклодекстрин-холестерин, повышается эффективность криоконсервации, а доля подвижных клеток после заморозки увеличивается на 14%. При этом содержание холестерина в мембранах сперматозоидов при их инкубации с данными комплексами с концентрациями 2 мг/мл увеличивается с  $30,5 \pm 3$  нмоль/(20 млн клеток) до  $95 \pm 3$  нмоль/(20 млн клеток).

1. Quinn, P. J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions// Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1989, 21(1), 3–19.
2. Christian A.E., Haynes M.P., Phillips M.C., Rothblat G.H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content// J Lipid Res., 1997, 38(11), 2264-72.

## **ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОДУКТОВ ОМЕГА-ОКИСЛЕНИЯ ПАЛЬМИТИНОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ИСКУССТВЕННЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН**

### **STUDYING OF THE EFFECT OF OMEGA OXIDATION PRODUCTS OF PALMITIC ACID ON THE PERMEABILITY OF BIOLOGICAL AND ARTIFICIAL LIPID MEMBRANES**

*А. Е. Степанова, В. Н. Самарцев, Белослудцев К.Н., М.В. Дубинин*  
Марийский государственный университет, 424001, Йошкар-Ола, пл. Ленина, 1  
*lady.stepanova2010@yandex.ru*

Одним из минорных путей метаболизма монокарбоновых жирных кислот у млекопитающих и человека является их  $\omega$ -окисление, происходящее, главным образом, в клетках печени и почек и приводящее к образованию соответствующих  $\alpha, \omega$ -дикарбоновых кислот. При некоторых патологических состояниях, когда активность основных путей метаболизма жирных кислот (прежде всего,  $\beta$ -окисление жирных кислот в митохондриях) недостаточна,  $\omega$ -окисление становится намного более интенсивным. В нормальных физиологических условиях только 5 – 10% свободных жирных кислот метаболизируется по пути  $\omega$ -окисления. Это сопровождается накоплением конечных продуктов этого процесса  $\alpha, \omega$ -дикарбоновых кислот, а также промежуточных метаболитов  $\omega$ -гидроксикарбоновых кислот в крови и клетках. Показано, что насыщенные кислоты разной структуры в присутствии  $Ca^{2+}$  могут оказывать детергентное, пертурбирующее и протонифорное действие при взаимодействии с биологическими и искусственными мембранами.

Целью настоящей работы являлось изучение молекулярного механизма действия одного из продуктов  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты, а именно  $\omega$ -гидроксипальмитиновой кислоты (ГПК) как индуктора  $Ca^{2+}$ -зависимой пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий, цитоплазматической мембраны эритроцитов и искусственной мембраны липосом.

В результате проведенной работы нами установлено, что  $\omega$ -гидроксипальмитиновая кислота способна индуцировать агрегацию  $Ca^{2+}$ -нагруженных митохондрий печени, которая сопровождается пермеабилзацией внутренней мембраны органелл. Такая пермеабилзация сопровождается снижением мембранного потенциала органелл, окислением пула NAD(P)H и выходом проапоптотического белка цитохрома *c* из органелл.

Кроме того, в настоящей работе нами установлено, что ГПК индуцирует массивную  $Ca^{2+}$ -зависимую агрегацию эритроцитов в суспензии, что сопровождается образованием различных дефектов мембраны и снижением количества одиночных клеток в суспензии, а также выходом ионов калия из клеток, что свидетельствует о пермеабилзации мембраны эритроцитов.

Чтобы проверить нашу гипотезу о механизме действия ГПК как индуктора  $Ca^{2+}$ -зависимой агрегации митохондрий и эритроцитов, нами изучено влияние указанных продуктов  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты на лецитиновые липосомы. В отсутствие  $Ca^{2+}$  ГПК не влияла на размер липосом. Однако добавление  $Ca^{2+}$  к

липосомам, содержащим эту кислоту, приводило к значительному увеличению диаметра (до 1990 нм). Это указывает на то, что в присутствии ГПК и  $\text{Ca}^{2+}$  происходят динамические процессы, которые приводят к изменению размера липосом, которое может быть вызвано агрегацией везикул.

Учитывая схожесть эффектов указанных кислот на митохондриях, эритроцитах и липосомах нами предположено наличие универсального механизма, лежащего в основе  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабиллизации липидных мембран этими кислотами, который заключается в их агрегации и перестройке липидов мембран.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МК-61.2019.4.

---

## ВЛИЯНИЕ ЦЕРАМИДА НА ПРОЦЕССЫ, СВЯЗАННЫЕ С ГИБЕЛЬЮ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ INFLUENCE OF CERAMIDE ON PROCESSES ASSOCIATED WITH THE DEATH OF NUCLEAR ERYTHROCYTES

*Сюсин И.В., Ревин В.В.*

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Факультет биотехнологии и биологии, кафедра биотехнологии, биоинженерии и биохимии, Саранск, [ilya.sysin@gmail.com](mailto:ilya.sysin@gmail.com)

Важнейшими биологическими эффекторами и регуляторами, участвующими практически во всех физиологических процессах, которые происходят в клетке, в том числе и в регуляции программируемой клеточной гибели, являются липиды. В качестве вторичных мессенджеров они передают внутрь клетки различные внешние сигналы, а также сами могут играть роль межклеточных медиаторов. Известно, что некоторые липиды и их производные играют определенную роль в запуске процессов клеточной гибели. Ключевую роль в развитии программируемой клеточной гибели играет фермент – каспаза-3. При реализации программируемой клеточной гибели данный фермент блокирует передачу сигнала ростовых факторов, а также повышает активность белков-ингибиторов клеточного цикла, что приводит к его остановке.

Класс сфинголипидов является сигнальными молекулами, которые способны контролировать баланс между процессами роста клеток и апоптотической гибелью. Церамид – это основная структурная единица сфинголипидов, которая играет важную роль в активации сигнальных путей гибели клетки, которые запускаются в ответ на стрессовые стимулы, такие как химиотерапевтические агенты, цитокины и ионизирующее излучение. Накопление церамида может происходить благодаря усиленному синтезу *de novo*, однако, в большинстве случаев активируется одна или несколько клеточных сфингомиелиназ, которые гидролизуют сфингомиелин с образованием церамида и фосфотидилхолина. В связи с этим целью работы было исследование влияния церамида на накопление каспазы-3 и морфологические параметры ядерных эритроцитов.

Ядерные эритроциты получали путем центрифугирования цельной крови при 1500g в течение 15 минут. Нагрузку эритроцитов раствором церамида (Sigma, США) проводили путем выдерживания эритроцитов в среде, содержащей  $10^{-3}$  мМ церамида. Инкубацию вели при температуре 40 °С. Анализ накопления каспазы-3 проводили с помощью метода иммуноферментного анализа. Анализ влияния церамида на морфологические характеристики эритроцитов проводили при помощи лазерного интерференционного микроскопа (ЛИМ) МИИ-4М (ВНИИОФИ, Россия).

Полученные результаты показывают, что при наличии церамида в среде инкубирования в концентрации  $10^{-3}$  мМ происходит увеличение концентрации каспазы-3 в начальный момент времени инкубирования и по прошествии 10 минутной инкубации становится больше контрольного значения на 30%. Дальнейшее увеличение времени инкубирования не приводит к увеличению концентрации каспазы-3. С помощью ЛИМ было установлено, что при действии церамида происходит увеличение площади клетки. Также было установлено, что церамид вызывает увеличение оптической разности хода в опытных образцах по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать, о том, что при инкубации эритроцитов с раствором церамида в концентрации  $10^{-3}$  мМ происходит перераспределение внутриклеточных структур клетки и происходит изменение формы эритроцитов.

Таким образом, при действии церамида на эритроциты происходит накопление каспазы-3 и изменение их морфологических характеристик, что может указывать на развитие механизмов, связанных с клеточной гибелью красных кровяных клеток.

## ВЛИЯНИЕ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ И МАГНИТНОГО ИЗОТОПА $^{25}\text{Mg}$ НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЁНОК БАКТЕРИЯМИ

### THE EFFECT OF MAGNETIC FIELDS AND MAGNETIC ISOTOPE $^{25}\text{Mg}$ ON THE FORMATION OF BACTERIA BIOFILMS

*Тихонова Т.А., Летуа У.Г.*

Оренбургский государственный университет, Оренбург, [tta-9@mail.ru](mailto:tta-9@mail.ru)

Образование биопленок – это один из факторов патогенности микроорганизмов, а также процесс, который ведет к значительному изменению их чувствительности к антибактериальным препаратам и внешнему воздействию. Поиск способов управления образованием биопленок, а также нетрудоёмких способов их разрушения – актуальная междисциплинарная задача. В данной работе предлагается использовать магнитный изотоп магния и слабое постоянное магнитное поле в качестве управляющих факторов формирования биопленок. Такой выбор обусловлен способностью магнитного изотопа магния влиять на ферментативные процессы [1], изменять ростовые и биохимические показатели бактерий *E. coli* [2]. Подобные эффекты открывают новые возможности управления ферментативными процессами и, как следствие, основными физиологическими свойствами бактерий, к которым относится образование биопленок. Внешнее постоянное магнитное поле способно усиливать действие магнитного изотопа магния на внутриклеточные процессы [3].

Цель работы – исследовать влияние изотопов магния и постоянных магнитных полей на процесс формирования биопленок. В качестве объекта исследований выбраны грамотрицательные *Escherichia coli* и грамположительные бактерии *Bacillus subtilis*. Образование биопленок оценивалось стандартным фотометрическим методом по степени связывания красителя кристаллического фиолетового. Бактерии образовывали биопленки лучше в том случае, когда культивировались на среде с магнитным изотопом магния  $^{25}\text{Mg}$  по сравнению с немагнитными формами  $^{24,26}\text{Mg}$ . Также стимулирует образование биопленок бактериями *E. coli* совместное влияние магнитного изотопа магния  $^{25}\text{Mg}$  и постоянного магнитного поля диапазона 20-35 мТл. При увеличении постоянного магнитного поля до 80 мТл происходит подавление образования пленок микроорганизмами всех исследуемых групп [4].

1. Buchachenko A.L. Magneto-Biology and Medicine. New York: Nova Science Publishers, 2014. Inc. – 235 p..
2. Letuta, U. G., Berdinskiy, V. L., Magnetosensitivity of bacteria *E. coli*: Magnetic isotope and magnetic field effects // *Bioelectromagnetics*, 2017, no. 38(8), pp. 581-591.
3. Letuta, U. G., Berdinskiy, V. L., Udagawa, Ch., Tanimoto, Y., *Bioelectromagnetics*, 2017, no. 38(7), pp. 511-521.
4. Letuta U.G., Tikhonova T.A. Magnetic fields and magnetic isotope  $^{25}\text{Mg}$  effects on biofilms formation by bacteria *E. coli* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2019, Volume 484, Issue 1, Pages 85-87.

## ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

### PROTECTIVE EFFECT OF DEUTERATED POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ON PEROXIDATION OF LIPID BILAYERS

*А.М. Фирсов<sup>1</sup>, Е.А. Котова<sup>1</sup>, Максим А. Фомич<sup>2</sup>, Андрей В. Бекиш<sup>2</sup>, Ольга Л. Шарко<sup>2</sup>,  
Вадим В. Шманай<sup>2</sup>, Ю.Н. Антоненко<sup>1</sup>, М.С. Щепинов<sup>3</sup>*

1. НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы 1/40, Москва 119991, Россия; факс +7(495)939-3181, электронная почта amfamf@yandex.ru;
2. Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск 220072;
3. Retrotope Inc., Los Altos, CA 94022, USA.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) лежит в основе патогенеза многих заболеваний, среди которых можно выделить атеросклероз, поражение ЦНС (болезни Паркинсона, Альцгеймера и Хантингтона), различные воспалительные процессы и прочие. Для защиты от ПОЛ в системах *in vivo* недавно предложен подход, основанный на использовании значительного изотопного эффекта в скорость-лимитирующей цепной реакции ПОЛ. Для этого предлагается использовать полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), содержащие атомы дейтерия вместо протонов в бис-аллильных положениях (D-ПНЖК), что приводит к эффективному подавлению ПОЛ при неизменности обычных химических свойств жирных кислот. В связи с этим дейтерированные ПНЖК рассматриваются как перспективные терапевтические средства для лечения нейродегенеративных заболеваний. В экспериментальных моделях болезней Паркинсона и Альцгеймера у мышей было продемонстрировано значительное подавление развития симптомов при введении в пищу D-ПНЖК [1,2]. Отметим, что в клетках дрожжей при окислительном стрессе наличие менее 20 % D-ПНЖК от

общего количества ПНЖК приводило к полной остановке ПОЛ [3]. Механизм такого сильного подавления ПОЛ на настоящий момент неясен.

Для выяснения данного механизма мы попытались количественно оценить защитное действие фосфолипидов, содержащих D-ПНЖК, при индукции ПОЛ как по их влиянию на образование диеновых конъюгатов в липосомах, так и по их влиянию на вызванную ПОЛ пермеабиллизацию липосом.

Для получения моноламеллярных липосом нам использован метод экструзии, основанный на продавливании дисперсии липосом через поликарбонатные фильтры на ручном миниэкструдере. Индукция неспецифической утечки (пермеабиллизация) липосом, отражающая нарушение целостности липосомальной мембраны, измерялась по изменению интенсивности флуоресценции липосом, нагруженных флуоресцирующим красителем сульфородаминоном Б [4]. Диеновые конъюгаты, являющиеся первичными продуктами ПОЛ, регистрировали на спектрофотометре по поглощению при 234 нм [5].

В условиях индукции ПОЛ в липосомах оба экспериментальных подхода продемонстрировали значительное протекторное действие D-ПНЖК, для которого характерно наличие концентрационного порога. Обнаружено, что защитное действие зависит от природы D-ПНЖК и определяется, в первую очередь, общим уровнем дейтерированных бис-аллильных (CD<sub>2</sub>) групп в липидном бислое. Получена зависимость порогового содержания (%) D-ПНЖК от вида использованных D-ПНЖК на примере липидов, содержащих остатки дейтерированной линолевой, линоленовой, арахидоновой, эйкозапентаеновой или докозагексаеновой кислоты (около 20-25% для D2-Lin-PC и намного меньше для D10-DHA-PC). Показано соответствие между концентрациями дейтерированных фосфолипидов, эффективными для подавления ПОЛ, и концентрациями, обеспечивающими защиту целостности мембраны. Таким образом, продемонстрирован сильный защитный эффект небольших количеств D-ПНЖК в липосомальных бислоях, ранее описанный в живых системах [6].

1. Shchepinov M.S., et al. Isotopic reinforcement of essential polyunsaturated fatty acids diminishes nigrostriatal degeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Toxicol. Lett.* 207 (2011) 97-103.
2. Raefsky S.M., et al. Deuterated polyunsaturated fatty acids reduce brain lipid peroxidation and hippocampal amyloid  $\beta$ -peptide levels, without discernable behavioral effects in an APP/PS1 mutant transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 66 (2018) 165-176.
3. Hill S., et al. Small amounts of isotopereinforced polyunsaturated fatty acids suppress lipid autoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 893-906.
4. Firsov A.M., et al. Peroxidative permeabilization of liposomes induced by cytochrome c/cardiolipin complex. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 1848 (2015) 767-774.
5. Yamamoto Y., et al. Oxidation of lipids. 7. Oxidation of phosphatidylcholines in homogeneous solution and in water dispersion, *Biochim. Biophys. Acta*, 795 (1984) 332-340.
6. Andreyev A.Y., et al. Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect mitochondria from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 82 (2015) 63-72.

---

## О ВОЗМОЖНОСТИ ГЕНЕРАЦИИ ВЫСОКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ В ВОЗБУДИМЫХ БИОМЕМБРАНАХ

### ABOUT THE POSSIBILITY OF GENERATION OF THE HIGH-FREQUENCY ELECTROMAGNETIC FIELD IN EXCITABLE BIOMEMBRANES

**Фомин Л.Б**

ГБУЗ НО Специализированная кардиохирургическая клиническая больница  
Нижний Новгород, 603950, ул. Ванеева, 209, 8(831)4177790, [ddeejj@yandex.ru](mailto:ddeejj@yandex.ru)

Наряду с использованием канонических дифференциальных уравнений Ходжкина-Хаксли четвертого порядка (и их модификаций), уравнений Зимана третьего порядка для описания и анализа работы возбудимых биомембран (ВБМ) используются уравнения типа Ван-дер-Поля-Дуффинга (ВДПД) второго порядка.

Системы типа ВДПД применяются для удобства анализа движения переменных (в частности, токов и напряжений в ВБМ) и дают хорошее сходство по форме, амплитуде, скважности с реально измеренными параметрами импульсов в ВБМ.

Однако, например, в основополагающей работе Фитц-Хью [1] не указаны временные интервалы в поведении переменных при генерации автоколебаний, а частотные характеристики соответствующей модели типа ВДПД не рассматривались.

В связи с этим, представляется важным рассмотрение диапазона частот колебаний в системе ВДПД в автоколебательном режиме для оценки адекватности модели типа ВДПД к реальным движениям переменных в ВБМ.

Для такого анализа систем ВДПД удобно перейти к схеме замещения типа генератора на туннельном диоде (ГТД), поскольку движения токов и напряжений полностью описывается аналогичными уравнениями.

Частота автоколебаний колебаний зависит от соотношения потерь ( $R$  – сопротивление потерь мембранного перехода), подкачки ( $E$  – мембранная э.д.с.) и величины отрицательного сопротивления на падающем участке вольт-амперной характеристики (ВАХ) туннельного диода, или, иначе, от угла между нагрузочной прямой и касательной к падающему участку ВАХ в точке пересечения.

Рассматривалась аналитически зависимость периода колебаний (в параметрическом пространстве устойчивости), например, от  $R$ , где имеется верхний предел периода  $T_{\max}$ , что соответствует  $\sim 1$  мсек, или  $\sim 1$  кгц.

Таким образом, при работе ГТД (с реальными биофизическими значениями параметров) в пространстве устойчивых автоколебаний частота не может быть ниже  $\sim 1$  кгц и находится в диапазоне  $\sim (1 - 10000)$  кгц.

Это значит, что при работе ВБМ может возбуждаться высокочастотное (ВЧ) электромагнитное поле, которое может оказывать определенное влияние на функционирование живых электрически возбудимых и невозбудимых тканей. Степень такого влияния может быть значительным, т.к. амплитуда соответствующих колебаний  $\sim 1$  мв, т.е. порядка амплитуд кардиограммы сердца.

1. FitzHugh R Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane, Biophysical J., 1961

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТИОННЫХ АНТИСЕПТИКОВ С ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНОЙ

### INVESTIGATION OF CATIONIC ANTISEPTICS INTERACTION WITH BACTERIAL PLASMA MEMBRANE

*Холина Е.Г., Орехов Ф.С.<sup>1</sup>, Коваленко И.Б.<sup>2</sup>, Боздагянн М.Е.<sup>2</sup>, Страховская М.Г.<sup>2</sup>*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, 119992, г. Москва, Ленинские горы, 1-24

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт, Россия, 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

<sup>2</sup>Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, г. Москва, Ореховый бульвар, 28

Антисептики применяются при борьбе с бактериальной инфекцией в клинических условиях, включая гигиену рук и дезинфекцию областей хирургического воздействия и введения катетера. Антисептики предотвращают заражение, уменьшая количество микроорганизмов, тем самым уменьшая распространение патогенов. В настоящее время широкое распространение получило применение катионных антисептиков, которые благодаря наличию положительного заряда взаимодействуют с отрицательно заряженными полисахаридами и молекулами тейхоевой кислоты грамположительных бактерий, липополисахаридами грамотрицательных бактерий, а также непосредственно с плазматической мембраной. Однако основной мишенью действия антисептиков предполагается плазматическая мембрана бактериальной клетки [1].

На примере пиклоксидина нами было показано, что отрицательный поверхностный потенциал бактериальных клеток эффективно нейтрализуется катионными антисептиками, что свидетельствует об эффективном электростатическом связывании положительно заряженных молекул антисептиков с отрицательно заряженными группами молекул клеточных стенок. Также с помощью сканирующей ионно-электронной микроскопии было показано, что катионные антисептики обладают выраженным деструктивным действием на клеточную стенку [2]. Однако даже для хлоргексидина, наиболее изученного из катионных антисептиков, молекулярные механизмы антибактериального действия детально не известны.

Нами были созданы крупно-зернистые модели четырех катионных антисептиков: мирамистина, хлоргексидина, октенидина, пиклоксидина. Силовые параметры валентных взаимодействий для крупно-зернистых моделей были итеративно оптимизированы на основе полученной полноатомной молекулярно-динамической траектории в силовом поле GROMOS54a7 в течение 100 нс. Для исследования агрегационной способности антисептиков для каждой из построенных крупно-зернистых моделей была проведена молекулярно-динамическая симуляция в течение одной микросекунды. На основе проведенного моделирования было выявлено, что при концентрациях, используемых в медицинских препаратах (0.05-0.15%), хлоргексидин и пиклоксидин находятся в виде мономеров. Для мирамистина и октенидина, обладающих выраженными гидрофобными участками в молекулах, показано образование мицеллоподобных структур при концентрациях в 3 раза выше применяемых в медицине.

Было рассмотрено взаимодействие катионных антисептиков с бактериальной плазматической мембраной состава POPE:POPG 180:60 при различных концентрациях (антисептик:липиды 1:24, 1:8, 1:4). Крупно-зернистое молекулярно-динамическое моделирование для систем с соотношением антисептик:липиды 1:24, 1:8 проводилось в течение 3 микросекунд, для систем с соотношением 1:4 - в течение 30 микросекунд. Температура (303.15 К) и давление (1 бар) поддерживались постоянными с использованием термостата Нозе-Хувера и баростата Парринелло-Рамана, шаг интегрирования составил 20 фс. На основе проведенных расчетов для мембраны в присутствии антисептиков были оценены профили распределения плотностей, параметры



порядка, толщина бислоя, площадь, приходящаяся на липид. Было показано, что благодаря наличию положительного заряда молекулы антисептиков эффективно встраиваются в бактериальную плазматическую мембрану, несущую отрицательные заряды, и их положительно-заряженные частицы локализируются в области остатков фосфатов, при этом терминальные части молекул антисептиков располагаются в области жирно-кислотных остатков липидов. Все рассмотренные антисептики, за исключением мирамистина, при увеличении концентрации снижают параметр порядка для каждой из связей в жирно-кислотных остатках липидов. Однако наиболее выраженным эффектом из исследуемых антисептиков обладает октенидин, для которого показано наиболее значительное изменение площади на липид и толщины бислоя.

1. Gilbert, P., & Moore, L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet // Journal of applied microbiology, 2005, vol. 99, № 4, p. 703-715.
2. Халатян А.С., Будзинская М.В., Холина Е.Г., Страховская М.Г., Шевлягина Н.В., Жуховицкий В.Г. Бактерицидное действие пиклоксидина на штаммы *Staphylococcus epidermidis*, выделенные с конъюнктивы на фоне интравитреальных инъекций // "Современные технологии в офтальмологии": "Современные технологии лечения витреоретинальной патологии", 2019, № 1, с. 315-320.

### ОСОБЕННОСТИ АДсорбЦИИ ПОЛИЛИЗИНА НА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ АНИОННОГО ЛИПИДА И ДЛИНЫ ПОЛИМЕРА

#### ADSORPTION OF POLYLYSINES OF VARIOUS LENGTHS ONTO LIPID MEMBRANES WITH DIFFEREND ANIONIC LIPID CONTENT

*Хомич Д.А., Нестеренко А.М.<sup>1</sup>, Молотковский Р.Ю.<sup>2</sup>, Галимзянов Т.Р.<sup>2,3</sup>, Ермаков Ю.А.<sup>2</sup>*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

<sup>1</sup>Институт Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Москва

<sup>3</sup>Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

Изучение особенностей адсорбции положительно заряженных полимеров на бислойные липидные мембраны представляет большой интерес, так как полимер-мембранное взаимодействие имеет множество биомедицинских приложений. Ранее было показано, что адсорбция различных катионов приводит к изменению граничного потенциала мембраны и сама по себе происходит неравномерно, демонстрируя нетривиальную зависимость как от содержания отрицательно заряженного липида, так и от длины поликатионов [1].

Нами были проведены электрокинетические измерения на суспензиях липосом, состоящих из нейтральных (фосфатидилхолин, ФХ) и анионных (кардиолипин, КЛ) фосфолипидов. Данные эксперименты обычно описываются в рамках теории Смолуховского, а результаты представляют в виде  $\zeta$ -потенциала – величины, которая зависит как от потенциала на поверхности, так и от гидродинамических свойств этой поверхности. В ходе исследования мы добавляли к суспензии липосом фиксированного состава молекулы  $\alpha$ -поли-L-лизина (ПЛ) и обнаружили, что до определенной концентрации они адсорбируются необратимо. При этом адсорбция происходит неравномерно, заметны кооперативные эффекты которые проявляются различным образом в зависимости от длины адсорбируемого полимера. Для описания наблюдаемых экспериментальных феноменов мы привлекли как аналитические выкладки, так и методы молекулярной динамики (МД). В частности, для количественного анализа таких характеристик адсорбционного слоя ПЛ как латеральное распределение и геометрия липид-полимерных кластеров и их влияние на положение плоскости скольжения, а также распределение электрического потенциала вблизи поверхности мембраны. Методы МД успешно применялись нами ранее для оценки зависимости  $\zeta$ -потенциала от концентрации адсорбирующихся катионов [2]. В результате анализа данных МД было обнаружено, что вне зависимости от длины полимера толщина адсорбированного слоя, который он формирует, не может быть меньше пяти ангстрем. Кроме того, при низком содержании КЛ в мембране молекулы ПЛ способны связываться с ней электростатически одним концом, другой экспонируя в раствор. За счет этого к мембране может присоединиться намного больше положительно заряженных групп полимера, чем есть на поверхности анионных групп липидов. Как следствие, в таких системах возможна существенная перезарядка поверхности мембраны.

Уточнив в вычислительном эксперименте, как происходит процесс заполнения молекулами полипептида поверхности мембраны из цвиттерионных и анионных фосфолипидов, мы получили возможность разработать достаточно точную математическую модель, описывающую геометрические параметры заполнения поверхности липидной мембраны молекулами ПЛ различной длины. Два варианта модели использовались для описания экспериментальных данных: без и с учетом геометрии адсорбции. В варианте без учета геометрии ( $\Gamma$ -0) мы предполагали, что полимер изменяет поверхностный заряд мембраны на величину, равную количеству адсорбированных мономеров ПЛ. В варианте модели, учитывающей геометрию системы ( $\Gamma$ -1), мы опирались на разработанную ранее модель полимерных кластеров [3].  $\Gamma$ -1 учитывала, как смещение плоскости скольжения в

направлении от поверхности, так и агрегацию анионных липидов под полимерными кластерами. И модель Г-0 и модель Г-1 позволяли подобрать параметры таким образом, чтобы описывать экспериментальные данные, полученные на суспензии липосом. Однако в результате описания в рамках модели Г-0 оказывалось, что количество адсорбированных мономеров всегда лишь незначительно превышает количество анионных групп поверхности. Такой результат совершенно не согласуется с данными МД, которые предсказывают возможность адсорбции значительно большего, чем количество анионных групп, количества мономеров ПЛ. В то же время модель Г-1 предсказывает, что в мембранах с низким содержанием КЛ, количество мономеров ПЛ в насыщении может в несколько раз превышать количество анионных групп. Таким образом, учет геометрии адсорбции является *необходимым* для интерпретации результатов электрокинетических измерений при адсорбции поликатионов.

Работа поддержана грантами РФФИ (19-04-00242а, 18-34-00574 мол\_а), а также стипендией президента РФ. Расчеты производились на вычислительных мощностях сектора Биофизики и информатики сложных систем кафедры биофизики биологического ф-та МГУ.

1. Finogenova O.A. et al. Electrostatic effects upon adsorption and desorption of polylysines on the surface of lipid membranes of different composition // Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2008. Vol. 2. P. 181–188.
2. Khomich D.A. et al. Independent adsorption of monovalent cations and cationic polymers at PE/PG lipid membranes // J. Phys. Conf. Ser. 2017. Vol. 794. P. 012010.
3. Molotkovsky R.J., Galimzyanov T. R., Ermakov Yu. A. Polypeptides on the Surface of Lipid Membranes. Theoretical Analysis of Electrokinetic Data // Colloid Journal. 2019. Vol. 81. P. 125–135

### **ВЛИЯНИЕ ИФР-1 НА ФОСФОИНОЗИТИДНЫЙ СОСТАВ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ**

### **EFFECT OF IGF-1 ON THE PHOSPHOINOSITIDE COMPOSITION OF THE SEAT OF THE RAT'S NERVE DURING REGENERATION**

*Чудайкина Е.В., Ревина Э.С., Пиняев С.И.*

Национальный исследовательский Мордовский Государственный Университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск

Одной из важнейших задач нейробиологии является исследование механизмов регенерации и поиск физиологических активных соединений, ускоряющих эти процессы в соматических нервах. Одним из перспективных соединений является инсулиноподобный фактор роста. Известно, что эффект ИФР-1 реализуется через рецептор ИФР 1-го типа (ИФР-1R), передаются сигналы в клетку, за счет чего в ней регулируются множественные метаболические процессы.

Цель данного исследования – роль ИФР-1 в регуляции количества фосфоинозитидов в седалищном нерве крысы при повреждении. Объектом исследования служили седалищные нервы белых крыс линии Wistar.

Установлено, что при перерезке нерва изменяется концентрация всех фракций фосфоинозитидов, причем эти изменения продолжают в течение всех исследованных временных интервалов эксперимента. Количество фосфоинозитидов возрастает в течение 7 суток после перерезки нерва. Затем начинается снижение концентрации, которое продолжается до 28 суток.

Уменьшение количества фосфоинозитидов после 7 суток в дистальном отделе перерезанного нерва идет более интенсивно, чем в проксимальном. К концу эксперимента их содержание осталось увеличенным по отношению к контролю на 30% в проксимальном, и на 20% в дистальном отделе. ИФР-1 влияет на изменение количества фосфоинозитидов в травмированном нерве. Под его влиянием восстановление количества фосфоинозитидов происходит более интенсивно. Причём, этот процесс проходит быстрее в проксимальном участке. Таким образом, ИФР-1 стимулирует процессы восстановления количества фосфоинозитидов, являясь ключевым звеном в регуляции внутриклеточных метаболических процессов.

## МЕХАНИЗМ АГРЕГАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ

## MECHANISM OF RED BLOOD CELL AGGREGATION

*Шереметьев Ю.А., Левин Г.Я.*

ФГБОУ Приволжский исследовательский медицинский университет, МЗ РФ  
603155, Нижний Новгород, Верхневолжская наб. 18/1  
Тел.: +8 (831)436-21-80; Факс: +8(831)432-21-58; e-mail: ya.sher777@rambler.ru

За последнее десятилетие изучению механизмов агрегации эритроцитов посвящены многочисленные исследования. Однако до настоящего времени не существует единого взгляда на причины, приводящие к объединению эритроцитов в агрегаты.

Известно, что процесс агрегации эритроцитов определяются двумя типами биофизических и физико-химических факторов: свойствами плазмы крови и свойствами самих эритроцитов (главным образом компонентами мембран). В настоящее время предложены две модели механизма агрегации эритроцитов: «мостиковая» теория и теория истощенного слоя. Согласно мостиковой модели, объединение клеток в агрегаты происходит, когда макромолекулы образуют мостики между мембранами соседних клеток. Согласно модели истощенного слоя, эритроциты объединяются в агрегаты за счет того, что вблизи клеточной поверхности в сравнении с объемной фазой образуется истощенный по макромолекулам (белкам или полимерам) слой. Это приводит к возникновению осмотического градиента, способствующему сближению и взаимодействию клеток. Проведенными нами исследованиями показано, что эритроциты, имеющие эхиноцитарную форму, не агрегируют в аутологичной плазме крови и в среде, содержащей высокомолекулярные полимеры. В качестве полимеров использовали декстран 70 и поливинилпирролидон 360 кДа. Показано, что нормальные эритроциты, фиксированные глутаровым альдегидом, не агрегируют в аутологичной плазме и под влиянием полимеров. В тоже время фиксированные глутаровым альдегидом стоматоциты I агрегируют в аутологичной плазме и в растворе высокомолекулярных полимеров. Установлено, что напряжение сдвига (shear stress) стимулирует образование стоматоцитов I.

Известно, что фосфатидная кислота индуцирует образование стоматоцитарных форм эритроцитов и их агрегацию [1]. Фосфатидная кислота образуется в эритроцитах после активации фосфолипазы D и гидролиза фосфатидилхолина [2].

Исходя из наших данных и анализа современной литературы нами выдвинута рабочая гипотеза механизма агрегации эритроцитов которая включает активацию их фосфолипазы D под влиянием сдвигающего напряжения, что приводит к гидролизу фосфатидилхолина с образованием фосфатидной кислоты. В свою очередь фосфатидная кислота приводит к образованию стоматоцитов I и кластеризации в мембранах интегральных белков (рецепторов). Дальнейшее неспецифическое связывание белков плазмы крови, таких как фибриноген и  $\alpha_2$  - макроглобулин, и полимеров с дискретными областями рецепторов эритроцитов приводит к их агрегации.

Исходя из нашей гипотезы механизма агрегации эритроцитов можно объяснить отсутствие агрегации эритроцитов у быков и коров. Связано это с отсутствием в мембранах их эритроцитов фосфатидилхолина и невозможностью образования стоматоцитарных форм. Высокое же содержание фосфатидилхолина в эритроцитах лошади определяет и более высокую способность их к агрегации по сравнению с эритроцитами человека.

1. Noh J-Y et al. Procoagulant and prothrombic activation of human erythrocytes by phosphatidic acid // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010. V.299. H.347- H.355.

2. Butikofer P et al. Generation of phosphatidic acid during calcium-loading of human erythrocytes. Evidence for a phosphatidylcholine hydrolyzing phospholipase D // Eur. J. Biochem. 1993. V.213. P.367-375.

**УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ НЕЙРОНОВ ПОСЛЕ МОДЕЛИРУЕМОГО ЭПИЗОДА ОСТРОГО КИСЛОРОДНОГО ГОЛОДАНИЯ IN VITRO**

**ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION OF INTRACELLULAR CONTACTS OF NEURONS AFTER MODELED ACUTE OXYGEN STARVATION IN VITRO**

***Широква О.М.<sup>1</sup>, Мищенко Т.А.<sup>1,2</sup>, Мухина И.В.<sup>1,2</sup>, Ведунова М.В.<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>- ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> - Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*shirokovaom@gmail.com*

Исследования последних нескольких десятилетий продемонстрировали, что эндоплазматический ретикулум (ЭР) и митохондрии морфологически и функционально связаны с формированием соединений, называемых мембранами, ассоциированных с митохондриями или митохондрия-эндоплазматическими ретикулярными контактами (МЭРК). Целью работы являлось изучение ультраструктурных особенностей митохондрия-эндоплазматических контактов (МЭРК) и межмитохондриальных контактов (ММК) в структурных отделах нейронов при гипоксическом воздействии *in vitro*.

Объектом исследования служили первичные культуры гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей. Острую нормобарическую гипоксию моделировали на 21 день культивирования диссоциированных клеток гиппокампа путем замены культуральной среды на среду с низким уровнем содержания кислорода в течение 10 минут. Фиксацию культур проводили через 24 часа после гипоксического воздействия. Ультраструктурный анализ проводили с использованием просвечивающей электронной микроскопии. Ультратонкие срезы получали на ультратоме Leica EM UC7 (Leica, Германия) и анализировались на электронном микроскопе Morgagni 268D (FIE, Нидерланды).

В результате проведенных исследований было показано, что острое кислородное голодание *in vitro* приводит к значимому увеличению количества митохондрий, связанных с ЭР во всех структурных частях нейронов. Наиболее выраженные изменения наблюдались в клеточных телах. Незначительное увеличение количества митохондрий, взаимодействующих с ЭР, визуализировалось в аксонах. В аксонах же наблюдается исходно меньшее количество (на 20%) таких внутриклеточных контактов по сравнению с телами нейронов. Несмотря на то, что в телах нейронов после нормобарической гипоксии на 21 день культивирования количество МЭРК возрастает, чем в интактных клетках, их протяженность в группе «Нормоксия» значительно выше, чем в группе «Гипоксия». Схожая тенденция отмечена в нейрональных отростках, однако снижение протяженности статистически не достоверно.

Известно, что в условиях нехватки кислорода в первую очередь страдают такие органеллы как митохондрии. При гипоксии происходят изменения внутренней структуры митохондрий, их свойства к делению, слиянию, движению. Поскольку данные свойства контролируются МЭРК, следует предположить, что в пространственной организации митохондриона тоже могут произойти изменения. Однако, помимо процессов слияния и деления митохондрии могут взаимодействовать друг с другом посредством межмитохондриальных контактов (ММК). Считается, что межмитохондриальные контакты позволяют обмениваться содержимым матрикса митохондрий. Острая нормобарическая гипоксия приводит к снижению количества таких контактов на 47 % в телах нейронов, таким образом, митохондриальная сеть распадается на отдельные митохондрии. Схожие изменения в группе «Гипоксия» наблюдались в дендритных отростках. В аксональных отростках, в которых межмитохондриальных контактов исходно намного меньше на 49% по сравнению с телами нейронов, наблюдается обратная зависимость: гипоксия вызывает незначительное увеличение количества взаимодействующих между собой митохондрий. Кроме количества митохондрий, участвующих в организации митохондриальной сети при гипоксии изменялся и такой параметр межмитохондриальных контактов, как протяженность. В телах нейронов протяженность ММК снижалась в среднем на 10%. В нейрональных отростках достоверных изменений протяженности не зарегистрировано.

Общая способность митохондрий к организации межорганелльных контактов значимо не изменялась. Поверхность митохондрий, занимаемая внутриклеточными контактами (ВВК), снижается при воздействии кислородного голодания в телах и дендритах. Количество самих митохондрий, имеющих ВВК, не изменяется во всех частях нейронов.

Таким образом, митохондриальные внутриклеточные контакты в различных частях нейронов обладают различной чувствительностью к кислородному голоданию.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (гранты №17-04-01128, 18-015-00391, 18-315-20003), гранта Президента РФ МК-1485.2019.4, а также при поддержке государственного задания (проекты 17.3335.2017/4.6 и 6.6379.2017/8.9).

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИЛЬНОЗАРЯЖЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ С МЕМБРАНОЙ ЭРИТРОЦИТОВ INTERACTION OF HIGHLY CHARGED NANOPARTICLES WITH ERYTHROCYTE MEMBRANE**

*Шляпникова Е.А., Канев И.Л., Шляпников Ю.М., Морозов В.Н.*

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино  
shlyapnikova@rambler.ru

Используемые в качестве лекарственного средства, вдыхаемые аэрозольные частицы, прежде чем достичь легочного эпителия, должны сначала проникнуть через слой лёгочного сурфактанта. Ранее мы показали [1], что высокозаряженные частицы диаметром 20–200 нм. образующиеся при электрораспылении растворов различных веществ (глюкозы, белков, ДНК и др.), способны пробивать монослой ДПФХ и лёгочного сурфактанта-БЛ с переносом части липидных молекул в субфазу. В данной работе исследовано проникновение таких заряженных наночастиц через клеточную мембрану эритроцитов человека, находящихся в условиях частичного обезвоживания для моделирования поверхности легочных альвеол. Ожидалось, что удастся подобрать условия для внедрения в клетки материала распыляемого вещества. Эритроциты наносили в количестве, достаточном для образования монослоя, на трековую мембрану (ООО «Реатрек-Фильтр») с размером пор 400 нм. Перед нанесением суспензии клеток мембрану помещали на поверхность физиологического раствора и герметически закрепляли в специально изготовленной кювете. Электрораспыление проводили при отрицательном давлении - 3 см вод. ст., приложенном к раствору под мембраной, при котором часть поверхности клеток была экспонирована на воздух. Необратимое повреждение мембраны эритроцитов, приводящее к гемолизу клеток, регистрировали спектрофотометрически по значению оптической плотности на полосе Соре гемоглобина в растворе, находящимся под фильтром. Оставшиеся на фильтре целые эритроциты смывали водой и также измеряли концентрацию получившегося в ходе лизиса гемоглобина. Таким образом определяли долю повреждённых при взаимодействии с заряженными наночастицами клеток. Показано, что электрораспыление растворов глюкозы и ФИТЦ-БСА с концентрацией 1% и 0.1%, соответственно, в течение 15 мин приводит к необратимому нарушению мембраны у 50-70% эритроцитов. При этом в оставшихся неповреждёнными клетках флуоресцентная метка не обнаруживается. Это означает, что высокозаряженные наночастицы этих веществ пробивают мембрану клеток и оставляют в ней поры, не способные затянуться за время эксперимента.

Работа поддержана грантом РФФИ-офиМ №15-29-01180.

Сокращения:

ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин,

ФИТЦ-БСА – бычий сывороточный альбумин, меченный флуоресцеинизотиоцианатом.

1. Morozov V.N., Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Shlyapnikova E.A. Ballistic penetration of highly charged nanoaerosol particles through a lipid monolayer. // *Langmuir*, 2017, v.33 (32), p.7829-7837.

## **ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В МОНОСЛОЯХ ФОСФОЛИПИДОВ РАЗЛИЧНОЙ ХИРАЛЬНОСТИ: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ПРЕДБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ**

## **PHASE TRANSITIONS IN MONOLAYERS OF LIPIDS OF DIFFERENT CHIRALITY: POSSIBLE ROLE IN PREBIOLOGICAL EVOLUTION**

*Яковенко Л.В., Генералов Е.А., Муртазина А.Р.*

МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, yakovenko.lv@physics.msu.ru

Одним из важных вопросов теоретической биологии и биофизики является вопрос о возникновении так называемой хиральной чистоты биосферы. При этом, как правило, рассматриваются структуры и биосинтез белков и нуклеиновых кислот, а хиральность липидов остается вне поля зрения. Тем не менее, хиральность липидов могла быть важным фактором на ранних стадиях предбиологической эволюции, повлиявшим на, если не определившим, отбор хиральных стереоизомеров более сложных соединений. Основными соединениями, из которых образовались сложные органические молекулы в предбиологическую эпоху, то есть около 3,8 млрд. лет назад, были вода, водород, метан, угарный газ, углекислый газ, азот и аммиак. Из них легко образовывались формальдегид, циановодород и цианамид [1]. Синтез углеводородов по схеме Фишера-Тропша может идти при высокой температуре, освещении ультрафиолетом, электрическим разрядом. Молекулы амфифилов гораздо проще аминокислот и НК, синтезируются легче, а деградируют медленнее. При низких концентрациях органики в присутствии воды амфифилы должны были бы быть основной фракцией растворенной органики в океане. Амфифилы адсорбируются на любые поверхности, поэтому образуются области с повышенной их

концентрацией. При высыхании и повторном размачивании слоев амфифилов образуются дисперсии. Структуры частиц – разные, но среди них всегда будут бислойные и многослойные везикулы и мицеллы. При капельном уносе с поверхности океана образуются липид-содержащие аэрозоли, которые могли дать начало примитивным липосомам – прообразам протоклеток [2].

Существует несколько сценариев возникновения протоклеток, но во всех случаях у протоклеток должна быть мембрана. При абиогенном синтезе фосфолипидов L- и D-формы образуются в равных концентрациях. Однако в мембраны современных клеток «хирально чисты»: у эубактерий и эукариотов они содержат L-фосфолипиды, а у архебактерий – D-фосфолипиды [3]. Поскольку исходно мембрана должна была сформироваться из рацемической смеси каждого типа фосфолипидов, то должен был существовать механизм отбора энантиомеров фосфолипидов в мембранах протоклеток, приведший к образованию хирально чистых мембран клеток. При этом возникает вопрос, что представлял собой «последний универсальный общий предок». Считается, что эубактерии были первой клеточной формой жизни, а остальные появились в ходе эволюции бактерий. Однако смена хиральности липидов в мембране клетки не могла произойти одновременно и должна была сопровождаться образованием мембраны смешанного состава. Физико-химические свойства такой мембраны должны отличаться от свойств хирально чистых мембран, причем, скорее всего, механическая прочность у них была ниже, а пассивная проницаемость выше. Такие изменения привели бы к ухудшению приспособленности клетки и ее «отбраковке» в естественном отборе. Таким образом на этой стадии эволюции признаком, по которому шел отбор, могли быть физические свойства мембран.

В настоящей работе исследовано поведение монослоем фосфолипидов на поверхности водных растворов различного состава. Давно известно, что хиральные липиды образуют в определенных условиях хиральные агрегаты в монослое на границе раздела раствор-воздух [4]. Однако мало известно о зависимости такого разделения энантиомеров от параметров состояния системы. В нашей работе получены изотермы сжатия для монослоев из чистых L-энантиомеров фосфолипидов (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин) и монослоев их рацемических смесей на поверхностях растворов разного солевого состава. Показано, что изотермы чистых фосфолипидов значительно отличаются от изотерм рацематов. Предложен способ расчета соответствующих различий в энергиях Гельмгольца для этих систем на основе двумерного уравнения состояния монослоя.

1. Fluegel R.M. *Chirality and Life*. – Berlin–Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.
2. Яковенко Л.В., Твердислов В.А. Поверхность Мирового океана и физические механизмы предбиологической эволюции. // *Биофизика*. 2003. Т. 48, №6. С. 1137–1146.
3. *The structure of biological membranes*. Edited by P.L. Yeagle. 2nd ed. – Boca Raton–London–New York: CRC Press, 2005.
4. Vollhardt D., Nandi N., Banik S.D. Nanoaggregate shapes at the air/water interface. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. Vol. 13. P. 4812–4829.

**Секция 4. Биологическая подвижность.  
Молекулярные моторы.**

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕОДНОРОДНОСТИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ОДИНОЧНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ И СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПРЕДСЕРДИЙ И ЖЕЛУДОЧКОВ СЕРДЦА КРЫС**

**A STUDY OF HETEROGENEITY IN MECHANICAL FUNCTION OF SINGLE CARDIOMYOCYTES AND CONTRACTILE PROTEINS FROM RAT ATRIA AND VENTRICLES**

***Бутова К.А.<sup>1,2</sup>, Мячина Т.А.<sup>1,2</sup>, Берг В.Ю.<sup>1</sup>, Щепкин Д.В.<sup>1</sup>, Копылова Г.В.<sup>1</sup>, Хохлова А.Д.<sup>1,2</sup>***

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

<sup>2</sup>Уральский Федеральный университет, Екатеринбург

Насосная функция сердца обусловлена неоднородностью на клеточном и молекулярном уровне, которая обеспечивает пространственно-временную координацию между сократительными элементами миокарда [1]. В то время, как существует большое количество работ, посвящённых электрической неоднородности одиночных кардиомиоцитов из разных камер сердца [2, 3], региональная неоднородность механической функции изучена недостаточно. Кроме того, относительно мало известно об особенностях механической функции предсердий. Цель данной работы заключалась в исследовании различий механической функции одиночных кардиомиоцитов и сократительных белков из предсердий, левого (ЛЖ) и правого желудочка (ПЖ) сердца.

Эксперименты были выполнены на самцах крыс линии Вистар в соответствии с принципами, изложенными в Директиве 2010/63/EU. Одиночные кардиомиоциты были получены стандартным методом ретроградной перфузии по Лангендорфу при использовании коллагенлитического фермента, расщепляющего внеклеточных каркас. Измерения динамики саркомеров и кальция в цитозоле кардиомиоцитов выполнялись с использованием кальций-чувствительного флюорофора Fluo-8 AM (AAT Bioquest) при помощи системы лазерной конфокальной сканирующей микроскопии LSM 710 (Carl Zeiss, Германия), генератора стимулирующих импульсов MyoPacer, датчика температуры mTCP (IonOptix Corporation, США) и специализированного программного обеспечения. Все измерения на одиночных кардиомиоцитах выполнялись при температуре 36–37 °С и частотах электрической стимуляции 0.5, 1, 2 и 3 Гц.

Взаимодействие миозина с нативным тонким филаментом, экстрагированного из предсердий, ЛЖ и ПЖ, было изучено при помощи *in vitro* подвижной системы. Определение степени фосфорилирования белков саркомера кардиомиоцитов осуществлялось при помощи гель-электрофореза с окрашиванием Pro-Q Diamond (Thermo Fisher Scientific).

Было обнаружено, что конечно-диастолическая длина саркомера, амплитуда укорочения саркомера и амплитуда изменения концентрации цитозольного кальция была меньше в миоцитах предсердий по сравнению с кардиомиоцитами ЛЖ и ПЖ. Негативный инотропный эффект при увеличении частоты стимуляции был выявлен для всех камер сердца, но в значительно меньшей степени был выражен в клетках предсердий, по сравнению с желудочковыми миоцитами. Время достижения максимума сокращения и время расслабления было меньше для предсердных клеток по сравнению с кардиомиоцитами желудочков, статистически значимых различий этих показателей между клетками ЛЖ и ПЖ выявлено не было.

Скорость скольжения F-актина в *in vitro* подвижной системе была больше по поверхности миозина предсердий, по сравнению с миозином желудочков, что согласуется с результатами, полученными на изолированных кардиомиоцитах. Скорость скольжения нативного тонкого филамента по миозину ЛЖ и ПЖ достоверно не различалась, однако были выявлены различия в уровне фосфорилирования тонкого филамента из ЛЖ и ПЖ.

Полученные результаты подтверждают наличие региональной неоднородности среди камер сердца на уровне одиночных клеток и сократительных белков.

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А19-119070190064-4) и поддержана грантом Президента РФ №-949.2019.9.

1. Cazorla O., Lacampagne A. Regional variation in myofilament length-dependent activation // Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. 2011. Vol. 462. №. 1. P. 15-28.
2. Ravens U., Aalkjaer C. Cardiac heterogeneity and drug-provoked arrhythmias // Acta Physiologica. 2017. Vol. 221. №. 3. P. 157-159.
3. Dressler F.F. et al. Interregional electro-mechanical heterogeneity in the rabbit myocardium // Progress in biophysics and molecular biology. 2017. Vol. 130. P. 344-355.



**О МЕХАНИЗМЕ СИСТЕМЫ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ИОНОВ****ABOUT THE MECHANISM OF ACTIVE ION TRANSPORT***Н.С. Васильева-Вашиакмадзе*

Инженерная Академия Грузии, 10175, Тбилиси engacad@mail.ru; : nonavas@ Rambler.ru

Ионы  $Na^+$ ,  $H^+$ , способные к движению против градиента концентрации в ионном канале АТФаз бактерий в интервале  $[8^0 - 70^0]C$  в водной среде гидратируются, в отличие от ионов  $K^+$ , которые вплоть до температуры  $[+70^0]C$  проявляют отрицательную гидратацию. Гидрокомплекс натрия ( $Na^+ \cdot nH_2O$ ) имеет слабый заряд вследствие экранировки иона молекулами воды, в то время, как ион  $K^+$  обладает зарядом  $q \approx +1,6 \cdot 10^{-19}$  Кул.  $Na^+$   $K^+$  как и молекулы воды, диамагнитны. В силу аддитивности диамагнитной восприимчивости гидрокомплексы натрия ( $Na^+ \cdot nH_2O$ ) как и водорода (гидроксоний  $H^+ \cdot H_2O$  или  $H^+ \cdot 4H_2O$ ) обладают гораздо большей по абсолютной величине диамагнитной восприимчивостью, чем негидратированные ионы, в частности, ионы  $K^+$ . Этими особенностями электрических и магнитных свойств ионов  $Na^+$  и  $H^+$  по сравнению с ионами  $K^+$  можно объяснить их разное поведение в ионном канале АТФ-азы в режиме активного ионного транспорта. При функционировании АТФ-аз изменение ионного состава в цито- или экзоплазме инициирует воротный ток в  $\alpha$ -спиральных субъединицах ионных каналов. Вокруг тока зарядов всегда формируется магнитное поле [1]. В случае воротного тока  $\vec{B} = \mu_0 \mu N l^{-1} J \cdot \vec{n}$  (1) где  $B$  – индукция магнитного поля,  $\mu_0$  – магнитная постоянная,  $\mu$  – магнитная проницаемость,  $N$  – число витков,  $l$  – длина  $\alpha$  – спирали,  $J$  – воротный ток,  $\vec{n}$  – единичный вектор вдоль оси  $\alpha$ -спирали. В ионных каналах АТФ-аз внешний портал (устье) расширяется к выходу в экзоплазму [2]. Поэтому здесь магнитное поле неоднородно и ослабевает на выходе в экзоплазму. Таким образом, в ионном канале при изменении трансмембранного потенциала действует одновременно и электрическое, и магнитное поля. В неоднородном магнитном поле на диамагнитные ионы действует выталкивающая сила, направленная в сторону ослабления магнитного поля:  $\vec{F}_m = \chi B_z (\partial B_z / \partial z) \vec{n}$  (2) где  $B$  – индукция,  $N$  – число витков,  $\chi$  – магнитная восприимчивость. –  $l$  – длина  $\alpha$  – спирали,  $J$  – воротный ток,  $\vec{n}$  – единичный вектор вдоль оси. Суммарная сила складывается из двух составляющих – электрической и магнитной:  $\vec{F} = q\vec{E} - \chi B_z (\partial B_z / \partial z) \vec{n}_z$  (3) где  $\vec{E}$  – напряжённость электрического поля,  $\chi$  и  $B_z$  были определены выше. Электрическая составляющая  $q\vec{E}$  силы (3) оказывается направленной в сторону цитоплазмы, в то время как магнитная составляющая – противоположно – в сторону экзоплазмы. Поскольку ионы  $K^+$  и  $Na^+$  различаются электрическими и магнитными свойствами, то в ионном канале на них по-разному действуют электрическое и магнитное поля. Ионы,  $K^+$  имеют значительный электрический заряд и слабую магнитную восприимчивость. Поэтому электрическая составляющая силы (3) на них действует сильнее, чем магнитная составляющая (2) и они могут двигаться только в цитоплазму. Движение гидратированных диамагнитных ионов  $Na^+$  против градиента концентрации может реализоваться в системе активного транспорта, поскольку магнитная составляющая силы (3)  $\vec{F}_m = \chi B_z (\partial B_z / \partial z) \vec{n}$  превосходит по величине противоположно направленную электрическую составляющую  $\vec{F}_e = q\vec{E}$  (4). При этом, магнитное поле выталкивает диамагнитные гидрокомплексы  $Na^+$  или  $H^+$  в направлении слабого магнитного поля – в экзоплазму, что может обеспечить функционирование "ионной помпы" – системы активного транспорта ионов  $Na^+$ ,  $H^+$ . Электрогенность объясняется в полном тексте.

1. Матвеев А.Н., Электричество и магнетизм. (2010), ISBN, 978-5-8114-1008-8, 464p

2. Castillo JP, Rui H, Basilio D, Das A, Roux B, Latorre R, Bezanilla F, Holmgren M. Mechanism of potassium ion uptake by the Na(+)/K(+)-ATPase. (2015), Nat Commun.; 6:762.

**О МЕХАНИЗМЕ ВРАЩЕНИЯ РОТОРА FO F1 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> АТФ-СИНТАЗЫ****ABOUT THE MECHANISM OF ROTATION OF THE ROTOR FO F1 ATP-SYNTHASE***Н.С. Васильева-Вашакмадзе*

Инж.Академия Грузии, 10175,Тбилиси engacad@mail.ru; nonavas@rambler.ru

Высказывается предположение, что в основе механизма вращения ротора бактериальной FOF1  $Na^+, K^+$  АТФ-синазы и других молекулярных моторов лежат следующие факторы: изменение трансмембранного потенциала при активации, вызывающее воротный ток в белковых компонентах ионных каналов, связь между током зарядов и появлением магнитного поля; способность силы Лоренца инициировать вращающий момент, действующий на токи. Ротор или С -диск FOF1  $Na^+, K^+$  АТФ-синазы пространственно сближен с компонентой  $ab_2$  статора. При внешних воздействиях в трансмембранном участке  $\alpha$ - спиральных субъединиц ионного канала компоненты  $ab_2$  появляется воротный ток и вокруг него - магнитное поле:

$\vec{B} = k \frac{J \cdot \vec{n}}{l}$  (1), где  $\vec{B}$  - индукция магнитного поля,  $N, l$  - число витков и длина  $\alpha$ - спиральной

субъединицы,  $J$  – воротный ток,  $k$  – коэффициент, зависящий от системы единиц. С-диск погружен в толщу цитоплазматической мембраны. Нижнее основание С-диска контактирует с экзоплазмой, а в центре его верхнего основания закорена субъединица  $\gamma$ , проникающая в цитоплазму. Поэтому между центром и периферией С-диска образуется разность потенциалов и напряжённость  $\vec{E}$ , совпадающие с трансмембранными. При достаточно больших  $\vec{E}$  между центром и периферией С - диска возникает движение зарядов под действием силы  $\vec{F}_1 = q\vec{E}$  (2). Магнитное поле статора (1) не локально и потому на заряды ротора действует сила Лоренца:  $\vec{F} = \vec{F}_1 + \vec{F}_2$ , где  $\vec{F}_1$  определено соотношением (2), а  $\vec{F}_2 = q[\vec{v} \cdot \nu]$  (3). Поэтому

$\vec{F} = q\vec{E} + q[\vec{v} \cdot \nu]$  (4), где  $q$ - заряды,  $\vec{v}$ - их радиальная скорость;  $\vec{B}$  –магнитное поле (1). Сила  $\vec{F}_2$  (3) действует перпендикулярно движению зарядов в плоскости С-диска и создаёт вращающий момент  $\vec{N} = [\vec{R}\vec{F}_2]$  (5), где  $R$  -радиус С-кольца,  $\vec{F}_2$ -сила (3) действующая на движущиеся заряды. При этом, радиальный ток С-диска начинает вращаться, увлекая за собой всю систему ротора и субъединицу  $\gamma$ . Во время вращения остаётся неизменной взаимно - перпендикулярная ориентация радиальной скорости зарядов  $\vec{v}$  относительно индукции  $\vec{B}$ , поэтому вращающий момент  $\vec{N}$  продолжает действовать без затухания в течение некоторого времени, обеспечивая длительное вращение ротора.

1.В.П.Скулачев.Законы биоэнергетики. (1997), МГУ им.Ломоносова; СОЖ, 01,с 9 - 14, [http://www.pereplet.ru/nauka/Soros/pdf/970/\\_009.pdf](http://www.pereplet.ru/nauka/Soros/pdf/970/_009.pdf), (1997).

2.Н.С. Васильева- Вашакмадзе. Молекулярные механизмы биопроцессов. LAMBERT Acad.Publishing, 2018, 170p.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЪЕМ-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ****INVESTIGATION OF THE VOLUME-DEPENDENT MECHANISMS OF REGULATION OF CONTRACTILE FUNCTION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS OF RAT PULMONARY ARTERY***Гусакова С.В., Рыдченко В.С., Смазлий Л.В., Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Голованов Е.А., Чибисов Е.Е., Носарев А.В., Акбашева О.Е., Медведев М.А., Орлов С.Н.<sup>1</sup>*

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, gusacova@yandex.ru

<sup>1</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Клетки млекопитающих нуждаются в постоянном поддержании физиологически нормального объема. Объем клеток является важным параметром, стабильность которого обеспечивается целым рядом регуляторных механизмов. Однако, клеточный объем постоянно изменяется и зависит от осмотически активных соединений,

которые переносятся через клеточную мембрану. Содержание осмотически активных соединений так же зависит от метаболических процессов, которые происходят внутри клетки.

Методом механографии оценивали сократительную активность дезнотелизированных кольцевых сегментов легочной артерии крыс-самцов линии Wistar. Амплитуду ответов рассчитывали в процентах от контрольного сокращения на действие гиперкалиевого раствора Кребса (30 KCl), которую принимали за 100%. Изменение объема клеток получали помещением сегментов в растворы с различной осмолярностью.

Согласно полученным данным, гладкомышечные клетки в ответ на гиперкалиевую деполяризацию мембраны развивают поддерживаемый воспроизводимый сократительный ответ. Амплитуда сократительного ответа зависит от концентрации KCl в среде инкубации и является максимальной при 40 mM KCl. Выявлено, что  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  котранспорт (NKCC) участвует в развитии сокращения при гиперкалиевой деполяризации мембраны. Предобработка блокатором NKCC буметанидом приводит к достоверному снижению амплитуды сократительного ответа. Предполагается, что данные эффекты буметанида опосредуются способностью вызывать гиперполяризацию мембраны сосудистых гладкомышечных клеток путем угнетения NKCC-опосредованного градиента хлора, являющегося причиной деполяризующего хлорного тока при активации хлорных каналов плазмалеммы.

Инкубация сегментов в растворах разной осмолярности приводит к развитию сократительных ответов гладкомышечных клеток легочной артерии. Гиперосмотически-индуцированное сморщивание гладкомышечных клеток приводит к развитию поддерживаемого воспроизводимого сократительного ответа. Амплитуда сокращения дозозависимо увеличивается при увеличении концентрации сахарозы в инкубационной среде. Близкий к полумаксимальному сократительный ответ получен при действии 120 mM сахарозы. При блокировании NKCC в условиях гиперосмотической стрикции клеток получены разнонаправленные эффекты, зависящие от концентрации блокатора NKCC буметанида. Подавляющее влияние буметанида на сократительную активность гладкомышечных клеток в условиях гиперосмотического сжатия клеток может быть связано с вовлечением NKCC и NKCC-опосредованного контроля внутриклеточной концентрации хлора. В свою очередь хлор опосредует сопряжение возбуждения и сокращения клеток, обеспечивая деполяризацию мембраны при открывании или активации хлорных каналов. Полученный активирующий эффект буметанида на сегодняшний день остается неясен и требует дальнейшего изучения.

При моделировании гипоосмотической стрикции гладкомышечных клеток легочной артерии наблюдается сократительный ответ транзиторного характера, амплитуда которого меньше амплитуды гиперкалиевого сокращения. Транзиторный характер сокращения может быть связан с временной активацией NKCC, что отличает его от сокращения, вызванного добавлением сахарозы, где активация NKCC носит постоянный характер.

Развитие гипоосмотической стрикции клеток также приводит к транзиторному сократительному ответу гладкомышечных сегментов легочной артерии. Амплитуда и время транзиторного сокращения увеличиваются с увеличением степени гипоосмотичности среды.

Изменение нормального объема клеток может служить субстратом для развития различных патологий сосудов малого круга кровообращения. Выявленные механизмы взаимосвязи процессов поддержания клеточного объема и развития сокращения гладкомышечных клеток легочной артерии могут служить важной фундаментальной основой для детального изучения и коррекции сосудистых патологий малого круга кровообращения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-44-700009.

## ИЗОФОРМЫ ТИТИНА ПРИ ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИИ СЕРДЦА

### TITIN ISOFORMS IN CARDIAC DIASTOLIC DYSFUNCTION

*Капелько В.И.<sup>1</sup>, Вихлянцева И.М.<sup>2,3</sup>, Лакомкин В.Л.<sup>1</sup>, Уланова А.Д.<sup>2</sup>, Абрамов А.А.<sup>1</sup>, Лукошкова Е.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, ул. 3-я Черепковская, 15а, Москва 121552, Россия;

<sup>2</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино;

<sup>3</sup> Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Московская обл.

Диастолическая дисфункция (ДД) является начальной стадией ХСН, она характеризуется замедленным расслаблением и повышенным диастолическим давлением, но нормальной сократимостью миокарда, что отличает её от систолической дисфункции. Одним из факторов, способных поддержать нормальную фракцию выброса при ДД может быть повышенная диастолическая растяжимость миокарда. Она в физиологическом диапазоне длины саркомеров определяется состоянием титина, пружиноподобная форма которого связывает миозиновые нити с Z-линией саркомера. В сердечной мышце титин находится в I-диске саркомера и существует в двух изоформах – эластичной N2BA и жесткой N2B.

Задача данной работы состояла в определении содержания и уровня фосфорилирования изоформ титина в миокарде крыс с одновременной характеристикой сократительной функции сердца при ДД, возникающей после 4 недель введения доксорубина (ДОК) крысам Wistar.

Катетеризация левого желудочка (ЛЖ) через правую сонную артерию была выполнена при помощи стандартного PV-катетера FTH-1912B-8018 и усилителя ADV500 (Transonic, Канада) под золотилковым наркозом (5 мг/кг). Использовали программное обеспечение этой фирмы, позволявшее рассчитывать более 20 параметров сократительной функции в ходе сердечного цикла. Определение изоформ титина и степени фосфорилирования белка выполняли по методу [1] в замороженных образцах миокарда, взятых после острого опыта. Результаты представлены как  $M \pm SEM$ .

Фракция изгнания у крыс, сердца которых затем были подвергнуты биохимическому исследованию, через 4 недели после начала применения ДОК оказалась в пределах нормы ( $58 \pm 4\%$ , контроль -  $61 \pm 2\%$ ). Диастолический объем ЛЖ, а также ударная работа были в пределах нормы. Индекс сократимости миокарда также был нормален ( $130 \pm 9 \text{ с}^{-1}$  против  $137 \pm 9 \text{ с}^{-1}$  в контроле). Однако индекс расслабления ЛЖ у этих крыс ( $67 \pm 6 \text{ с}^{-1}$ ) был снижен на 19% ( $p < 0.05$ ), а давление в течение всей диастолы было повышено приблизительно вдвое. Эти признаки характеризуют ДД сердца.

Соотношение N2BA/N2B изоформ титина в контрольных опытах составило 14/86%, а у ДОК крыс содержание N2BA составило  $26 \pm 2\%$ . Уровень фосфорилирования титина был увеличен на  $60 \pm 18\%$  ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем и отлично коррелировал ( $r = 0,94$ ) с содержанием изоформы N2BA, что позволяет предполагать, что фосфорилирование было направлено на снижение жесткости молекул титина. С таким предположением согласуется и снижение диастолической упругости миокарда в группе ДОК почти вдвое.

Таким образом, сдвиг изоформ титина в сторону N2BA благоприятствует мобилизации растяжения миокарда в диастоле, что способствует сохранению нормального сердечного выброса. Такой сдвиг наблюдали при дилатационной кардиомиопатии, хронической ишемической кардиомиопатии [2], а противоположный - при концентрической кардиомиопатии или гипертонии [3]. Эти данные показывают, что в ситуациях, когда требуется мобилизация растяжения миокарда, соотношение сдвигается в сторону N2BA, а когда требуется усиление сокращений, преобладает изоформа N2B.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-015-00271.

1. Vkhlyantsev I.M, Podlubnaya Z.A. Nuances of electrophoresis study of titin/connectin. Biophys Rev. 2017, 9(3):189-199.
2. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. Circ Res 2004; 95(7):708-716.
3. Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA. Deranged myofibrillar phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. Cardiovasc Res 2013; 97(3):464-471

## МАГНИТНО-ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ МАГНИЯ И ЦИНКА В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ ГИДРОЛИЗА АТФ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МОТОРАМИ

## MAGNETIC-ISOTOPE EFFECTS OF MAGNESIUM AND ZINC IN THE ATP HYDROLYSIS DRIVEN BY THE MOLECULAR MOTORS

***Кольтовер В.К.<sup>1</sup>, Лабынцева Р.Д.<sup>2</sup>, Карандашев В.К.<sup>3</sup>, Веклич Т.А.<sup>2</sup>, Костерин С.О.<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Московская область, Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии им А.В. Палладина НАН, Киев, Украина

<sup>3</sup>Институт проблем технологии микроэлементов и особочистых материалов РАН, Черноголовка, Московская область, Россия

Клетки состоят из атомов химических элементов, многие из которых имеют стабильные изотопы двух типов – магнитные и немагнитные. Например, из трех стабильных изотопов магния,  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{25}\text{Mg}$  и  $^{26}\text{Mg}$  с природным содержанием 78.7, 10.13 и 11.17%, изотоп  $^{25}\text{Mg}$  имеет ядерный спин ( $I = 5/2$ ) и, соответственно, создает магнитное поле, тогда как изотопы  $^{24}\text{Mg}$  и  $^{26}\text{Mg}$  не имеют ядерного спина ( $I = 0$ ) и не создают магнитного поля. Другой распространенный в живой природе элемент, цинк, имеет пять стабильных изотопов,  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{67}\text{Zn}$ ,  $^{68}\text{Zn}$  и  $^{70}\text{Zn}$  с относительным содержанием, соответственно, 48.6, 27.9, 4.1, 18.8 и 0.6%, из которых только  $^{67}\text{Zn}$  имеет ядерный спин ( $I = 5/2$ ). Магнитно-изотопные эффекты (МИЭ) давно известны в физике и химии. МИЭ однозначно свидетельствует о том, что в изучаемом процессе имеется «узкое место» - лимитирующая стадия, зависящая от электронного спинового состояния ( $S$ ), и что ядерный спин изотопа ускоряет эту стадию [1].

Недавно были открыты МИЭ в экспериментах с живыми клетками, дрожжами *S. cerevisiae* и бактериями *E. coli*, обогащёнными различными изотопами магния [2, 3]. В работах нашей группы обнаружены МИЭ в экспериментах с одним из важнейших молекулярных моторов биоэнергетики – миозином, изолированным из гладких мышц. В среде, содержащей хлорид магнитного изотопа магния,  $^{25}\text{Mg}$ , скорость гидролиза АТФ миозином в 2.0-2.5 раза выше, чем в аналогичной среде, содержащей хлорид немагнитного изотопа,  $^{24}\text{Mg}$  или  $^{26}\text{Mg}$ , или магния природного изотопного состава. В экспериментах с тем же миозином был обнаружен МИЭ цинка. Ион  $\text{Zn}^{2+}$  в качестве кофактора миозина существенно менее эффективен, чем  $\text{Mg}^{2+}$ . Однако скорость ферментативного гидролиза АТФ с магнитным изотопом,  $^{67}\text{Zn}$ , на 40-50% выше, чем с немагнитными изотопами,  $^{64}\text{Zn}$  или  $^{68}\text{Zn}$  [4]. Небольшой эффект выявлен в экспериментах с Са-независимой/Мg-зависимой АТФазой плазматических мембран клеток миометрия. Скорость ферментативного гидролиза АТФ в реакционной среде, содержащей магнитный  $^{25}\text{Mg}$  оказалась, в среднем, на 20 % выше, чем в средах с немагнитными изотопами,  $^{24}\text{Mg}$  или  $^{26}\text{Mg}$ . Не удалось, однако, обнаружить МИЭ в экспериментах с транспортными Na, K-АТФазой и Са, Mg-зависимой АТФазой плазматических мембран. Известно, что не был обнаружен МИЭ в аналогичных экспериментах по изучению влияния различных изотопов магния на АТФ-зависимые реакции, катализируемые креатин-фосфокиназой [5] и люциферазой [6].

Обнаруженные нами эффекты изотопов  $^{25}\text{Mg}$  и  $^{67}\text{Zn}$  в реакциях гидролиза АТФ «молекулярными моторами» можно объяснить следующим образом. Энергия, выделяемая при гидролизе АТФ (~0.54 эВ), недостаточна для электронно-конформационного перехода макромолекулы в синглетное возбужденное состояние. Этой энергии достаточно для перехода в более низкое триплетное состояние ( $S = 1$ ), но такой переход из основного состояния ( $S = 0$ ) запрещен законом сохранения спина. Ядерный спин магнитного изотопа устраняет спиновый запрет, обеспечивая необходимый переход и, таким образом, ускоряет хемомеханический цикл ферментативной реакции. Альтернативно, можно предположить образование в активном центре фермента ион-радикальной пары. Создавая спиновый запрет, магнитный изотоп препятствует нежелательной обратной реакции синтеза АТФ и, тем самым, способствует завершению реакции гидролиза АТФ и связанного с ней хемомеханического цикла. Гипотеза о ключевой роли виртуальной ион-радикальной пары в синтезе АТФ при окислительном фосфорилировании была предложена около 50 лет тому назад [7]. Детальные механизмы ядерного спинового биокатализа – задачи дальнейших исследований.

1. Зельдович Я.Б., Бучаченко А.Л., Франкевич Е.Л. Магнитно-спиновые эффекты в химии и молекулярной физике // Успехи физ. Наук, 1988, 155, 3-45.
2. Авдеева Л.В., Кольтовер В.К. Ядерный спиновый катализ в живой природе // Вестн. Моск. ун-та, сер. 2 (химия), 2016, 57, 145-153.
3. Koltover V.K. Nuclear spin catalysis: from physics of liquid matter to medical physics. // J. Mol. Liquids, 2017, 235, 44-48.
4. Koltover V.K., Labyntseva R.D., Kosterin S.O. Stable magnetic isotopes as modulators of ATPase activity of smooth muscle myosin. In: Myosin: Biosynthesis, Classes and Function. - New York: Nova Science Publ., 2018, pp. 135-158.
5. Crotty D; et al. Reexamination of magnetic isotope and field effects on adenosine triphosphate production by creatinekinase. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, 109, 1437-1442.
6. Смирнова Д.А. и др. Люцифераза светлячков как инструмент для поиска и изучения магнитно-изотопных эффектов в АТФ-зависимых ферментативных реакциях. // Вестн. Моск. ун-та, сер. 2 (химия), 2018, 59, 266-274.
7. Блюменфельд Л.А., Кольтовер В.К. Трансформация энергии и конформационные переходы в митохондриальных мембранах как релаксационные процессы. // Мол. биол., 1972, 6, 161-166.

## ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ

## ELECTROMECHANICAL MODEL OF CARDIAC MUSCLE

**Осеян А.Ш.<sup>1</sup>, Семин Ф.А.<sup>2,3</sup>, Цатурян А.К.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>НИИ механики МГУ, Москва

<sup>3</sup>Российский университет дружбы народов, Москва

Моделирование работы сердца важно для более глубокого понимания механизмов его работы и регуляции в норме и при патологиях. В последние годы, персонализированные математические модели начинают применяться в диагностике и лечении различных заболеваний сердца. Важным фактором в моделировании сердца является простота численной реализации, что необходимо для расчёта пространственных задач. В то же время модель должна достаточно точно описывать механохимические и электромеханические процессы, лежащие в основе сокращения сердца.

В докладе представлена электромеханическая модель сердечной ткани, которая основана на кинетической модели [1], описывающей пассивные упругие свойства сердечной мышцы, активные

механические напряжения, обусловленные актин-миозиновым взаимодействием, кинетику этого взаимодействия и связывание ионов кальция с регуляторными белками. Кинетическая модель задается системой обыкновенных дифференциальных уравнений, что упрощает численное решение задач. Поток ионов  $Ca^{2+}$  в клетку миокарда полагаали заданной функцией времени, что не позволяло описать электромеханическое сопряжение в миокарде.

Мы объединили эту модель с простой и популярной моделью электрической активности сердечной мышцы [2]. В новую модель были добавлены уравнения, описывающие перераспределение ионов кальция между цитоплазмой, внеклеточным пространством, продольным саркоплазматическим ретикулумом и его терминальными цистернами в зависимости от разности электрического потенциала на клеточной мембране. Это позволило описать изменения механики миокарда при изменении межстимульных интервалов, т.е. зависимость амплитуды и длительности сокращений от частоты стимуляции, эффект экстрасистол и постэкстрасистолическую потенциацию сокращений [3].

Численные расчеты двумерных задач о распространении электромеханических волн в плоском слое миокарда проводили методом конечных элементов. При этом учитывали электрическую и механическую анизотропию миокарда и возможную зависимость электрической проводимости от деформаций. Для решения кинетических уравнений модели использовали метод Эйлера. Сокращение ткани инициировали стимулирующим электрическим током на границе или во внутренних точках слоя.

Были проведены расчеты распространения электромеханических волн при различной ориентации области стимуляции по отношению к направлению мышечных волокон и процесса образования спиральной волны. Результаты расчётов показывают, что модель адекватно описывает электромеханические свойства сокращения миокардиальной ткани и может быть использована для 2D и 3D моделирования сердца.

1. Syomin F. A., Tsaturyan A. K. A simple model of cardiac muscle for multiscale simulation: passive mechanics, crossbridge kinetics and calcium regulation // *Journal of Theoretical Biology*. — 2017. — Vol. 420. — P. 105–116.
2. Aliev R. R., Panfilov A. V. A simple two-variable model of cardiac excitation // *Chaos, Solitons & Fractals*. — 1996. — Vol. 7, no. 3. — P. 293–301.
3. Syomin F. A., Tsaturyan A. K. A simple electromechanical model of cardiac muscle for multiscale simulation of the heart // *Abstracts of the 8th World Congress of Biomechanics, Dublin, Ireland, 8-12 July 2018*.

---

## ВЛИЯНИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ

### INFLUENCE OF GAS TRANSMITTERS ON THE CONTRACTILE ACTIVITY OF THE PULMONARY ARTERY

*Рыдченко В.С., Голованов Е.А., Чибисов Е.Е., Горянова А.М., Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В.*  
Сибирский государственный медицинский университет, Томск, rydchenkoviknoriya@mail.ru

Монооксид углерода (CO) и сероводород ( $H_2S$ ) относят к эндогенно продуцируемым газовым сигнальным молекулам (газотрансмиттерам) [1]. Эти молекулы являются неотъемлемыми компонентами регуляции тонуса кровеносных сосудов и сократительных свойств гладкомышечных клеток (ГМК). Взаимодействие CO и  $H_2S$  с различными ферментативными и структурными компонентами ГМК оказывает существенное влияние на тонус кровеносных сосудов. Обнаружено, что в модели легочной гипертензии крыс, индуцированной монокротолином, наблюдалось подавление сигнального каскада, опосредованного эндогенным  $H_2S$ . Напротив, донор  $H_2S$  значительно снижал давление в легочной артерии и подавлял ремоделирование стенки легочной артерии [2]. Известно, что CO подавляет индуцированную гипоксией констрикцию легочных сосудов посредством снижения экспрессии и чувствительности рецепторов к эндотелину-1 [3]. Другим важным аспектом функционирования клеток и тканей организма является поддержание нормального клеточного объема. Показано, что при развитии легочной гипертензии происходит набухание гладкомышечных клеток легочной артерии и ремоделирование сосудов [4]. В данной работе было изучено влияние сероводорода и монооксида углерода на сократительные реакции гладкомышечных клеток, вызванные гиперкалиевой деполаризацией гладкомышечных клеток, активацией  $\alpha_1$ -адренорецепторов, изменением клеточного объема.

Объектом исследования служили изолированные гладкомышечные сегменты легочной артерии крыс линии Wistar. Сократительную активность гладкомышечных клеток легочной артерии оценивали методом механографии с использованием четырехканальной механографической установки Myobath II (Германия). Для исследования сократительной активности сегментов в модели гипоосмотического набухания сегменты помещали в раствор с концентрацией NaCl равной 40 мМ. Изоосмотическую стрикцию вызывали восстановлением ионного состава раствора после 60-минутной инкубации сегментов в гипоосмотической среде, содержащей 40 мМ NaCl. Для получения гиперосмотического сокращения готовили гиперосмотический

раствор путем добавления 120 мМ сахарозы в нормальный раствор Кребса (120 мМ NaCl). В качестве донора сероводорода использовали NaHS (Sodium hydrogen sulfide), а донора монооксида углерода – CORM II (tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer-II).

При аппликации CORM II на фоне гиперкалиевого и фенилэфрин-индуцированного сокращения наблюдалось дозозависимое снижение величины механического напряжения сегментов легочной артерии крысы, тогда как добавление NaHS приводило к увеличению амплитуды этих сокращений.

Инкубация сегментов сосудов в гипосмотической среде приводила к развитию транзиторного сократительного ответа ГМК. Аппликация CORM II NaHS не влияла на амплитуду сокращения, индуцированного гипосмотическим раствором. Восстановление ионного состава среды после длительной инкубации сосудов в гипосмотическом растворе приводило к транзитному сокращению сегментов сосудов. CORM II достоверно снижал амплитуду изоосмотически-индуцированного транзиторного сокращения. Противоположный эффект был получен при добавлении NaHS.

Инкубация сегментов в гиперосмотическом растворе приводила к развитию поддерживаемого сокращения ГМК. CORM II достоверно снижал амплитуду сокращения сегментов на фоне гиперосмотической стрикции клеток. Аппликация NaHS в концентрации приводила к достоверному увеличению амплитуды сокращения сосудов, индуцированного гиперосмотическим раствором.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленных эффектах доноров сероводорода и монооксида углерода на сократительные реакции гладкомышечных клеток, вызванные гиперкалиевой деполяризацией гладкомышечных клеток, активацией  $\alpha_1$ -адренорецепторов, изменением клеточного объема при гипер- и изоосмотической стрикции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектах № 18-315-00296 и № 18-44-70009

1. Баскаков М.Б. Ионные механизмы действия газотрансмиттеров на сократительную активность сосудистых гладких мышц // Известия высших учебных заведений. Физика. 2013. Т. 56. № 4-2. С. 73-78.
2. Feng S. et al. H<sub>2</sub>S inhibits pulmonary arterial endothelial cell inflammation in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension // Laboratory Investigation. 2017. V. 97. №. 3. P. 268.
3. Christou H. et al. Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by enhancement of endogenous heme oxygenase-1 in the rat // Circulation research. 2000. V. 86. №. 12. P. 1224-1229.
4. Sun XZ. et al. Effects of Fasudil on hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats // Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014. 18(7). P. 959-64.

## **РОЛЬ РЕАКЦИИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ФОСФАТА ИЗ КАРМАНА ТУБУЛИНА В МЕХАНИЗМЕ РАСПОЗНАВАНИЯ КОНЦА МИКРОТРУБОЧКИ БЕЛКОМ EB1**

### **ROLE OF PHOSPHATE DISSOCIATION FROM $\beta$ -TUBULIN IN EB1 PROTEIN MICROTUBULE END RECOGNITION**

***Сараницева М.Ю.<sup>1</sup>, Гудимчук Н.Б.<sup>1,2,3</sup>***

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 1.

<sup>2</sup>НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1.

<sup>3</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

Микротрубочки (МТ) - полимеры белка тубулина, являются одними из главных элементов цитоскелета. Они обладают свойством динамической нестабильности, то есть могут попеременно пребывать в длительной фазе самосборки и деполимеризации. В какой из этих фаз находится микротрубочка, определяется тем, связаны ли тубулины на ее конце с молекулой гуанозинтрифосфата (ГТФ) или гуанозиндифосфата (ГДФ), соответственно. Благодаря своей динамике и механическим свойствам, микротрубочки участвуют в целом ряде жизненно важных процессов, начиная от внутриклеточного транспорта и заканчивая поиском и перемещением хромосом во время митоза.

В ходе многолетних исследований выяснилось, что растущие концы микротрубочек - удивительно сложные клеточные области, где динамика микротрубочек может быть координирована с полимеризацией актина, движением клеточного груза и ремоделированием клеточных мембран. Эти процессы регулируются разнообразными белками, которые образуют динамичную и гибкую сеть взаимодействий. Центральным белком этой цепи считается EB1 (End binding protein), механизм взаимодействия которого с МТ нуждается в изучении. Понимание молекулярных основ взаимодействия МТ с плюс-концевым белком EB1 поможет прояснить и механизм динамической нестабильности микротрубочек. Это необходимо, в частности, для понимания

фундаментальных вопросов клеточного деления, что в будущем предоставит возможность контролировать процесс митоза в медицинских целях, например, для подавления деления клеток опухолей.

В рамках данной работы была создана детальная стохастическая модель взаимодействия EB1 с МТ, которая способна описать уникальную локализацию EB1 на МТ, наблюдаемую в экспериментах с флуоресцентным белком [1,2]. В компьютерной модели использован алгоритм, в котором симуляция динамики МТ основана на методе Монте Карло. В результате каждой итерации происходит одно биохимическое или механическое событие. Полученные результаты говорят в пользу гипотезы о распознавании белком EB1 особой области на конце МТ, в котором тубулины связаны с ГДФ и отщепленным, но еще не вышедшим в раствор фосфатом (Ф). В таком случае гидролиз ГТФ происходит в два этапа, и высвобождение фосфата из обменного сайта тубулина является определяющим скоростью реакции событием, так как полученное значение константы скорости диссоциации фосфата от МТ значительно меньше скорости предыдущего шага – гидролиза ГТФ. Учет влияния белков EB1 на скорость реакции высвобождения фосфата из карманов ГДФ-Ф-тубулинов, находящихся в пределах сайта связывания EB1, позволяет описать сжатие профиля флуоресценции при повышении концентрации EB1 [3]. Этот эффект возможен благодаря близкому расположению EB1 к обменному сайту тубулина [4].

Мы предположили, что возможна обратная реакция присоединения фосфата из раствора к ГДФ-тубулинам. Это должно было бы приводить к появлению новых ГТФ-Ф сайтов для EB1 в теле микротрубочек. С целью проверить эту гипотезу, было исследовано влияние солей фосфата натрия в растворе на число связанных с МТ белков EB1-GFP. В результате экспериментов, не было обнаружено корреляции между концентрацией фосфата в растворе и средней интенсивностью флуоресценции EB1-GFP на МТ, что, вероятно означает, что реакция диссоциации фосфата из решетки МТ практически необратима.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают гипотезу о распознавании белком EB1 комплекса тубулина с ГДФ и отщепленным фосфатом, а также свидетельствуют о том, что реакция выхода фосфата из кармана тубулина в раствор медленная и практически не обратимая. Эти результаты проливают свет на молекулярный механизм работы белка EB1.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 17-00-00480.

1. Zanic, M. et al. (2009) EB1 Recognizes the Nucleotide State of Tubulin in the Microtubule Lattice, PLoS ONE, 4
2. Nakamura, S. G. (2012) Dissecting the nanoscale distributions and functions of microtubule-end-binding proteins EB1 and ch-TOG in interphase HeLa cells. PLoS One, 7, e51442.
3. Maurer, S.P. et al. (2014) EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics. Curr Biol. 2014;24(4)
4. Maurer, S.P. et al. (2012) EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends, Cell, 149 (2), 371–382

---

## **МНОГОМАСШТАБНАЯ МОДЕЛЬ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА: ВЛИЯНИЕ КАРДИОМИОПАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ТРОПОМИОЗИНА НА НАСОСНУЮ ФУНКЦИЮ СЕРДЦА MULTISCALE MODEL OF THE LEFT VENTRICLE OF THE HEART: AN INFLUENCE OF THE CARDIOMYOPATHIC MUTATIONS OF TROPOMYOSIN ON THE PUMPING FUNCTION OF THE HEART**

***Сёмин Ф.А.<sup>1,2</sup>, Хабибуллина А.Р.<sup>3</sup>, Цатурян А.К.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>НИИ механики МГУ, Москва, f.syomin@imec.msu.ru

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, Москва

<sup>3</sup>МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва

В настоящее время активно развиваются модели сердца и его камер, которые позволили бы более подробно анализировать опытные данные и нашли бы применение в диагностике заболеваний сердца и оценке результатов планируемых хирургических операций. Такие модели, называемые многомасштабными, включают в себя описание механохимических и электромеханических процессов, протекающих на уровне клетки сердечной мышцы (миокарда), описание сердечной ткани как материала, аппроксимацию геометрии сердца и модель кровеносного русла. Несмотря на то, что некоторые из разработанных моделей учитывают персонафицированную геометрию камер сердца и ход мышечных волокон в их стенках, они, за редким исключением, содержат довольно примитивное описание механики клетки миокарда.

В докладе представлена модель сердца, левый желудочек которого описан новой многомасштабной моделью. Эта модель основана на кинетической модели механики сердечной мышцы [1], которая задана системой обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), что упрощает численное решение сложной пространственной задачи о сокращении левого желудочка. В то же время модель достаточно точно описывает механохимические процессы сокращения клетки, активации и регуляции сокращения, сопровождаемые



взаимодействием сократительных и регуляторных белков. Модель левого желудочка представляет собой расширение нашей предыдущей модели [2]. Миокард стенки левого желудочка рассматривали как трансверсально-изотропную несжимаемую сплошную среду, активные напряжения в которой вызваны силами, действующими вдоль мышечных волокон на площадку, перпендикулярную этому направлению, и определяются из кинетической модели. Остальные камеры сердца (предсердия и правый желудочек) и сосудистое русло описывали моделью с сосредоточенными параметрами, выделяя в кровеносном русле в качестве резервуаров с фиксированной податливостью и неизвестным давлением аорты, крупные системные артерии, системные вены, лёгочные артерии и лёгочные вены. Отношения давление-объём для предсердий и правого желудочка задавали ОДУ для вязкоупругого тела с переменными коэффициентами упругости и вязкости. Полную систему уравнений движения левого желудочка, его несжимаемости, а также уравнения кинетической и гемодинамической модели решали методом конечных элементов. Сокращение желудочка инициировали заданной периодической функцией входящего в клетку потока ионов кальция от времени.

Мы провели численные эксперименты с параметрами модели, соответствующими здоровому сердцу человека. Построены кривые временного хода основных величин сосудистого русла, согласующиеся с данными наблюдений в медицинской практике. Чтобы исследовать возможности нашей многомасштабной модели, мы выполнили моделирование при изменениях в параметрах модели мышцы, соответствующих некоторым типам наследственных мутаций тропомиозина, приводящим к кардиомиопатии. Так, при одной из мутаций такого типа, описанной в [3], наблюдали снижение максимальной развиваемой мышцей силы и снижение зависимости активации сокращения от длины мышцы. Результаты моделирования этой кардиомиопатии показали значительное снижение ударного объёма желудочков и характерное для падения сократительной способности миокарда изменение петель давление-объём для левого желудочка, построенных при разном наполнении желудочка, что демонстрирует нарушение закона Франка-Старлинга. На следующем шаге мы учли адаптационную перестройку геометрии желудочка в ответ на нарушение свойств миокарда: утолщение его стенок. Кроме того, использовали параметры модели сосудистого русла, соответствующие стенозу аортального клапана, который сопутствует утолщению стенки желудочка. Полученные результаты расчётов демонстрируют частичную компенсацию производительности сердца за счёт утолщения стенки левого желудочка и рост перепада давления между желудочком и аортой, характеризующий стеноз выводящего тракта.

В работе показана возможность применения нашей многомасштабной модели для исследования изменений конкретных нарушений свойств сердечной мышцы и их влияния на работу сердца как органа.

Работа поддержана грантами РФФИ № 18-31-00065 и 17-00-00066.

1. Syomin F.A., Tsaturyan A.K. A simple model of cardiac muscle for multiscale simulation: Passive mechanics, crossbridge kinetics and calcium regulation // *Journal of Theoretical Biology*. 2017. Vol. 420. P. 105-116.
2. Syomin F.A., Tsaturyan A. K. Mechanical model of the left ventricle of the heart approximated by axisymmetric geometry // *Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling*. 2017. Vol. 32 (5). P. 327–337.
3. Sequeira V. et al., Perturbed length-dependent activation in human hypertrophic cardiomyopathy with missense sarcomeric gene mutations // *Circulation Research*. 2013. Vol. 112 (11). P. 1491-1505.

## **Секция 5. Механизмы трансформации энергии. Биоэнергетика.**

**РАЗОБЩИТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ: НОВЫЙ ВИТОК В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ И МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

**UNCOUPLERS OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION: A NEW STEP IN MECHANISTIC STUDIES AND MEDICAL APPLICATIONS**

*Ю.Н. Антоненко<sup>1</sup>, Е.А. Котова<sup>1</sup>, Л.С. Хайлова<sup>1</sup>, Т.И. Рокицкая<sup>1</sup>, П.А. Назаров<sup>1</sup>, Г.А. Коришнова<sup>1</sup>, Р.С. Курсанов<sup>1</sup>, И.Р. Яубасарова<sup>2</sup>*

1. НИИ ФХБ имени А. Н. Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва 119991, Россия

E-mail: antonen@genebee.msu.ru; тел. (495)9395149; факс: (495)9393181

2. Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва 119991, Россия

В процессе окислительного фосфорилирования на внутренней мембране митохондрий образуется трансмембранная разность электрохимических потенциалов протонов, энергия которой используется при синтезе АТФ. Соединения, нарушающие сопряжение между процессом окислительного фосфорилирования и синтезом АТФ, называемые разобщителями, представляют интерес как потенциальные лекарственные препараты для лечения рака, бактериальных инфекций и борьбы с ожирением, а также для терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом, таких как инфаркт, инсульт и диабет второго типа. Для обеспечения способности разобщителей переносить протоны из межмембранного пространства митохондрий в матрикс, тем самым снижая мембранный потенциал, в структуре этих соединений должна присутствовать протонофорная группа. Разобщители – это протонофоры, которые шунтируют электрохимическую разность потенциалов ионов водорода на внутренней мембране митохондрий, создаваемую протонными помпами дыхательной цепи. Большинство разобщителей представляют собой слабые кислоты, которые могут проникать через мембраны в протонированной и заряженной (анионной) форме, осуществляя циклическое движение в мембране, что в результате создает трансмембранный ток протона. Несмотря на то, что изучение действия разобщителей на митохондрии, хлоропласты и бактерии заложило основы современной биоэнергетики, до сих пор детальный механизм работы классических разобщителей (в частности, роль мембранных белков в протонофорной активности разобщителей) остается неясным. В последние годы наблюдается повышенный интерес к поиску новых разобщителей и изучению действия известных разобщителей не только на органы и ткани живых организмов, но и на бактерии. Это связано с перспективой использования разобщителей для борьбы с инфекционными заболеваниями на фоне угрожающего роста множественной лекарственной устойчивости, а также для лечения нейродегенеративных и злокачественных заболеваний.

В свое время в группе Мерфи был синтезирован и исследован конъюгат классического разобщителя динитрофенола и трифенилфосфония. Предполагалось, что присоединение липофильного катиона обеспечит селективное накопление разобщителя в митохондриях, поскольку энергизованные митохондрии отрицательно заряжены по отношению к цитозолю, однако оказалось, что такая молекула утрачивает свойства разобщения. В нашей лаборатории в последние годы ведется активная работа по всестороннему изучению механизма действия классических разобщителей и созданию новых разобщителей с полезными свойствами. В частности, были созданы и изучены три серии флуоресцирующих разобщителей, обладающих не только высокой разобщающей активностью, но и яркой флуоресценцией. Это алкиловые эфиры родамина 19, алкиловые эфиры флуоресцеина и алкиламинопроизводные 7-нитро-(2,1,3)-бензоксадиазола (NBD). В отличие от производных флуоресцеина и NBD, представляющих собой анионные разобщители, эфиры родамина 19 относятся к классу катионных разобщителей. Следующим существенным шагом в нашей работе было создание цвиттер-ионных разобщителей путем присоединения к алкилпроизводным флуоресцеина и NBD катиона трифенилфосфония. В частности, был создан эффективный митохондриально-направленный разобщитель на основе децилтрифенилфосфониевого эфира флуоресцеина, mitoFluo. Это соединение энергозависимо накапливалось в митохондриях, а также проявляло классические свойства протонофора на искусственных БЛМ.

В докладе будут представлены данные, свидетельствующие о значении протонофорной активности для антибактериального действия таких известных агентов как усниновая кислота и триклозан, а также созданных нами алкилтрифенилфосфониевых производных флуоресцеина и NBD.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 16-14-10025).

## МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ $\text{Ca}^{2+}$ И ИНДУКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ $\text{Ca}^{2+}$ -ЗАВИСИМЫХ ПОР ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ I ТИПА

### THE MITOCHONDRIAL $\text{Ca}^{2+}$ TRANSPORT AND THE FORMATION OF MITOCHONDRIAL $\text{Ca}^{2+}$ -DEPENDENT PORES IN DIABETUS MELITUS TYPE I

*Белослудцев К.Н.<sup>1,2</sup>, Белослудцева Н.В.<sup>1</sup>, Старинец В.С.<sup>2</sup>, Михеева И.Б.<sup>1</sup>, Таланов Е.Ю.<sup>1</sup>, Дубинин М.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, [bekonik@gmail.com](mailto:bekonik@gmail.com)

<sup>2</sup>Марийский государственный университет, Йошкар-Ола

Сахарный диабет – одно из самых распространенных метаболических заболеваний, которое связано либо с нарушением секреции инсулина, либо с толерантностью клеток организма к этому гормону (диабет I и II типа, соответственно). В обоих случаях, общим патологическим изменением является повышение уровня глюкозы в крови - гипергликемия, которая со временем приводит к серьезному повреждению многих органов и систем организма. Известно, что одной из основных мишеней сахарного диабета на внутриклеточном уровне являются митохондрии. При этом наблюдаются нарушения работы систем окислительного фосфорилирования митохондрий, гиперпродукция активных форм кислорода и др.

Одними из эффекторных структур, ответственных за митохондриальную дисфункцию при сахарном диабете, могут являться митохондриальные кальций-транспортирующие системы. В настоящей работе мы исследовали, как изменяется транспорт ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях печени крыс, а также индукция  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых пор (МРТ поры и липидной, индуцированной пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$ ) при развитии у животных сахарного диабета I типа. Сахарный диабет I типа был смоделирован у крыс линии Sprague-Dawley массой 100 г путем введения животным внутривентриально стрептозотоцина в дозе 70 мг/кг веса животного. Животных с индуцированным диабетом I типа отбирали по концентрации глюкозы в крови  $>$  ммоль/л (у контрольных животных содержание глюкозы не превышало 8 ммоль/л).

В результате проведенной работы нами было установлено, что при развитии сахарного диабета I типа у крыс происходит ремоделирование митохондриальной сети в гепатоцитах. В митохондриях наблюдается деформация крист и наружной мембраны. Показано, что скорость входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии печени крыс при развитии диабета I типа достоверно увеличивается  $\sim$  в 1.2 раза. Установлено, что при развитии диабета показатели увеличивается параметр  $\text{Ca}^{2+}$  емкости митохондрий печени крыс ( $\sim$  в 1.6 раза) и снижается скорость набухания митохондрий, индуцированного  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии неорганического фосфата. Это говорит о том, что при развитии сахарного диабета I типа происходит увеличение резистентности митохондрий к открытию циклоспорин А-чувствительной МРТ поры. Данное наблюдение может подтвердить тот факт, что при развитии диабета достоверно снижается уровень экспрессии генов *ant1* и *ant2*, ответственных за синтез митохондриальных аденилаттранслокаторов – одних из возможных канальных компонентов МРТ поры.

Пальмитиновая кислота является одним из факторов развития диабета у животных и человека. В связи с этим в работе было исследовано, как изменяется индукция липидной циклоспорин А-нечувствительной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в митохондриях печени крыс, при развитии сахарного диабета I типа. Показано, что скорость пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого набухания митохондрий печени диабетических достоверно увеличивается по сравнению с контрольными животными (при 15 мкМ пальмитиновой кислоты и 30 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  скорость набухания митохондрий печени диабетических животных была  $\sim$  в 2 раза выше по сравнению с контролем). Это свидетельствует, что резистентность митохондрий к данному типу митохондриальной поры при развитии диабета I типа снижается. В основе данного эффекта может лежать несколько факторов облегчающих открытие липидной поры – увеличение уровня свободных жирных кислот в митохондриях, повышение жесткости мембраны и др.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (19-015-00117-а).

## ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ И НЕСЕЛЕКТИВНАЯ ПОРА МИТОХОНДРИЙ: $\text{Cd}^{2+}$ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ВЫЯСНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

### MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN AND PERMEABILITY TRANSITION PORE: $\text{Cd}^{2+}$ AS A TOOL TO STUDY MOLECULAR MECHANISMS OF THEIR INTERACTION

*Беляева Е.А.*

ИЭФБ РАН, Санкт-Петербург, [alenab61@mail.ru](mailto:alenab61@mail.ru)

$\text{Cd}(\text{II})$  это токсичный металл с множественными сайтами действия на систему окислительного фосфорилирования. В предыдущих работах на изолированных митохондриях печени крысы (МПК) нами были выявлены дискретные способы действия  $\text{Cd}^{2+}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ - и SH-зависимые домены, являющиеся ключевыми для проницаемости митохондриальных мембран, а также обнаружена способность ионов двухвалентного кадмия индуцировать открытие неселективной поры внутренней мембраны митохондрий, так называемой

митохондриальной поры перехода проницаемости, или мППП (“mitochondrial permeability transition pore”, mPTP), как в ее низко-, так и высоко-проводящем состоянии. На изолированных МПК нами были получены экспериментальные свидетельства того, что ротенон и стигмателлин - селективные ингибиторы соответственно комплексов I и III дыхательной цепи митохондрий, т.е. I<sub>Q</sub> и III<sub>Q<sub>0</sub></sub> сайтов, были также эффективны как и циклоспорин А (ЦсА) – мощный ингибитор или десенсибилизатор мППП против индуцированного Cd<sup>2+</sup> процесса митохондриального перехода проницаемости (мПП), который наблюдался и без дополнительного добавления Ca<sup>2+</sup> в среду инкубации. Мы сделали заключение, что дыхательные комплексы I и III участвуют в вызываемой Cd<sup>2+</sup> и/или Ca<sup>2+</sup> «пермеабилитации» внутренней мембраны митохондрий. Как известно, мППП обычно активируется при условии окислительного стресса и кальциевой перегрузки, и ее открытие стимулируется повышенным P<sub>i</sub>, истощением адениновых нуклеотидов, а также окисленным состоянием пиридиновых нуклеотидов и критических дитиолов, по крайней мере, на двух дискретных редокс-чувствительных сайтах, “P”- и “S”-сайтах, соответственно, точная локализация которых до сих пор неизвестна. На основе полученных нами, а также имеющихся в литературе данных, мы высказали гипотезу, что комплекс I может иметь отношение к “P”-сайту, а комплекс III – к “S”-сайту мППП, и что в зависимости от условий и типа клеток или один, или оба комплекса могут быть вовлечены в запуск сборки мППП. Также было сделано предположение, что Me<sup>2+</sup>-связывающие сайты, критические для индукции мППП, наиболее вероятно расположены: (i) на пути обратного потока электронов от сукцината к НАД<sup>+</sup> (комплекс I) и (ii) на цитохроме b где-то рядом с гемом b<sub>L</sub> и вблизи от стигмателлин-связывающего сайта (комплекс III); более того, комплекс I (“P”-сайт) and комплекс III (“S”-сайт) представляют собой не только места расположения Me<sup>2+</sup>-связывающих сайтов, но являются важнейшими локусами генерации активных форм кислорода (АФК), играющих решающую роль в окислении критических тиолов и открытии мППП [1-3]. Таким образом, способность Cd<sup>2+</sup> действовать одновременно и как Ca<sup>2+</sup> агонист, и как дитиоловый реагент делает его чрезвычайно полезным для изучения молекулярных основ индукции мППП, в особенности механизмов, связанных с предполагаемым прямым вовлечением компонентов дыхательной цепи в активацию митохондриальной мембранной «пермеабилитации» и клеточной смерти. Так ранее на клетках AS-30D асцитной гепатомы крысы нами было показано, что Cd<sup>2+</sup> активирует гибель клеток, как по механизму некроза, так и апоптоза, и Cd<sup>2+</sup>-индуцированная митохондриальная дисфункция сопровождается повышенной продукцией АФК на уровне комплекса III дыхательной цепи и открытием мППП [4]. Полученные нами ранее на двух типах клеток (AS-30D и PC12) результаты указывали также, что подъема уровня АФК в клетках еще недостаточно для индукции как апоптоза, так и некроза, и что дополнительным фактором, благоприятствующим цитотоксическому действию тяжелых металлов, таких как Cd<sup>2+</sup>, может быть частичная блокада дыхательной цепи митохондрий [4, 5]. Кроме того, нами было обнаружено, что диазоксид, который является одновременно активатором митохондриального АТФ-чувствительного K<sup>+</sup> канала и ингибитором Q-связывающего сайта комплекса II дыхательной цепи, П<sub>Q</sub>, частично защищает AS-30D клетки от индуцируемой Cd<sup>2+</sup> гибели [6]. Для дальнейшего изучения молекулярных механизмов цитотоксического действия Cd<sup>2+</sup> и выяснения причинно-следственных связей, лежащих в основе Cd<sup>2+</sup>-индуцированной митохондриальной дисфункции, а также для получения новых данных, указывающих на участие различных комплексов электрон-транспортной цепи в митохондриальной «пермеабилитации» и клеточной смерти, вызываемой Cd<sup>2+</sup>, в нашей работе был использован ряд эффекторов дыхательного комплекса II. Было найдено, что малонат (эндогенный конкурентный ингибитор дикарбоксилатного сайта комплекса II, П<sub>F</sub>) и теноилтрифлуороацетон (необратимый конкурентный ингибитор Q-связывающего сайта комплекса II, П<sub>Q</sub>) модулируют Cd<sup>2+</sup>-индуцированную токсичность и клеточную смертность. Так малонат частично защищал от индуцированного Cd<sup>2+</sup> некроза AS-30D и PC12 клеток и уменьшал внутриклеточную продукцию АФК в присутствии Cd<sup>2+</sup> на PC12 клетках. Малонат, кроме этого, частично восстанавливал дыхательную функцию, повреждаемую Cd<sup>2+</sup> на изолированных МПК, в частности улучшал фосфорилирующее и максимально разобценное дыхание в KCl среде в присутствии субстратов комплекса I, а также сглаживал изменения базального дыхания и дыхания в состоянии покоя на субстратах комплексов I и II. При этом, малонат увеличивал Cd<sup>2+</sup>-индуцированное набухание митохондрий, энергизованных субстратами комплекса I, в KCl и, в меньшей степени и при более высоких [Cd<sup>2+</sup>], в сахарозной среде, но не оказывал влияния на эффекты Cd<sup>2+</sup> в NaCl среде. Другой селективный ингибитор комплекса II, теноилтрифлуороацетон, сам индуцировал апоптоз AS-30D клеток, который блокировался в присутствии Cd<sup>2+</sup>, а также снижал внутриклеточную генерацию АФК, усиленную Cd<sup>2+</sup>. Наконец, дециллубихинон (аналог кофермента Q, или CoQ<sub>10</sub>), взятый в низких μM концентрациях, не защищал AS-30D клетки от Cd<sup>2+</sup>-индуцированного некроза и усиливал Cd<sup>2+</sup>-индуцированный апоптоз. Высокие μM концентрации дециллубихинона сами являлись высокотоксичными для AS-30D клеток. Все это дает новые важные свидетельства, указывающие на критическое вовлечение комплекса II в механизмы Cd<sup>2+</sup>-индуцированной цитотоксичности. Полученные результаты говорят и о том, что помимо связывания с III<sub>Q<sub>0</sub></sub> участком дыхательной цепи, Cd<sup>2+</sup> вероятно связывается также и с ее П<sub>Q</sub> участком [7]. Более того, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что не столько изменения в продукции АФК, сколько конформационные изменения “Q-зоны” (I<sub>Q</sub>, П<sub>Q</sub>, и III<sub>Q<sub>0</sub></sub>) митохондриальной дыхательной цепи являются ключевыми для Cd<sup>2+</sup>-индуцированной цитотоксичности и клеточной смерти. Именно эти конформационные изменения вероятно вовлечены в Cd<sup>2+</sup> и/или Ca<sup>2+</sup>-индуцированную митохондриальную дисфункцию, опосредованную активацией мППП, и являются кардинальными для многих других патологических состояний и заболеваний, в которых задействован процесс мПП. Полученные нами данные о Cd<sup>2+</sup>-индуцированных динамических изменениях во внутриклеточной продукции АФК в зависимости от продолжительности инкубации клеток с этим металлом в отсутствие и в присутствии различных эффекторов дыхательной цепи и мППП (в частности, последовательность событий и когерентное вовлечение комплекса I, комплекса II/III, и/или мППП) прекрасно согласуются с результатами, найденными в последние годы рядом других

авторов на различного рода экспериментальных моделях, изучающих мППП. На основе анализа имеющихся экспериментальных свидетельств нами была высказана гипотеза, что  $Cd^{2+}$  и/или  $Ca^{2+}$  плюс  $P_i$  или  $Ca^{2+}$  (в присутствии прооксидантов или тиоловых реагентов), или «высокий»  $Ca^{2+}$  являются, главным образом, сигналами (и инструментами) для конформационных изменений, ведущих к дезинтеграции/«дисассемблированию» митохондриальных «респирасома/АТФ синтасома» суперкомплексов, с последующим включением их компонентов путем, зависящим от условий и типа клеток, в «ассемблирование» (сборку) мППП и активацию процесса мПП, участвующего в индукции клеточной смерти различного типа.

1. Belyaeva E.A. Regulated mitochondrial permeability transition: a possible involvement of mitochondrial respiratory complexes I and III // *Mitochondrion* 2004. Vol. 4. P. 71.
2. Belyaeva E.A. et al.  $Cd^{2+}$  versus  $Ca^{2+}$ -produced mitochondrial membrane permeabilization: a proposed direct participation of respiratory complexes I and III // *Chem Biol Interact.* 2004. Vol. 150. P. 253.
3. Belyaeva E.A. Mitochondrial respiratory chain inhibitors modulate the metal-induced inner mitochondrial membrane permeabilization // *Acta Biochim Polon.* 2010. Vol. 57. P. 435.
4. Belyaeva E.A. et al. Reactive oxygen species produced by the mitochondrial respiratory chain are involved in  $Cd^{2+}$ -induced injury of rat ascites hepatoma AS-30D cells // *Biochim Biophys Acta* 2006. Vol. 1757. P. 1568.
5. Belyaeva E.A. et al. Mitochondrial electron transport chain in heavy metal-induced neurotoxicity: effects of cadmium, mercury, and copper // *ScientificWorldJournal* 2012. Vol. 2012.
6. Belyaeva E.A. Effect of diazoxide on AS-30D rat ascites hepatoma cells treated by  $Cd^{2+}$  // *J Evol Biochem Physiol.* 2013. Vol. 49. P. 489.
7. Belyaeva E.A. Respiratory complex II in mitochondrial dysfunction-mediated cytotoxicity: insight from cadmium // *J Trace Elem Med Biol.* 2018. Vol. 50. P. 80.

## ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАЦИИ ВОССТАНОВЛЕННОЙ ФОРМЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЦИТОХРОМА *bd* С ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИМПУЛЬСНОЙ АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ С РАЗРЕШЕНИЕМ ВО ВРЕМЕНИ

## INVESTIGATION OF RECOMBINATION OF THE REDUCED FORM OF BACTERIAL CYTOCHROME *bd* WITH CARBON MONOXIDE USING TIME-RESOLVED PULSED ABSORPTION SPECTROSCOPY

*Силецкий С.А., Арутюнян А.М., Елкина Д.А., Монахова М.В., Борисов В.Б.*

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, E-mail: bor@belozersky.msu.ru, [siletsky@belozersky.msu.ru](mailto:siletsky@belozersky.msu.ru)

Цитохром *bd* - терминальная оксидаза дыхательных цепей бактерий. Фермент катализирует перенос электронов с уби- или менахинола на молекулярный кислород с образованием воды. Эта реакция сопряжена с генерацией протонного потенциала, который используется бактерией для синтеза АТФ. Цитохром *bd* состоит из трех субъединиц: *CydA*, *CydB* и *CydX*. *CydA* несет на себе хинол-связывающий сайт, а также три гема: один низкоспиновый ( $b_{558}$ ) и два высокоспиновых ( $b_{595}$  и  $d$ ). Гем  $b_{558}$  непосредственно вовлечен в окисление хинола. На геме  $d$  происходит связывание  $O_2$  и его превращение в  $2H_2O$ . Роль гема  $b_{595}$  пока не ясна.

Метод импульсной лазерной абсорбционной спектроскопии дает возможность регистрировать с высоким разрешением во времени изменения в отдельных гемах, индуцированные фотодиссоциацией лиганда. В качестве такого лиганда нередко используют окись углерода (СО), что позволяет моделировать реакцию оксидазы с ее природным субстратом -  $O_2$ .

В этой работе с помощью вышеуказанного метода подробно изучена индуцированная фотолизом рекомбинация восстановленного дитионитом цитохрома *bd-I Escherichia coli* со 100% (~1 мМ) СО. Аппроксимация полученных спектрально-кинетических данных произведена методом глобального анализа. Анализ показал, что вслед за фотолизом происходит поэтапное, в четыре фазы, обращение спектральных изменений, вызванных вспышкой, с характеристическими временами ( $\tau$ ) 0,0246, 0,252, 1,15 и 24 мс. Первая фаза вероятнее всего объясняется рекомбинацией гема  $d$  с СО в ферменте. Моделирование показало, что вторая фаза рекомбинации неоднородна. По-видимому, она представляет собой суперпозицию двух разных процессов: связывания СО с фракцией гема  $b_{595}$  и перехода гема  $d$  из пентакоординированного в промежуточное гексакоординированное состояние в той же фракции белка. Четвертая фаза рекомбинации может свидетельствовать о возврате гема  $d$  в пентакоординированное состояние в этой популяции фермента. Что касается третьей фазы рекомбинации, то она скорее всего отражает ресвязывание СО с 15% гема  $b_{558}$ . Такая интерпретация третьей фазы вполне согласуется с результатами анализа спектров магнитного кругового дихроизма комплекса восстановленного цитохрома *bd* с СО, согласно которым при высокой концентрации этого лиганда в реакцию с ним может вступать часть (10-20%) низкоспинового гема  $b_{558}$ . Для объяснения

полученных данных предлагаются гипотетические схемы изменений состояния лигандирования разных гемов в восстановленном дитионитом цитохроме *bd* при фотоллизе и последующей рекомбинации CO.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-04-00094).

## ВЛИЯНИЕ САХАРОЗЫ НА СТАБИЛЬНОСТЬ СОЛНЕЧНОЙ ЯЧЕЙКИ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЙ ТИЛАКОИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ

### EFFECT OF SUCROSE ON THE STABILITY OF A THYLAKOID-SENSITIZED SOLAR CELL

*Волошин Р.А., Жармухамедов С.К.<sup>1</sup>, Аллахвердиев С.И.<sup>1,2,3</sup>.*

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, voloshinra@gmail.com

<sup>1</sup>Институт фундаментальных проблем биологии, РАН, Пущино, Московская обл.

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл.

Высококонцентрированные буферные растворы сахарозы используются для сохранения фотосинтетической активности изолированных компонентов фотосинтетического аппарата (ФА) в процессе их хранения и анализа. Задача повышения стабильности изолированных фрагментов тилакоидных мембран с функционирующим ФА, иммобилизованных на проводящей подложке, является существенной для фотоэлементов на основе компонентов ФА. Одной из причин повреждения фотосинтетического аппарата и снижения активности фотоэлементов являются высокие температуры, возникающие в процессе их эксплуатации. В нашей работе продемонстрировано что присутствие сахарозы в среде с препаратами тилакоидных мембран повышает как стабильность работы ФА, так и эффективность солнечной ячейки, сенсibilизированной препаратами тилакоидных мембран при высоких температурах.

Сахароза незначительно влияет на стабильность разделения зарядов в реакционном центре ФС2 (РЦ ФС2). Активность на уровне РЦ одинаково плавно снижается с ростом температуры от 5 до 40°C для контрольных образцов и образцов, содержащих 0,5 и 1М сахарозы.  $F_v/F_m(10^\circ\text{C})=0,71\pm 0,03$ ;  $0,72\pm 0,03$ ;  $0,732\pm 0,025$  для контроля (без сахарозы), 0,5М р-ра сахарозы и 1М р-ра сахарозы соответственно;  $F_v/F_m(35^\circ\text{C})=0,63\pm 0,04$ ;  $0,66\pm 0,04$ ;  $0,68\pm 0,04$  для контроля; 0,5М р-ра сахарозы и 1М р-ра сахарозы. При этом работа всей электрон-транспортной цепи, измеренная по скорости выделения кислорода в присутствии феррицианида калия – акцептора электронов от ФС1, сильно зависит от присутствия сахарозы. Все препараты демонстрируют максимальную активность при температуре 25°C.  $d[\text{O}_2]/dt(25^\circ\text{C})=68\pm 2$ ;  $74\pm 2$ ;  $90\pm 4$  мкмоль(O<sub>2</sub>)/мг(хл)ч для контроля, 0,5М р-ра сахарозы и 1М р-ра сахарозы, соответственно.  $d[\text{O}_2]/dt(35^\circ\text{C})=45\pm 1$ ;  $62\pm 5$ ;  $75\pm 5$  мкмоль(O<sub>2</sub>)/мг(хл)ч для контроля, 0,5М р-ра сахарозы и 1М р-ра сахарозы. Фотоэлементы на основе наноструктурированного слоя диоксида титана, сенсibilизированного препаратами тилакоидных мембран при облучении белым светом 100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup> демонстрировали максимальное значение фототока при 10°C (контроль, около 80нА), при 35°C (0,5М сахарозы, около 100нА). Препараты, содержащие 1М сахарозы не получилось успешно иммобилизовать на поверхности диоксида титана. Полученные результаты позволяют сделать предположения: 1) сахароза стабилизирует тилакоидные мембраны не только в суспензии, но и в иммобилизованном на твердом субстрате виде; 2) присутствие сахарозы смещает максимум эффективности и стабильности работы солнечной ячейки в зону более высоких температур.

*Работа поддержана грантом РФФИ №19-14-00118, и частично РФФИ № 17-04-01289*

## ТРАНСПОРТ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В МИТОХОНДРИЯХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И СЕРДЦА ПРИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА

### TRANSPORT OF CALCIUM IONS IN MITOCHONDRIA OF SKELETAL MUSCLE AND HEART IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

*Дубинин М.В., Старинец В.С., Теньков К.С., Белослудцев К.Н.*

Марийский государственный университет, 424001, Йошкар-Ола, пл. Ленина, 1, dubinin1989@gmail.com

Мышечная дистрофия Дюшенна представляет собой нервно-мышечное заболевание, которое обусловлено мутацией в гене дистрофина, расположенного на X-хромосоме. Известно, что при этом заболевании наблюдаются значительные морфологические и функциональные изменения митохондрий, связанные с гиперпродукцией активных форм кислорода в митохондриях, снижением активности окислительного фосфорилирования, перекисным окислением мембранных липидов и открытием МТР поры.



Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование функционирования систем транспорта кальция в митохондриях скелетных мышц и сердца дистрофин-дефицитных мышцей линии C57BL/10ScSn-Dmdmdx (mdx мышца) и мышцей C57BL/10 «дикого типа», использованных в качестве контрольных животных.

В результате проведенной работы нами установлено, что митохондрии скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышцей характеризуются более низким, по сравнению с контрольными животными, сопряжением дыхания и окислительного фосфорилирования. В то же время установлено, что митохондрии сердца изучаемых групп животных не различались по изучаемым параметрам.

Показано, что для митохондрий скелетных мышц mdx мышцей характерно существенное снижение скорости  $\text{Ca}^{2+}$  унипорта по сравнению с животными «дикого типа». При этом отмечено отсутствие различий в скорости выхода ионов кальция из органелл посредством  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипорта между экспериментальными группами животных. Выяснено, что для митохондрий скелетной мускулатуры mdx мышцей характерно резкое снижение резистентности к индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры по сравнению с мышцей «дикого типа». В то же время показано, что для митохондрий сердца mdx мышцей характерно достоверное увеличение скорости  $\text{Ca}^{2+}$  унипорта по сравнению с митохондриями контрольных животных. Кроме того, установлено, что митохондрии сердца mdx мышцей характеризуются увеличением скорости выхода ионов кальция из органелл посредством  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипорта по сравнению с органеллами животных «дикого типа». Также установлено, что митохондрии сердца mdx мышцей характеризуются увеличением кальциевой емкости по сравнению с контрольными мышцей.

Показано, что для скелетной мускулатуры дистрофин-дефицитных животных характерно увеличение экспрессии гена доминант-негативной субъединицы кальциевого унипортера  $\text{MCuB}$  по сравнению с животными дикого типа. При этом экспрессия генов других изучаемых в работе субъединиц кальциевого унипортера не изменялась. Также не происходило изменения экспрессии гена  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера. Полученные данные соотнесены с результатами western-blot анализа. Установлено, что митохондрии дистрофин-дефицитных животных характеризуются увеличением количества субъединицы  $\text{MCuB}$  в составе кальциевого унипортера по сравнению с контрольными животными. При этом также наблюдается резкое снижение количества регуляторной субъединицы  $\text{MiCu1}$  в митохондриях mdx мышцей по сравнению с животными дикого типа. Количество других изучаемых в работе субъединиц кальциевого унипортера, а также  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера достоверно не изменялось, что соотносится с данными ОТ ПЦР в реальном времени. Мы предполагаем, что изменение соотношения субъединиц кальциевого унипортера ( $\text{MCuB}$  и  $\text{MiCu1}$ ) приводит к снижению скорости кальциевого унипорта и уменьшению кальциевой емкости митохондрий скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышцей по сравнению с органеллами контрольных животных.

Наряду с этим установлено, что для тканей сердца дистрофин-дефицитных животных характерно увеличение экспрессии гена канальной субъединицы кальциевого унипортера  $\text{MCu}$  по сравнению с животными дикого типа. Также в тканях сердца mdx мышцей наблюдается увеличение экспрессии генов регуляторных субъединиц  $\text{MiCu1}$  и  $\text{MiCu2}$ . Экспрессия генов других изучаемых в работе субъединиц кальциевого унипортера ( $\text{MCuB}$  и  $\text{EMRE}$ ) не различалась между двумя группами животных. Также для тканей сердца дистрофин-дефицитных животных характерно увеличение экспрессии гена  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера. Полученные данные соответствуют результатам ОТ ПЦР в реальном времени: для митохондрий дистрофин-дефицитных животных установлено увеличение количества субъединиц  $\text{MCu}$  и  $\text{MiCu1}$  в составе кальциевого унипортера, а также  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера по сравнению с мышцей «дикого типа». Мы полагаем, что увеличение количества указанных субъединиц в составе кальциевого унипортера и  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера приводит к увеличению скорости кальциевого транспорта и кальциевой емкости митохондрий сердца дистрофин-дефицитных мышцей по сравнению с органеллами контрольных животных.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-75-00011.

## АНАЛИЗ ПРОТОННОГО ТРАНСПОРТА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОРИЕНТАЦИИ ВХОДНОГО ПОЛУКАНАЛА В АТФ-СИНТАЗЕ

## ANALYSIS OF PROTON TRANSPORT FOR DIFFERENT INPUT HALF-CHANNEL ORIENTATIONS IN ATP SYNTHASE

*Ивонцин Л.А., Машковцева Е.В., Нарциссов Я.Р.*

НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, ivontsin@icmph.ru

Одной из частых причин возникновения патологических состояний является энергодефицит тканей и органов организма. Основным источником энергии в клетке для многих физиологических и биохимических процессов являются молекулы аденозинтрифосфата (АТФ), постоянное восполнение которых осуществляется в основном митохондриальным белковым комплексом  $\text{F}_0\text{F}_1$ -АТФ-синтазой с использованием трансмембранного градиента ионов водорода. Мембранная часть фермента представляет собой два несоосных полуканала со сложной траекторией движения протона, поэтому экспериментальная оценка параметров протонного



транспорта, а также влияния мембранного потенциала на транспорт в АТФ-синтазе до сих пор остается малоизученной.

Недавние исследования АТФаз методом крио-ЭМ привели к появлению набора различных структур мембранной части белка, характеризующегося ориентацией протонных полуканалов вдоль плоскости мембраны. В настоящий момент предполагается, что транспорт через эти структуры является более вероятным, чем в ранее описанной трансмембранно ориентированной структуре, однако это требует дополнительного изучения.

С использованием программы Dowser++ было проведено моделирование возможных положений молекул воды в двух структурах входного полуканала из *E. Coli* трансмембранно и латерально ориентированной формы. В результате кластерного анализа были определены наиболее вероятные расположения молекул воды. Механизм протонного транспорта описывался с использованием комбинированного подхода, в котором вероятности переноса протона определялись в квантово-механической модели квазидомерного движения, а задача транспорта через последовательность заряженных центров (аминокислотные остатки или молекулы воды) реализована в рамках стохастического алгоритма.

Расчетное время  $H^+$  транспорта через входной полуканал находилось в диапазоне  $10^{-10}$ - $10^{-8}$  с в зависимости от количества и расположения молекул воды. При этом для латерально ориентированной формы входного полуканала скорость переноса протона оказалась на порядок выше, чем в трансмембранно ориентированной, хотя существенных различий в количестве молекул воды не было обнаружено. Уменьшение уровня разности потенциалов оказывало наибольшее влияние на транспорт протонов вдоль направления действия трансмембранного градиента, однако не приводило к полной остановке. Таким образом, пространственная ориентация полуканалов в мембране может оказывать влияние на функционирование  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы.

## НОВЫЙ МЕХАНИЗМ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ ПРИ СИНТЕЗЕ И ГИДРОЛИЗЕ АТФ. МЕХАНО-ХЕМИОСМОТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

### A NEW MECHANISM OF ENERGY TRANSFORMATION IN SYNTHESIS AND HYDROLYSIS OF ATP. MECHANO-CHEMIOSMOTIC MODEL

*Касумов Э.А., Касумов Р.Э., Касумова И.В.*

ООО Научно-производственный центр «КОРВЕТ», г. Домодедово, E-mail: kasumov\_eldar@mail.ru

Несмотря на многочисленные исследования до сих пор остается нераскрытым механизм не только синтеза АТФ в митохондриях, хлоропластах, бактериях [1], но и механизм передачи энергии при гидролизе АТФ при активном переносе молекул через биологические мембраны, мышечном сокращении [2] и др. В связи с этим мы предлагаем механо-хемиосмотическую модель сопряжения переноса электронов по ЭТЦ, переноса протонов, передвижения катионов, низкоамплитудного набухания-сокращения органелл и синтеза АТФ [3, анимация: [www.youtube.com/watch?v=CeZxSyeDBwk](http://www.youtube.com/watch?v=CeZxSyeDBwk)]. Согласно этой модели предполагается, что электрон переходит от [2Fe-2S] кластера ISP белка одного димера на гем  $c_1$  (или  $f$ ) другого димера цитохром  $bc_1$  (или  $b_{L}$ ) комплекса, расположенного на противоположной стороне мембраны крист (тилакоида) при сокращении межмембранного пространства митохондрий или тилакоидов хлоропластов. По нашему мнению, такое низкоамплитудное набухание-сокращение выполняет регуляторную функцию, приобретенную эволюционно в отличие от некоторых примитивных бактерий. Особо надо отметить, что одним из важных постулатов механо-хемиосмотической модели является сопряженное функционирование АТФ синтетазы с низкоамплитудным набуханием-сокращением. При сокращении межмембранного пространства скрученные  $b_2$  субъединицы укорачиваются в результате присоединения ионов фосфата (а также, других полианионов, в т.ч. полифосфатов) к положительно заряженным остаткам основных аминокислот (лизина и аргинина) за счет протонирования, что вызывает притягивание  $\alpha_3\beta_3$ -гексамера к мембране в процессе энергизации мембраны. В это же время,  $\gamma$ -субъединица вращается по противочасовой стрелке  $360^\circ$  шагами  $30^\circ$  и  $90^\circ$ , благодаря связыванию ионов фосфата с положительно заряженными аминокислотными остатками на N-концевой части  $\gamma$ -субъединицы в электрическом поле. Синтез АТФ происходит в течение деэнергизации митохондрий и набухания межмембранного пространства, в результате дефосфатизации под действием ионов кальция  $\gamma$ -субъединица вращается обратно по часовой стрелке, тогда как  $b_2$  субъединицы раскручиваются и отдаляют  $\alpha_3\beta_3$ -гексамер от мембраны. Эта модель хорошо согласуется с влиянием полифосфатов на энергетику [4]. Следует подчеркнуть, что протонирование основных аминокислотных остатков (лизина и аргинина) происходит вследствие изменения рН матрикса от щелочных к нейтральной величине при переходе шести протонов из общепринятых девяти (три протона расходуются для синтеза АТФ) в матрикс через АТФ синтетазу. Энергия, выделяемая при нейтрализации девяти протонов равна 122,94 ккал/моль, которая близка к значению энергии, получаемой при отрыве двух атомов водорода и их ионизации - 122,34 ккал/моль, хотя изменение свободной энергии для окисления NADH в стандартных условиях составляет 52,6 ккал/моль, что значительно меньше, чем в

физиологических условиях. В таких же физиологических условиях, по литературным данным, на синтез 3 молекул АТФ в клетке требуется 37,2 ккал/моль энергии. По нашим расчетам на скручивание  $b_2$  субъединиц расходуется - 8,02 ккал/моль, а на вращение  $\gamma$ -субъединицы - 4,39 ккал/моль энергии при значениях  $\epsilon$  диэлектрической постоянной. Зависимость расходуемой энергии на вращение  $\gamma$ -субъединицы и скручивание  $b_2$  субъединиц от диэлектрической постоянной показывает, что расход энергии может быть очень высоким при значениях диэлектрической постоянной ниже 10, что не позволит произойти синтезу АТФ. Например, при значении диэлектрической постоянной равно 1, потребовалось бы 757,22 ккал/моль энергии для фосфата с 2-мя зарядами только для вращения  $\gamma$ -субъединицы и скручивания  $b_2$  субъединиц, а с увеличением заряда требуется еще больше энергии. Следовательно, производство энергии очень сильно зависит от количества воды в клетке.

Таким образом, в процессе синтеза АТФ энергия нейтрализации ионов используется для электростатических взаимодействий и запасается в виде протона и иона фосфата в молекуле АТФ, и наоборот, во время гидролиза АТФ образуются протон и ион фосфата. Эти протоны изменяют pH к нейтральной величине (опять энергия получается за счет нейтрализации зарядов), вследствие чего происходит фосфатизация положительно заряженных аминокислотных остатков, где за счет электростатического взаимодействия одноименных зарядов в электрическом поле выполняется работа, например, сокращение мышечного волокна.

1. Walker J.E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown // *Biochem Soc Trans.* 2013. Vol 41. N. 1. P. 1-16.
2. Kodera, N., Ando, T. The path to visualization of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy // *Biophys. Rev.* 2014. Vol. 6. N. 3-4. P. 237-260.
3. Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V. A mechano-chemiosmotic model for the coupling of electron and proton transfer to ATP synthesis in energy-transforming membranes: a personal perspective // *Photosynth. Res.*, 2015. Vol. 123. N. 1. P. 1-22.
4. Seidlmayer LK et al. Dual role of inorganic polyphosphate in cardiac myocytes: The importance of polyP chain length for energy metabolism and mPTP activation // *Arch Biochem Biophys.* 2018. Vol. 662. P. 177-189.

## ЭНЕРГОТРОПНЫЙ И ПРОТОНОФОРНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ РАДИОЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЗАМЕЩЕННЫХ САЛИЦИЛАНИЛИДОВ НА МЕМБРАННЫХ СИСТЕМАХ ПРИ Г-ОБЛУЧЕНИИ

### ENERGY-TROPIC AND PROTONOPHORE MOLECULAR MECHANISM OF RADIO PROTECTIVE ACTION OF SUBSTITUTED SALICYLANILIDES ON MEMBRANE SYSTEMS AT G-IRRADIATION

*Кожокару А.Ф.*

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Московская область, Пущино, aurelium@inbox.ru

На искусственных бислойных липидных мембранах (БЛМ) было выявлено увеличение электропроводности ( $G_m$ ) и было доказано протонофорное действие для 16 соединений из класса замещенных салициланилидов (ЗСА) с OH и NH-группой в основном бензольном кольце их молекул. Эти препараты и аспирин по химической структуре являются различными производными салициловой кислоты. Препараты с линейной зависимостью  $G_m$  от концентрации ЗСА осуществляли транспорт протона по мономерному механизму подвижных переносчиков. Для препаратов, у которых в химической структуре имеются 2 дополнительных бензольных кольца, способствующих более высокой растворимости препаратов в липидной мембране, была обнаружена квадратичная зависимость  $G_m$  БЛМ от концентрации препарата в растворе и, соответственно, димерный механизм трехстадийного протонного транспорта. Галогенные заместители, притягивающие электронное облако и способствующие диссоциации протона OH-группы, увеличивали протонофорную активность ЗСА в следующем порядке:  $\Gamma > Br > Cl$ . Являясь протонофорами на БЛМ, препараты ЗСА разобщали окислительное фосфорилирование (ОФ) в мембранах митохондрий (Mx) печени крыс, что приводило к снижению образования энергии, необходимой для синтеза АТФ. Была получена корреляционная зависимость протонофорной активности в присутствии Mx на БЛМ и разобщающей активности на Mx для исследованных соединений. Радиопрофилактическая активность ЗСА на лабораторных животных при сублетальных и летальных дозах  $\gamma$ -облучения 7-11 Гр коррелировала с их протонофорной активностью на БЛМ при оптимальной радиозащитной концентрации 5,44 мг/кг живого веса. Эти две корреляционные зависимости позволяют сделать вывод о первичном протонофорном и разобщающем молекулярном механизме радиозащитного действия изученных соединений ЗСА, связанном с временным и обратимым ингибированием образования энергии. Восстановление энергообразования в клетке и в целом организме, уменьшение степени разобщения ОФ и дыхания в Mx после  $\gamma$ -облучения становится возможным, вероятно, благодаря процессам клеточной адаптации. На основании полярографических кривых увеличение скорости потребления кислорода митохондриями при разобщении ОФ препаратами уменьшает его

концентрацию в среде и, по всей вероятности, в клетке, - возникает состояние гипоксии. Снижение синтеза энергии при разобщении ОФ препаратами ЗСА способствовало временному угнетению клеточного метаболизма и снижению скорости пролиферации клеток, что было доказано в опытах на синхронной многоядерной культуре миксомицета *Fisagum polycephalum*. Внутриклеточная гипоксия, замедление клеточного метаболизма и пролиферации к моменту облучения приводили к снижению образования перекисных радикалов, увеличению времени и полноты репарации ДНК, синтеза стволовых клеток и, следовательно, увеличению радиоустойчивости клетки и организма. Молекулярное действие ЗСА проявлялось в физико-химических и структурных изменениях липидной фазы биологических мембран и уменьшении потенциального барьера на границе мембрана/среда, снижении микровязкости мембран эритроцитов на 0,5-1,0 сПз и увеличении текучести мембран липосом и Мх, в результате увеличивались проницаемость мембран Мх для препаратов и их разобщающее действие. Таким образом, радиозащитное действие исследованных соединений ЗСА проявляется на молекулярном, клеточном и организменном уровне и является многофакторным. Выявлены 3 эффективных потенциальных радиопротектора, показавших высокую радиозащитную эффективность 70-80% в низких нетоксических концентрациях 0,54-5,44 мг/кг живого веса, по показателю фактора изменения дозы 1,54-1,56 они не уступают наиболее эффективным из известных радиопротекторов.

Молекулярными механизмами действия разобщителей ОФ является снижение трансмембранного потенциала Мх, стимуляция скорости дыхания и последующее ее ингибирование при увеличении концентрации разобщителя. «Мягкое» разобщение препаратов ионами Скулачева, природными флавоноидами у млекопитающих может приводить к снижению генерации токсичных активных форм кислорода в митохондриях, образующихся при патологиях. Разобщающим действием обладают также ионофоры (грамидин), повышающие электропроводность мембраны в результате образования ионных каналов, эндогенные жирные кислоты, способствующие образованию тепла у зимнеящих. Специфическое разобщающее действие препаратов на Мх паразитов, как было показано нами ранее, являются основными отличиями комплексного молекулярного механизма действия фирменных антипаразитарных препаратов из класса ЗСА (нитроксинил, тегалид) и двухосновных серосодержащих кислот (битионол).

1. Кожокару А.Ф., Гъбев Е.Е., Владимиров Ю.А., Акоев И.Г. Действие нового класса замещенных салициланилидов на ионную проводимость липидных мембран. // Биофизика. 1981. 26 (6), 995-998.
2. Кожокару А.Ф. Направленная модификация структурно-функционального состояния мембран с целью изменения устойчивости клеток и организма к факторам окружающей среды. //Дисс. докт. физ.-мат. наук. 1992. М., МНО «Форум». 88 с.

## РАЗОБЩИТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ КАК SH-РЕАГЕНТЫ

### UNCOUPLERS OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AS SH-REAGENTS

*Л.С. Хайлова, А.М. Фирсов, Ю.Н. Антоненко, Е.А. Котова*

НИИ ФХБ имени А. Н. Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва 119991, Россия

E-mail: kotova@genebee.msu.ru; тел. (495)9395149; факс: (495)9393181

Считается, что окислительный стресс является причиной множества серьезных заболеваний, включая нейродегенеративные нарушения, сердечную недостаточность, патологии почек, нарушение работы эндокринной системы. Согласно ряду работ, разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях может существенно влиять на генерацию активных форм кислорода (АФК). Чтобы доказать связанный с АФК механизм терапевтической активности разобщителей, исследователи часто используют данные о влиянии антиоксидантов на защитное действие разобщителей. В частности, на основании полного снятия кардиопротекторного действия известного разобщителя карбонилцианида 4-(трифторметокси) фенилгидразона (FCCP) с помощью N-ацетилцистеина (NAC) [1] авторы приписали кардиозащите влиянию FCCP на уровень АФК. В ряде работ об участии модуляции уровня АФК карбонилцианид-3-хлорфенилгидразоном (СССР), FCCP и флуазинамом в некоторых клеточных процессах судили по чувствительности действия разобщителей на эти процессы к NAC. На основании данных о том, что NAC ингибирует деполяризацию митохондрий в клетках под действием СССР, авторы [2] даже предположили, что АФК регулируют митохондриальный трансмембранный потенциал. С другой стороны, ряд ранних исследований выявил доказательство того, что как СССР, так и FCCP могут ковалентно реагировать с тиолами [3-5]. Следует отметить, что о подавлении действия СССР аминотиолами сообщалось в очень ранних работах [6]. Тем не менее, недавно было высказано мнение о том, что мягкое разобщение может увеличивать или уменьшать митохондриальные АФК в зависимости от редокс-потенциала среды [7]. Фактически, это утверждение было основано на вызванном добавлением ДТТ (1-2 мМ) уменьшении эффекта FCCP на уровень АФК. Ввиду наших данных, концентрация FCCP сама по себе резко снижается при добавлении ДТТ в таких экспериментах.

Среди множества митохондриальных разобщителей фунгицид флуазинам известен не только своей чрезвычайно высокой разобщающей способностью, но и своеобразной особенностью, а именно быстрым

исчезновением активности после добавления разобщителя к изолированным митохондриям [8,9]. Было установлено, что быстрая дезактивация флуазинома связана с нуклеофильным замещением атома хлора в 3-ем положении фенильной группы остатком глутатиона [8]. Однако до сих пор не было получено данных о влиянии экзогенно добавленных антиоксидантов на деполаризующую активность флуазинома в митохондриях.

В настоящей работе мы провели тщательное исследование функциональных последствий взаимодействия СССР, FCCP и флуазинома с тиоловыми антиоксидантами, в частности их влияния на способность разобщителей снижать мембранный потенциал и ускорять дыхание изолированных митохондрий. В настоящем исследовании показано, что разобщающая активность таких мощных протонофоров, как карбонилцианид 4-(трифторметокси) фенилгидразон (FCCP), карбонилцианид 3-хлорфенилгидразон (СССР) и флуазином может быть полностью подавлена добавлением тиолсодержащих антиоксидантов к изолированным митохондриям. В частности, N-ацетилцистеин, глутатион, цистеин и дитиотреитол устраняли как уменьшение потенциала мембраны митохондрий, так и увеличение скорости дыхания, вызванное FCCP. Мы также продемонстрировали подавление протонофорной активности СССР и FCCP в модельных липидных бислойных мембранах. В отличие от случая флуазинома, где предполагается, что фермент глутатион-S-трансфераза (GST) [10] участвует во взаимодействии разобщителя с GSH и, вероятно, с NAC, производные карбонилцианидфенилгидразона FCCP и СССР, скорее всего, подвергаются прямой модификации тиолсодержащими соединениями без участия митохондриальных белков. Это предположение подтверждается подавлением FCCP-индуцированного тока через БЛМ при добавлении цистеина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 16-14-10025).

1. Brennan, J. P.; Southworth, R.; Medina, R. A.; Davidson, S. M.; Duchon, M. R.; Shattock, M. J. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *72*, 313-321.
2. Chaudhari, A. A.; Seol, J. W.; Kim, S. J.; Lee, Y. J.; Kang, H. S.; Kim, I. S.; Kim, N. S.; Park, S. Y. *Oncol. Rep.* **2007**, *18*, 71-76.
3. Drobnica, L.; Sturdik, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *585*, 462-476.
4. Toninello, A.; Siliprandi, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *682*, 289-292.
5. Mlejnek, P.; Dolezel, P. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *239*, 110.
6. Heytler, P. G. *Biochemistry* **1963**, *2*, 357-361.
7. M.A. Aon, S. Cortassa, B. O'Rourke. *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 865–877
8. Guo, Z.; Miyoshi, H.; Komyoji, T.; Haga, T.; Fujita, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1056*, 89-92.
9. Hollingworth, R. M.; Gadelhak, G. G. *Rev. Toxicol.* **1998**, *2*, 253-266.
10. Clarke, E. D.; Greenhow, D. T.; Adams, D. *Pestic. Sci.* **1998**, *54*, 385-393.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЗМЕМБРАННОГО МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА И ЭЛЕКТРОННЫХ УСТРОЙСТВ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ АНАЭРОБНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА

### USE OF MEMBRANELESS MICROBIAL FUEL CELL AND ELECTRONIC DEVICES FOR PRACTICAL USE OF ANAEROBIC MICROBIOTA ENERGY

Лазукин А.А., Волченко Н.Н., Самков А.А., Худокормов А.А.

Кубанский государственный университет, Краснодар, lazukin1996@mail.ru

В настоящее время все более актуальной становится проблема поиска новых источников энергии. Ввиду расширения технологических возможностей появляется возможность создания самых разных технических устройств, для которых традиционные источники энергии могут не вполне подходить. Примером может служить создание автономных метеорологических станций, для питания которых используют солнечные батареи, демаскирующие устройства и увеличивающие риск вандализма. На указанном примере акцентируется внимание на задаче создания альтернативных полностью автономных источников питания.

Микробный топливный элемент (МТЭ) — биотехнологическое устройство, позволяющее преобразовывать энергию химических связей органических веществ в электрическую посредством микроорганизмов. Микробные топливные элементы являются новым типом топливных элементов, и, в виду низкой удельной мощности, пока не нашли широкого применения. В настоящее время, мощность большинства микробных топливных элементов, по разным данным, составляет от 1 до 100 мВт, что является крайне незначительными показателями, недостаточными для работы большинства электронных приборов.

Несмотря на низкую мощность МТЭ, известны случаи питания автономного комплекса мониторинга на реке Потомак (США), работающего только от энергии данного источника. Авторы использовали сборку микробных топливных элементов, с суммарной генерируемой мощностью около 100 мВт. Мощность, потребляемая электроникой, при этом составляла 50 мВт. В рамках представляемой работы была произведена

попытка питания электронного устройства (датчик температуры с радиопередатчиком), использующего энергию бентосного микробного топливного элемента в лабораторных условиях.

Для работы был сконструирован безмембранный микробный топливный элемент бентосного типа. Материалом служил углеродный токопроводящий войлок. Для создания анаэробных условий в анодную зону были внесены донные отложения пресного водоема. Толщина илового слоя, над углеродным войлоком составила 2 сантиметра, выше располагался катод, выполненный из того же материала, что и анод, и имеющий такую же площадь при толщине 3 мм. К аноду и катоду были подключены электрические провода, к которым подключали остальные устройства. В течение первой недели бентосный МТЭ набирал свою мощность. Выводы от электродов представляли собой изолированные от воды, но имеющие электрический контакт с углеродным войлоком гибкие провода. Концы проводов были подключены к резистору, номиналом 500 Ом, для создания электрического тока. Напряжение при этом составило 490 мВ, ток 0,98 мА, мощность 480 мкВт. Для увеличения напряжения было изготовлено авторское техническое устройство, содержащее сверхнизковольтный DC-DC преобразователь, накопитель заряда в виде ионистра номиналом 4Ф, и микропроцессорный супервизор, отслеживающий уровень заряда ионистра. К такому устройству был подключен микроконтроллер Atmega 88 с минимальной обвязкой и подключенным датчиком температуры DS18B20. Для передачи данных о температуре использовался передатчик с шиной UART «НС – 12» с частотой 433 МГц. В результате сложилась следующая последовательность действий: DC-DC сверхнизковольтный преобразователь, используя энергию МТЭ заряжает ионистор. Супервизор отслеживает заряд, и, при достижении напряжения в 3.27 В подает питание на микроконтроллер. Микроконтроллер отслеживает показания датчика, передает их, и, по завершении работы программы воздает высокий уровень на ногу перезагрузки супервизора. Супервизор отключает питание микроконтроллера, и зарядка ионистра продолжается. Особенность данной схемы в том, что при наличии крайне низкой электрической мощности, происходит ее аккумуляция и выполнение полезной работы. При мощности МТЭ в 480 мкВт отправка радиосигнала происходила каждые 20 минут. Суммарная потребляемая мощность устройства, в момент зарядки ионистра, составляет 200 мкВт.

Таким образом была показана возможность питания датчика температуры с функцией отправки данных по радиоканалу, используя только энергию МТЭ. В будущем, данные наработки могут быть использованы для создания более совершенных приборов контроля окружающей среды, с неограниченным по питанию временем работы.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОНОВ ТЕРБИЯ С УЧАСТКАМИ СВЯЗЫВАНИЯ МЕТАЛЛОВ В КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩЕМ КОМПЛЕКСЕ ФОТОСИСТЕМЫ 2

### INTERACTION OF TERBIUM CATIONS WITH THE METAL-BINDING SITES IN PHOTOSYSTEM II OXYGEN-EVOLVING COMPLEX

*Ловягина Е.Р., Локтюшкин А.В., Сёмин Б.К.*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,  
биологический факультет, кафедра биофизики, Москва, E-mail: Elena.Lovyagina@gmail.com

Фотосинтез окислительных организмов основан на светоиндуцированном процессе окисления воды, в результате которого фотосистема 2 (ФС2) получает электроны и протоны, необходимые для синтеза высокоэнергетических соединений (АТФ и НАДФН), и выбрасывает в атмосферу побочный продукт реакции окисления двух молекул воды – молекулярный кислород. Процесс окисления воды и синтеза O<sub>2</sub> катализируется кислород-выделяющим комплексом (КВК), локализованным с внутренней стороны тилакоидной мембраны. Каталитический центр КВК состоит из 4 катионов марганца и одного катиона кальция, связанных кислородными мостиками (Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>). Удаление катиона Ca и внешних белков PsbP и PsbQ с сохранением марганцевого кластера и Mn-стабилизирующего белка PsbO (33кДа) приводит к утрате функции выделения кислорода. Однако неполное окисление воды до пероксида водорода в КВК с такими нарушениями продолжает осуществляться. Это позволяет регистрировать электронный транспорт к переносчикам на акцепторной стороне ФС2 по восстановлению искусственного акцептора 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ). Функция полного окисления воды до молекулярного кислорода может быть восстановлена инкубацией препаратов ФС2 без Ca с экзогенным Ca. В нашей работе мы исследовали взаимодействие катионов тербия с донорной стороной мембранных препаратов ФС2 без Ca в КВК. Инкубация таких препаратов с 1 мМ Tb<sup>3+</sup> в течение 10-20 мин приводит к ингибированию Ca-зависимого восстановления скорости выделения кислорода на 60%. Присутствие 30 мМ Ca<sup>2+</sup> в среде во время инкубации препаратов с 1 мМ Tb<sup>3+</sup> полностью защищает КВК препаратов ФС2 без Ca от ингибирования катионами тербия. Полученные результаты позволяют предположить, что катионы тербия способны конкурентно связываться с Ca-связывающим участком КВК.

Экстракция марганцевого кластера и всех белков КВК сопровождается появлением участка, связывающего катион марганца, и называемого высокоаффинным Mn-связывающим участком. Связанный с этим участком катион марганца окисляется переносчиком электронов радикалом тирозина Y<sub>Z</sub><sup>•</sup>.

Высокоаффинный участок наряду с катионами  $Mn^{2+}$  способен взаимодействовать с катионами  $Fe^{2+}$ , которые окисляются  $Y_Z^\bullet$  на свету и в трехвалентном состоянии прочно связываются с этим участком. То есть, высоким сродством к этому участку обладает не двухвалентный катион металла, а трехвалентный. По-видимому, решающим фактором в связывании катиона металла с высокоаффинным Mn-связывающим участком является его валентность. Исследование взаимодействия катионов  $Tb^{3+}$  с высокоаффинным Mn-связывающим участком в препаратах ФС2 без Mn показало, что они прочно связываются с этим участком в темноте, полностью препятствуя донированию электронов экзогенной донорной системой [ $Mn^{2+} + H_2O_2$ ]. Эффект полного блокирования электронного транспорта от [ $Mn^{2+} + H_2O_2$ ] к  $Y_Z^\bullet$  наблюдался при концентрациях катионов тербия 50 мкМ и выше. Связываясь с высокоаффинным участком катионы тербия экранируют  $Y_Z^\bullet$  и от другого экзогенного донора 1,5-дифенилкарбазида, имеющего свой участок связывания на донорной стороне ФС2(-Mn). Полное блокирование электронного транспорта от 1,5-дифенилкарбазида к  $Y_Z^\bullet$  регистрируется при концентрации  $Tb^{3+}$  почти на порядок большей (200 мкМ). При этом поток электронов от 1,5-дифенилкарбазида через альтернативный низкоаффинный участок к  $P680^+$  полностью сохраняется. Блокирование катионами тербия электронного транспорта через высокоаффинный Mn-связывающий участок к  $Y_Z^\bullet$  подтверждается данными измерения кинетики индукции флуоресценции в препаратах ФС2 без марганца в присутствии экзогенной донорной системой [ $Mn^{2+} + H_2O_2$ ] и катионов тербия.

### ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЭРИТРОЦИТАХ И ГЕМОГЛОБИНЕ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА

### STUDY OF STRUCTURAL CHANGES IN ERYTHROCYTES AND HEMOGLOBIN, INDUCED BY HYDROGEN PEROXIDE

*Лоскутова А.Ю., Десяткин А.А., Ревин В.В.*

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск.

Функциональная активность эритроцитов определяется их способностью выполнять газотранспортную функцию, которая в значительной степени зависит от состояния биологических мембран эритроцитов. В связи с этим исследование механизмов, изменяющих функциональные свойства эритроцитов с последующим кислородтранспортным дефицитом в тканях, является достаточно актуальным. Целью нашей работы стало исследование структурных изменений в эритроцитах и гемоглобине, индуцированных пероксидом водорода.

Объектом были выбраны эритроциты голубя. В качестве индуктора клеточной гибели использовали пероксид водорода, который вводили в кровь голубя *in vitro* в различных концентрациях ( $10^{-5}$  -  $10^{-3}$ М) и инкубировали при 40°C. Измерения структурных изменений эритроцитов проводили при помощи лазерного интерференционного микроскопа МИИ-4М с компьютерной регистрацией данных. Также, при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния была исследована конформация гемоглобина. Для этого использовались полосы комбинационных спектров (положение максимумов): 1172 и 1375  $cm^{-1}$ . Соотношение  $I_{1375} / I_{1172}$  показывает интенсивность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец, а ее изменение может быть связано с конформационными изменениями пирролов.

Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют о том, что пероксид водорода влияет на структуру эритроцитов. С помощью метода лазерной интерференционной микроскопии было показано, что площадь эритроцита уменьшается, по сравнению с контрольной пробой. Наибольшее изменение было замечено при концентрации пероксида водорода  $10^{-3}$  М и времени инкубации 20 минут.

На следующем этапе исследования проведён анализ структуры гемоглобина при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния. Было установлено, что при увеличении времени инкубации проб значения отношения  $I_{1375} / I_{1172}$  возрастает. В контрольных пробах данный показатель ниже.

На основании проведённых экспериментов можно сделать вывод о том, что действие пероксида водорода реализуется как за счёт изменения структуры мембран эритроцитов, так и за счёт изменения конформации гемоглобина, что может свидетельствовать о нарушении кислородтранспортной функции.

## РЕЦЕПТОРЫ ГЛУТАМАТА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА И МОЗГА

### GLUTAMATE RECEPTORS IN HEART AND BRAIN MITOCHONDRIA

***Нестеров С.В.<sup>1,2</sup>, Пантелева А.А.<sup>3</sup>, Павлик Л.Л.<sup>4</sup>, Михеева И.Б.<sup>4</sup>, Ягужинский Л.С.<sup>1,2,3</sup>, Подопригора Г.И.<sup>1</sup>, Нарциссов Я.Р.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup> Институт цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

<sup>3</sup> НИИ ФХБ им. Белозерского, Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

В течение нескольких последних лет нами были обнаружены в несинаптических митохондриях мозга [1,2] и в митохондриях сердца [3,4] глутаматные рецепторы NMDAR. Присутствие глутаматного рецептора изначально было установлено благодаря обнаружению эффекта низких концентраций глутамата на выделенном препарате митохондрий. Глутамат в концентрации от 10 мкМ открывал кальциевый канал и индуцировал синтез H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в митохондриях, который частично подавлялся ингибиторами NMDA-рецептора [2].

В настоящей работе приводятся данные иммуноферментного анализа, которые однозначно подтверждают наличие в митохондриях сердца и митохондриях мозга крыс глутаматного NMDA-рецептора. Доказано присутствие двух достаточных субъединиц для сборки функционального рецептора – глицин-связывающей субъединицы NR1 и глутамат-связывающей NR2B. Методом иммуноблоттинга показывается локализация этого рецептора во внутренней мембране митохондрий. В работе также проводится теоретический и экспериментальный поиск условий, в которых может происходить активация митохондриального NMDAR и делается вывод, что активация рецептора должна происходить при гипоксии в условиях блокирования работы комплекса I.

В экспериментах по Вестерн-блоту с использованием anti-NMDAR1 мы обнаружили полосу с массой 145±5кДа, которая может соответствовать устойчивому комплексу NMDAR1-субъединицы с ND2 субъединицей митохондриального комплекса I. Тесное взаимодействие этих белков известно в плазматической мембране [5,6]. В продолжение исследования возможной роли NMDAR рецептора в митохондриях нами анализируются литературные данные о молекулярном докинге NMDA-рецептора с ND2 субъединицей комплекса I. В результате сопоставления данных докинга с положением ND2-субъединицы в структуре полного комплекса I выдвигается предположение о возможности стыковки NMDAR с функционирующим комплексом I во внутренней мембране митохондрий. Структура такого суперкомплекса предполагает, что связывание агонистов (глицина и глутамата) происходит со стороны митохондриального матрикса. Это позволяет думать, что митохондриальный NMDAR в первую очередь должен регистрировать внутримитохондриальные сигналы.

Работа поддержана институтом цитохимии и молекулярной фармакологии, а также грантом РФФИ 19-04-00835\19.

1. Lobysheva N.V. et al. Glutamate as a regulator of ROS production by brain mitochondria under hypoxia/reoxygenation conditions // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2012. Vol. 1817. P. S79.
2. Lobysheva N.V. et al. Glutamate induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis in nonsynaptic brain mitochondria // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. Vol. 65. P. 428–435.
3. Selin A.A. et al. On the regulative role of the glutamate receptor in mitochondria // *Biol. Chem.* 2016. Vol. 397, № 5. P. 445–458.
4. Nesterov S.V. et al. NMDA and GABA receptor presence in rat heart mitochondria // *Chem. Biol. Interact.* 2018. Vol. 291. P. 40–46.
5. Gingrich J.R. et al. Unique domain anchoring of Src to synaptic NMDA receptors via the mitochondrial protein NADH dehydrogenase subunit 2 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. Vol. 101, № 16. P. 6237–6242.
6. Scanlon D.P. et al. An evolutionary switch in ND2 enables Src kinase regulation of NMDA receptors // *Nature Communications*. 2017. Vol. 8. P. 15220.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА В ДИАПАЗОНЕ -170 °С – +20 °С В РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

### THE TEMPERATURE DEPENDENCE OF FLUORESCENCE LIFETIME OF TRYPTOPHAN IN THE RANGE OF -170 °C – +20 °C IN VARIOUS SOLVENTS

***Пащенко В.З., Горохов В.В., Корватовский Б.Н., Нокс П.П.***

МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, E-mail: vz.paschenko@gmail.com

Флуоресцентная спектроскопия триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного внутреннего индикатора конформационного состояния этих белков, их динамики, а также процессов межмолекулярных взаимодействий. Известно, что динамические (спектрально-кинетические) характеристики молекул триптофана (Trp) сильно зависят от свойств окружающей среды [1]. Собственная



флуоресценция индольного хромофора тонко реагирует на состояние окружающей среды, а длительность и квантовый выход флуоресценции являются индикатором даже небольших изменений в этом окружении [2]. Уже давно используются в качестве показателя, отражающего состояние внутримолекулярной динамики белка, в том числе при изменении температуры, положение максимума спектра флуоресценции белковых триптофанилов, определяемое релаксационными характеристиками полярного окружения возбужденного хромофора [3]. Сложнее ситуация с интерпретацией влияния состояния окружения на длительность флуоресценции белковых триптофанилов. Особенно это относится к малоисследованным температурным зависимостям длительности триптофановой белковой флуоресценции в диапазоне от криогенных температур до комнатной. Детальное выяснение природы локальных изменений окружения триптофановых остатков в структуре белка, влияющих на регистрируемые в эксперименте зависимости от температуры длительности флуоресценции ( $\tau$ ), требует тщательных комплексных исследований, включая различные модели, описывающие особенности изменения  $\tau$  молекул Тгр от температуры в различных растворителях.

Наблюдаемый в экспериментах многокомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции Тгр в растворе, а также в составе пептидов и белков можно связать, в том числе, с наличием трех возможных ротамеров индольных колец вокруг  $C_\alpha$ - $C_\beta$  связи, возникающих в результате электростатических взаимодействий в молекуле Тгр [4]. При этом обычно удельное содержание одного из ротамеров существенно выше, чем двух других. В свою очередь, среди этих двух наименее выраженных по содержанию ротамеров также преобладает один из них.

Мы исследовали температурные зависимости (-170 - +20 °С) длительности флуоресценции молекул триптофана в водном растворе, в растворах глицерина (50 %, 75 %, по объёму), диметилсульфоксида (50 %, 75 %) и в 1 М водном растворе трегалозы. Во всей температурной области кинетика флуоресценции образцов лучшим образом аппроксимировалась тремя экспонентами с характерными временами при комнатных температурах  $\tau_1 \sim 3$  нс,  $\tau_2 \sim 4$  нс и  $\tau_3 \sim 15$  нс. Состав растворителя, определяющий детали его взаимодействия с индольным ядром и аланильной боковой цепью молекулы Тгр, влиял на величину конкретных соотношений популяций разных ротамеров, фиксируемых низкой температурой. В ходе нагревания замороженных образцов наблюдался антибатный (противофазный) характер температурных зависимостей длительности флуоресценции наиболее быстрого и среднего компонентов в температурной области от -60 °С до 10 °С. При этом, регистрировали разные значения температур перехода между ротамерами Тгр (температурных диапазонов антибатного поведения компонентов затухания флуоресценции Тгр) в разных растворителях – соответственно температурным диапазонам активизации молекулярной динамики в окружении флуоресцирующих хромофоров. Для объяснения антибатного характера экспериментальных температурных зависимостей  $\tau$  предложена модель, учитывающая переход молекулы Тгр из возбужденного состояния в состояние с разделением заряда, обратный переход в возбужденное состояние, а также релаксацию состояния с разделенными зарядами в основное состояние. Математически данная модель эквивалентна предложенной нами ранее модели [5], описывающей переходы между разными ротамерными формами триптофана, однако физический смысл процессов в новой модели может оказаться более соответствующим действительности, чем в ротамерной модели. Полученные результаты могут служить основой для интерпретации экспериментальных зависимостей длительности триптофановой флуоресценции от температуры в белках.

1. Dashnau J.L. et al. Tryptophan interactions with glycerol/water and trehalose/sucrose cryosolvents: infrared and fluorescence spectroscopy and ab initio calculations // *Biophys. Chem.* 2005. Vol. 114. P.71.
2. Mei G. et al. Dipolar relaxation times of tryptophan and tyrosine in glycerol and in proteins: a direct evaluation from their fluorescence decays // *J. Fluoresc.* 2003. Vol. 13. P. 467.
3. Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белка как метод изучения быстрой структурной динамики // *Мол. биология.* 1983. Т. 17. С. 455.
4. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, New York, 3rd ed., 2006.
5. Горохов В.В. и др. Температурная зависимость длительности флуоресценции триптофана в водных растворах глицерина и трегалозы // *Биохимия.* 2017. Т. 82. С. 1615.

## ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА ГОМОЙОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ

## PHYSICAL MECHANISMS OF TEMPERATURE HOMEOSTASIS OF HOMIOOTHERMAL ORGANISMS

*Прокопьев В.Е., Удут В.В.<sup>1</sup>*

Институт сильноточной электроники СО РАН (ИСЭ СО РАН), Томск, Prokop@ogl.hcei.tsc.ru  
НИИФармакологии и Регенеративной Медицины СО РАН им. Е.Д. Гольдберга, Томск, mail:udutv@mail.ru

Поддержание постоянства параметров внутренней среды живых организмов в пределах физиологической нормы является одним из важнейших достижений эволюционного развития теплокровных животных, в том числе и человека. Среди большого количества гомеостатических параметров температурный гомеостаз (ТГ), наряду с окислительно - восстановительным (рН), являются наиболее стабильными и



устойчивыми. Значения этих параметров характеризуют состояния всего организма в целом, и могут легко измеряться, причём даже дистанционно.

Известно, что даже небольшие отклонения значений этих параметров от нормы (в пределах нескольких и даже долей процентов) может сигнализировать о значительных изменениях в организме, и в том числе, и опасных для жизни. Несмотря на то, что проблема температурной гомеостаза организма человека считается одной из наиболее изученных и биологии и медицине, по сей день, нет достаточно надёжных качественных и количественных биофизических теоретических моделей, позволяющих объяснить поведение температуры организма ( $T$ ) от основных характеристик внутренней и внешней среды. Более того, отсутствуют не только математические (биофизические) модели процессов терморегуляции человека, но даже и качественные теоретические модели процессов позволяющие объяснить нормальные “оптимальные” значений температур теплокровных животных.

Исходя из сказанного выше, в настоящей работе на основе простейших тепловых балансных уравнении, учитывающих особенности процессов теплопродукции с учётом закона Рубнера для теплообразования и теплопотерь включающих теплопотери при испарении воды и т.д., находится стационарная температура тела (ядра) гомойотермных животных ( $T_c$ ) и анализируются причины ее устойчивости. Таким образом, на суд читателя выносятся предложенный нами вариант абстрагирования в представлении сути температурного (гомеостаза) баланса.

Из полученных нами результатов следует, что организм гомойотермных животных находится в состоянии далеко от состояния, как термодинамического равновесия, так и от состояния близкого к нему. (область линейной неравномерной термодинамики), поскольку, согласно теоремам Пригожина и Онзагера, для стационарных состояний этих систем справедливы принцип минимума производства энтропии и минимума диссипации энергии. Стационарная  $T_c$  - устойчива относительно случайных возмущении температуры. Действительно, если температура тела опускается ниже  $T_c$ , то при биохимических реакциях выделяется тепла больше, чем отводится, то есть организм будет разогреваться и, следовательно, наоборот. Эта устойчивость не зависит от центральных механизмов терморегуляции и определяется локальными теплофизическими характеристиками тканей и ферментативных реакций и присуща как пойкилотермным, так и гомойотермным организмам, а также популяциям одноклеточных при термогенезе.

Таким образом, в рамках предположений заложенных в расчетах, стационарная температура тела плацентарных животных определяется теплотой испарения воды, кинетическими параметрами дыхательных ферментов и температурной устойчивостью митохондриальных дыхательных ферментов и структур (внутренней мембраны), характеризующихся точкой фазового перехода  $T_\phi \approx 40^\circ\text{C}$ .

Преимущественный выбор стационарной температуры гомойотермных животных вблизи  $\sim 37^\circ\text{C}$  определяется минимальной скоростью диссипации энергии на обеспечение управления ТГ (при температуре  $37^\circ\text{C}$  обеспечивается минимальная скорость изменения энтропии для открытых биологических систем, теплоемкость которых определяется водой).

И наконец, заметим, что для детального исследования процессов терморегуляции с участием центральных механизмов ТГ необходимо исследование системы нестационарных уравнений теплового баланса, которые включает в себя временное поведение всех основных параметров энергетического обмена.

## МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ БИОЭНЕРГЕТИКА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ У ПАЦИЕНТОВ С ПРЕМАНИФЕСТНОЙ СТАДИЕЙ БОЛЕЗНИ ГЕНТИНГТОНА

## MITOCHONDRIAL BIOENERGETIC OF SKELETAL MUSCLES IN PATIENTS WITH THE PRECLINICAL STAGE OF HUNTINGTON'S DISEASE

*Пчелин П.В.<sup>1</sup>, Коротыш М.А.<sup>2</sup>, Копишинская С.В.<sup>1</sup>, Мухина И.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, ptch.pv@gmail.com

<sup>2</sup>Медико-генетический центр «Геном», Нижний Новгород

Болезнь Гентингтона (БГ) представляет собой аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, связанное с экспрессией мутантного белка гентингтина в головном мозге и периферических тканях. Развитие БГ сопряжено с селективной гибелью нейронов стриатума, коры больших полушарий, гиппокампа, гипоталамуса и других отделов мозга, что приводит к появлению хореического гиперкинеза, нарушения поведения и когнитивных функций. Результаты ряда исследований последних лет указывают на связь развития БГ с патологическими процессами, протекающими не только в мозге, но и в скелетных мышцах, в частности, с атрофией мышц и нарушением митохондриальной биоэнергетики. В связи с этим актуальным представляется поиск изменений в митохондриях, которые могут служить потенциальным биомаркером появления и прогрессирования метаболических нарушений при БГ.

Цель данного исследования: изучение изменений динамики мембранного потенциала и дыхания митохондрий скелетных мышц пациентов с преманифестной стадией болезни Гентингтона.

Объект исследования: образец мышечной ткани (5-6 мг), полученный в результате биопсии латеральной широкой мышцы бедра пациентов с преманифестной стадией болезни Гентингтона. После разделения и

пермеабиллизации мышечных волокон производилась оценка биоэнергетических изменений митохондрий на флюоресцирующем аппарате высокого разрешения Oroboros Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Австрия).

Было обследовано 12 пациентов: по 3 человека в группах мужчин и женщин с преманифестной стадией заболевания и по 3 человека в группах контроля, подобранных соответственно по возрасту. Отмечено снижение коэффициента дыхательного контроля, т.е. степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования митохондрий, у пациентов с преманифестной стадией БГ: на 32% у мужчин и на 28% у женщин в сравнении с контролем соответственно. В дополнении к этому у женщин было отмечено более выраженное снижение максимальной емкости системы переноса электронов: на 38% в сравнении с контролем. У мужчин по сравнению с контрольной группой отмечена более выраженная поляризация мембраны в нефосфорилирующем состоянии дыхательной цепи. Указанные признаки свидетельствуют о нарушении функционального состояния митохондрий в мышцах пациентов с преманифестной стадией болезни Гентингтона.

Таким образом, выявленные характерные изменения биоэнергетики митохондрий скелетных мышц пациентов с преманифестной стадией болезни Гентингтона могут способствовать получению точных представлений о степени развития внутриклеточных метаболических нарушений в скелетной мускулатуре и лучшему пониманию особенностей развития данного заболевания.

Исследование проведено при финансовой поддержке ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России.

### **ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ТОЧКОЙ ВХОДА В ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ БАКТЕРИЙ, НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ВЫХОД МЕМБРАННОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА**

#### **EFFECT OF NUTRIENT SUBSTRATES DIFFERING IN THE ENTRY POINT TO THE ENERGY METABOLISM OF BACTERIA ON THE ENERGY YIELD OF THE MEMBRANE FUEL CELL**

*Самков А.А., Волченко Н.Н., Лазукин А.А., Худокормов А.А.*

Кубанский государственный университет, Краснодар, andreysamkov@mail.ru

Для проверки возможной взаимосвязи электрогенеза микробных топливных элементов (МТЭ) мембранного типа от используемого питательного субстрата, анодные камеры стерильных МТЭ инокулировали микрофлорой анаэробных донных отложений, либо материалом анода из «маточного» аналогичного МТЭ, ранее исходно инокулированного микрофлорой ила и длительно работавшего в условиях замкнутой внешней цепи. Последнее было сделано для учета возможных сукцессионных изменений микробиоценоза анодной камеры МТЭ, по сравнению с исходным составом донных отложений.

Исследовали влияние типа источника углерода и энергии на силу тока во внешней цепи МТЭ, а также на выход электричества: в одну часть экспериментальных ячеек МТЭ, инокулируемых по первому или второму варианту, вносили глюкозу, во вторую часть - сукцинат натрия.

Использованные в данном эксперименте субстраты были выбраны как различающиеся по предположительной точке входа в энергетический метаболизм бактерий в анаэробных условиях анодной камеры МТЭ. Глюкоза может служить источником энергии как по пути электронтранспортированного фосфорилирования, так и по пути субстратного. Однако во втором случае, наличие данного легкодоступного углевода могло вызвать преимущественное развитие бродильщиков, обладающих высоким средством к субстрату и не образующих в ходе субстратного фосфорилирования избыточного количества восстановительных эквивалентов, необходимых для передачи заряда на анод и генерации электричества. Сукцинат же мог включаться в катаболизм, преимущественно, на стадии ЦТК, обеспечивая большую долю выхода энергии в форме восстановленных медиаторов формирования трансмембранного градиента протонов, для части микробного сообщества обеспечивающих участие в электрогенезе.

Было обнаружено, что зависимость электрогенеза МТЭ от способа инокуляции анодной камеры слабо выражена и носит субстратспецифичный характер. При использовании в МТЭ в качестве единственного источника углерода глюкозы, в данном эксперименте, способ инокуляции практически не влиял на электрогенез, ток достигал 33,5 мкА. При использовании же сукцината, пиковые значения тока незначительно превалировали при инокуляции микрофлорой донных отложений (194 мкА) по сравнению с инокуляцией непосредственно электрогенной биопленкой анода (177 мкА). Наряду с незначительными различиями значений пикового электрогенеза, суммарное количество продуцированного электричества было больше при инокуляции донными отложениями.

В течение цикла электрогенеза, продолжавшегося 40 суток, было определено суммарное количество электричества, прошедшего через внешнюю цепь МТЭ с резистором 1 КОм. Было обнаружено, что при использовании сукцината, в зависимости от способа инокуляции, количество электричества, генерированного отдельным МТЭ, варьировало от 184,9 до 382,0 Кл, при использовании глюкозы – от 37,8 до 39,3 Кл. Таким образом, использование в качестве энергетического субстрата сукцината, являющегося, с одной стороны, одним из распространенных интермедиатов прокариот с бродильным типом метаболизма, но при этом способным непосредственно служить интермедиатом цикла трикарбоновых кислот, обеспечивающего

электронтранспортное фосфорилирование для экзоелектрогенных микроорганизмов, либо являющимся продуктом фумаратного дыхания, обеспечило ярко выраженное увеличение выхода электричества по сравнению с глюкозой, по-видимому утилизируемой сообществом без использования возможностей экзоелектрогенеза. Это косвенно доказывает факт, что в среде, лишенной иных неорганических акцепторов электронов, экзоелектрогенные микроорганизмы сложного сообщества, способные передавать избыточные восстановительные эквиваленты на внешний нерастворимый акцептор электронов (анод МТЭ), в качестве наиболее энергетически выгодного пути утилизации субстрата используют анаэробное дыхание.

**ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОВ ПАЛЬМИТИНОВОЙ,  $\omega$ -ГИДРОКСИПАЛЬМИТИНОВОЙ И  $\alpha,\omega$ -ГЕКСАДЕКАНДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТ КАК АКТИВАТОРОВ СВОБОДНОГО ДЫХАНИЯ И ИНГИБИТОРОВ ГЕНЕРАЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ**

**FEATURES OF THE EFFECTS OF palmitic,  $\omega$ -HYDROXYPALMITIC and  $\alpha,\omega$ -HEXADECANEDIOIC ACIDS AS ACTIVATORS OF FREE RESPIRATION AND INHIBITORS OF HYDROGEN PEROXIDE GENERATION In liver mitochondria**

*Семенова А.А., Самарцев В.Н., Павлова С.И., Дубинин М.В.*

Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия, *sem\_al.ru@mail.ru*

Свободные монокарбоновые жирные кислоты в зависимости от экспериментальных условий оказывают различные эффекты на энергетические функции митохондрий. В присутствии ионов кальция жирные кислоты способны индуцировать неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий для гидрофильных соединений (открытие поры). В отсутствие ионов кальция монокарбоновые жирные кислоты в митохондриях животных разобщают окислительное фосфорилирование путем активации дыхания по протонофорному механизму. Важной физиологической функцией этого так называемого «свободного» дыхания у млекопитающих является продукция тепла для поддержания необходимой температуры тела, а также снижение в митохондриях генерации токсичных активных форм кислорода, в частности пероксида водорода.

В клетках печени основным путем метаболизма жирных кислот является их  $\beta$ -окисление в митохондриях и пероксисомах. Другой путь катаболизма жирных кислот –  $\omega$ -окисление, при физиологических условиях не превышающий и 10% от их общего метаболизма, значительно усиливается при различных нарушениях их распада, а также при действии некоторых ксенобиотиков. Так в процессе  $\omega$ -окисления одной из наиболее распространенных жирных кислот – пальмитиновой на первом этапе образуется  $\omega$ -гидроксиальпальмитиновая кислота (ГПК), на следующем этапе –  $\alpha,\omega$ -гексадекандикарбоновая кислота (ГДК). Известно, что ГПК и ГДК эффективно индуцируют ЦсА-нечувствительную пермеабиллизацию внутренней мембраны митохондрий печени, как это характерно для пальмитиновой кислоты (ПК). Остается неизученным действие ГПК и ГДК как индукторов свободного дыхания в митохондриях печени. Также не известно, связана ли стимуляция дыхания этими жирными кислотами с ингибированием генерации пероксида водорода.

Установлено, что ГПК стимулирует дыхание и снижает разность электрических потенциалов ( $\Delta\psi$ ) в митохондриях печени в той же степени, как это характерно для ПК и классических протонофорных разобщителей: 2,4-динитрофенола и FCCP. При аналогичных условиях стимуляция дыхания митохондрий ГДК не сопровождается снижением  $\Delta\psi$  и подавляется 10 мкМ циклоспорином А. В связи с этим, ГДК рассматривается как «десопрягающий» агент, переключающий комплексы дыхательной цепи митохондрий на холостой режим работы.

В присутствии хлорида калия в инкубационной среде ГПК индуцирует интенсивное снижение оптической плотности суспензии митохондрий, что свидетельствует о высокоамплитудном набухании органелл. При этих условиях ПК и ГДК не влияют на оптическую плотность суспензии митохондрий и, следовательно, не индуцируют их набухания. Хлорид магния полностью устраняет индуцируемое ГПК набухание митохондрий. Как известно, способность монокарбоновых жирных кислот транспортировать ионы калия через фосфолипидные мембраны подавляется ионами магния. Следовательно, в отличие от ПК и ГДК, ГПК способна транспортировать ионы калия через внутреннюю мембрану митохондрий. По-видимому, стимуляция свободного окисления в митохондриях печени ГПК обусловлена комбинацией ее протонофорных и ионофорных эффектов.

ПК, ГДК и ГПК в концентрациях, вызывающих приблизительно в равной степени стимуляцию дыхания митохондрий в состоянии 2, одинаково эффективно ингибируют генерацию  $H_2O_2$ . Ингибирующие эффекты этих жирных кислот наблюдаются как в отсутствие ротенона (при наличии энергезависимого обратного переноса электронов комплексом I от сукцината), так и в присутствии его (при условии транспорта электронов только от сукцината до кислорода). Предполагается, что эффекты указанных жирных кислот как ингибиторов генерации  $H_2O_2$  в митохондриях печени обусловлены стимуляцией дыхания различными путями и могут быть не связаны со снижением  $\Delta\psi$ .

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации №МК-61.2019.4

**ИССЛЕДОВАНИЕ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ВА3 ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ ИЗ THERMUS THERMOPHILUS, СОПРЯЖЕННОЙ С ОДНОЭЛЕКТРОННЫМ ВОССТАНОВЛЕНИЕМ АКТИВИРОВАННОГО СОСТОЯНИЯ O(H)**

**STUDY WITH A TIME RESOLUTION OF THE GENERATION OF THE MEMBRANE POTENTIAL OF BA3 CYTOCHROME OXIDASE FROM THERMUS THERMOPHILUS IN RESPONSE TO ONE-ELECTRON REDUCTION OF THE ACTIVATED STATE O(H)**

*Силецкий С.А., Белевич И.Н.<sup>1</sup>, Белевич Н.П.<sup>1</sup>, Сулейман Т.<sup>2</sup>, Викстром М.<sup>1</sup>*

Институт физико-химической биологии им. А. А. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

<sup>1</sup>Хельсинкская группа биоэнергетики, Институт биотехнологии, Хельсинкский университет, Финляндия

<sup>2</sup>Отдел химических наук Берналь НИИ университет Лимерика, Ирландия

4-х электронное восстановление кислорода до воды катализируют гем-медные терминальные оксидазы. В результате их работы формируется протон-движущая сила, за счет: а) переноса электронов и субстратных протонов с разных сторон мембраны, и б) редокс-зависимого протонного насоса. Каталитический цикл цитохромоксидазы включает в себя 4 одноэлектронных перехода:  $O \rightarrow E \rightarrow R(P) \rightarrow F \rightarrow O$ , каждая из которых включает в себя два одноэлектронных перехода. Восстановительная полуреакция каталитического цикла (переходы  $O \rightarrow E \rightarrow R$ ) изучена хуже окислительной ( $P \rightarrow F \rightarrow O$ ). Помимо электрогенного переноса субстратных протонов, каждый из переходов цитохромоксидаз семейства А сопряжен с перекачиванием одного протона через мембрану. В оксидазах канонического семейства А (включая цитохромоксидазу митохондрий) каталитически активное окисленное высоко энергетическое состояние  $O_H$  самопроизвольно переходит в отрелаксированное состояние  $O$ . В отличие от  $O_H$  одноэлектронное восстановление состояния  $O$  ограничивается переносом электрона через входные редокс-центры (CuA и низко-спиновый гем), не сопровождается переносом электронов в кислород-редуктазный центр (включающий гем а3 и CuB) и не сопряжено с перекачиванием протонов через мембрану (1).

Изучена быстрая кинетика генерации мембранного потенциала при одноэлектронной инъекции с помощью комплекса трис(бипиридил)рутения в высокоэнергетическое "неотрелаксированное" состояние  $O(H)$  цитохромоксидазы ba3 из *Thermus thermophilus* семейства В, характеризующейся снижением усредненной стехиометрии перекачки протонов через мембрану, отличиями каталитического центра и протон-проводящих путей от представителей семейства А (1). Разрешены три электрогенные стадии: восстановление пары гем b/гем а3 от CuA в "быстрой" фазе (~ 22 мкс) и перенос протонов в "средней" и "медленной" электрогенных фазах (~ 0,185 мс и ~ 0,78 мс), сопряженно с транспортом электронов от пары гем b/гем а3 на сайт CuB. Суммарная амплитуда "средней" и "медленной" электрогенных фаз цитохромоксидазы ba3 меньше ~ в 1.6 раза, чем в цитохромоксидазах семейства А. "Средняя" и "медленная" электрогенные фазы связаны с переносом протонов из внутренней водной фазы к протон-загрузочному сайту (PLS) протонного насоса фермента. Однако, в момент, когда все введенные электроны достигают сайта CuB, заряд электрона на нем компенсируется практически полным обратным переносом протона из PLS в кислород-редуктазный центр. В результате, наблюдающаяся эффективность перекачки через мембрану протонов составляет ~ 0,1 H<sup>+</sup>/e, по всей вероятности вследствие формирующегося в ходе эксперимента мембранного потенциала. Это может объяснять снижение эффективной стехиометрии перекачки протонов, наблюдаемое на оксидазах семейства В в стационарных измерениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00503).

1. Siletsky S.A., Belevich I., Belevich N.P., Soulimane T., Wikström M. Time-resolved generation of membrane potential by ba3 cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus* coupled to single electron injection into the O and OH states. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Vol. 1858(11) p. 915-926.

**СТОХАСТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА ПРОТОНОВ В ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗЕ МИТОХОНДРИЙ**

**THE STOCHASTIC MODELING OF PROTON PUMPING IN MITOCHONDRIAL CYTOCHROME C OXIDASE**

*Тимова В.Ю., Бороновский С.Е., Ransac S.<sup>1</sup>, Нарциссов Я.Р., Mazat J.P.<sup>1</sup>*

НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, yarosl@biotic.dol.ru

<sup>1</sup>Laboratoire de métabolisme énergétique cellulaire IBGC – CNRS and University of Bordeaux, Bordeaux

Цитохром с-оксидаза – это терминальный белковый комплекс митохондриальной дыхательной цепи. Она катализирует процесс восстановления кислорода до воды за счет окисления восстановленного цитохрома с. Эти реакции сопряжены с центральной реакцией, обеспечивающей формирование электрохимического

градиента, - переносом протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану с N-стороны на P-сторону. В настоящее время точный механизм помпирования протонов, а также локализация и механизм функционирования протон-загрузочного сайта неизвестны и до сих пор остаются предметом изучения.

В данной работе исследовалась активность цитохром *c*-оксидазы с использованием компьютерного алгоритма, основанного на стохастическом подходе, при котором каталитический цикл белка рассматривается как набор последовательных переходов между состояниями бинуклеарного центра с различным количеством метаболитов в нём. Схема переходов реализована на базе марковских стохастических процессов. В настоящем исследовании изучалась активность протонных каналов в зависимости от значений рН в матриксе митохондрии. Функционирование белка исследовалось на четырёх схемах переходов, отличающихся необходимыми условиями для начала процесса трансмембранного переноса протонов. В общем случае помпируемые протоны могут захватываться не только D-каналом, но и K-каналом, и данная возможность была реализована в одной из схем.

При увеличении рН наблюдалось увеличение потока переносимых протонов через K-канал (K-протонов). Более того, потоки протонов, проходящих через K- и D-каналы, оказались равными при рН 8,5, а при значениях рН в интервале от 8,5 до 10 наблюдалось значительное преобладание K-протонов. Данный результат свидетельствует в пользу смены режимов работы протонных каналов при защелачивании матрикса: активность D-канала существенно снижается в пользу K-канала. В схеме переходов, допускающей трансмембранный перенос K-протонов, наблюдается рост потока K-протонов при увеличении рН до 8,4. В диапазоне от 8,4 до 8,6 наблюдается пик и дальнейшее снижение активности K-канала. Максимальная эффективность помпирования протонов также наблюдалась в схеме, допускающей перенос K-протонов при условии полностью заполненного протоном бинуклеарного центра. Однако в схемах с тремя или четырьмя протонами, находящимися в бинуклеарном центре к началу помпирования, эффективность возрастала монотонно.



#### **ЦИТОБИОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ И ПРОДУКЦИИ АФК У МЫШЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ОБЛУЧЕНИЯ УСКОРЕННЫМИ ИОНАМИ УГЛЕРОДА С ЭНЕРГИЕЙ 450 МЭВ/Н**

#### **CYTOBIOCHEMISTRY ASSAY FOR DETERMINING THE FUNCTIONAL STATE OF MITOCHONDRIA AND ROS IN MICE TO ASSESS THE EFFECT OF IRRADIATION WITH ACCELERATED CARBON IONS WITH AN ENERGY OF 450 MEV/N**

*Хундерякова С.А.<sup>1</sup>, Ячкула Т.В.<sup>1</sup>, Заичкина С.И.<sup>1</sup>, Дюкина А.Р.<sup>1</sup>, Смирнова Е.Н.<sup>1</sup>, Розанова О.М.<sup>1</sup>,  
Сорокина С.С.<sup>1</sup>, Пикалов В.А.<sup>2</sup>, Ларюшкин Д.П.<sup>1</sup>, Хундерякова Н.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, [nkhundryakova@gmail.com](mailto:nkhundryakova@gmail.com)

<sup>2</sup>«Институт физики высоких энергий имени А.А. Логунова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Протвино.

Облучение ускоренными ионами углерода с энергией 450 МэВ/н является одним из новейших эффективных способов воздействия на опухолевые клетки при лечении рака [1]. Специфика воздействия ускоренных ионов заключается в выделении основного количества энергии при облучении в пике Брэгга, что позволяет максимально воздействовать на клетки опухолей и не затрагивать нормальные ткани.

В связи с этим целью работы являлось исследование функционального состояния митохондрий по активности ключевого фермента дыхания митохондрий сукцинатдегидрогеназы (СДГ), цитозольного фермента гликолиза лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и уровня продукции АФК в крови мышей, облученных в пике Брэгга ионами углерода с энергией 450 МэВ/н.

В экспериментах использовали мышей-самцов (n=25) неинбредной линии SHK, содержащихся в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. Наркотизированную смесь ксилазин - золетил мышей облучали в помещении временного радиобиологического стенда ускорительного комплекса У-70 (НИЦ «Курчатовский институт» - ИФВЭ, г. Протвино) пучком ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/н в пике Брэгга в дозах 0,2, 0,5, 1,0 и 2 Гр в режиме медленного вывода 1 раз в 8 с, длительность выпуска – 0,6 с. На каждую экспериментальную точку использовали 4–6 мышей. Животных выводили из эксперимента методом декапитации и брали кровь для анализа уровня продукции АФК и приготовления мазков. Продукцию АФК измеряли методом люминол-зависимой хемилюминесценции с помощью 12 канального прибора СЕМІLUM-12 [2, 3]. Так как уже принято, функциональное состояние митохондрий определяет состояние клеток и организма. Мы определяли авторским цитобиохимическим (ЦБХ) методом активности СДГ и цитозольной ЛДГ в иммобилизованных лимфоцитах крови на мазке [4-6]. Эти ферменты позволяют определить направление превращения веществ как топлива катаболизм - активность СДГ и противоположное направление восстановления биосинтезов – анаболизм - активность ЛДГ. Обычно внимание биохимиков привлечено к главной роли митохондрий – дыханию для энергообеспечения работы за счет окисления пищевых веществ.

Однако для поддержания устойчивости организма при сильных патогенных воздействиях, ключевой является работа митохондрий по восстановлению затрат на работу и обеспечения клеток.

В результате экспериментов ЦБХ методом была выявлена существенная гетерогенность уровней активности СДГ и ЛДГ в крови у индивидуальных животных в интервале доз от 0.2 до 1 Гр. При дозе 1.5 Гр у всех животных наблюдался резкий спад активности СДГ до одинакового низкого уровня. При этих же дозах уровень аэробного гликолиза, в отличие от СДГ, также гетерогенен, но с более низкими значениями, а при дозе 1.5 Гр наблюдается их резкое увеличение. Поскольку при дозе 1.5 Гр митохондрии повреждаются сильнее, обеспечение энергией клеток идет за счет гликолиза. Отмечено, что лимфоциты при 1,5 Гр были набухшие и имели внутриклеточные повреждения. Динамика изменений уровня продукции АФК также была гетерогенна при дозах 0.2-1.5 Гр с максимальным снижением, как уровень СДГ, при дозе 1.5 Гр. Максимальное снижение активности СДГ сопровождалось снижением внутриклеточной АФК, по-видимому, эта доза является наиболее критичной для митохондрий и лимфоцитов в целом. Таким образом, ЦБХ метод выявляет индивидуальные характеристики животных при влиянии разных доз облучения и наиболее критичные дозы, снижающие энергетический обмен, поэтому может быть рекомендован для подбора дозы облучения и эффективности лечения в персонализированной медицине.

1. Mohamad O., Sishc B.J., Saha J. et al. *Cancers*. 2017. V. 9. p. 66.
2. Заичкина С.И. и др. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018, т 161, в5. с.621-625.
3. Дюкина А.Р. и др. *Радиационная биология*. 2011, т. 51, № 5. с. 536-541.
4. Хундерякова Н.В. и др. *Биофизика* 2015. т.60,в.6, с.1104-1108.
5. Кондрашова М.Н., и др. *Инновационные методы диагностики в медицине*, ред. В.П.Волков. СибАК. Новосибирск, 2013, с. 149
6. Kondrashova M.N. et al. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Oct;41(10):2036-50.

## КОЛЛЕКТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ У МЫШЕЙ С МЕЛАНОМОЙ B16/F10 В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ НЕЙРОГЕННОЙ БОЛИ

## COLLECTIVE BEHAVIOR OF CARDIOMYOCYTE MITOCHONDRIA IN MICE BEARING MELANOMA B16 / F10 IN THE CONDITIONS OF CHRONIC NEUROGENIC PAIN

*Шихлярова А.И., Франциянц Е.М., Жукова Г.В., Гончарова А.С., Нескубина И.В., Каплиева И.В.*  
 ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, Ростов-на-Дону,  
 shikhliarova.a@mail.ru

Одним из значимых сигнальных путей перехода организма в экстремальное патофизиологическое состояние, включая хроническую боль и развитие злокачественной опухоли, на клеточном уровне является активизация сукцинатоксидазной системы. Впервые роль такого перехода в митохондриях (МХ) была обнаружена М.Н. Кондрашовой [1], которая показала неоспоримую значимость интенсивности клеточного дыхания при изменении физиологического состояния организма в условиях гипоксии, чрезмерных физических нагрузок, ионизирующего излучения и других стрессовых факторов среды. Также рассматриваются условия самоорганизации МХ в сложные трехмерные структуры, что является ключевым принципом целесообразности [2]. Однако, исследования в контексте клинически часто сочетаемого развития злокачественных опухолей на фоне хронической боли отсутствуют, и нет представления об энергетической взаимосвязи этих процессов.

В работе проводилось изучение процессов самоорганизации ассоциатов митохондрий и оценка энергетического потенциала в сердце, мозге и печени мышей с ростом опухоли, модулированным хронической нейрогенной болью (ХНБ). Объектом исследования служили мыши линии C57BL/6, самцы и самки (n=28). Модель ХНБ у животных была создана компрессионным путем при проведении операции двустороннего наложения лигатуры на седалищный нерв. Моделью злокачественной опухоли служила высокоагрессивная быстрорастущая меланома B16/F10, трансплантированная путем подкожного введения клеточного штамма. Выделение митохондрий из гомогенатов сердца, мозга и печени выполняли по стандартной методике, среда выделения – фосфатный буфер с ЭДТА и сахарозой. Из капли нативной суспензии делали мазки, которые окрашивали по Паппенгейму, а также спиртовым раствором фуксина с добавлением капли нашатырного спирта, наносимой на мазок под контролем микроскопии, фото- и видеорегистрации.

При микроскопии суспензии митохондрий, выделенных из гомогенатов печени и мозга животных, на препарате, окрашенном фуксином, четко просматривались поля мелких однородных гранул. При нанесении нашатырного спирта наблюдалось розово-красное окрашивание, при этом были хорошо различимы единичные тонкие нити митохондриальных ассоциатов. В отличие от препаратов печени и мозга в суспензии митохондрий, выделенных из гомогенатов ткани сердца животных, наблюдались значительные участки ассоциатов митохондрий с крупной разветвленной сетеподобной структурой. Дальнейшее наблюдение за ходом трансформации митохондриома позволило выявить существенное изменение энергизации митохондрий, индуцированное повторным добавлением нашатырного спирта, диссоциирующего с образованием катионных

(NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> и анионных (OH)<sup>-</sup> групп. В результате повышения концентрации гидроксильных ионов зафиксирован процесс холодного свечения высокой яркости, который заключался в образовании дислоцирующихся в поле зрения укрупненных комплексов – ассоциатов линейной формы, характеризующихся ярким вспыхиванием сначала в центре движущейся структуры, а затем быстрым распространением оптического сигнала к краям и 5–10 секундным интенсивным белым свечением всей структуры с постепенным угасанием свечения и оседанием на субстратный слой.

Болевая стимуляция, модифицируя патогенез опухоли, детерминирует единственный путь энергообеспечения через самоорганизацию длинных электронно-транспортных путей, трансмембранного перемещения протонов и повышения разности потенциалов на мембране с последующими фотоэффектами свечения в реактивной среде, активированной NH<sub>4</sub>OH. Очевидно, критически высокая нагрузка сердца в условиях интеграции ХНБ и роста опухоли реализуется благодаря высокому уровню самоорганизации митохондрия кардиоцитов, как ключевого фактора жизнеобеспечения.

1. Kondrashova M.N. The Structural and Kinetic Organization of the Tricarboxylic Acid Cycle during the Active Functioning of Mitochondria // *Biophysics*. 1989. № 34(3). P. 450-459.

2. Степанов А.В., Байдюк Е.В., Сакута Г.А. Характеристики митохондрий кардиомиоцитов крыс с хронической сердечной недостаточностью // *Цитология*. 2016. Т. 58, № 11. С. 875-882.

### ЧАСТИЧНО ДЕГИДРАТИРОВАННЫЕ ИОНЫ ВОДОРОДА. УЧАСТИЕ В РАБОТЕ АТФ СИНТЕТАЗЫ PARTIALLY DEHYDRATED HYDROGEN IONS. PARTICIPATION IN THE ATP SYNTHASE FUNCTIONING

*Ягузинский Л.С.<sup>1,2,3</sup>, Нестеров С.В.<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup> НИИ ФХБ им. Белозерского, Москва

<sup>2</sup> Институт цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный

В настоящее время является актуальным вопрос о механизме переноса энергии на АТФ синтетазу митохондрий. Ранее нами неоднократно ставился вопрос о возможности запасаения энергии окислительных реакций в форме частично дегидратированных ионов водорода. Было показано, что часть энергии, запасённой в форме дегидратированного протона, действительно включена в процесс синтеза АТФ и удаление этой фракции протонов снижает эффективность фосфорилирования на 15-40% [1,2]. Наши исследования в первую очередь были направлены на обоснование механизма локального сопряжения, в основе которого лежала идея работы системы окислительного фосфорилирования (ОКСФОС) в форме суперкомплекса. При этом само существование режима суперкомплекса работы ОКСФОС было обосновано экспериментально на функционировании митохондрий – было показано, что функционирующая система ОКСФОС подобно часовому механизму блокируется при остановке любой шестерёнки. В частности было показано, что подавление дыхательной цепи подавляет АТФ синтетазный блок, и наоборот, подавление синтетазного блока ингибитором транслокатора нуклеотидов блокирует работу дыхательной цепи [3].

К настоящему времени вопрос существования суперкомплекса отошёл на второй план, хотя остаётся открытым вопрос о стыковке АТФ синтетазного блока и дыхательной цепи. Решением этой проблемы мы в настоящее время заняты, однако при этом на первый план выходит новый этап исследований, который требует установления механизма включения энергии частично дегидратированного протона непосредственно в реакцию работы АТФ синтетазы (процесс синтеза АТФ).

В настоящем сообщении на основании наших результатов и данных литературы будет показано, что в процессе работы АТФ синтетазы, действительно, происходит дегидратация и гидратация протонов. В работе изучен банк структурных данных по протонным и водным каналам, а также АТФ синтезам разных видов. Определён химический состав центров, участвующих в реакциях разделения воды и протона и показано, что при связывании протона в АТФ синтетазе работают те же биохимические механизмы, что и в других аналогичных системах. При этом вращение АТФ синтетазы сопряжено с переносом иона водорода, связанного с одной или двумя молекулами воды. Таким образом, показывается, что дегидратированный протон участвует в работе системы, обеспечивающей вращение ротора АТФ синтетазы.

Поддержано грантом РФФИ 19-04-00835\19.

1. Солодовникова И.М. и др. О локальном сопряжении процессов дыхания и фосфорилирования в митохондриях печени крысы // *Биофизика*. 2004. Том 49, № 1. стр. 47–56.

2. Eroshenko L.V. et al. Bronsted Acids Bounded to the Mitochondrial Membranes as a Substrate for ATP Synthase // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2012. Vol. 444, № 1. P. 158–161.

3. Krasinskaya I.P. et al. Relationships of respiratory chain and ATP-synthetase in energized mitochondria // *FEBS Letters*. 1984. Vol. 167, № 1. P. 176–180.

**Секция 6. Биофизика одиночных  
молекул. Нанобиотехнологии.**



**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ АСТН (7-10)****SPATIAL STRUCTURE OF THE АСТН (7-10) MOLECULE***Агаева Л.Н.<sup>1</sup>, Абдинова А.А.<sup>2</sup>, Ахмедова С.Р.<sup>3</sup>, Ахмедов Н.Ф.<sup>1</sup>*<sup>1</sup>Бакинский Государственный Университет, <sup>2</sup>Азербайджанский Государственный Педагогический Университет, <sup>3</sup>Азербайджанский Технический Университет, e-mail: [levlanamig@mail.ru](mailto:levlanamig@mail.ru)

В качестве пептидов, которые по своей ноотропной и нейропротективной активности не уступали бы семаксу, испытывали различные фрагменты АСТН: АСТН-(7-10)-PGP, АСТН-(4-10)-PGP, АСТН-(6-10)-PGP, АСТН-(5-7)-PGP. Эти пептиды не только проявляли ноотропную и анксиолитическую активности, но также увеличивали жизнеспособность культивируемых клеток глии, полученных из коры больших полушарий мозга крыс с ишемическим повреждением мозга. При исследовании влияния АСТН-(4-10)-PGP на размер некротического очага у крыс оказалось, что данный пептид, как и семакс, уменьшает размер некроза при развитии ишемического инсульта у крыс приблизительно на 50%. Все эти препараты планируется использовать в качестве лекарственных средств. При разных способах введения из исходных пептидов образуется разный набор продуктов гидролиза, а известно, что образующиеся более короткие пептиды часто имеют собственную биологическую активность [1].

Данная работа посвящена расчету пространственной структуры молекулы АСТН-(7-10) – Phe7-Arg8-Trp9-Gly10 и является продолжением наших исследований в этой области [2]. Для нахождения пространственного строения пептидной молекулы использовался метод теоретического конформационного анализа, позволяющий рассчитывать трехмерную структуру биомолекул, исходя из известной аминокислотной последовательности.

Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей, оценивалась с помощью потенциала Морзе.

Пространственная структура молекулы АСТН-(7-10) – (Phe7-Arg8-Trp9-Gly10) исследована на основе низкоэнергетических конформаций метиламида N-ацетилглицина, метиламида N-ацетил-L-фенилаланина метиламида N-ацетил-L-аргинина и метиламида N-ацетил-L-триптофана. Из рассмотренных свыше 200 структурных вариантов тетрапептидной молекулы, некоторые оказались стерически запрещенными, относительная энергия остальных распределилась от 0 до 20 ккал/моль. Результаты расчета молекулы АСТН-(7-10) показывают, что происходит энергетическая дифференциация по конформациям и по формам основной цепи. В энергетический интервал 0-3 ккал/моль попадают восемь форм основной цепи восьми шейпов fff, ffe, eef, efe, eee, fef, eff, fee. В этих конформациях вклад невалентных взаимодействий изменяется в энергетическом интервале (-17.6) – (-15.0) ккал/моль, вклад электростатических взаимодействий в энергетическом интервале 2.7 - 4.3 ккал/моль, вклад торсионных взаимодействий в энергетическом интервале 1.5-3.3 ккал/моль. Глобальной конформацией молекулы АСТН-(7-10) является В<sub>1</sub>R<sub>31</sub>В<sub>23</sub>В. Эта конформация одновременно выгодна по невалентным и электростатическим взаимодействиям. В этой структуре возникают эффективные взаимодействия Phe7 с Arg8, Phe7 с Trp9, Trp9 с Gly10, Arg8 с Gly10, которые вносят вклад в общую энергию - 13,9 ккал/моль. Как видно из аминокислотной последовательности в молекулу АСТН-(7-10) входят многоатомные аминокислотные остатки Phe, Arg, Trp и во всех восьми формах основной цепи возникают эффективные стабилизирующие взаимодействия, конформации являются низкоэнергетическими.

Теоретический конформационный анализ гексапептидной молекулы АСТН-(6-9) привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

1. Шевченко К.В., Дулов С.А., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Радилев А.С., Мясоедов Н.Ф. Устойчивость His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидазы Y и ферментным системам назальной слизи, крови и плазмы крови. Биоорганическая химия, 2016, т.42, 2, с.171
2. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> Биофизика, 2013, т. 58, вып.4, с.587-590

**ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ ЭКЗОРФИНА В4****THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF THE EKZORPHYNE B4***Ахмедов Н.А., Аббаслы Р.М., Агаева Л.Н., Исмаилова Л.И.*Институт Физических Проблем Бакинского Государственного Университета, e-mail: [Namiq.49@bk.ru](mailto:Namiq.49@bk.ru)

Регуляторные пептиды, впервые обнаруженные во второй половине XX века, активно изучаются как физиологами, так и фармакологами, поскольку область биологической активности пептидов чрезвычайно широка. Они являются одним из главных звеньев, объединяющих три главные регуляторные системы организма – нервную, эндокринную и иммунную в единое целое. В настоящее время у разных видов животных и у человека охарактеризовано уже более 9000 физиологически активных пептидов. Это короткие цепочки аминокислот (2-70 остатков), выполняющие функцию сигнальных молекул. Для регуляторных пептидов характерно воздействие сразу на многие системы организма. Опиоидные пептиды в настоящее время считаются наиболее изученной группой сигнальных веществ пептидной природы. Опиум вызывает обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Опиоидные пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоидоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами [1-2].

Нами были исследованы структурно-функциональные организации ряда опиоидных пептидов, и эта работа является продолжением наших предыдущих исследований.

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монополярном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы экзорфина изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей, оценивалась с помощью потенциала Морзе.

Пространственная структура молекулы экзорфина В4 (Tyr1-Gly2-Gly3-Trp4) исследована на основе низкоэнергетических конформаций метиламида N-ацетилглицина, метиламида N-ацетил-L-тирозина и метиламида N-ацетил-L-триптофана. Результаты расчета молекулы экзорфина В4 показывают, что происходит энергетическая дифференциация по конформациям и по формам основной цепи. В энергетический интервал 0-6 ккал/моль попадают тринадцать форм основной цепи четырех шейпов fff, eef, efe, fee. Шейп fff представлен шестью формами основной цепи, энергия которых изменяется в интервале 0–4.8 ккал/моль. Глобальной конформацией молекулы экзорфина В4 является В<sub>11</sub>PRB<sub>11</sub>. Эта конформация одновременно выгодна по невалентным и электростатическим взаимодействиям. В этой структуре возникают эффективные взаимодействия Tyr1 с Gly2, Gly3 и Trp4, которые вносят вклад в общую энергию -12,5 ккал/моль. Шейп eef имеет четыре низкоэнергетические формы основной цепи, относительная энергия которых изменяется в интервале 3.7 – 4.9. ккал/моль Шейпы efe и fee представлены всего тремя формами основной цепи, относительная энергия которых изменяется в энергетическом интервале 5.2–5.6 ккал/моль. Во всех низкоэнергетических структурах молекулы экзорфина В4 боковые цепи Tyr1 и Trp4 в одинаковых положениях, боковая цепь Tyr1 направлена к С-концу молекулы, а боковая цепь Trp3 направлена к N-концу молекулы. В таких положениях они эффективно взаимодействуют друг с другом и атомами основной цепи молекулы.

Были построены конформационные карты вокруг двугранных углов боковых цепей Tyr2 и Tyr3. Конформационные карты показывают, что вокруг двугранных углов  $\chi_1$  остатков Tyr2 и Tyr3 возможна почти полная конформационная свобода. Боковые цепи тирозинов свободно вращаются от (-180°) до 180° и, следовательно могут легко взаимодействовать с другими молекулами и рецепторами.

Таким образом, теоретический конформационный анализ молекулы экзорфина В4 привел к таким структурным организациям молекул, которые не исключают реализацию молекулами целого ряда самых разнообразных функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

1. Ашмарин И.П., Данилова Р.А., Рудько О.И. Исследование пролонгированного действия короткоживущих анксиогенных олигопептидов на крысах. Биомедицина. 2007.Т.6.С.103-110.
2. Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей и их влияние на нервную систему. Успехи физиологических наук. 2015.Т.46.№1.С.22-46.

## СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И ИК СПЕКТР ТРИФЕНИЛФОСФИТА STRUCTURALLY-DYNAMIC MODELS AND THE IR SPECTRA OF TRIPHENYLPHOSPHITE

*Ивлиева-Перетокина И.В., Бабков Л.М., Давыдова Н.А.<sup>1</sup>*

Саратовский государственный университет, Саратов, e-mail: irine09@yandex.ru lmbabkov@gmail.com

<sup>1</sup>Институт физики НАН Украины, Киев, e-mail: naddavalex@gmail.com

Теоретическому и экспериментальному исследованиям трифенилфосфита (ТФФ,  $P(OC_6H_5)_3$ ) уделяется большое внимание: он обладает большим набором уникальных свойств, представляющих интерес для фундаментальной науки, являясь при этом удобным объектом для их исследования, и приложений: он может применяться в качестве пестицидов, антиоксидантных и антикоррозионных приставок и т.д. С помощью разнообразных физических методов исследованы его строение и свойства в твёрдокристаллической (ТК), аморфной, жидкой фазах и состоянии "глассиал", промежуточном между ТК и аморфной фазами. Среди использованных физических методов крайне редко встречаются методы колебательной ИК спектроскопии. Между тем результаты, полученные этими методами, вполне в состоянии дополнить и обосновать результаты, полученные ранее, а также установить влияние на сами ИК спектры ТФФ конформационных изменений и специфических межмолекулярных взаимодействий, в частности, водородной связи. В настоящем сообщении обсуждаются результаты молекулярного моделирования, на основании которых установлено влияние конформационных изменений и водородной связи на структуру и ИК спектр ТФФ.

ИК спектры ТФФ были измерены в области 300 - 4000  $cm^{-1}$  на Фурье-спектрометре IFS-88 фирмы Bruker. Методом ТФП, V3LYP/6-31G(d) [1, 2], реализованным в программном пакете GAUSSIAN-03 [3], проведено моделирование структуры трёх наиболее вероятных конформеров (I, II, III)  $H$ -комплекса ТФФ, представленного димером молекул одного из них (конформера I), наиболее устойчивого в ТК модификации. Димер образован за счёт обобществления атома водорода между атомами углерода фенильного кольца и кислорода группы  $PO_3$ .

Энергии конформеров составили -1261,991493 (I), -1262,007903 (II), -1262,005736 (III), Хартри. Близость рассчитанных значений энергий конформеров указывает на равную вероятность их реализации в образце. Вычисленные значения геометрических параметров конформеров лежат в пределах, допустимых структурной химией, и могут быть оценены как достоверные. Дипольные моменты конформеров I, II, III оказались равными 1,14, 2,03, 1,15, D, соответственно. Анализ измеренных и рассчитанных ИК спектров ТФФ конформеров позволяет сделать ряд выводов. Группа атомов  $PO_3$  оказывает локальное влияние на силовые поля фенильных колец ТФФ. Установлены спектрально-структурные признаки ТФФ: полосы в областях 700-750, 860-880, 1180-1220  $cm^{-1}$ , соответствующие колебаниям группы атомов  $P(OC)_3$ . Их анализ показал, что конформеры I, II, III спектрально различимы. В гексагональной и моноклинной кристаллических модификациях реализуется конформер типа I, у которого отсутствует симметрия и длины связей P-O различаются. Конформационные изменения влияют на формирование полос ИКС образца ТФФ. Измеренные ИКС "глассиал", стеклофазы и жидкости частично принадлежат смеси конформеров I, II, III и являются суперпозицией их спектров.

Энергия водородной связи в димере ТФФ составила 1,3 ккал/моль, что позволяет отнести её к слабому типу. Её влияние на геометрию молекул ТФФ, образующих димер, не велико и сказывается лишь на окрестности водородного мостика  $C-H \cdots O$ . Его длина - 2,963 Å. Длина связи C-H - 1,093 Å, что на 0,008 Å больше, чем в конформере. Длины связей P-O и O-C уменьшились с 1,673 до 1,657 Å и с 1,391 до 1,385 Å соответственно. Дипольный момент димера составил 4,5 D, что на 3,36 D больше дипольного момента конформера. Образование водородной связи в силу её слабого типа является возмущением, которое влияет на спектрально-структурные признаки ТФФ. Полосы в областях 700-750, 860-880, 1180-1220  $cm^{-1}$  трансформируются. Соответствующие им колебания группы атомов  $P(OC)_3$  уменьшаются по частоте не более, чем на 18  $cm^{-1}$  и заметно изменяются по интенсивностям. Комплексообразование играет определяющую роль в трансформации полосы, соответствующей валентным колебаниям связей C-H в области 3000-3100  $cm^{-1}$  ИК спектра: частота валентного колебания связи C-H уменьшается на ~21  $cm^{-1}$ , а интенсивность увеличивается более, чем в пять раз; частоты и интенсивности других валентных колебаний связей C-H изменяются в меньшей степени. Форма рассчитанной кривой распределения интенсивности в данной области ИК спектра в большей степени соответствует экспериментальной. На колебания фенильных колец, проявляющиеся в других областях ИК спектров ТФФ, водородная связь практически не влияет.

Итоги исследований позволяют сделать общий вывод о том, что образцы ТФФ в жидком, аморфном, "глассиал" состояниях и в двух ТК модификациях (моноклинной и гексагональной) являются смесью трёх спектрально различимых устойчивых конформеров и их комплексов со слабой водородной связью (димеров и, возможно, тримеров). Их наличие в совокупности определяет вид измеренных ИК спектров.

1. Kohn W. Nobel Lecture: Electronic structure of matter – wave functions and density functionals. //Reviews of Modern Physics, 1999, Vol. 71, №5, P. 1253-1266.

2. Pople J. Nobel Lecture: Quantum chemical models. //Reviews of Modern Physics, 1999, Vol. 71, №5, P. 1267-1274.

3. Frisch M.J., Trucks G.W., etc. Gaussian03, Revision B.03; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003, 302 p.

**МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, СТРУКТУРА И ИК СПЕКТРЫ БЕГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ****INTERMOLECULAR INTERACTIONS, STRUCTURE AND IR SPECTRA OF BEGENIC ACID*****Бабков Л.М., Безродная Т.В.<sup>1</sup>, Гаврилко Т.А.<sup>1</sup>, Фирсунин С.Н.***

Саратовский государственный университет, Саратов, e-mail: lmbabkov@gmail.com; untoah@gmail.com

<sup>1</sup>Институт физики НАН Украины, Киев, e-mail: gavrilko@gmail.com; tomaalone@yahoo.com

Жирные (карбоновые) кислоты и их производные образуют важный класс биологических объектов, входящих в сложные липиды, в избытке присутствующие в биообъектах, обеспечивающих функционирование гидрофобной части биомембран.

Объектом исследований, результаты которых представлены в настоящем сообщении, стала бегеновая кислота,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$  (сокращённо -  $\kappa\text{C}_{22}$ ) - длинноцепочечное алифатическое соединение. Одной из важных характеристик длинноцепочечных молекул является их конформационная гибкость и мобильность, которые определяют общие физико-химические свойства этих веществ, специфические связи в их молекулярных агрегациях, фазовые переходы. Углеводородные фрагменты алкильных радикалов (АР) могут проявлять различные конфигурации и боковые упаковки, что приводит к разнообразию ориентаций молекул и конденсированных фаз. Структура, динамика, водородная связь, конформационная мобильность и полиморфизм карбоновых кислот были предметами активных исследований, например, в [1]. Структурная эволюция конформаций димеров молекулы бегеновой кислоты была исследована в работе [2]

Целью проведённых исследований, результаты которых представлены в настоящем сообщении, стала оценка влияния межмолекулярного взаимодействия (ММВ) на структуру и колебательный ИК спектр бегеновой кислоты,  $\kappa\text{C}_{22}$ , на основе молекулярного моделирования. Проблема влияния ММВ на структуру и ИК спектры карбоновых кислот ( $\kappa\text{C}_n$ ) решалась в работах [1, 2]: главное внимание уделялось глобальному влиянию водородной связи на структуру и спектр. Как показал дальнейший анализ ИК спектров  $\kappa\text{C}_n$ , в частности,  $\kappa\text{C}_{22}$ , Н-связь является не единственным механизмом, влияющим на строение образца и его спектры. Ещё одним механизмом может быть межмолекулярное взаимодействие димеров, благодаря которому в образце образуются их комплексы различных конформаций. Это предположение стало рабочей гипотезой для исследования особенностей структуры образца  $\kappa\text{C}_{22}$  методами квантовой химии и ИК спектроскопии (теория эксперимент).

ИК спектры образца  $\kappa\text{C}_{22}$  измерены в широком интервале температур от 11 до 330 К и от 25° до 90° С на Фурье спектрометре IFS-88 (Bruker) в спектральном диапазоне 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Анализ спектров обнаружил существенную температурную зависимость некоторых их областей, которую не удалось в полной мере интерпретировать на основании модели изолированных димеров молекулы различных конформаций. Для исследования межмолекулярного взаимодействия димеров  $\kappa\text{C}_{22}$ , в частности, оценке его влияния на структуру и ИК спектр бегеновой кислоты, методом теории функционала плотности (ТФП) [3-5] B3LYP/6-31G(d), реализованном в комплексе программ GAUSSIAN-03 и GAUSSIAN-09W, проведено моделирование структур и ИК спектров молекулярных систем: молекул  $\kappa\text{C}_{22}$  и её димера, масляной кислоты  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$  ( $\kappa\text{C}_4$ ), и её димера и двух её систем димер-димер, в которых димеры ориентированы двумя вариантами: "кольцо к кольцу" и "кольцо к хвосту". Использование  $\kappa\text{C}_4$  в моделировании системы димер-димер вместо  $\kappa\text{C}_{22}$  стало вынужденной мерой, поскольку в ходе моделирования возникла трудность технического характера, связанная с громоздкостью комплекса димеров  $\kappa\text{C}_{22}$ . Используемый подход, на наш взгляд, качественно не может сказаться отрицательно на конечном результате. Действительно, распределение интенсивностей в рассчитанных ИК спектрах комплекса димеров  $\kappa\text{C}_4$  согласуются с экспериментальным для  $\kappa\text{C}_{22}$ . В частности, в области 1168-1286  $\text{cm}^{-1}$  в ИК комплексов димеров имеет место схожая картина с измеренными ИК спектрами  $\kappa\text{C}_{22}$ : начинает прослеживаться "гребенка", которая отсутствует в ИК спектрах мономера и димера. Влияние ММВ наглядно проявляется в диапазонах 1100-1500  $\text{cm}^{-1}$  и 2700-3200  $\text{cm}^{-1}$  ИК спектров  $\kappa\text{C}_{22}$ . Полученный результат оценивается нами как предварительный: он нуждается в дополнительном обосновании, опирающемся на результаты расчетов, которые проводятся нами в настоящее время с учётом изменения ориентации колец и метильных групп относительно друг друга в комплексах димеров.

1. Бабков Л.М., Пучковская Г.А., Макаренко С.П., Гаврилко Т.А. ИК спектроскопия молекулярных кристаллов сводородными связями. Киев, "Наукова Думка", 1989, 160 с.
2. Bezrodna T. Temperature dynamics of dimmer formation in behenic acid: FT-IR spectroscopic study // J. Mol. Struct. 2013.- V.1040.- P. 112-116.
3. Kohn W. Nobel Lecture: Electronic structure of matter – wave functions and density functionals. //Reviews of Modern Physics, 1999, Vol. 71, №5, P. 1253-1266.
4. Pople J. Nobel Lecture: Quantum chemical models. //Reviews of Modern Physics, 1999, Vol. 71, №5, P. 1267-1274.
5. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., etc. Gaussian03, Revision B.03; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA. 2003. 302 p

**ОПТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЛЕНОК ZnO, ДОПИРОВАННЫХ ДЕТОНАЦИОННЫМИ НАНОАЛМАЗАМИ****OPTICAL ANALYSIS OF ZnO FILMS DOPED WITH DETONATION NANODIAMONDS***Борулева Е.А.<sup>1</sup>, Чудинова Г.К.<sup>1,2</sup>, Наговицын И.А.<sup>2,3</sup>, Хайруллина И.А.<sup>4</sup>*<sup>1</sup>НИЯУ МИФИ, Москва<sup>2</sup>ИОФ РАН, Москва<sup>3</sup>ИХФ РАН, Москва, Россия<sup>4</sup>РУДН, Москва Россия

В последнее время, исследования, связанные с оптическими свойствами детонационных наноалмазов (ДНА), приобрели большое значение, поскольку детонационные НА из всех углеродных наночастиц обладают наименьшей токсичностью и используются, например, для лечения опухолей и создания биосовместимых имплантов.

В данной работе пленки ZnO, модифицированные ДНА, впервые получены гидротермальным методом. Пленки ZnO являются популярными для оптических исследований, из-за уникальных свойств, таких как, наличие широкой запрещенной зоны 3.37 эВ, относительно большой энергии связи, около 60 мэВ и возможность включения различных типов примесей в структуру решетки оксида цинка [1, 2]. Следовательно, было интересно изучить оптические свойства данных пленок с различными концентрациями наноалмазов.

Цель данной работы заключалась в анализе оптических свойств пленок ZnO, допированных ДНА (ZnO:ДНА). Концентрации легирующей примеси варьировались от 10% до 80% относительно 100% ZnO.

Спектры флуоресценции образцов измеряли на спектрофлуорометре (Shimadzu RF 5001). Полученные спектры флуоресценции показаны на рисунке 1.

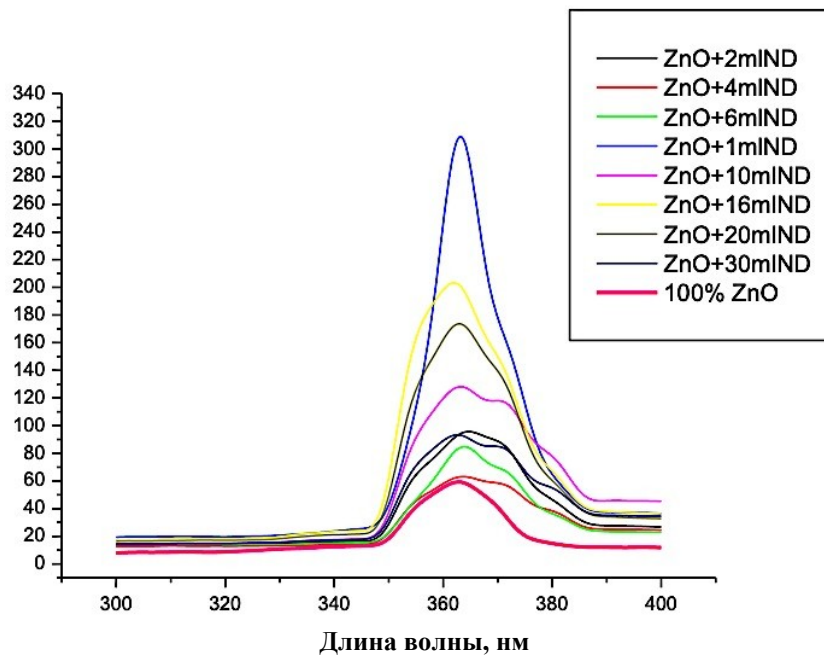


Рисунок 1. Спектры флуоресценции пленок ZnO, легированных ДНА различных концентраций и пленки ZnO без примесей.

Нет однозначной закономерности влияния количества ДНА на интенсивность флуоресценции пленки ZnO. Все же, следует отметить, что в сравнение с чистым оксидом цинка добавки ДНА увеличивают ее флуоресценцию в 5 раз для максимальной концентрации ДНА и приводят к образованию плеча в области 365 нм.

Таким образом, было выявлено, что присутствие ДНА на поверхности пленок ZnO влияет на оптические свойства материала.

1. Pearton S.J. et al. Recent advances in processing of ZnO // J. Vac. Sci. Technol. B. 2004. Vol. 22, No 3. P. 932-948.

2. Boruleva E.A., Chudinova G.K. The change in fluorescence of zno films doped with detonation nanodiamonds under DNA action. FLAMN. 2019.

## ЭНТЕРОСОРБЦИЯ И ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИГРАФЕНА КАК УГЛЕРОДНОЙ НАНОМАТРИЦЫ В ДО-КЛИНИЧЕСКИХ ТЕСТАХ

### ENTEROSORPTION AND SAFETY ASSESSMENT OF USING POLYGRAPHENE AS A CARBON NANOMATRIX IN PRE-CLINICAL TESTS

**Ботин А.С.<sup>1,2,3</sup>, Буравцев В.Н.<sup>2</sup>, Попова Т.С.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>НИИ Скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, Москва, alexbotin@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт химической физики РАН, Москва, biogr@bk.ru

<sup>3</sup>Институт биохимической технологии и нанотехнологии Российского университета дружбы народов, Москва

В настоящее время одним из самых перспективных направлений в современной физике являются исследования свойств графенов. Мировое экспертное сообщество прогнозирует, что применение графенов в широкой практике приведет к технологической революции, в частности в электронике и создании новых материалов. Однако, по отношению к «мэйн стриму» в мире, лишь незначительное количество научных групп заняты изучением и использованием уникальных свойств графенов для их применения в биотехнологии и медицине.

ПолиГрафен (ПГ) – оригинальный модифицированный аналог терморасщепленного графита. Было обнаружено, что ПГ образует прочные «комплексы» с микроорганизмами. Материалы типа ПГ обладают очень высокой поглотительной емкостью, особенно по отношению к гидрофобным соединениям (1:30 - 1:100). По этой причине такие материалы эффективно используются для очистки водных растворов и суспензий от широкого спектра органических загрязнений (от бензола до масел). Поскольку оболочки бактерий и вирусов, а также многие токсины – гидрофобны, формы графита, полученные путем термодеструкции, могут эффективно сорбировать и удерживать токсины, антибиотики, вирусные частицы, патогенную микрофлору и многие ксенобиотики и т.д.. Приведенные факты указывают на возможные биотехнологические применения ПГ.

Цель работы. Изучение взаимодействия углеродного сорбента нового поколения ПолиГрафен со структурой слизистой тонкой кишки и компонентами химуса для определения возможности использования ПГ для детоксикации общего и селективного действия.

Материалы и методы. Полиграфен – углеродный порошок с высокой удельной поверхностью и удельным весом 0,25г/см<sup>3</sup>. Частицы ПолиГрафена выглядят как смятые пленочные структуры или деформированные стопки из нескольких углеродных слоев, толщина каждой стопки 20-50 нм, что позволяет однозначно отнести данный материал к классу наносорбентов.

Электронная микроскопия различных образцов ПГ показала, что этот материал представляет собой полиграфеновые (мультиграфеновые) стопки графеновых монолистов с кратностью примерно от 5-ти до 10-ти, и даже до 20-ти в зависимости от технологии приготовления. Многократная химическая модификация и термоактивация позволяет получать материал со стопками меньшей кратности, вплоть до одиночных листов графена. Эти наблюдения позволили считать, что мы имеем дело графеносодержащим углеродным материалом полиграфен (ПГ). Были исследованы различные технологические варианты получения ПГ и был определен вариант, оптимальный с точки зрения соотношения функциональных характеристик и стоимости, таким образом получаемого сорбента.

Гистологическое исследование тонкой кишки. 10-ти крысам через зонд в начальный отдел двенадцатиперстной кишки вводили суспензию ПолиГрафена. Через 2,5 часа крыс забивали, вскрывали брюшную полость и отсекали участки медиального отдела двенадцатиперстной, начального отдела тощей и дистального отдела подвздошной кишки. Образцы помещали в охлажденный раствор фиксатора и обрабатывали по стандартной схеме для гистологического исследования.

Результаты. Результаты проведенных морфологических исследований свидетельствуют о том, что при одноразовом введении суспензии ПолиГрафена через зонд в начальный отдел двенадцатиперстной кишки, через 2,5 часа ПолиГрафен не задерживаясь полностью покидает двенадцатиперстную и начальный отдел тощей кишки. В тот же период времени (через 2,5 часа после введения) ПолиГрафен остается в составе химуса и в люминальной области пристеночной зоны слизистой оболочки дистального отдела подвздошной кишки. При этом ПолиГрафен не проникает непосредственно к поверхности эпителиальных клеток. Это относится не только к достаточно крупным частицам ПолиГрафена (100-500 мкм), но и более мелким частицам (10-50 мкм). Можно предположить, что при одноразовом введении ПолиГрафена, он проходит транзитом через тонкую кишку, не задерживаясь и не проникая непосредственно к поверхности кишечного эпителия, который закрыт непрерывным плотным слизистым слоем, а также в пространство между кишечными ворсинками. По всей вероятности, ПолиГрафен работает, преимущественно в просвете кишечника и на люминальной поверхности слизистого слоя, не оказывая непосредственного цитопротективного действия на кишечный эпителий. Вопрос о распределении частиц ПолиГрафена в просвете кишки и в пристеночной зоне эпителия при длительном (многодневном) его применении остается открытым и требуют проведения дополнительных, хронических исследований.

Таким образом, показано, что ПолиГрафен может быть использован в различных областях медицины, в частности, как действующая основа и модификатор для энтеросорбентов – препаратов для профилактики и лечения широко распространенных патологий путем связывания и выведения из желудочно-кишечного тракта патогенных веществ и микроорганизмов.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИГРАФЕНА КАК УГЛЕРОДНОЙ НАНОМАТРИЦЫ ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ И СТЕРИЛИЗАЦИИ ГАЗОВЫХ И ЖИДКИХ СРЕД

## USING OF POLYGRAPHENE AS A CARBON NANOMATRIX FOR DETOXICATION AND STERILIZATION OF GASEOUS AND LIQUID MEDIA

*Ботин А.С.<sup>1,2,3</sup>, Буравцев В.Н.<sup>2</sup>, Полетаев А.И.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>НИИ Скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, Москва, E-mail: alexbotin@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт химической физики РАН, Москва, E-mail: biogr@bk.ru

<sup>3</sup>Институт биохимической технологии и нанотехнологии Российского университета дружбы народов, Москва

Полиграфен (ПГ) – оригинальный модифицированный аналог терморасщепленного графита. Было обнаружено, что ПГ образует прочные «комплексы» с микроорганизмами. Материалы типа ПГ обладают очень высокой поглотительной емкостью, особенно по отношению к гидрофобным соединениям (1:30 - 1:100). По этой причине такие материалы эффективно используются для очистки водных растворов и суспензий от широкого спектра органических загрязнений (от бензола до масел). Поскольку оболочки бактерий и вирусов, а также многие токсины – гидрофобны, формы графита, полученные путем термодеструкции, могут эффективно сорбировать и удерживать токсины, антибиотики, вирусные частицы, патогенную микрофлору и многие ксенобиотики (например, диклофенак) и т.д.. Приведенные факты указывают на возможные биотехнологические применения ПГ.

Электронная микроскопия различных образцов ПГ показала, что этот материал представляет собой стопки графеновых листов с кратностью 5-10 в зависимости от технологии приготовления. Многократная химическая модификация и термоактивация позволяет получать материал со стопками меньшей кратности, вплоть до одиночных листов графена. Эти наблюдения позволили считать, что мы имеем дело графеносодержащим углеродным материалом полиграфен (ПГ). Были исследованы различные технологические варианты получения ПГ и был определен вариант, оптимальный с точки зрения соотношения функциональных характеристик и стоимости, таким образом получаемого сорбента.

Было показано, что ПГ может быть использован в нескольких областях: в качестве иммуносорбента – основного биоактивного компонента тест-систем для иммунодиагностики вирусных инфекций; поглотителя для очистки воды от вредных примесей – в том числе биологических; поглотителя для стерилизации воздуха. Для микробиологической очистки газовых смесей ПГ использовали в фильтрах типа «кипящий слой» для избегания «проскока» микроорганизмов через мелкодисперсный сорбент. Испытания проводили на экспериментальной базе (виварий с макаками-резус) ИМБП РАН.

Исследование стерилизации жидких сред показало, что ПГ фильтры способны задерживать и инактивировать до  $10^6$  клеток на 1 мг сорбента. Исследование фильтров на основе ПГ показало, что вода из загрязненного открытого источника (городской пруд) после однократной фильтрации через патрон с ПГ приобретает свойства питьевой воды в соответствии с санитарными показателями. Наличие окисленных углеродных остатков наделяет ПГ способностью связывать ионы тяжелых металлов. Наибольшей эффективностью обладали фильтры комбинирующие ПГ с активированным углем. В этом варианте фильтр способен удалять не только ионы металлов, но и ионы хлора.

Результаты проведенных микробиологических исследований фильтрации воздуха через фильтр с ПГ позволяют заключить, что общая микробная обсемененность воздуха, исходно превышающая допустимый уровень на 10%, после фильтрации через фильтр, содержащий ПГ, падает практически до нуля.

Выполнен анализ результатов экспериментов и проведена оценка эффективности использования сорбента ПГ для фильтрации воздуха в условиях соответствующих их естественной микробиологической обсемененности. Сделан вывод о перспективности продолжения научно-исследовательской опытно-конструкторской работы и о целесообразности применения сорбента ПГ в качестве активной фильтрующей матрицы для обеззараживания газовых (воздушных) сред от микробных загрязнений.

Использование ПГ для очистки газовых и жидких смесей имеет ещё одну привлекательную перспективу: химическая модификация углеродных остатков (окисление) позволяет легировать сорбент с каталитическими добавками, которые, например, могут окислять окись углерода до двуокиси, а также выполнять другие функции детоксикации.

Сорбенты на основе ПГ могут служить основой для создания комплексных систем с введением дополнительных компонент, имеющих специфические сорбционные характеристики. Это позволяет считать, что сорбенты на основе ПГ являются перспективным материалом для разнообразных применений в области экологии окружающей среды и эндоэкологии – нормализации параметров внутренней среды организма.

Благодаря своим уникальным свойствам ПГ может найти самое широкое использование на практике в различных сферах промышленного, служебного и бытового применения, где требуется очистка воздушной среды от микрофлоры.

Дальнейшее исследование природы выдающихся физико-химических характеристик ПГ позволит определить наиболее эффективные новые способы и варианты его изготовления и модификации для достижения максимального эффекта при фильтрации газовых и жидких сред.



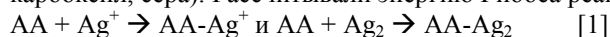
## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОНОВ И КЛАСТЕРОВ СЕРЕБРА С АМИНОКИСЛОТАМИ И БЕЛКАМИ INTERACTION OF SILVER ION AND SILVER CLUSTER WITH AMINO ACIDS AND PROTEINS

*Буглак А.А., Сыч Т.С., Кононов А.И.*

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербург  
e-mail: andreybuglak@gmail.com

Люминесцирующие лиганд-защищенные субнанометровые металлические кластеры (МК) в последние годы получили заслуженный интерес исследователей из-за своей высокой биосовместимости, малого размера, высокой чувствительности к окружению. МК используются для детекции металлических ионов, тиолов, пептидов и нуклеиновых кислот. В растворе МК могут быть стабилизированы пептидами. По сравнению с другими МК серебряные кластеры демонстрируют высокую яркость и фотостабильность. Серебряные МК, флуоресцирующие в видимой области, были синтезированы с использованием аминокислот, пептидов, белков, таких как бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин, яичный альбумин, а также лизоцим. Однако до сих пор остается неизвестным, какие аминокислотные остатки и сайты в составе белка предпочтительны для связывания серебряных МК. Ответ на этот вопрос дал бы ценную информацию для дизайна кластеров. В этой связи целью нашего исследования было: (1) сравнить способность к связыванию с Ag различных аминокислот; (2) идентифицировать сайты связывания Ag в аминокислотах и белках.

Расчет равновесной геометрии и гессиана комплексов Ag с аминокислотами выполняли двумя методами: PBE-D3 и MP2. Использовали базис 6-31G(d), для атомов Ag применяли псевдорелятивистский базис LANL2TZ. Исходные геометрии комплексов получали, помещая Ag около активных сайтов аминокислот (аминогруппа, карбоксил, сера). Рассчитывали энергию Гиббса реакций:



Синтез кластеров серебра, стабилизированных аминокислотами и белками, проводился методом восстановления ионов серебра с помощью боргидрида натрия [2,3].

Мы учли влияние протонирования на энергию Гиббса взаимодействия серебра и аминокислот. Все четыре депротонированные анионные формы аминокислот по-разному связываются с  $Ag^+$ . Так, Cys( $-H^+$ ) образует бидентатный комплекс, связываясь с S и карбонилем. Glu( $-H^+$ ) образует бидентатный комплекс с  $Ag^+$ , связываясь с кислородами карбоксила в боковом заместителе. Asp( $-H^+$ ) образует тридентатный комплекс  $Ag^+$  с аминогруппой и двумя карбонилами. Tyr( $-H^+$ ) формирует пи-взаимодействие с  $Ag^+$ . Все четыре депротонированные аминокислоты демонстрируют высокую энергию взаимодействия с  $Ag^+$ : -139,3 ккал моль<sup>-1</sup>, -154,9 ккал моль<sup>-1</sup>, -158,3 ккал моль<sup>-1</sup> и 163,2 ккал моль<sup>-1</sup> для Glu( $-H^+$ ), Tyr( $-H^+$ ), Asp( $-H^+$ ) и Cys( $-H^+$ ), соответственно [1]. Среди нейтральных аминокислот наибольшую  $\Delta G$  имеет Lys: -6,7 ккал моль<sup>-1</sup>.

В ходе взаимодействия аминокислот и минимального серебряного кластера  $Ag_2$  образуется координационная связь между Ag и азотом аминогруппы. В случае ионизованных аминокислот Glu( $-H^+$ ), Tyr( $-H^+$ ), Asp( $-H^+$ ) взаимодействие происходит по кислороду бокового заместителя, в случае Cys( $-H$ ) – по сере бокового заместителя. Анализ с помощью квантово-топологической теории молекулярной структуры Бейдера показал, что большинство аминокислот образуют с  $Ag_2$  кластером частично электростатическую и частично ковалентную связь. Энергия взаимодействия с  $Ag_2$  значительно выше для депротонированных аминокислот. Так, для Glu, Cys, Asp, и Tyr  $\Delta G$  составила: -23,4 ккал моль<sup>-1</sup>, -30,1 ккал моль<sup>-1</sup>, -30,7 ккал моль<sup>-1</sup> и -30,9 ккал моль<sup>-1</sup>, соответственно [1]. Тирозин имеет рКа равную 10,5, в неионизованной форме  $\Delta G$  равна -6,5 ккал моль<sup>-1</sup>. Цистеин имеет рКа равную 8,3, в неионизованной форме  $\Delta G$  равна -5,4 ккал моль<sup>-1</sup>. Таким образом, депротонирование тирозина и цистеина дает существенный «выигрыш» в энергии взаимодействия с  $Ag_2$ . Это, по-видимому, объясняет, почему образование серебряных кластеров на белке происходит преимущественно при щелочном pH [2], а также, почему среди всех аминокислот только Cys и Tyr способны образовывать флуоресцирующие серебряные кластеры в растворе [3]. Кроме того, нами показано, что энергия взаимодействия  $Ag_2$  с сульфидной связью значительно меньше энергии взаимодействия  $Ag_2$  с атомами серы в составе цистеина и метионина. На основании этого нами сделан вывод, что при образовании серебряных кластеров на белках происходит разрушение дисульфидных мостиков.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-13-10090.

1. Buglak A.A. et al. Silver cluster–amino acid interactions: a quantum-chemical study // *Amino Acids*. 2019. Vol. 51. P. 855-864.
2. Sych T.S. et al. Which Amino Acids are Capable of Nucleating Fluorescent Silver Clusters in Proteins? // *J. Phys. Chem. C*. 2018. Vol. 122. P. 26275-26280.
3. Sych, T.S. et al. Fluorescent Silver Clusters on Protein Templates: Understanding Their Structure // *J. Phys. Chem. C*. 2018. Vol. 122. P. 29549-29558.



## НАНОКОМПОЗИТ «ЛАНДОМИЦИН А — ФУЛЛЕРЕН C<sub>60</sub>» КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ

### “LANDOMYCIN A — C<sub>60</sub> FULLERENE” NANOCOMPOSITE AS PROMISING ANTITUMOUR DRUG

Бучельников А.С., Костюков В.В., Савченко Е.В., Прилуцкий Ю.И.<sup>1</sup>, Евстигнеев М.П.

Севастопольский государственный университет, Севастополь, tolybas@rambler.ru

<sup>1</sup>Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев

В течение последнего десятилетия достаточно интенсивно развивается направление молекулярной биофизики, связанное с исследованием влияния водного коллоидного раствора фуллерена C<sub>60</sub> на медико-биологическую активность некоторых биологически активных веществ, прежде всего, антибиотиков. Существует несколько точек зрения на молекулярные механизмы такого влияния, среди которых особо следует отметить представление о кластерах фуллеренов C<sub>60</sub> как эффективной системе доставки лекарственного препарата внутрь клетки.

Достаточно мало изученным, хотя и обладающим мощным терапевтическим потенциалом, является антибиотик ангуциклинового ряда ландомицин А, выделяемый из бактерий *Streptomyces globisporus*. Ландомицин А обладает высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, а также способностью преодолевать приобретенную множественную лекарственную устойчивость этих клеток к химиотерапевтическому лечению [1]. Вместе с тем, существенным недостатком ландомицина А является наличие у него побочной токсичности, которая препятствует его использованию в качестве лекарственного препарата непосредственно в клинической практике [2]. Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия фуллеренов C<sub>60</sub> и ландомицина А в водном растворе, а также опосредованного этим взаимодействием влияния фуллеренов на медико-биологическую активность антибиотика.

Взаимодействие фуллерена C<sub>60</sub> и ландомицина А на физико-химическом уровне было изучено методами атомно-силовой микроскопии, инфракрасной спектроскопии, малоуглового нейтронного рассеяния, динамического светорассеяния и измерения дзета-потенциала. Экспериментальные данные свидетельствуют об образовании нековалентных комплексов между двумя этими молекулами. Дополнительное подтверждение этого было получено с помощью методов молекулярного моделирования.

Цитотоксическая активность ландомицина А, фуллерена C<sub>60</sub>, а также их наноконкомпозита была исследована *in vitro* на двух опухолевых клеточных линиях (клетки остеосаркомы человека и клетки рака молочной железы мышей) и нормальных мезенхимальных стволовых клетках человека. Было показано, что наночастицы фуллерена C<sub>60</sub> нетоксичны для клеток, ландомицин А в концентрации 2 мг/мл приводил к гибели всех протестированных клеточных линий, в то время как его наноконкомпозит с фуллереном C<sub>60</sub> в той же концентрации продемонстрировал высокую токсичность для раковых клеток и гораздо более низкую токсичность для мезенхимальных стволовых клеток.

Мембранотропный эффект наноконкомпозита «ландомицин А – фуллерен C<sub>60</sub>» был изучен с помощью флуоресцентной микроскопии. Было показано, что адсорбция ландомицина А внутри фуллеренового кластера приводит к усилению флуоресценции антибиотика внутри клеток в зависимости от концентрации C<sub>60</sub>. Таким образом, фуллерен C<sub>60</sub> способствует проникновению молекул антибиотика в опухолевые клетки благодаря его мембранотропной активности, тем самым усиливая цитотоксическую активность этих наноконкомпозитов. В целом, было выявлено более высокое поглощение наноконкомпозита «ландомицин А – фуллерен C<sub>60</sub>» опухолевыми клетками и более низкое – мезенхимальными стволовыми клетками.

Учитывая, что подобные эффекты фуллерена C<sub>60</sub> уже наблюдались нами для наноконкомпозитов «доксорубин – фуллерен C<sub>60</sub>» и «цисплатин – фуллерен C<sub>60</sub>», можно сделать вывод, что усиление поглощения лекарственного средства опухолевыми клетками является уникальной особенностью фуллерена C<sub>60</sub>, которая может быть имеет большое значение для дальнейших доклинических испытаний наноконкомпозитов фуллерена C<sub>60</sub> и молекул различных лекарственных препаратов.

Полученные результаты указывают на возможность использования фуллерена C<sub>60</sub> в качестве наноконтейнера для доставки лекарственных препаратов и, в частности, огромный потенциал наноконкомпозита «ландомицин А – фуллерен C<sub>60</sub>» в качестве нового противоопухолевого лекарственного средства [3].

Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ № НШ-5889.2018.3.

1. Ostash B. et al. Chemistry and biology of landomycins, an expanding family of polyketide natural products // Mini-Rev. Med. Chem., 2009, Vol. 9, P. 1040-1051.
2. Prylutsky Yu.I. et al. Study of the complexation between Landomycin A and C<sub>60</sub> fullerene in aqueous solution // RSC Adv., 2016, Vol. 6, P. 81231-81236.
3. Bilobrov V. et al. A novel nanoconjugate of Landomycin A with C<sub>60</sub> fullerene for cancer targeted therapy: *in vitro* studies // Cell. Mol. Bioeng., 2019, Vol. 12, P. 41-51.

## МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ: МЕХАНИЗМЫ, ХАРАКТЕРИСТИКИ, ПРИМЕНЕНИЕ MICROBIAL SYNTHESIS OF NANOPARTICLES: MECHANISMS, CHARACTERISTICS, APPLICATION

*Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Кулигин В.С., Дебабов В.Г.*

НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика, Москва, [voeikova.tatyana@yandex.ru](mailto:voeikova.tatyana@yandex.ru)

Биологический метод получения наночастиц металлов, их оксидов, сульфидов с использованием биологических субстанций - бактерий, дрожжей, грибов, экстрактов растений, интенсивно разрабатывается в последние годы. Биосинтез наночастиц с помощью микроорганизмов осуществляется при нормальной температуре, давлении, без образования токсичных отходов, масштабируем и может являться дополнением к физико-химическим методам синтеза наноматериалов. Метод «зеленого синтеза» наночастиц экологически безопасен, менее энергозатратен, позволяет получать дисперсные наночастицы различной формы с узким распределением по размеру, обеспечивает стабильность наночастиц в водных суспензиях. Стабильность наночастиц достигается за счет адсорбции на поверхности наноструктур биополимеров, синтезируемых клетками, в большинстве случаев, белков с образованием «белковой короны». Удаление белков с поверхности наночастиц приводит к их агрегации и седиментации.

Механизмы бактериального синтеза наночастиц и их стабилизации полностью не выяснены. В научной литературе рассматриваются два основных механизма образования наночастиц металлов и их солей. При получении с использованием микроорганизмов металлических наночастиц из солей соответствующих металлов клетки действуют в качестве восстанавливающих и стабилизирующих агентов. Стабилизация наночастиц происходит за счет адсорбции на их поверхности гидрофильных молекул, в основном, белков. При получении наночастиц сульфидов металлов в среде, содержащей источники ионов металлов и серы, основная роль микроорганизмов заключается в поставке биомолекул, адсорбирующихся на поверхности и стабилизирующих наночастицы в водных суспензиях.

Важным классом наноматериалов являются нанокристаллы полупроводников или квантовые точки (QDs). Халькогениды металлов, такие как  $Ag_2S$ ,  $CdS$  и  $ZnS$ , обладают уникальными электронными и оптическими свойствами, находят применение в оптике, электронике, фотоэлектрохимии, преобразовании солнечной энергии, биомедицинских исследованиях, в качестве антимикробных агентов, охране окружающей среды. Одной из перспективных областей применения полупроводниковых наночастиц является использование их в качестве люминесцентных меток для медицинской диагностики и терапии. Способность наночастиц к фотокаталитическому окислению органических и биологических молекул может быть использована для охраны окружающей среды с целью разрушения вредных отходов производств.

В НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика разработан простой и экологически чистый способ получения наночастиц  $Ag_2S$ ,  $CdS$  и  $ZnS$  с использованием штаммов микроорганизмов различных таксономических групп [2 - 5]. Концентрация наночастиц в водных суспензиях составляет 1–4 мг/мл. Определены основные характеристики биогенных наночастиц: форма; размер; кристаллическая структура; эффективный диаметр; уровень люминесценции;  $\zeta$ -потенциал; антибактериальная активность. На поверхности наночастиц идентифицированы белки внешней мембраны бактериальных клеток микроорганизмов, использованных для биосинтеза наночастиц и представленные различными поринами, семействами белков TonB, TolC, FadL, флагеллинами; доказана избирательность адсорбции на поверхность наночастиц определенных белков; проведена эффективная иммобилизация биогенных наночастиц на поверхность различных полимерных носителей для создания новых наноконструктивных материалов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00088.

1. Gahlawat G, Choudhury R.A. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes // RSC Adv., 2019, 9, 12944–12967. DOI: 10.1039/c8ra10483b.
2. Дебабов В.Г., Воейкова Т.А. и др. Бактериальный синтез наночастиц сульфида серебра // Российские нанотехнологии. 2013. Т. 8. № 3-4. С. 269-276.
3. Шибанова А.С., Воейкова Т.А. и др. Исследование некоторых биофизических аспектов механизма бактериального синтеза наночастиц сульфида серебра металл восстанавливающими бактериями *Shewanella oneidensis* MR-1 // Биофизика. 2014. Т. 59. Вып. 3. С. 500–507.
4. Воейкова Т. А., Журавлева О. А. и др. «Белковая корона» наночастиц сульфида серебра, полученных в присутствии грамотрицательных и грамположительных бактерий // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 2017, 35(4), 151-156.
5. Журавлева О.А., Воейкова Т.А. и др. Бактериальный синтез наночастиц сульфидов кадмия и цинка. Характеристика и перспектива их применения // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018, 36(4), 191-198. <https://doi.org/10.17116/molgen201836041191>.

## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА VAM-25P

## THE SPATIAL ORGANIZATION OF THE C-TERMINAL FRAGMENT OF THE VAM-25P

*Гасанов Э.М.<sup>1</sup>, Тагиев З.Г.<sup>1</sup>, Абдинова А.А.<sup>2</sup>, Ахмедов Н.А.<sup>3</sup>*

Азербайджанский Медицинский Университет, <sup>2</sup>Азербайджанский Государственный Педагогический Университет, <sup>3</sup>Бакинский Государственный Университет  
e-mail: Namiq.49@bk.ru

Семейство опиоидных пептидов объединяет в себе пептиды с морфиноподобным действием, образуемые самим организмом и являющиеся эндогенными лигандами опиатных рецепторов. Они проявляют такие же эффекты как алкалоиды с известной химической структурой - морфин, героин, кодеин и другие. Опиоидные пептиды производятся как нейронами в ЦНС, так и различными железами. По этой причине они ведут себя и как нейромодуляторы и как гормоны.

Энкефалины были первыми и простейшими эндогенными представителями особого класса биологически активных веществ нейропептидов. После того, как последовательность проэнкефалина была окончательно определена, из мозгового слоя надпочечников крупного рогатого скота [1] были изолированы продукты его деградации, также включающие последовательности энкефалинов и проявляющие сильную опиатную активность: пептиды I, F, B, E, VAM-22P (bovine adrenal medulla 22 residue peptide), VAM-20P (bovine adrenal medulla 20 residue peptide), VAM-12P (bovine adrenal medulla 12 residue peptide). Отметим, что последовательность пептида E идентична последовательности остатков 15-39 пептида I, пептид VAM-22P соответствует последовательности остатков с 1 по 22 пептида E, пептиды VAM-20P и VAM-12P являются фрагментами 1-20 и 1-12, соответственно, пептида E, а значит и пептида VAM-22P, на что указывают также их названия. Опиатная активность VAM 20P в несколько раз выше активности Met-энкефалина и  $\delta$ -эндорфина. В последовательность VAM-20P входят Met-энкефалин (Tyr1-Met5), адренорфин (Tyr1-Val8), VAM-12P (Tyr1-Gln12), сама молекула VAM-20P входит в состав опиоидных пептидов E и I и поэтому представляет большой научный интерес [2-3].

Нами были исследованы структурно-функциональные организации ряда вышеуказанных опиоидных пептидов, и эта работа является продолжением наших предыдущих исследований. Нами исследуется пространственная структура молекулы пептида VAM-25P фрагментарно. Поэтому выполнен конформационный анализ С-концевого тетрапептидного фрагмента Lys19-Arg20-Tyr21-Gly22 молекулы пептида VAM-22P и Gly22-Gly23-Phe24-Leu25 молекулы пептида VAM-25P.

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы экзорфина изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей, оценивалась с помощью потенциала Морзе.

Расчет пространственной структуры тетрапептидных фрагментов выполнен на основе низкоэнергетических конформаций метиламидов N-ацетил L лизина, аргинина, глицина, фенилаланина и лейцина. Расчет нескольких сотен конформаций фрагментов показал, что происходит энергетическая дифференциация между формами основной цепи и конформациями. Низкоэнергетическими оказались конформации всех восьми шейпов. Относительная энергия этих конформаций изменяется в энергетическом интервале 0 – 5.0 ккал/моль.

Аминокислотная последовательность тетрапептидного фрагмента Lys19-Arg20-Tyr21-Gly22 содержит два положительно заряженных аминокислотных остатка лизин и аргинин, которые находятся рядом. Между ними возникают электростатические отталкивания, поэтому реализуются такие конформации фрагмента, когда электростатические отталкивания между лизином и аргинином наименьшие. Аминокислотная последовательность тетрапептидного фрагмента Gly22-Gly23-Phe24-Leu25 содержит два глицина, поэтому для него более энергетически выгодными являются свернутые формы основной цепи. Полученные низкоэнергетические конформации тетрапептидных фрагментов будут использованы для расчета пространственной структуры молекул VAM-22P и VAM25.

1. Kinnerthick D.L., Taniguchi T., Jones B.N., Stern A.S., Sniveli J.E., Hullian J., Kimura S., Stein S., Udenfriend. A highly potent 3200-dalton adrenal opioid peptide that contains both a Met- and Leu-enkephalin sequence Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, V. 78, P.3265-3268.
2. Kupruszewski G. Chemical structure of neuropeptides Wiss. Beitr. M.-Luther-Univ.Halle Wittenberg. 1988, V. 32, P.218-240.
3. Yu-E Sun, Gui-e Lu, Yishan Lei Liu, Zhengliang Ma, Xiaoping Gu. Mas-related G-protein- coupled receptor C agonist bovine adrenal medulla 8-attenuates bone cancer pain in mice. Int J. Clin Exp Med. 2015, 8(11).

**ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИБРИДНОГО КОМПЛЕКСА КВАНТОВАЯ ТОЧКА – ФТАЛОЦИАНИН, МОДИФИЦИРОВАННОГО ТРАНСФЕРРИНОМ**

**PHOTODYNAMIC ACTION OF QUANTUM DOT – PHTHALOCYANINE HYBRID COMPLEX MODIFIED WITH TRANSFERRIN**

*Гвоздев Д.А., Рамонова А.А.<sup>1</sup>, Слонимский Ю.Б.<sup>2</sup>, Максимов Е.Г.<sup>1</sup>, Мойсенович М.М.<sup>1</sup>, Пащенко В.З.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

Гибридные комплексы флуоресцентных наночастиц и тетрапиррольных красителей в настоящее время рассматриваются как перспективные фотосенсибилизаторы т. н. третьего поколения для процедур фотодинамической инактивации (ФДИ), в том числе раковых клеток. Благодаря своим уникальным оптическим свойствам полупроводниковые нанокристаллы (квантовые точки, КТ) являются прекрасными донорами энергии электронного возбуждения в различных сенсорных системах. В случае ФДИ квантовые точки могут использоваться как светособирающие антенны для молекул красителя, значительно увеличивая сечение его поглощения в видимой области спектра. Кроме того, красители в комплексе с КТ, модифицированными антителами, олигопептидами и т. д., будут обладать большей селективностью к мишеням воздействия и эффективностью проникновения в клетки. Таким образом, применение наночастиц в качестве платформы для доставки молекул красителей к клеткам-мишеням может способствовать увеличению эффективности фотодинамического действия красителей.

В данной работе мы синтезировали комплекс, состоящий из квантовых точек CdSe/ZnS, покрытых полимерной оболочкой, поликатионных фталоцианинов алюминия и белка человеческого трансферрина. Ковалентную сшивку холо-формы белка с полимерной оболочкой КТ проводили карбодимидным методом. Связывание молекул фталоцианина с отрицательно заряженной поверхностью квантовой точки происходило самопроизвольно в водном растворе за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий.

Показано, что в буферном растворе (ПБС) происходит перенос энергии электронного возбуждения от КТ к фталоцианину согласно индуктивно-резонансному механизму (FRET), что выражается в увеличении интенсивности флуоресценции фталоцианина. Перенос энергии между КТ и фталоцианином возможен вследствие значительного перекрытия спектров поглощения фталоцианина и флуоресценции КТ (условие резонанса) и небольшого расстояния (~5 нм) между компонентами комплекса. Кроме того, мы обнаружили генерацию синглетного кислорода фталоцианином в составе гибридного комплекса вследствие переноса энергии от КТ при облучении в зеленой области спектра, где фталоцианин не обладает собственным поглощением. Для выявления синглетного кислорода в водном растворе использовали окрашенную химическую ловушку АДМА, скорость выцветания которой пропорциональна скорости образования синглетного кислорода.

С помощью метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показано, что такие гибридные комплексы эффективно проникают в клетки эпидермоидной карциномы человека (линия A431) за счет эндоцитоза, опосредованного трансферрином, и локализуются в перинуклеарном компартменте. Квантовые точки и их комплексы с фталоцианином в отсутствие трансферрина, напротив, слабо связываются с клеточной мембраной. Мы обнаружили эффективный перенос энергии электронного возбуждения от квантовой точки к фталоцианину внутри клеток, что свидетельствует о стабильности комплекса в процессе интернализации. С помощью МТТ-теста показано, что фотодинамическая активность гибридных комплексов квантовая точка – фталоцианин, ковалентно связанных с трансферрином, значительно превышает активность немодифицированных гибридных комплексов при облучении клеток в сине-зеленой области спектра. Результаты, полученные в данной работе, подтверждают целесообразность применения флуоресцентных наночастиц для усиления фотодинамических свойств фотосенсибилизаторов на основе тетрапиррольных красителей.

## **БЕЗДЕТЕРГЕНТНАЯ СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО КАНАЛА KV10.2 С ЦИСТЕИНОВЫМИ ЗАМЕНАМИ**

### **DETERGEN-FREE SOLUBILIZATION OF A EUKARYOTIC CHANNEL KV10.2 WITH DOUBLE-CYS MUTATIONS**

*Глухов Г.С., Качер Ю.Г., Соколова О.С.*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва.

Бездетергентная изоляция мембранных белков представляет собой интересный метод солюбилизации мембранных белков с сохранением липидного окружения. Одним из новейших методов выделения белков в нативном липидном окружении является использование сополимера стирола и малеиновой кислоты (SMA). Частицы, содержащие небольшие участки мембраны и трансмембранный белок, ограниченные полимером, называются нанодисками (липидными частицами, образованными сополимером малеиновой кислоты - SMALP).

В этой работе в качестве канала для солюбилизации мы использовали канал HEAG2 с добавлением аффинного Id4 тага на С-конце и двумя цистеиновыми заменами (D339C-M474C), стабилизирующими канал в закрытом положении. Каналы были экспрессированы в эукариотических клетках линии COS-1. В ходе работы нами была подобрана методика солюбилизации каналов с использованием SMA. Для подтверждения образования наночастиц SMALP с интегрированным в них белком канала HEAG2 D339C-M474C был использован метод динамического светорассеяния (DLS). Средний размер частиц составил 15 нм. На основании полученных изображений была произведена предварительная реконструкция электронной плотности SMALP с интегрированными в них ионными каналами HEAG2.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ для молодых ученых (18-74-00087) и РФФИ (18-504-12045). Электронная микроскопия выполнялась на базе ЦКП Биологического факультета МГУ "Электронная микроскопия в науках о жизни" с использованием УНУ "3D- ЭМС".

## **ФОТОКОНВЕРСИОННЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ ПОКРЫТИЯ, УСИЛИВАЮЩИЕ ИНТЕНСИВНОСТЬ ВИДИМОГО СВЕТА В СИНЕЙ И КРАСНОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА**

### **PHOTO-CONVERSION POLYMER COATINGS, STRENGTHENING THE INTENSITY OF VISIBLE LIGHT IN THE BLUE AND RED SPECTRUM**

*Гудков С.В., Симакин А.В., Баймлер И.В., Раков И.И., Бармина Е.В., Шафеев Г.А.*

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва, E-mail S\_makariy@rambler.ru

Известно, что для получения энергии в процессе фотосинтеза растения используют преимущественно кванты красной и сине-фиолетовой части спектра [1]. Большая часть нашей страны находится в зоне рискованного земледелия, что определяется, в том числе, и режимом инсоляции. Для многих культур, выращиваемых в условиях закрытого грунта в зоне рискованного земледелия, среднесуточной интенсивности красной и сине-фиолетовой части спектра обычно хватает только в ясные летние дни. Проблему недостаточной освещенности в теплицах обычно решают с помощью источников искусственного света, так называемой «досветки». В данном проекте предполагается создание научных основ и технологии изготовления полимерного фотоконверсионного покрытия для теплиц, парников и т.д. Покрытие производит фотоконверсию УФ-излучения в сине-фиолетовый свет, а зеленого и желтого света в красный свет. В перспективе, применение такого покрытия позволит повысить производительность закрытых грунтов [2,3].

В данном исследовании мы используем различные флуорофоры, которые нанесены или стабилизированы наночастицами золота. Такие светопреобразующие ансамбли способны эффективно конвертировать УФ-излучение, часть зеленого и желтого света в синий свет и красный свет необходимый растениям. Они малотоксичны и довольно стабильны. В докладе будут детально рассматриваться физико-химические характеристики таких ансамблей. Нами разработана технология их включения в биоинертные паронепроницаемые фторполимерные матрицы без изменений и модификаций, причем благодаря разработанному нами экспериментальному приему наночастицы могут образовывать в фторполимерном покрытии агрегаты в виде цепочек состоящих из единичных частиц (похоже на «бусы») [4]. Такие агрегаты в перспективе позволят увеличивать люминесцентный выход на полтора-два порядка [5]. В докладе будут детально рассматриваться физико-химические характеристики фторполимерных покрытий содержащих фотоконверсионные ансамбли. С помощью искусственных источников освещения моделирующих солнечный свет проведены первичные испытания фотоконверсионных полимерных покрытий. Показано, что при освещении модельным солнечным светом через фотоконверсионное полимерное покрытие наблюдается заметное увеличение накопления биомассы растений салата до 30%. Мы предполагаем, что это связано с более

эффективной работой фотосинтетического аппарата [6]. Безусловно, данное предположение нуждается в дальнейшей проверке.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук (МД-3811.2018.11). Часть работы выполнена при поддержке НИР "Физические методы в сельском хозяйстве и экологии" (№ 0024-2019-0004) и гранта РФФИ 19-02-00061\_a.

1. Gudkov S.V. et al. Effect of Visible Light on Biological Objects: Physiological and Pathophysiological Aspects // Phys Wave Phenom. 2017. Vol. 25. P. 207.
2. Raida V.S. et al. Absorption of UV radiation by polyethylene films with addition of luminophores based on europium compounds. // Int Polym Sci Tech. 2001. Vol. 28. P. 57.
3. Минич А.С. и др. Способ измерения интенсивности люминесценции фотокорректирующих полиэтиленовых пленок сельскохозяйственного назначения. // Пластические массы. 1992. С. 59.
4. Barmina E.V. et al. Optical properties of nanocomposites based on polymers and metal nanoparticles. // Phys Wave Phenomen. 2017. Vol. 25. P. 165.
5. Barmina E.V. et al. Spectral properties of nanocomposites based on fluorine-containing polymer and gold nanoparticles. // IOP Conf. Series: Mat Sci Eng. 2018. Vol. 347. P. 012005.
6. Gudkov S.V. et al. Creation and application of fluoropolymer photoconversion films for greenhouses: Concept. // IOP Conf. Series: Mat Sci Eng. 2019. Vol. 347. P. 012005.

### **ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КОНЬЮГАТОВ НАНОЧАСТИЦ АЛМАЗА С ТЕТРАКАРБОКСИФЕНИЛПОРФИРИНОМ В МАКРОФАГАХ ЛИНИИ ТНР-1**

### **VISUALIZATION OF DIAMOND NANOPARTICLES CONJUGATED WITH TETRA (CARBOXYPHENYL) PORPHYRIN IN TNR-1 MACROPHAGES**

*М. В. Ерохина<sup>1</sup>, А. Г. Масютин<sup>1</sup>, Г. Е. Онищенко<sup>1</sup>, А. В. Трофимов<sup>2</sup>, П. П. Зак<sup>2</sup>, Н. Трофимова<sup>2</sup>, Ю. Б. Цаплев<sup>2</sup>, В. А. Лапина<sup>3</sup>, А. Павич<sup>3</sup>, П. П. Першукевич<sup>3</sup>.*

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Российской академии наук, Москва

<sup>3</sup>Институт физики им. Б.И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Среди материалов, разрабатываемых для медицинских целей, следует выделить материалы с оптически управляемыми свойствами на основе углеродных наночастиц, в том числе, наноалмазов детонационного синтеза. Свойства наноалмазов детонационного происхождения представляют значительный интерес из-за их доступности и перспектив использования. Наноалмазные частицы обладают лабильной поверхностью и легко функционализируются, что позволяет создавать комплексные наночастицы под различные задачи. Вышеуказанное позволяет рассматривать наноалмазы в качестве перспективных материалов для биомедицинских исследований. В настоящей работе представлены модельные исследования комплексов наноалмазов с тетракарбоксифенилпорфирином (ТСРР) в качестве люминесцирующего агента. Целью настоящего исследования было дать характеристику исследуемых наночастиц, а также визуализировать их в макрофагальных клетках человека линии ТНР-1. Синтез наноалмазных комплексов тетракарбоксифенилпорфирина осуществлялся с использованием ультрадисперсных синтетических алмазов марки "УДА-СП" НП ЗАО "Синта" (Минск, Беларусь). Для характеристики наноалмазов и их внутриклеточной визуализации использовали методы традиционной и аналитической трансмиссионной электронной микроскопии, а также лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ). Образцы наноалмазных частиц представляют собой порошки серого цвета, отдельные наночастицы имеют размер от 4 до 25 нм в диаметре. В воде наночастицы формируют неустойчивую суспензию и оседают примерно через 5 минут после суспендирования. Также алмазные наночастицы могут образовывать агрегаты. Методом дифракции электронов получены данные о кристаллической структуре наноалмазов, что позволило в дальнейшем идентифицировать их в клетках ТНР-1. Клеточная культура ТНР-1 – суспензионная культура, используемая для моделирования процессов фагоцитоза. Добавление форболового эфира к суспензии клеток в итоговой концентрации 100 нМ индуцирует макрофагальную дифференцировку, клетки прикрепляются к субстрату, распластываются и формируют отростки. На третьи сутки дифференцировки в культуральную среду добавляли суспензию наноалмазов (50 мкг/мл). Через 24 часа инкубации клетки отмывали и фиксировали для дальнейших исследований при помощи электронной микроскопии и ЛСКМ. Было показано, что клетки активно поглощают наноалмазные комплексы, которые выявляются в эндосомах размером до 5 мкм. Также скопления наночастиц были визуализированы в клетках с помощью ЛСКМ в канале Qdot655 (Olympus, Япония). Таким образом, можно сделать вывод, что наноалмазный комплекс ТСРР хорошо сохраняет свою кристаллическую структуру и люминесцентные свойства при поглощении клетками. Это позволяет в дальнейшем визуализировать данные наночастицы методами как электронной микроскопии, так и ЛСКМ. Интенсивное поглощение изученных в



настоящей работе наноконплексов клетками, и их эффективная визуализация внутри клеток, говорят о том, что такие комплексы возможно использовать для переноса в клетки фотоуправляемых агентов, включая терапевтические, а также для изучения локализации таких комплексов во внутриклеточных компартментах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-53-00038.

## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЛИПРОЛИНОВЫХ МОЛЕКУЛ

## STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE GLYPROLINE MOLECULES

*Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.*

Институт Физических Проблем Бакинского Государственного Университета, lara.ismailova 52@mail.ru

Регуляторные пептиды - молекулы, являющиеся основным звеном механизма регуляции всех функций живого организма. Они быстро действуют, не имеют негативных последствий и высоко эффективны. Используя регуляторные пептиды человеческого организма, можно создавать новые и эффективные лекарственные препараты. К регуляторным пептидам относится семейство глипролинов - коротких пептидов, аминокислотные последовательности которых содержат остатки глицина и пролина. Глипролины модулируют работу иммунной и нервной систем, влияют на систему свертывания крови и обладают противовоспалительным действием. В настоящее время механизмы действия глипролинов и их мишени мало изучены. Важной задачей также является создание синтетических аналогов глипролинов с высокой стабильностью, эффективностью и селективностью действия. Актуальным представляется проведение структурно-функциональных исследований глипролинов и их синтетических аналогов на модельных системах с помощью теоретических методов исследования.

Представления об электронно-конформационных взаимодействиях в пептидных молекулах являются фундаментом современных теоретических представлений механизмов их функционирования. Независимое рассмотрение конформационных и электронных аспектов базируется на предположении о том, что пептидная молекула в исходном состоянии является ненапряженной системой, согласованной в отношении всех внутримолекулярных взаимодействий. Становится возможным анализировать электронное состояние химических связей отдельно от изменений конформаций молекулы. Метод молекулярной механики позволяет оценить конформационные возможности пептидной молекулы. Квантово-химические методы расчета электронной структуры пептидов позволяют определить эффективные заряды на атомах, дипольные моменты молекул. Метод молекулярной динамики позволяет моделировать картину внутренней подвижности пептидов.

Объектом исследования электронно-конформационных свойств были выбраны глипролиновые пептидные молекулы. Целью данной работы является определение пространственного строения ди-, три- и тетрапептидных молекул с чередующимися остатками Gly и Pro, а так же Arg. Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей.

В качестве объекта исследования электронно-конформационных аспектов была выбрана пептидная молекула глипролинов Gly-Pro, Gly-Pro-Gly, Arg-Pro-Gly, Gly-Pro-Arg, Gly-Pro-Gly-Pro. Для нахождения пространственного строения этих пептидных молекул использовался теоретический подход, позволяющий рассчитывать трехмерную структуру пептидной молекулы исходя из известной аминокислотной последовательности с помощью специально разработанной программы. Такие расчеты трехмерной структуры пептидных молекул позволяют определить геометрические и энергетические параметры пептидов, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий.

Расчет дипептидной молекулы Gly-Pro, содержащей 27 атомов и 6 переменных двугранных углов, выполнялся на основе стабильных конформаций монопептидов N-ацетил-L-пролина и L-глицина. Расчет обнаружил все возможные для дипептидной молекулы конформационные состояния, выявил низкоэнергетические конформации. Самой низкой энергией обладает конформация PR и RR свернутой формы основной цепи. Низкой энергией обладают конформации с граничными значениями углов основной цепи Gly.

Трипептидная молекула Gly-Pro-Gly включала 31 атом и 9 переменных двугранных углов. Конформационный анализ трипептида Gly-Pro-Gly показал, что из всех рассчитанных форм основной цепи трипептидной молекулы самой низкоэнергетической является RRB, которая имеет свернутый ход основной цепи. Низкоэнергетическими являются также конформации свернутого шейпа PRB, PRR, RRR.

Далее были изучены конформационные возможности глипролинов Pro-Arg-Gly, Arg-Pro-Gly и Gly-Pro-Arg. Для каждой молекулы были найдены энергетические параметры (значения вкладов невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий, энергии водородных связей, внутримолекулярные моно-, ди- и трипептидные взаимодействия) и геометрические параметры (значения двугранных углов основной и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в эти молекулы).

Молекула Gly-Pro-Gly-Pro насчитывает 34 атома и 9 переменных двугранных углов основной цепи. Проведенный теоретический конформационный анализ тетрапептидной молекулы обнаружил 30 низкоэнергетических конформаций, попадающих в энергетический интервал 0–4 ккал/моль. Самыми

низкоэнергетическими оказались конформации с полусвернутой основной цепью RRBR, BRRB, PRBB и свернутой основной цепью RBPR, RRRR, PRRB.

Найденные низкоэнергетические конформации глипролиновых молекул послужили основой для вычисления электронных характеристик: значений эффективных зарядов на атомах, дипольных моментов молекул. Для боковой цепи аргинина были построены конформационные карты для изучения подвижности.

## МЕТОД РАСЧЕТА ПАРАМЕТРОВ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЭМП

## METHOD OF CALCULATING THE BEHAVIOR OF MAGNETIC NANOPARTICLES IN EMF

*Титов С.В., Калмыков Ю.П., Казаринов К.Д.*

ФИРЭ им.В.А.Котельникова РАН, 141190, Фрязино, Московская обл., Россия,  
pashkin1212@yandex.ru, kalmykov@univ-perp.fr, kazarinov@ms.ire.rssi.ru

В настоящее время известны достижения в использовании магнитных наночастиц в медицине. Основные области биомедицинского приложения магнитных наночастиц: диагностика и инструменты исследований (биосенсоры, MRI, маркеры биомолекул, биосепарация и пробоподготовка, исследования молекулярного взаимодействия), а также адресное терапевтическое воздействие (целевая доставка молекул, управляемая локальная гипертермия опухолей).

В нашей работе предложена методика расчета нелинейного стационарного отклика на воздействие переменным полем произвольной величины и ориентации системы *антиферромагнитных наночастиц*. В следствии большого магнитного дипольного момента антиферромагнитных наночастиц ( $\sim 10^2 - 10^4 \mu_B$ ), зеэмановская энергия для них велика даже в относительно слабых внешних магнитных полях, что приводит к проявлению нелинейных эффектов, в частности в динамической восприимчивости, стохастическом резонансе, динамическом магнитном гистерезисе (ДМГ). Разработана также методика расчета нелинейного стационарного отклика на внешнее переменное поле магнитных наночастиц со смешанной (одноосной и кубической) магнето кристаллической анизотропией. Теория построена на использовании модели непрерывной диффузии Брауна [1]. Отмечена существенная зависимость восприимчивости и площади петли ДМГ перечисленных систем магнитных наночастиц от температуры, частоты, амплитуды и ориентации магнитного поля. Показано, что форма и площадь петли значительно меняются при наложении внешнего постоянного магнитного поля, что позволяет регулировать энергию, поглощаемую такими наночастицами [2]. Разработанные методики дают возможность проводить оценки энергопотребления магнитных суспензий при воздействии на них внешних магнитных полей.

В результате проведенных исследований получены аналитические формулы для *частот ферромагнитных резонансов* (ФМР) наночастиц с различными типами локальной магнитной анизотропии. Полученные выражения учитывают форму внутренних потенциалов частиц, обусловленных магнитной анизотропией. Результаты согласуются с известными оценками, основанными на параболическом приближении локальных анизотропных потенциалов, но также позволяют вычислять частоты ФМР, когда параболическое приближение невозможно (потенциальный минимум обладает формой более высокого порядка). Продемонстрировано полное согласие полученных выражений с результатами строгого решения магнитного уравнения Ланжевена методом непрерывных матричных дробей. Аналитические формулы для частот ФМР используются при оптимизации тепловых эффектов в системах магнитных наночастиц. Предложенные выражения, несомненно, также будут полезны для интерпретации экспериментальных данных, выполняемых по данной тематике. [3,4]

Проведено исследование по оценке дополнительных факторов, влияющих на степень нагрева магнитных суспензий, в частности взаимодействия между магнитными наночастицами. Решена задача об оценке времени переориентации намагниченности в системе магнитных наночастиц с учетом парных взаимодействий между ними. Решение основано на непосредственном усреднении системы стохастических уравнений Ланжевена для пары взаимодействующих магнитных диполей. Путем расчета динамической восприимчивости системы частиц проанализированы два механизма взаимодействия между частицами, а именно диполь-дипольное и обменное взаимодействие. Отмечено, что первый тип взаимодействия существенно больше влияет на характеристики систем, в частности на время релаксации [5].

1. Brown Jr. W.F., Phys. Rev., 1963, V. 130, P.1677.
2. Kalmykov Yu. P., Ouari B., Titov S. V. J. Appl. Phys., 2016, V. 120, P. 053901 (12 pages).
3. Kalmykov Yu. P., Titov S. V., Coffey W. T. and Dowling W. J., Phys. Rev. B, 2018, V. 97, P. 224418 (11 pages).
4. С.В. Титов, Ю.П. Калмыков, К.Д. Казаринов «Разработка методов расчета поведения магнитных наночастиц в ЭМП», VIII Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», СПб, 10 - 15 Сентября 2018 г.
5. Kalmykov Yu. P., Titov S. V., Byrne D.J., Coffey W.T., Zarifakis M. and Al Bayyari M.H. Comparison of dipole-dipole and exchange interaction effects on the magnetization relaxation of two macrospins // Phys. Rev. B, 2019, направлена в печать.



## СИНЕРГИЗМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ЭКСТРАКТА *T.POLIUM*

### SYNERGISM IN ANTIBACTERIAL ACTION OF SILVER NANOPARTICLES AND *T.POLIUM* EXTRACT

*Казарян Ш.А., Рштуни Л.Р., Оганесян А.А.*

Российско-Армянский Университет, Армения, Ереван, shushanik.kazaryan@rau.am  
Лаборатория аналитической биохимии и биотехнологий

В последние годы все более актуальным становится вопрос борьбы с резистентностью бактерий к антибиотикам. Согласно докладу ВОЗ 2017 года существует уже 12 классов патогенов с резистентностью к антибиотикам, способных вызывать заболевания, приводящие к летальному исходу [1]. Среди 51 клинически испытываемого препарата на данный момент, только 8 определяются ВОЗ, как инновационные, остальные - модификации уже известных антибиотиков, к которым имеется резистентность. В связи с этим возникает необходимость нахождения новых веществ с антибактериальными свойствами, из-за чего все большее внимание обращают на наночастицы. Однако учитывая тот факт, что сами наночастицы обладают токсичностью, перспективным является использование растительных экстрактов, которые могут, как стабилизировать наночастицы, уменьшать их токсичность, так и увеличивать спектр свойств потенциального препарата [2].

Целью данной работы было исследование антибактериальных свойств (АБА) как наночастиц Ag, так и совместное действие с этанольным экстрактом *T.poliium*.

Исследование антибактериальной активности проводили диск-диффузионным методом против дикого штамма *E.coli* K-12 и *S.aureus*. Статистический анализ проводили посредством программы Microsoft Office Excel. В качестве образцов наночастиц серебра был использован коммерческий препарат «Биоцидная добавка» («Наноиндустрия», Россия). Площадь зон лизиса рассчитывали в пиксель<sup>2</sup> с помощью программы Image Repair.

Следует отметить, что наночастицы серебра обладали выраженной антибактериальной активностью (АБА). Стабилизатор наночастиц ДСС не обладал АБА в аналогичных концентрациях, откуда можно утверждать, что данная активность обусловлена именно наночастицами серебра. Сами наночастицы серебра обладают АБА, которую можно сравнить с АБА ампицилина, но в концентрации в 4,76 раз превышающую концентрацию наночастиц. Наночастицы обладали большей активностью против *E.coli* K-12 (7151±76 пиксель<sup>2</sup>), чем против *S.aureus* (6319±97 пиксель<sup>2</sup>).

96% этанольный экстракт *T.poliium* обладал выраженной АБА против *E.coli* K-12 (13124±29 пиксель<sup>2</sup>) и *S.aureus* (9269±17 пиксель<sup>2</sup>), а 70% этанольный экстракт *T.poliium* не проявлял АБА, однако при совместном применении экстрактов с НЧ происходило потенцирование АБА последних. Так в случае с 96% этанольным экстрактом АБА против *E.coli* K-12 увеличилась в 4,2 раза, а против *S.aureus* в 6,6 раз. 70% этанольный экстракт *T.poliium* вместе с наночастицами серебра повысили АБА в 4,5 раз против *E.coli* K-12 и в 2 раза против *S.aureus*. Дальнейшие исследования выявили, что мажорным компонентом в данных экстрактах является рутин, за счет которого и обеспечивается эффект потенцирования АБА наночастиц серебра.

Таким образом, из вышеизложенного следует, что совместное применение наночастиц серебра и экстрактов *T.poliium* может привести не только к повышению АБА, но также и к её появлению, как это произошло в случае с 70% экстрактом.

Работа выполнена в рамках субсидий МОН РФ.

Список литературы.

[1] Cassandra Willyard, The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats, Nature, 543,15 doi:10.1038/nature.2017.21550, 2017.

[2] Saptarshi Chatterjee et al., Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application, Journal of Nanobiotechnology (2011), 9:34, 2011.

## ВЛИЯНИЕ ЗЕЛЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС

### EFFECT OF "GREEN" SILVER NANOPARTICLES ON RAT LIVER FUNCTIONING BIOCHEMICAL MARKERS

Казарян Ш.А., Рштуни Л.Р., Петросян М.С., Каралян Н.Ю., Оганесян А.А.

Российско-Армянский Университет, Армения, Ереван, shushanik.kazaryan@rau.am  
Лаборатория аналитической биохимии и биотехнологий.

В связи с нарастающими темпами развития нанотехнологий и использования наночастиц в различных сферах, становится неизбежным соприкосновение человека с данным типом веществ [1]. Помимо их потенциального использования в медицине, НЧ уже давно и активно применяются в производстве различных косметологических средств, упаковочных материалов, тканей и т.д. [2]. С учетом такого разнообразного и всё более обширного применения НЧ, остро встаёт вопрос безопасности этих веществ. Актуальным становится вопрос исследования их воздействия на центральный орган детоксикационной системы организма – печень, в которой метаболизируются все ксенобиотики, подвергающие при этом гепатоциты токсическому воздействию.

Целью данной работы было исследование действия НЧ серебра, стабилизированных в экстракте *O.araratum* на биохимические показатели функционирования печени белых беспородных крыс Wistar. Стабилизированные в экстракте *O.araratum*, НЧ серебра вводились крысам внутривенно.

НЧ серебра синтезировались с помощью 50% этанольного экстракта *O.araratum* путем добавления соли Ag<sup>+</sup>.

В результате данного синтеза образовывались НЧ сферической формы с диаметром 8-16 нм.

Для скрининга воздействия НЧ серебра был проведен анализ биохимических параметров плазмы крови экспериментальных животных. Было выявлено, что отдельно экстракт *O.araratum* обладает гипополипидемическими свойствами (общий холестерин – 1,36±0,02 ммоль/л, ЛПНП – 0,73±0,01 ммоль/л, ЛПВП – 0,63±0,01 ммоль/л), подавляет синтетические свойства печени, но при этом повышается активность АсТ (7,66±0,012 Ед/л) по сравнению с контрольными животными в 1,4 раза. Однако совместное воздействие с НЧ Ag нормализует данные показатели (общий холестерин – 2,06±0,001 ммоль/л, ЛПНП – 1,48±0,024 ммоль/л, ЛПВП – 0,58±0,013 ммоль/л, АсТ – 2,94±0,003 Ед/л, альбумин – 13,06±0,031 г/л), что может свидетельствовать о гепатопротекторных свойствах данных наночастиц. Так же гистологический анализ показал, что воздействие стабилизированными наночастицами серебра на предварительно поврежденную печень приводит к появлению участков регенерации и появлению ложных долек.

Таким образом, помимо представленных нами ранее результатов о проявлении гемолитических, антибактериальных свойств и отсутствия генотоксичности, можно утверждать, что НЧ серебра, стабилизированные в экстракте *O.araratum* нормализуют биохимические показатели функционирования печени белых беспородных крыс Wistar и не являются токсичными в исследованных нами концентрациях.

[1] Maynard A D. Nanotechnology: A Strategy for Addressing Risk. Woodrow Wilson International Center for Scholars; p. 45, 2006.

[2] Marina E Vance, Todd Kuiken, [...], and Matthew S Hull, Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory, Beilstein J Nanotechnol. 6; 1769-1780, 2015.

## ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ НАНОКЛАСТЕРЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ ДЛЯ БИОИМДЖИНГА

### LUMINESCENT METAL NANOCCLUSERS AS PROMISING OBJECTS FOR BIOIMAGING

Капитонова М.А., Сопова Ю.В., Ревезук З.В., Кононов А.И.

СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

Для создания люминесцирующих металлических нанокластеров традиционно используются матрицы из биополимеров, таких как белки и нуклеиновые кислоты [1]. Области их возможного применения различны и многочисленны, самыми перспективными на наш взгляд являются биомиджинг и селективная детекция определенных биомолекул *in vitro* и *in vivo*. Люминесцентные метки на основе белковых молекул или ДНК хорошо совместимы с живыми системами, также биополимерная матрица может обеспечить протекцию неустойчивых самих по себе металлических кластеров от агрессивной среды [2].

В качестве матрицы для синтеза люминесцирующих серебряных нанокластеров были отобраны определенные последовательности ДНК, способные специфически взаимодействовать с выбранными целями. В данной работе объектом для детектирования стала матричная РНК. В ходе процессинга матричная РНК

эукариот приобретает на 3'-конце полиадениновый хвост, который защищает молекулу от быстрой деградации в цитоплазме клетки. В работе был произведен поиск последовательностей ДНК, оптимальных для синтеза серебряных нанокластеров, содержащих при этом участок, комплементарный полиадениновому концу. Критерием отбора последовательностей являются химический выход синтеза и квантовый выход люминесценции получившихся кластеров. В дальнейшем их фотофизические характеристики изменяются при взаимодействии матрицы ДНК с мРНК *in vitro* и *in vivo*.

Нами были синтезированы люминесцирующие кластеры на различных матрицах ДНК: одонитевой, двунитевой, обладающих особенностями структуры в виде шпилек (hairpin), мисматчей и выпячиваний (bulge). Все последовательности имели одну общую деталь – политиминовый хвост для гибридизации с мРНК. Проводился подбор оптимальных условий для синтеза серебряных нанокластеров: варьировались температура, давление, время синтеза, pH среды, ионная сила, количество ионов серебра по отношению к одной молекуле олигонуклеотида и восстановителю  $\text{NaBH}_4$ . При гибридизации выбранных последовательностей с мРНК наблюдались изменения в интенсивности люминесценции кластера, что лишним раз указывает на высокую чувствительность пространственной структуры кластера к его окружению. Показана эффективность и простота данного способа детекции мРНК *in vitro*. В ближайшее время планируется переход к экспериментам *in vivo*, которые в свою очередь могут поставить новые интересные вопросы и задачи.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 16-13-10090.

1. Gwinn E., Schultz D., Copp S. M., Swasey S., DNA-Protected Silver Clusters for Nanophotonics// *Nanomaterials* 5, 180-207, 2015.
2. Yuan, Z., Chen, Y.-C., Li, H.-W.; Chang, H.-T. Fluorescent silver nanoclusters stabilized by DNA scaffolds// *Chem. Comm.* 50, 8900–9815, 2014.

## ОБРАТИМАЯ КОМПАКТИЗАЦИЯ ДНК В РАСТВОРЕ, ИНДУЦИРОВАННАЯ ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ СО СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ КАТИОННЫМИ ПАВ

### REVERSIBLE DNA PACKAGING IN SOLUTION INDUCED BY ITS INTERACTION WITH LIGHT-SENSITIVE CATION SURFACTANTS

***Касьяненко Н.А.<sup>1</sup>, Мамиствалов Г.З.<sup>1</sup>, Бакулев В.М.<sup>1</sup>, Унксов И.Н.<sup>1</sup>, Santer S.<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>University of Potsdam, Germany

ДНК представляет собой жесткий и сильно заряженный полимер, который в клетке находится в компактизованном состоянии. Однако в растворе ДНК образует сильно набухший клубок. Переход ДНК в компактизованное состояние в растворе могут обеспечить многие агенты, к числу которых относятся катионные поверхностно активные вещества (ПАВ). Взаимодействие ДНК с fotocувствительными поверхностно-активными веществами, которые способны обратимо менять свою конформацию при облучении светом в определенном диапазоне длин волн, представляет возможность управления процессами компактизации и декомпактизации ДНК с помощью излучения в условиях постоянного химического состава. Компактизация ДНК является ключевым шагом при создании средств доставки нужных генов в клетки-мишени. Этот процесс также может быть использован в нанотехнологиях для структур различного назначения.

В работе исследуется взаимодействие молекулы ДНК со светочувствительным катионным ПАВ АзоТАБ (азобензолтриметиламмоний бромидом) в растворах разной ионной силы. Взаимодействие таких ПАВ с ДНК инициируется благодаря электростатическому притяжению между положительно заряженными «головами» молекул ПАВ и отрицательно заряженными фосфатными группами макромолекулы. При этом анализируется сходство и различие в связывании с ДНК транс- и цис-изомеров АзоТАБ. УФ облучение ((365 нм) индуцирует цис-транс конформационный переход АзоТАБ, который сопровождается изменением дипольного момента его молекул. В работе использовали коммерческий препарат ДНК тимуса телёнка (Sigma). Молекулярная масса используемого образца ДНК была определена по значению характеристической вязкости в 0,15 М NaCl и составила  $10^7$  г/моль. АзоТАБ был синтезирован в Потсдамском университете (Потсдам, Германия). Для облучения растворов, содержащих АзоТАБ, использовали УФ лампу с длиной волны 365 нм (VL-4.L, Vilber Lourmat). Растворы облучали УФ светом в темноте с расстояния 2 см в течение 10 минут (использовались кварцевые кюветы).

С помощью различных экспериментальных методов (спектрофотометрия, круговой дихроизм, динамическое светорассеяние, вискозиметрия, атомная силовая микроскопия) изучали компактизацию ДНК, индуцированную ее связыванием с транс- - изомером ПАВ, а также декомпактизацию формируемых в растворе структур под действием видимого света. Построены фазовые диаграммы систем ДНК-ПАВ в растворе.

Изучали также влияние различных концентраций NaCl на состояние цис- и транс-изомеров ПАВ в

растворах без добавления ДНК. По спектрам поглощения были идентифицированы различные состояния в растворах в зависимости от концентрации NaCl – мицеллярное состояние с ориентацией молекул ПАВ голова – к-голове, немиецеллярное состояние с формированием агрегатов с укладкой молекул ПАВ голова-хвост при достаточно больших концентрациях соли, экранирующих заряженные группы ПАВ, и состояние без появления устойчивых агрегатов. Показано, что добавление ДНК в раствор ПАВ в транс-состоянии провоцирует формирование псевдомицелл на ДНК при концентрациях существенно ниже ККМ (критической концентрации мицеллообразования). Такие структуры не формируются при связывании ДНК с цис-изомером ПАВ.

Показано, что молярное отношение концентраций ионогенных групп ПАВ и ДНК ( $z$ ), а также ионная сила раствора определяют образование трех различных систем: раствор с комплексами ДНК-ПАВ, в которых ДНК находится в компактизованном состоянии, осаждение ДНК с появлением крупных хлопьев, коллоидный раствор с формированием дискретных наноразмерных частиц ПАВ-ДНК. Существование немиецеллярных ассоциатов ПАВ (с ориентацией «голова к хвосту») была обнаружена при  $[NaCl] > 0,01$  М. Такие структуры не формируются в растворах низких ионных сил. Впервые в области концентраций NaCl от 0,01 М до 0,5 М обнаружено, что агрегация ДНК усиливается даже при значениях  $z < 1$ , что приводит к фазовому разделению в системе. При концентрациях соли выше 0,5 М NaCl взаимодействие ПАВ с ДНК не реализуется.

## ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ НА СКОРОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ

## THE EFFECT OF METALL OXIDE NANOPARTICLES ON THE RATE OF FIBRIN GEL FORMATION

*Кириченко М.Н., Чайков Л.Л.<sup>1</sup>, Бурханов И.С.<sup>1</sup>, Булычев Н.А.<sup>1,2</sup>*

ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, 119991, Ленинский пр., 53,  
maslovamarina87@gmail.com

<sup>1</sup>ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, 119991, Ленинский пр., 53,

<sup>2</sup>Московский авиационный институт (НИУ), Москва, 25993, Волоколамское ш., 4.

Биологические гели, представляющие собой белковые полимерные сети, используются в настоящее время для различных биомедицинских целей. Так, например, фибриновые гели, образующиеся в результате ферментативной реакции расщепления фибриногена тромбином, используются для предотвращения кровотечений и ускорения заживления ран. Уникальный механизм полимеризации фибрина, который позволяет контролировать время гелеобразования и сетевую архитектуру при изменении условий реакции, позволяет формировать широкий спектр биосовместимых материалов в физиологических условиях. Одним из способов варьирования условий, в которых могут быть получены гели, является добавление в реакционную смесь различных наночастиц, в том числе и оксидов металлов [1]. Настоящая работа посвящена исследованию влияния новых наночастиц оксидов металлов (железа и оксида алюминия), полученных в акустоплазменном разряде, на скорость реакции гелеобразования и на структуру образующегося геля при предварительном инкубировании наночастиц с фибриногеном и тромбином из плазмы крови человека.

Для изучения скоростей образования и структуры гелей идеально подходят методы динамического и статического светорассеяния. Традиционная установка по светорассеянию включает He-Ne лазер (633 нм, 6-10 мВт), поляризаторы, объективы, фотоприёмник (лавинный фотокатод), коррелятор со сдвиговым регистром (Photocor-FCm), цилиндрическую кювету с образцом и иммерсионная кювета с водой, термостат (все измерения проводились при температуре 37°C). Скорость образования геля в исследуемом образце оценивалась по скорости изменения полной интенсивности светорассеяния  $I/I_L$ , а также по появлению степенной компоненты в автокорреляционной функции интенсивности рассеянного света  $g^2(\tau)$  и уменьшению ее амплитуды. Для оценки фрактальной размерности гелей использовалась теория Мартина [2] и Мутукумара [3].

Наночастицы оксидов металлов получали в специальной установке в акустоплазменном разряде с возможностью активации их поверхности путем ультразвуковой кавитации. Специально разработанный акустоплазменный реактор представляет собой резервуар с двумя электродами (материал которых подбирается непосредственно под цели эксперимента, в нашем случае использовались железные и алюминиевые электроды), погруженными в жидкость, и ультразвуковым вибратором. Поддержание электрического разряда обеспечивается наночастицами, которые образуются в результате этого разряда из металла электродов. Химический состав, морфология, оптические и другие свойства этих наночастиц могут легко регулироваться параметрами плазменного разряда, материалами электродов и типами жидких фаз. Разряд инициируется в бидистиллированной воде между железными электродами с постоянным током 4 А и напряжением 40 В.

Приготовление образцов белков: фибриноген и тромбин из плазмы крови человека (Sigma Aldrich) разводили в трис-HCl-буфере (7,2 рН) и растворе NaCl (0,9 М), соответственно. Конечная концентрация фибриногена в растворе составляла 3 мг/мл, конечная активность тромбина – 0,125 NIH ед./мл. Начальная концентрация наночастиц составляла  $c = 1,147 \cdot 10^{-3}$  г/см<sup>3</sup>.

Выяснено, что инкубирование наночастиц оксида железа с тромбином перед добавлением его к фибриногену приводит к ускорению реакции гелеобразования в 20-30 раз (на стадии образования и роста протофибрил) и приводит к изменению его структуры (фрактальной размерности). Значения фрактальной размерности  $D_f$ , рассчитанные с использованием теории Мутукумара, составляют  $1,69 \pm 1,11$  для образца без добавления наночастиц, и  $1,77 \pm 0,08$  для образца фибриногена с тромбином, предварительно инкубированным с наночастицами. Такое увеличение фрактальной размерности свидетельствует об усложнении структуры (или увеличении плотности) фибринового геля в присутствии наночастиц. Полученные результаты открывают возможность регуляции скоростей образования фибринового геля на различных этапах с целью изменения их сетевой архитектуры, что может быть важно с точки зрения биомедицины и инженерии тканей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-32-00639\18.

1. Ziv-Polat O., Skaat H., Shahar A., Margel S. Novel magnetic fibrin hydrogel scaffolds containing thrombin and growth factors conjugated iron oxide nanoparticles for tissue engineering//Int J Nanomedicine. 2012. Vol. 7. P. 1259-74.
2. Kita R., Takahashi A., Kaibara M. Formation of Fibrin Gel in Fibrinogen - Thrombin System: Static and Dynamic Light Scattering Study//Biomacromolecules. 2002. Vol. 3. P.1013–1020.
3. Martin J., Wilcoxon J. Critical dynamics of the sol-gel transition//Phys. Rev. Lett. 1988. Vol. 61. № 3. P.373.

## ОЦЕНКА СИЛ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ «ЛИПОПОЛИСАХАРИД ИЕРСИНИЙ - МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА» МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

### FORCE INTERACTIONS BETWEEN YERSINIAE LIPOPOLYSACCHARIDES AND MONOCLONAL ANTIBODIES USING OPTICAL TWEZERS

Коньшев И.В.<sup>1,2</sup>, Бывалов А.А.<sup>1,2</sup>, Дудина Л.Г.<sup>1,2</sup>, Ананченко Б.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

<sup>2</sup>Вятский государственный университет, Киров, Россия

*Yersinia pseudotuberculosis* – сапрозоонозный патоген семейства *Enterobacteriaceae*, вызывающий системное заболевание, протекающее в форме острого гастроэнтерита с сопутствующим поражением мезентериальных лимфоузлов, а при септической форме – печени, селезёнки и почек [1]. В настоящее время выделяют 21 серотип возбудителя псевдотуберкулёза, которые различаются по структуре О-антигена ЛПС, при этом эпидемиологически значимыми являются серотипы О:1 и О:3 [2]. В условиях окружающей среды при температуре от +4 до +(25-30) °С клетки *Y. pseudotuberculosis* синтезируют «полную» форму ЛПС, состоящую из липида А, кора и О-антигена. Клетки близкородственного псевдотуберкулезному микробу вида иерсиний - *Y. pestis* - генетически не способны синтезировать О-антиген [3]. Учитывая названные биохимические особенности возбудителей, большое значение для разработки новых и совершенствования уже имеющихся иммунодиагностических средств имеет использование соответствующих моноклональных антител (МКАт).

Целью работы являлось количественное определение силы связи между О-боковыми цепями ЛПС *Y. pseudotuberculosis* и моноклональными антителами с помощью метода оптической ловушки.

В исследованиях использовали антигенные препараты ЛПС, выделенные из клеток *Y. pseudotuberculosis*, которые выращивались при температуре +10 °С (далее обозначен как «ЛПС-10»), и из клеток *Y. pestis EV*, выращенных при +27 °С (далее обозначен как «ЛПС-EV»). В качестве отрицательного контроля использовали микросферы, обработанные бычьим сывороточным альбумином (БСА). Антигены наносили на поверхность полистироловых микросфер ( $d = 1$  мкм), которые затем подводили с помощью пьезостолика к стеклянной поверхности, сенсibilизированной моноклональными антителами МКАт2 или МКАт7 в трёх разведениях – цельный препарат (3 мг/ мл), 1:1000 ( $3 \times 10^{-3}$  мг/ мл) и 1:1000000 ( $3 \times 10^{-6}$  мг/ мл). МКАт2 специфически взаимодействуют с углеводным эпитопом в составе О-боковых цепей ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, МКАт7 - с белковым эпитопом наружной мембраны как *Y. pseudotuberculosis*, так и *Y. pestis*. Контролем служила аминированная стеклянная подложка, не несущая белковых сенситинов (обозначена «APTES»). Первичные данные анализировали путём построения гистограмм распределения сил отрыва и их аппроксимации посредством функции ядерной оценки плотности вероятности (kernel density estimation).

С увеличением концентрации антител от 1:1000000 до 1:1000 средняя сила отрыва микросфер «ЛПС-10» от подложки «МКАт2» возрастает с 37.7 пН до 60.9 пН, что отражается и на характере аппроксимирующей кривой: она уплощается, расширяясь в область высокоамплитудных отрывов; низкоамплитудный пик (20 пН) выражен слабо. При использовании цельного препарата МКАт2 характер кривой по сравнению с разведением 1:1000 существенно не изменялся – наблюдалось лишь формирование слабовыраженного пика в области 120 пН. Средняя сила разрыва связей при этом составила 57.4 пН.

Характер кривых в системе «ЛПС-10 – МКАт7» при повышении концентрации антител практически не изменялся. Средняя сила отрыва микросфер «ЛПС-10» составила 32.9 пН для минимальной концентрации МКАт7, 31.3 пН – для разведения 1:1000 и 34.9 пН – для цельного препарата антител, что сопоставимо с контрольными препаратами – «АРТЕС» (31.6 пН) и «БСА» (36.8 пН).

В случае использования ЛПС-EV в качестве сенситина микросфер различия между МКАт2 и МКАт7 выражены меньше, несмотря на сложный характер аппроксимирующих кривых. Лишь в разведении 1:1000 для МКАт7 отмечено формирование небольшого выступа в области 110-130 пН с сохранением и незначительным его расширением до 90-130 пН при использовании цельного препарата антител.

Учитывая, что в условиях малой концентрации антител в разведении 1:1000000 поверхность подложек можно с большой вероятностью считать покрытой АРТЕС, отсутствие значимых различий между группами «ЛПС-10 – МКАт2» и «ЛПС-10 – МКАт7» выглядит закономерным. При увеличении концентрации антител в 1000 раз вероятность формирования связи в системе «ЛПС-10 – МКАт2» возрастает – это приводит к увеличению числа высокоамплитудных отрывов и появлению характерного пика в области более 100 пН, не отмеченного для препарата МКАт7 в том же разведении.

1. Barnes P.D. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine // J. Exp. Med. 2006. Vol. 203. P. 1591.
2. Bogdanovich T.M. et al. Genetic (sero) typing of *Yersinia pseudotuberculosis* // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. Vol. 529. P. 337.
3. Skurnik M., Bengoechea J.A. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersinia* // Carbohydr. Res. 2003. Vol. 338. P. 2521.

## АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТОПОТЕКАНА И ФУЛЛЕРЕНА: КЛЕТОЧНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ И ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯ DOSY

### INTERACTION OF TOPOTECAN AND FULLERENE: CELL EXPERIMENTS AND DOSY NMR SPECTROSCOPY

*Скуратовская И.В., Сало В.А., Бучельников А.С., Лантушенко А.О.*

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», кафедра «Физика», Севастополь, Россия

Ароматический антибиотик Топотекан (ТРТ) является одним из перспективных современных препаратов, используемых при лечении рака, и проявляющих свое действие на уровне ДНК топоизомеразы I. Ранее было показано, что при использовании его совместно с другими лекарственными препаратами, в частности, ароматическими биологически активными соединениями (БАС), достигается значительное усиление медико-биологической эффективности ТРТ. Методами ЯМР-спектроскопии было показано, что молекулы топотекана образуют гетерокомплексы с молекулами-интерцепторами флавин-монуклеотидом (FMN) и кофеином (CAF), что может являться причиной изменения биологической активности новатрона в смеси [1].

В данной работе было исследовано действие топотекана в смеси фуллереном C<sub>60</sub> на клетки буккального эпителия человека. Анализ взаимодействия в системе ТРТ - C<sub>60</sub> проводился также с помощью ЯМР-спектроскопии DOSY.

Фуллерен C<sub>60</sub> обладает насыщенной π-электронной системой, и в связи с этим может образовывать комплексы с ароматическими ДНК-интеркаляторами, включая противоопухолевые антибиотики и мутагены. Ранее было обнаружено, что введение немодифицированных фуллеренов C<sub>60</sub> совместно с различными ДНК-связывающимися ароматическими противоопухолевыми препаратами приводит к усилению их медико-биологического эффекта [2].

Клетки буккального эпителия используют как модельный объект в исследованиях влияния лекарственных веществ. Эпителий внутренней поверхности щеки является первым барьером в ингаляционном или пероральном маршруте и способен метаболизировать препараты химической природы, в том числе и канцерогены [2]. Показано, что в клетках буккального эпителия экспрессируются те же гены белков - супрессоров опухолей, что и в других типах клеток.

Состояние хроматина в клетках буккального эпителия человека оценивалось по количеству гранул гетерохроматина (КГГ) в ядрах клеток после окрашивания орсеином. Исследование процесса гетерохроматинизации позволяет оценить изменения функциональной активности клеточного ядра. Величина КГГ в каждом варианте эксперимента определялась в 30 ядрах. Анализировалось отклонение полученного в опыте значения от контрольного значения КГГ.

При проведении исследований концентрация топотекана поддерживалась постоянной, а концентрация C<sub>60</sub> изменялась. Было обнаружено концентрационно-зависимое изменение показателя КГГ, что свидетельствует о проявлении взаимодействия топотекана и фуллерена на клеточном уровне. При концентрации фуллерена

$C=10^{-4}$  моль/л показатель КГГ ядер практически совпадал со значением КГГ клеток в буферном растворе, без препаратов.

Определение равновесных параметров взаимодействия ТРТ-  $C_{60}$  производилось с помощью метода диффузионно упорядоченной ЯМР-спектроскопии. В эксперименте регистрировался средневзвешенный коэффициент поступательной диффузии в области сигналов ароматических протонов топотекана как функция концентрации антибиотика. В расчетах равновесной константы комплексообразования использовалась обобщенная масштабированная модель, учитывающая формирование кластеров фуллеренов в широком диапазоне размеров [4].

В результате расчетов была определена константа гетероассоциации топотекана и фуллерена  $K=1880$  л/моль, а также количество молекул топотекана, одновременно с разных сторон взаимодействующих с молекулой фуллерена  $N=4$ .

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ на государственную поддержку ведущих научных школ Российской Федерации (НШ-5889.2018.3).

1. Лантушенко А.О., Мосунов А.А., Даржинкевич З., Евстигнеев М.П. Протекторное действие витамина В2 по отношению к антибиотику топотекану *in vitro* // Физика живого. 2007. Том 15, № 2. С. 18–23.
2. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Prylutskyi Y. I., Ritter U. and Scharff P. Pristine  $C_{60}$  fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis // *Exp. Oncol.*, 2011, 33, 162–164.
3. Shckorbatov Y., Grigoryeva N., Shakhbazov V., Grabina V., Bogoslavsky A. Microwave irradiation influences on the state of human cell nuclei // *Bioelectromagnetics*. 1998. V. 19. № 7. P. 414-419.
4. Mosunov A.A., Pashkova I.S., Sidorova M., Pronozin A., Lantushenko A.O., Prylutskyi Yu.I., Parkinson J.A., Evstigneev M.P. Determination of the equilibrium constant of  $C_{60}$  fullerene binding with drug molecules *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017. V.19. P.6777-6784.

## ФОТОТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ РЕЛАКСАЦИИ ВЫСОКОВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

### PHOTOTHERMAL DAMAGE OF MICROORGANISMS AT RELAXATION OF HIGH-EXCITED STATES OF SENSITIZERS

*Летута С.Н., Пашкевич С.Н., Ишемгулов А.Т., Никиян А.Н.*

Оренбургский государственный университет, Оренбург, letuta@com.osu.ru

Поиск альтернативных способов борьбы с патогенными микроорганизмами становится все более актуальным в связи с участвовавшими сообщениями об увеличении количества штаммов, устойчивых к действию традиционных антимикробных препаратов [1]. Один из перспективных способов не медикаментозного воздействия на бактерии и грибы - фотодинамическая обработка, основанная на окислении субстрата активными формами кислорода, генерируемыми в биосистемах при использовании специальных сенсibilizаторов и света. При определенных условиях воздействия на сенсibilizаторы можно «включить» дополнительные физические процессы инактивации бактерий, которые несущественны в традиционных методиках. Так, при воздействии интенсивным лазерным излучением на молекулы-сенсibilizаторы, значительная доля поглощаемой энергии неизбежно трансформируется через их высокие электронно-возбужденные состояния (ВЭС). Энергообмен с окружением в ходе дезактивации ВЭС, в свою очередь, предопределяет первичные физико-химические процессы, происходящие в биосистемах. Основными повреждающими факторами при этом становятся тепловые эффекты – гипертермия клеток и локальный нагрев среды до температуры, превышающей температуру кипения жидкости.

Если сенсibilizатор локализован непосредственно в мембране микроорганизма, тепловыделение может инициировать её деструкцию. Но и тогда, когда сенсibilizатор находится вне клетки (в растворе), он также может оказывать антимикробное действие. В этом случае поглощенная энергия передается растворителю с последующим образованием и схлопыванием пузырьков пара, в результате чего образуются акустические волны, вызывающие деструкцию микроорганизмов. В роли теплосенсibilizаторов можно использовать наночастицы [2] или молекулы органических красителей. При использовании красителей локальный нагрев среды эффективнее осуществлять через их ВЭС.

Исследованы планктонные культуры клеток грамотрицательных *Escherichia coli* и грамположительных *Bacillus subtilis* в физрастворах (концентрация  $\sim 10^7$  КОЕ/мл) при нормальных условиях. Теплосенсibilizаторами служили анионные ксантеновые красители эритрозин и эозин, а также катионный родамин 6Ж (концентрация 0.01 - 0.5 мМ), которые по-разному взаимодействуют с клеточными стенками. Источником возбуждения служил импульсный YAG:Nd лазер (вторая гармоника  $\lambda = 532$  нм, длительность импульса 15 нс, плотность мощности возбуждения от 1 до 30 МВт/см<sup>2</sup>). Повреждения микроорганизмов оценивались путём подсчёта колониеобразующих единиц и визуализации с помощью атомно-силового

микроскопа.

Установлено, что фотодинамическая эффективность использованных сенсibilизаторов зависит от характера их взаимодействия с клеточной стенкой, в частности, грамположительные бактерии уничтожались эффективнее, чем грамотрицательные. Антимикробное действие резко усиливалось при плотности мощности возбуждения свыше  $10 \text{ МВт/см}^2$ . При высокой плотности мощности возбуждающего света одинаково эффективно уничтожались и грамположительные, и грамотрицательные бактерии, причем как с катионными, так и с анионными красителями.

При высокой плотности мощности возбуждения имеет место двухквантовое ступенчатое заселение ВЭВС молекул красителей, безызлучательная релаксация которых приводит к локальному нагреву среды. При определенных условиях это сопровождается образованием пузырьков пара, формирование и схлопывание которых приводит к генерации ударных акустических волн, повреждающих бактериальные клетки. Образование и исчезновение пузырьков пара в растворах, а также возникновение акустических волн, было зафиксировано по изменению интенсивности светорассеяния проходящего через кювету с образцом луча гелий-неонового лазера (632,8 нм).

Обнаруженное повреждение бактерий ударными волнами, генерируемыми в среде тепловыми источниками, позволяет утверждать, что предварительное связывание сенсibilизатора с бактериальными стенками или их проникновение внутрь бактериальных клеток, не являются обязательным условием фотодинамического действия. Полученные результаты могут быть полезны при разработке фотодинамических методов инактивации микроорганизмов.

1. Kashef N. et al. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. Review article. // Nanophotonics. 2017. Vol. 6(5). P. 853-879.

2. Lapotko D. Plasmonic nanoparticle-generated photothermal bubbles and their biomedical applications // Nanomed. 2009. Vol. 4(7). P. 813-845.

## СУПЕРКОМПЬЮТЕРНЫЙ КОДИЗАЙН ПРОГРАММЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ

## SUPERCOMPUTER CODESIGN OF MOLECULAR DYNAMICS PROGRAM FOR MODELING BIOMOLECULAR SYSTEMS

*Лихачев И.В., Балабаев Н.К.*

ИМПБ РАН – филиал ИПМ им. М.В.Келдыша РАН, Пушкино, [ilya\\_lihachev@mail.ru](mailto:ilya_lihachev@mail.ru)

Метод моделирования молекулярной динамики используется во многих научно-исследовательских лабораториях [1-6]. Размеры систем за последние годы существенно выросли и составляют порядка  $10^5$  атомов. Выполнение программ по молекулярной динамике, как правило, производят на специальных вычислительных кластерах, называемых нередко суперкомпьютерами.

Большинство вычислительных кластеров представляет собой массив достаточно мощных многоядерных ЭВМ, соединенных по определенной топологии. При этом, каждому пользователю кластера доступно в порядке очереди некоторое количество вычислительных ядер. В последние годы получают популярность гетерогенные вычислительные среды – узлы с современным многоядерным центральным процессором и одним или несколькими графическими ускорителями, предполагающими их использование в качестве математического сопроцессора.

Основную часть времени программа моделирования молекулярной динамики вычисляет силы, действующие на атом со стороны других атомов (Кулоновское и Ван-дер-Ваальсово взаимодействие). Следует заметить, что в системе взаимодействуют друг с другом не все атомы, а только расположенные на некотором расстоянии друг от друга, порядка  $15 \text{ \AA}$ . Можно ускорить выполнение программы расчета сил, убрав из расчета невзаимодействующие пары атомов.

Изложенная идея реализована в двух популярных алгоритмах учета ближайших соседей – алгоритма сканирования по пространству и алгоритма составления списков пар атомов (списка Верле).

Для повышения быстродействия алгоритмов было предложено разработать их реализацию на GPU. Графические ускорители компании NVIDIA поддерживают технологию CUDA и позволяют использовать себя в качестве математического сопроцессора, работающего в качестве системы SIMT (simple instruction multiple threads). Это подобно архитектуре SIMD (single instruction multiple data) для центральных процессоров.

На данной стадии разработки гетерогенный программный комплекс PUMA-CUDA [7] функционирует в следующих вычислительных средах:

- на одном процессоре;
- на многих процессорах по технологии OpenMP;
- на одном либо двух графических процессорах согласно метода сканирования по пространству



- на одном либо двух графических ускорителях согласно составлению списка Верле, который составляется согласно списку Верле;
- в гетерогенной вычислительной среде архитектуры N CPU \* 2 GPU.

Исследования показали, что наиболее эффективно графический ускоритель вычисляет невалентные взаимодействия списка пар атомов, построенных по методу Верле. Сам список Верле, с свою очередь, строится по методу сканирования по пространству.

1. A.S. Lemak, N.K. Balabaev. A comparison between collisional dynamics and Brownian dynamics. Mol Simul 15 (1995) 223-31.
2. A.S. Lemak, N.K. Balabaev Molecular dynamics simulation of a polymer chain in solution by collisional dynamics method. J Comp Chem 17 (1996) 1685-95.
3. Н.К. Балабаев, К.В. Шайтан. Компьютерное моделирование молекулярной динамики. В кн.: Методы компьютерного моделирования для исследования полимеров и биополимеров, М., Издательство ЛКИ, 2009. Глава 2, с.35-62.
4. Glyakina A.V., Likhachev I.V., Balabaev N.K., Galzitskaya O.V. Comparative mechanical unfolding studies of spectrin domains R15, R16 and R17. J Struct Biol. 2018; 201(2):162-170.
5. Glyakina A.V., Likhachev I.V., Balabaev N.K., Galzitskaya O.V. Mechanical stability analysis of the protein L immunoglobulin-binding domain by full alanine screening using molecular dynamics simulations. Biotechnol J. 2015;10(3):386-94.
6. Glyakina A.V., Likhachev I.V., Balabaev N.K., Galzitskaya O.V. Right- and left-handed three-helix proteins. II. Similarity and differences in mechanical unfolding of proteins. Proteins. 2014;82(1):90-102.
7. Лихачев И.В., Балабаев Н.К. // Сборник статей конференции ICMVB-2018. doi: 10.17537/icmbb18.53.

## ФОРМИРОВАНИЕ НАНОСТРУКТУРНОЙ ФОСФОЛИПИДНОЙ ФАЗЫ В НАТИВНЫХ МАСЛАХ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

## NANOSTRUCTURED PHOSPHOLIPID PHASE FORMATION IN NATIVE VEGETABLE OILS

*Михаловский И.С., Матвейко Н.П., Мельникова Г.Б.<sup>1</sup>, Бабодей В.Н.<sup>2</sup>, Пчельникова А.В.<sup>2</sup>*

Белорусский государственный экономический университет (кафедра физикохимии материалов и производственных технологий), Минск, jozef\_m@tut.by

<sup>1</sup>Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси, Минск

<sup>2</sup>Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию, Минск

Получение растительных масел в пищевом виде требует в первую очередь отделения фосфолипидов от масляного сырья [1]. Традиционные технологические процессы с использованием методов гидратации и последующей очистки приводят к образованию на маслодобывающих заводах значительного количества баковых отстоев (фузов), которые, практически, не имеют рентабельного сбыта, а при длительном хранении становятся не востребуемыми. С потерями фосфолипидов с гидратационным осадком теряются и глицериды ненасыщенных жирных кислот как основная компонента пищевых масел. В этой связи требуются новые подходы к выделению фосфолипидов из нативных масел, в виде пригодном для их практического использования. Известно, что при рафинации растительных масел перспективными являются акустические методы. Так, обработка подсолнечного масла ультразвуком после его гидратации способствует более полному удалению фосфолипидов [2]. Однако при разработке промышленных технологий желательна применение знаний молекулярной биофизики. Амфифильные фосфолипиды в присутствии воды способны образовывать регулярные структуры, что приведет к формированию в масле высокодисперсной фазы суспензионного типа, которая принципиально отличается от традиционной их гидратации с образованием фракции неизвестной природы. Последующее применение центробежных методов, например сепарации позволит получить фосфолипидную фракцию, пригодную для дальнейшего использования. В работе представлены результаты по формированию в масляном сырье фосфолипидных структур как основы суспензионной фазы.

Ультразвуковая обработка с использованием установки ИЛ100-6/1 «ИНЛАБ» (РФ) нативного (нерафинированного) масла, например, рапсового с водой приводит к формированию дисперсии. Для определения структуры дисперсных частиц применили оригинальный подход, основанный на предположении о том, что фосфолипидные дисперсные частицы, сформированные непосредственно в масле сохраняют свою структуру в полярной водной среде. Данный подход позволяет корректно исследовать размерные характеристики частиц, поскольку изучение структур непосредственно в масле является проблемой. Для этого часть фосфолипидных структур с маслом переводили в водную среду, гомогенизировали и центрифугировали с помощью центрифуги Universal 320R «Hettich» (ФРГ) для отделения глицеридной компоненты. Брали дисперсию вдали от границ раздела (с воздухом, стенками пробирки).

Образец дисперсии исследовали методами светорассеяния и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Регистрировали спектр светорассеяния  $R(\lambda)$  дисперсии с использованием спектрофотометра CM2203

«Солар» (Беларусь), работающего в режиме спектрофотометра. Затем аппроксимировали спектр зависимостью  $R=a/\lambda^p$  в представлении Ангстрема [3]. Установлено, что в интервале 300 нм – 900 нм наблюдается рэлеевское рассеяние на частицах, спектр хорошо аппроксимируется кривой с показателем  $p=4$ , что свидетельствует о форме частиц близкой к сферической, с размерами, не превышающими 100 нм (десятую долю длины волны рассеянного света).

Исследование дисперсии методом АСМ на приборе НТ-206 «Микротестмашины» (Беларусь) со стандартными кремниевыми зондами «Mikromacsh» (Эстония), жесткостью 2,5 Н/м, радиусом кривизны не более 10 нм подтверждает результаты, полученные с использованием метода светорассеяния. Установлено, что частицы на кремниевой подложке образуют сегменты, близкие к сферическим. Среднее значение линейного размера сегмента фосфолипидной структуры по высоте составляет от 30 до 50 нм. Среднее значение линейного размера ширины (диаметр основания сегмента) дисперсных структур составляет 80 нм. Аналогичным образом проведены измерения размера остальных дисперсных частиц.

Установлено, что непосредственно в масле структуры способны осаждаться центрифугированием с возможностью отделения супернатанта (глицеридов и др. компонентов масла).

Таким образом, ультразвуковая обработка нативных растительных масел в присутствии воды приводит к формированию фосфолипидных наноструктур, что может быть положено в основу новых технологий получения фосфолипидных концентратов суспензионного типа, пригодных для применения.

1. Товбин И.М., Фаниев Г.Г. Рафинация жиров. Москва: Пищевая промышленность, 1977.
2. Алексеева С.Л. и др. // Известия вузов. Пищевая технология. № 5-6. 1996. С. 44 – 45.
3. Ван де Хюлст Г. Рассеяние света малыми частицами. Москва: Изд-во иностр. лит., 1961.

## ИЗМЕНЕНИЕ СОБСТВЕННОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА И ЦИКЛОДЕКСТРИНА

### ALTERATION IN THE OWN LUMINESCENCE OF SERUM ALBUMIN UNDER THE ACTION OF POLYVINYLPIRROLIDONE AND CYCLODEXTRIN

*И.А. Наговицын<sup>1,2</sup>, И.А. Хайруллина<sup>3</sup>, Борулева Е.А.<sup>4</sup>, Г.К. Чудинова<sup>1,4</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУН Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, langmuir@bk.ru, g.chud@list.ru

<sup>2</sup>ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

<sup>3</sup>Российский университет дружбы народов, Москва, spaldingtm@mail.ru

<sup>4</sup>Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, katrinboruleva@gmail.com, g.chud@list.ru

В последнее время уделяется значительное внимание созданию наноструктур на основе биоорганических и биомакромолекул для применения в биологии, медицине, биосенсорике. Наноструктуры, полученные на основе сывороточных альбуминов, активно исследуются как супрамолекулярные системы доставки лекарственных препаратов [1]. Для понимания механизмов физиологического действия многокомпонентных супрамолекулярных систем необходимы подходы, позволяющие регистрировать зависимость свойств от состава и структуры нанообъекта. Одним из таких подходов является регистрация собственной люминесценции белка [2]. Нами изучена триптофановая люминесценция (спектрофлуориметр Shimadzu RF-5300pc) водных растворов сывороточного альбумина человека (САЧ, 0,68 мг/мл, Sigma-Aldrich Co.) в трехкомпонентных системах - с добавлением  $\beta$ -циклодекстрина (ЦД) и поливинилпирролидона (ПВП). Массовое соотношение САЧ и смеси ПВП-ЦД соответствует 1:1. Интенсивность триптофановой люминесценции САЧ ( $\lambda_{ex} = 280$  нм,  $\lambda_{em} = 337$  нм) в однокомпонентных растворах составляла 11,25 отн. ед. При добавлении ЦД, ПВП, и их смесей наблюдали тушение на 3,4 – 6,8 %. Изменения интенсивности люминесценции зависит от соотношения ЦД и ПВП и максимальны при соотношении 4:1 и 1:4 (рис. 1).

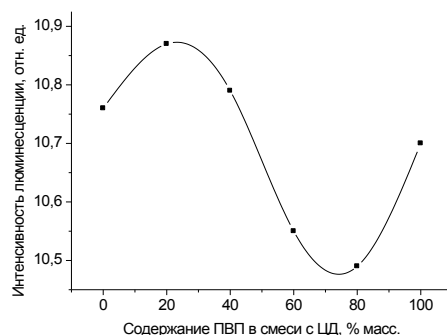


Рис. 1. Изменение собственной люминесценции САЧ в трехкомпонентных растворах САЧ-ПВП-ЦД.

В структуре молекул сывороточных альбуминов имеется несколько гидрофобных полостей, способных эффективно инкорпорировать липофильные молекулы. ЦД также обладает выраженной способностью образовывать устойчивые в водной среде комплексы с неполярными молекулами [3]. Предложенная комбинация компонентов может быть использована для создания наносистем по доставке лекарственных препаратов при контроле ее функциональных параметров оптическими методами.

1. Karimia M. et. al. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems // Expert Opin Drug Deliv. 2016. Vol. 13. No 11. P. 1609.
2. Пермяков Е.А. Метод собственной люминесценции белка // М. Наука, 2003. – 189 с.
3. I.A. Nagovitsyn, et. al. Pd complex of 5,10,15,20 - tetra (4-carbomethoxyphenyl) porphyrin luminescence study in interaction with  $\beta$ -cyclodextrin and human serum albumin in solutions // Chemistry and Chemical Biology. Methodologies and Applications, Apple Academic Press, 2014, P. 113-128.

---

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА ЛИЗИНОВОГО ДЕНДРИМЕРА 2-ГО ПОКОЛЕНИЯ С МОЛЕКУЛАМИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ВЕЗУГЕН МЕТОДОМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

### STUDY OF THE 2ND GENERATION LYSINE DENDRIMER COMPLEX WITH VESUGENE THERAPEUTIC PEPTIDE MOLECULES BY COMPUTER SIMULATION

*М.Ю.Ильяш, В.В. Безродный, Е.И.Фатуллаев, С.Е.Миктаниук, И.М. Неелов,*

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (Университет ИТМО), Кронверкский пр.49, Санкт-Петербург, 197101, Россия, Е-мэйл: i.neelov@mail.ru

Дендримеры являются сильно разветвленными молекулами с регулярным сферическим ветвлением от центрального ядра. Дендримеры используются в различных биомедицинских применениях, включая доставку лекарств и генов. Лизиновые дендримеры представляют собой особый тип дендримеров на основе только одного аминокислотного остатка лизина, который имеет положительно заряженные концевые группы [1,3]. Они могут использоваться в качестве противовирусных, антибактериальных и антиамилоидных агентов и могут образовывать комплексы с противоположно заряженными молекулами, например ДНК, полисахаридами и пептидами. В данной работе проведено исследование возможности образования комплекса пептида везуген (Lys-Glu-Asp) с лизиновыми дендримерами. Наше моделирование проводилось с использованием программного обеспечения GROMACS 4.5.6 и одного из самых современных силовых полей AMBER\_99SB-ildn. Мы изучили систему, состоящую из одного дендримера и 8 везугеновых пептидов в воде с явными противоионами и показали, что молекулы данного пептида образуют стабильный комплекс с лизиновым дендримером второго поколения. Такие комплексы могут быть использованы в будущей для доставки этого и других сходных терапевтических пептидов в целевые органы и клетки.

Работа была поддержана грантом 08-08 правительства Российской Федерации и грантом РФФИ 19-03-00715.

1. Denkwalter R.G., Kolc J., Lukasavage W.J., Macromolecular Highly Branched Homogeneous Compound, 1983, US Patent № 4410688.
2. Falkovich S.G., Markelov D., Neelov I., Darinskii A., Journal of Chemical Physics, 2013, 139, 064903
3. Neelov I.M., Shavykin O.V., Plyash M.Y., Bezrodnyi V.V., Mikhtaniuk S.E., Marchenko A.A., Fatullaev E.I., Darinskii A.A., Leermakers F.A.M., Supercomputing Frontiers and Innovations, 2018, 5, 60

---

## ИЗУЧЕНИЕ ОРИЕНТАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ ЛИЗИНОВОГО ДЕНДРИГРАФТА 2-ГО ПОКОЛЕНИЯ

### STUDY OF ORIENTATION MOBILITY OF 2ND GENERATION LYSINE DENDRIGRAPH

*О. В. Шавыкин<sup>1</sup>, М. Ю. Ильяш<sup>1</sup>, Э. И. Фатуллаев<sup>1</sup>, И. М. Неелов<sup>1</sup>, Д. А. Маркелов<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (Университет ИТМО), Кронверкский пр.49, Санкт-Петербург, 197101, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ), Санкт-Петербург, 199034, Россия, Университетская наб., 7/9, i.neelov@mail.ru

Дендриграфты являются интересным объектом для многих биомедицинских приложений, включая доставку лекарственных препаратов и генетического материала. Топологическая структура этих молекул сходна со структурой коротких дендронных щеток с короткой основной цепью. Длинные дендронные щетки имеют цилиндрическую форму и большие времена релаксации. Однако дендриграфты и, в частности,

лизиновые дендриграфты имеют форму, близкую к сферической, и размер близок к размеру лизиновых дендримеров той же молекулярной массы [1-3]. По этой причине можно предположить, что вращение этих молекул как целого может вносить значительный вклад в их локальную ориентационную подвижность, как это происходит в случае дендримеров. В данной работе молекулярно-динамическое моделирование ориентационной подвижности дендриграфта 2-го поколения проводилось в водном растворителе с явным учетом противоионов при температуре  $T = 300\text{K}$  и давлении  $P = 1\text{ атм}$  с использованием пакета программ Gromacs с силовым полем AMBER99SB-ildn. Глобальная ориентационная подвижность характеризовалась временными автокорреляционными функциями (ACF) 1-го и 2-го порядка для вектора соединяющего концы основной цепи дендриграфта. Локальная подвижность характеризовалась ACF 1-го и 2-го порядка для векторов Н-Н во внутренней и концевой группах СН<sub>2</sub> ближайшей к атому азота. Было показано, что глобальное время ориентации существенно больше (более чем на один порядок), чем локальное время ориентации. А локальное время ориентации для внутренних векторов Н-Н, в свою очередь, существенно больше, чем время ориентации для векторов Н-Н терминальных групп дендриграфта.

Работа была поддержана грантом 08-08 правительства Российской Федерации и грантом РФФИ 19-03-00715.

1. Neelov I.M., Markelov D.A., Falkovich S.G., Ilyash M.Yu., Okrugin B.M., Darinskii A.A. Mathematical simulation of lysine dendrimers: temperature dependences // *Polymer Science, Series C*. 2013, 55(1), 154–161.
2. Markelov D.A., Falkovich S.G., Neelov I.M., Ilyash M.Yu., Matveev V.V., Lahderanta E., Ingman P., Darinskii A.A. Molecular dynamics simulation of spin-lattice NMR relaxation in poly-L-lysine dendrimers. Manifestation of the semiflexibility effect // *Physical Chemistry and Chemical Physics*. 2015, 17, 3214–3226.
3. Sheveleva N.N., Markelov D.A., Vovk M.A., Mikhailova M.E., Tarasenko I.I., Neelov I.M., Lahderanta E. NMR studies of excluded volume interactions in peptide dendrimers // *Scientific Reports* - 2018, Vol. 8, pp. 8916

## РАЗРУШЕНИЕ АМИЛОИДНЫХ ОЛИГОМЕРОВ ЛИЗИНОВЫМИ ДЕНДРИГРАФТАМИ DESTRUCTION OF AMYLOID OLIGOMERS BY LYSINE DENDRIGRAPHS

*Д.Н. Хамидова<sup>1,2</sup>, М.Ю.Ильяш<sup>1</sup>, В.В. Безродный<sup>1</sup>, Э.И. Фатуллаев<sup>1</sup>, С.Е. Михтанюк<sup>1</sup>, И.М. Неелов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

<sup>2</sup> Таджикский национальный университет, Душанбе, 734025, Таджикистан, i.neelov@mail.ru

Дендриграфты имеют структуру сходную одновременно с лизиновыми дендримерами и лизиновыми дендронными щетками. В отличие от дендримеров они, как и щетки, включают в себя несколько центров ветвления, связанных в линейную цепь. Лизиновые дендримеры и дендриграфты часто используются в биомедицине для доставки лекарств и других биологических молекул. Они также могут быть использованы в качестве антибактериальных и противовирусных агентов. Ранее было экспериментально показано, что дендримеры могут быть использованы и в качестве антиамилоидных агентов. Однако для лизиновых дендриграфтов такие исследования до настоящего времени не проводились. Целью данной работы является проверка возможности разрушения пептидных олигомеров с помощью лизиновых дендриграфтов в двух системах, состоящих из дендриграфта 2-го поколения и стопки из 8 или 16 LVFFAE пептидных молекул в водном растворе. Исследование выполнено с помощью компьютерного моделирования методом молекулярной динамики. Показано, что лизиновый дендриграфт полностью разрушает стопки состоящие из 8 или 16 LVFFAE пептидных молекул, и образует стабильные комплексы с отдельными пептидными молекулами, полученными в результате этого разрушения. Также были изучены структуры образовавшихся дендример-пептидных комплексов. Было показано, что пептиды в комплексах находятся, в основном, на поверхности дендриграфтов и не проникают глубоко внутрь комплексов. Результаты, полученные в настоящей работе, могут быть полезны для разработки в будущем антиамилоидных агентов на базе лизиновых дендриграфтов для лечения болезни Альцгеймера, поскольку считается, что возможной причиной этого заболевания является образование токсичных амилоидных олигомеров и фибрилл.

Работа была поддержана грантом 08-08 правительства Российской Федерации и грантом РФФИ 19-03-00715.

1. B. Klajnert, M. Bryszewska, J. Cladera, “Molecular Interactions of Dendrimers with Amyloid Peptides: pH Dependence”. *Biomacromolecules*, vol. 7, 2006, pp. 2186–2191.
2. I.M. Neelov, A. Janaszewska, B. Klajnert, M. Bryszewska, N. Makova, D. Hicks, H. Pearson, G.P. Vlasov, M.Yu. Ilyash, D.S. Vasilev, N.M. Dubrovskaya, N.L. Tumanova, I.A. Zhuravin, A.J. Turner, N.N. Nalivaeva, “Molecular properties of lysine dendrimers and their interactions with  $\alpha\beta$ -peptides and neuronal cells”. *Current Medical Chemistry*, vol. 20, 2013, pp. 134–143.
3. H. Cottet, M. Martin, A. Papillaud, E. Souaid, H. Collet, A. Commeyras, Determination of dendrigraft poly-L-lysine diffusion coefficients by Taylor dispersion analysis, *Biomacromolecules*, 8, 3235, (2007).

## ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ВКЛАД «ЗЕЛЕННЫХ» НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОБРАЗОВАНИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

## POTENTIAL CONTRIBUTION OF "GREEN" NANOPARTICLES OF SILVER IN THE FORMATION OF ACTIVE FORMS OF OXYGEN

Оганесян А., Петросян М., Геворгян Т., Айвазян Н.<sup>1</sup>, Киракосян Г.<sup>1</sup>

Российско-Армянский Университет, ИБМиФ, Армения, Ереван, О. Эмина 123,

E-mail: ashkhen.hovhannisyan@rau.am,

1-НИИ физиологии им. Л. Орбели НАН РА, Армения, Ереван, Бр.Орбели 22,

E-mail: nairaayvazyan@physiol.sci.am

Наночастицы серебра (AgNPs) являются объектом повышенного внимания исследователей в силу проявляемых уникальных свойств, которые могут обеспечить широкое применение таких наночастиц в современной медицине, и в частности, в антиопухолевой терапии. Благодаря этому в последние годы они широко используются в здравоохранении. Тем не менее, имеется много данных также об их негативном воздействии на клеточном уровне: цитотоксичность, генотоксичность и различные иммунные реакции.

Полученные нами AgNPs в 50% этанольном экстракте базилика армянского (*Ocimum araratum*), испльзовали для исследования их антиоксидантных и противоопухолевых свойств. Исследования проводились на беспородных мышахсамцах. Клетки саркомы S-180 трансплантировали подкожно в правую подмышку каждой мыши. Когда опухоль достигала до размеров 100-300 мм<sup>3</sup>, животных делили на 3 группы: I группа контрольная, получающая 50% этанольный раствор на основе физиологического раствора, II группа, которым инъецировали 50% этанольный экстракт *O. araratum* (1,75 мкг/мл стандартизованные по розмариновой кислоте) и III группа с AgNPs, стабилизированными в экстракте.

Методом анализа спонтанной хемилюминисценции (СХЛ) было оценено образование АФК. Все эксперименты были выполнены с помощью портативного люминометра Junior LB 9509 (BERTHOLD Tech., Германия). Исследовали изменение интенсивности СХЛ гомогенатов опухолевой ткани саркомы S-180 всех групп мышей. Было выявлено, что, по сравнению с контрольными животными, самым сильным свечением обладала экспериментальная группа, которым инъецировали AgNPs, стабилизированные в экстракте.

Получены также результаты по определению количества малонового диальдегида (МДА) в ткани саркомы S-180, которое измеряли спектрофотометрически (СТ-ChromTech, Тайвань) с использованием тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Было выявлено, что, по сравнению с контрольной группой, самое высокое значение накопления МДА наблюдалось в экспериментальной группе, которой инъецировали AgNPs, стабилизированные в экстракте. Так как образование МДА характерно для реакций перекисного окисления липидов и полученные данные коррелируют с результатами СХЛ, то можно утверждать, что AgNPs повышают уровень АФК, которые и приводят к увеличению значений соответствующих параметров.

Для оценки образования супероксида и активности эндогенной ферментативной антиоксидантной системы измеряли активность супероксиддисмутазы (СОД) по фотоокислению адреналина. СОД катализирует дисмутацию супероксидного радикала либо в O<sub>2</sub>, либо в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [3]. При исследовании действия экстракта и AgNPs было установлено повышение активности СОД по сравнению с контрольной группой. Полученные нами результаты совпадали с литературными данными, что AgNPs могут генерировать различные АФК, такие как супероксид или гидроксильный радикал, перекись водорода и т.д. [1; 2], что и приводит к активации СОД в ходе защитной реакции организма против окислительной деструкции.

В нашем исследовании, результаты полученные по определению ХЛ, МДА и СОД, показали, что под действием AgNPs повышаются уровни образования АФК, которые приводят к повреждению клеточных структур и биополимеров, таким образом вызывая деградацию опухолевой ткани.

1. Wang, Z. et al. // Activation of biologically relevant levels of reactive oxygen species by Au/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hybrid nanozyme for bacteria killing and wound disinfection. Rev. 2017. Vol. 113. P.145–157.

2. Dwivedi S. et al. // Reactive oxygen species mediated bacterial biofilm inhibition via zinc oxide nanoparticles and their statistical determination. Rev. 2014. Vol. 185. P.938-944

3. Nayyan M. et al. // Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. Chem. Rev. 2016. Vol. 116 (5). P.3029–3085.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ  
ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ****MOLECULAR MECHANISMS OF PLANT EXTRACTS ANTIOXIDANT ACTIVITY***Пластун И.Д.<sup>1</sup>, Бокарев А.Н., Пластун В.О.<sup>1</sup>, Наумов А.А., Захаров А.А.*

Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., Саратов

<sup>1</sup> Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов

В настоящее время проявляется большой интерес к использованию растительных экстрактов, имеющих в своём составе большое количество флавоноидов, обуславливающих их высокую биологическую активность и дающих возможность использовать эти экстракты в качестве лечебных и общеукрепляющих средств. Необходимо отметить, что комплексные извлечения из лекарственных растений очень часто имеют значительно более выраженное терапевтическое действие по сравнению с индивидуальными веществами, что обуславливает актуальность задач исследования взаимодействия и взаимовлияния компонент растительных экстрактов с целью выявления веществ, являющихся наиболее значимыми в оказании лечебного эффекта.

Установлено, что многие флавоноидсодержащие экстракты способны влиять на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), проявляя как прооксидантное, так и антиоксидантное действие. К таким экстрактам относятся, например, экстракты очитка пурпурного и очитка большого, аврана лекарственного, бессмертника и многих других растений. Однако, точный механизм антиоксидантного действия экстрактов пока не установлен.

Как показали биологические эксперименты, в результате анализа антиоксидантной активности экстрактов двух видов очитка – очитка большого и очитка пурпурного – было обнаружено, что антиоксидантное действие экстракта о.пурпурного значительно превышает действие о.большого при равных условиях эксперимента. Учитывая тот факт, что данные растения являются близкородственными видами рода очиток, то их химический состав в целом сходен. Наиболее существенным отличием их состава является то, что о.пурпурный содержит галловую кислоту, относящуюся к группе фенолкарбоновых кислот, в то время как в экстракте о.большого ни одно из веществ этой группы не обнаружено. Таким образом, можно сделать вывод, что существенное повышение антиоксидантной активности флавоноидсодержащих экстрактов обеспечивает галловая кислота.

Целью представленной работы является теоретическое обоснование и исследование условий образования устойчивых молекулярных комплексов на основе водородных связей между продуктами ПОЛ и отдельными компонентами экстракта, оказывающими наиболее существенное влияние на антиоксидантную активность. Исследование проводилось при помощи молекулярного моделирования взаимодействия компонент экстракта и промежуточного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). В качестве исследуемых компонент экстракта были рассмотрены кверцетин как один из основных флавоноидов большинства растений, в том числе и очитков, а также галловая кислота.

Методами компьютерного моделирования были рассчитаны структура и ИК спектры образующихся молекулярных комплексов как попарно, так и в трёхкомпонентной смеси, а также проанализированы параметры образующихся водородных связей. Моделирование структуры и расчёт спектров молекул и их комплексов осуществлялись на основе метода теории функционала плотности (ТФП) с использованием функционала B3LYP с использованием базиса 6-31G(d). Все процедуры молекулярного моделирования были проведены с использованием программного комплекса Gaussian 09, который широко применяется для решения задач молекулярного моделирования в различных сферах вычислительной физики и химии. Сила образовавшихся водородных связей оценивалась по длине водородного мостика, сдвигу частоты валентных колебаний О-Н связей в ИК-спектрах молекулярного комплекса относительно ИК-спектра отдельных молекул, а также по энергии связи, которая рассчитывалась по эмпирической формуле Иогансена.

Как показали расчёты, между молекулами кверцетина и МДА устанавливается пять связей, и все они относятся к слабым (частотный сдвиг  $\Delta\nu$  не превышает  $90\text{см}^{-1}$ , а длина Н-мостика была  $2.92\text{ \AA}$  и выше). Это говорит о том, что кверцетин практически не связывается с МДА. При взаимодействии галловой кислоты с МДА устанавливаются четыре водородные связи средней силы (частотный сдвиг  $\Delta\nu$  составляет от  $130$  до  $245\text{см}^{-1}$ , а длина Н-мостика – от  $2.83$  до  $2.93\text{ \AA}$ ), что свидетельствует об образовании достаточно стабильного молекулярного комплекса. Наиболее сильное взаимодействие происходит между кверцетином и галловой кислотой – образуется восемь водородных связей, каждая из которых является связью средней силы (частотный сдвиг  $\Delta\nu$  составляет от  $190$  до  $376\text{см}^{-1}$ , а длина Н-мостика – от  $2.77$  до  $2.88\text{ \AA}$ ), то есть, в этом случае можно утверждать о наличии супрамолекулярного взаимодействия. Исходя из этих результатов, видно, что галловая кислота в процессе межмолекулярного взаимодействия выступает в качестве своеобразного катализатора, существенно повышая степень связывания кверцетина с продуктами окисления.

В результате проделанного теоретического и численного анализа можно сделать вывод о том, что степень антиоксидантной активности флавоноидсодержащих растительных экстрактов в значительной степени определяется наличием в них кислот фенолкарбоновой группы, за счёт которых существенно повышается степень связывания с продуктами перекисного окисления липидов, а конкретно – с малоновым диальдегидом.

**ПОВЫШЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ЗА СЧЁТ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ НАНОАЛМАЗАМИ**  
**ENHANCEMENT OF DRUG THERAPEUTIC EFFECT DUE TO SUPRAMOLECULAR INTERACTION WITH MODIFICATED NANODIAMONDS**

*Пластун И.Л., Бокарев А.Н.*

Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., Саратов, inna\_pls@mail.ru

Важным направлением современной химии, фармакологии и медицины является поиск новых механизмов адресной доставки лекарственных средств с целью повышения терапевтической активности и снижения побочных эффектов. Одним из перспективных материалов для адресной доставки лекарств являются детонационные модифицированные наноалмазы [1]. Широкие возможности модификации поверхности и выгодные размеры позволяют рассматривать их как весьма привлекательные объекты для использования в процессе доставки лекарственных средств. Большое количество экспериментальных исследований посвящено рассмотрению путей повышения эффективности лечения онкологических заболеваний за счёт использования препаратов в сочетании с наноалмазами, где они используются в качестве средства, удерживающего вещество в клетке на более длительный срок, что существенно снижает распространение токсичного препарата в организме и делает возможным уменьшение дозы вводимого препарата. Для иммобилизации лекарств на поверхности наноалмазов обычно используются методы адсорбции и ковалентной прививки, что позволяет образовать связь между наночастицей и лекарством. Это достаточно трудоёмкий процесс, но существует простейший метод создания молекулярных комплексов в двухкомпонентной смеси – за счёт образования водородных связей при перемешивании составляющих. Возможности подобного комплексообразования для наноалмазов практически не изучались. Существуют только экспериментальные работы (см., например, [2-3]), где показано существенное повышение терапевтической эффективности противоопухолевых препаратов в присутствии наноалмазов.

Целью представленной работы является теоретическое обоснование и исследование условий образования устойчивого межмолекулярного соединения на основе водородных связей между модифицированными наноалмазами и лекарственными препаратами. На примере взаимодействия препаратов доксорубин и митоксантрон с карбоксилированными наноалмазами были рассчитаны структура и ИК-спектры этих молекулярных комплексов и проведено сравнение с экспериментальными данными, взятыми из работ [2] и [3].

Моделирование структуры и расчёт спектров молекул и их комплексов осуществлялись на основе метода теории функционала плотности (ТФП) с использованием функционала B3LYP с использованием базиса 6-31G(d). Все процедуры молекулярного моделирования были проведены с использованием программного комплекса Gaussian 09. В качестве модели модифицированных наноалмазов были использованы вещества, подобные ему по своим свойствам, и представляющие собой адамантан (как наименьший диамантоид) с функциональными группами, соответствующими модификации наноалмазов: карбоксильной COOH-, гидроксильной OH- и аминогруппой NH<sub>2</sub>-. Поскольку размеры наноалмазов в несколько раз больше размера молекул лекарств, то вероятно ситуация, при которой к наноалмазу могут присоединиться несколько молекул лекарства одновременно, причём в различных точках. В связи с этим были рассмотрены все возможные варианты присоединения лекарств к наноалмазу, для которых были рассчитаны структуры и ИК-спектры и проанализированы параметры образующихся водородных связей. Водородные связи для большинства молекулярных комплексов карбоксилированных наноалмазов как с доксорубином, так и с митоксантроном можно охарактеризовать как связи средней силы, так как величина частотного сдвига для них варьируется от 209 см<sup>-1</sup> до 726 см<sup>-1</sup>, а энергия связи не превышает 8 ккал/моль.

Результаты расчётов, представляющие собой ИК спектр как суперпозицию спектров десяти вариантов комплексов, сопоставлены с экспериментальными ИК спектрами порошка комплекса наноалмаз-доксорубин из работы [2] и наноалмаз-митоксантрон из работы [3]. Рассчитанные и экспериментальные спектры хорошо согласуются друг с другом. Полученные результаты показывают, что между рассмотренными препаратами и карбоксилированными наноалмазами происходит достаточно сильное супрамолекулярное взаимодействие на основе водородных связей. Именно для супрамолекулярного взаимодействия характерно большое число средних и слабых связей, которые в комплексе обеспечивают высокую устойчивость образующихся ансамблей.

Таким образом, водородные связи можно рассматривать как один из базовых механизмов комплексообразования для реализации адресной доставки лекарств и удержания лекарственного препарата в клетках и, как следствие этого, для повышения терапевтической эффективности лекарства, как это наблюдалось в экспериментальных работах.

1. Chen X., Zhang W. Diamond nanostructures for drug delivery, bioimaging, and biosensing. //Chemical Society Reviews. 2017. V. 46. P. 734-760
2. Salaam A.D. et al. Nanodiamonds enhance therapeutic efficacy of doxorubicin in treating metastatic hormone-refractory prostate cancer// Nanotechnology. 2014. V. 25. № 42. P. 425103
3. Toh T. et al. Nanodiamond–Mitoxantrone Complexes Enhance Drug Retention in Chemoresistant Breast Cancer Cells. //Molecular Pharmaceutics. 2014. V.11. №8. P. 2683–2691

**КОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ НАНОВОЛОКОН ОКСИДА АЛЮМИНИЯ И НАНОАЛМАЗОВ – НОВЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ ИНДИКАЦИИ ФЕНОЛА**

**COMPOSITE BASED ON NANOFIBERS OF ALUMINUM OXIDE AND NANODIAMONDS – A NEW MATERIAL FOR THE DEVELOPMENT OF PHENOL INDICATION SYSTEMS**

Посохина Е.Д.<sup>1,2</sup>, Ронжин Н.О.<sup>1</sup>, Михлина Е.В.<sup>3</sup>, Симунин М.М.<sup>2</sup>, Рыжков И.И.<sup>2,3</sup>, Бондарь В.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики СО РАН, Красноярск

<sup>2</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск

<sup>3</sup>Институт вычислительного моделирования СО РАН, Красноярск

Одним из актуальных направлений современной нанотехнологии является разработка и создание новых эффективных средств индикации и диагностики (в том числе, систем многократного действия). Перспективным материалом для разработки таких систем являются наноалмазы детонационного синтеза. Наличие различных химически активных групп и микропримесей металлов на поверхности наноалмазов [1] позволяет использовать их в качестве катализаторов при создании аналитических систем многократного действия, в частности, для обнаружения фенола и фенольных соединений в водной среде [2,3]. При этом фиксация сенсорного элемента (наноалмазов) на твердой матрице будет способствовать адаптации конструируемых систем индикации для их практического применения, например, в экологическом мониторинге загрязнений окружающей среды.

В работе использовали модифицированные наноалмазы (МНА) с высокой коллоидной устойчивостью в водных суспензиях и средним размером кластеров ( $d_{50}$ ), составляющим 55 нм, полученные из детонационных наноалмазов российского производства (ООО «Реал-Дзержинск», Россия) разработанным ранее способом [4]. В качестве матрицы использованы нановолокна оксида алюминия NAFEN<sup>TM</sup> диаметром 10–15 нм и длиной порядка нескольких микрометров (ANF Technology, Эстония) [5].

Композит получали при смешивании водных суспензий нановолокон оксида алюминия и МНА при весовом соотношении 5:1 с последующей инкубацией полученной смеси в течение 15 минут при 32 °С и постоянном перемешивании. Далее осуществлялась вакуумная фильтрация смеси через фторопластовый фильтр (диаметр пор 0.6 мкм), на поверхности которого формировался композитный материал в виде круглого диска диаметром 40 мм [6]. Полученные диски подвергали термообработке при 300°С для придания композиту структурной стабильности в водных растворах.

Каталитическую активность МНА в композите оценивали реакцией окислительного азосочетания (фенол – 4-аминоантипирин – пероксид водорода) [2,3], которая сопровождается образованием цветного продукта. Количество цветного продукта в образцах определяли спектрофотометрически (UV-1800, Shimadzu, Япония) по величине оптической плотности при 506 нм.

Установлено, что при выбранных условиях эксперимента (весовое соотношение компонентов, время и температура инкубации) наблюдается полное связывание МНА с нановолокнами оксида алюминия. Результаты исследований позволяют предполагать, что взаимодействие наноматериалов, по-видимому, происходит из-за разницы их  $\zeta$ -потенциалов – отрицательного у МНА и положительного у нановолокон оксида алюминия. Методом сканирующей электронной микроскопии выявлено, что полученный композит имеет сетчатую структуру, в которой наблюдается распределение частиц МНА на поверхности нановолокон оксида алюминия.

Установлено, что МНА в составе полученного композита проявляют свою каталитическую активность и обеспечивают образование цветного продукта в реакции окислительного азосочетания. Показана применимость композита для многократного тестирования фенола в водных образцах.

Таким образом, на основе волокон оксида алюминия в качестве матрицы и МНА детонационного синтеза в качестве сенсорного элемента создан композит, который применим для детекции фенола в водной среде. Это открывает перспективы использования полученного композитного материала в разработке и создании новых аналитических систем многократного действия для экологического мониторинга загрязнений водной среды фенолом и его производными.

1. Gibson N. et al. Colloidal stability of modified nanodiamond particles // *Diam Relat Mater.* 2009. Vol. 18. P. 620.
2. Ronzhin N.O. et al. Catalytic activity of nanodiamonds in azocoupling reaction // *J Biomater Nanobiotech.* 2014. Vol. 5. P. 5173.
3. Ronzhin N.O. et al. Detonation nanodiamonds as a new tool for phenol detection in aqueous medium // *J Nanosci Nanotechnol.* 2018. Vol. 18. P. 5448.
4. Puzyr A.P., Bondar V.S. Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability // *RU Patent No. 2252192.* 2005. Bull. No. 14.
5. Features of Nafen alumina nanofibers, URL: <http://www.anftechnology.com/nafen/>
6. Solodovnichenko V.S. et al. Carbon Coated Alumina Nanofiber Membranes for Selective Ion Transport // *Adv Eng Materials.* 2017. Vol. 19. P. 170.



**НАНОКОМПОЗИТНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ДЛЯ УПРАВЛЯЕМОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ: ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ И МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ**

**NANOCOMPOSITE VESICLES FOR DRUG DELIVERY IN VIVO: EFFECTS OF EXTERNAL ELECTRIC AND MAGNETIC FIELDS**

**Потапенков К.В., Ким В.П.<sup>1</sup>, Сыбачин А.В.<sup>2</sup>, Ярославов А.А.<sup>2</sup>, Таранов И.В.<sup>3</sup>, Черепенин В.А.<sup>3</sup>, Гуляев Ю.В.<sup>3</sup>, Хомутов Г.Б.<sup>1</sup>**

Физический факультет МГУ им.М.В.Ломносова, Москва. E-mail: metalsonic@inbox.ru

<sup>1</sup>Физический факультет МГУ им.М.В.Ломносова, Москва.

<sup>2</sup>Химический факультет МГУ им.М.В.Ломносова, Москва.

<sup>3</sup>Институт радиотехники и электроники им. Котельникова, Москва

Проблема разработки новых технологий лекарственной терапии, позволяющих обеспечивать эффективную направленную доставку и управляемое высвобождение лекарственных препаратов (или иных биологически активных веществ) непосредственно в локальных целевых областях организма, является одной из наиболее важных проблем современной биофизики и нанобиоинженерии. Существует ряд подходов к решению данной проблемы, например в качестве средств капсулирования и носителей лекарств предлагается использовать коллоидные микрочастицы мезопористого кремния, полимерные капсулы и микросферы, капсиды вирусов, и биомиметические липидные везикулы – липосомы. Подход, основанный на использовании липосом в качестве носителей лекарств, обладает существенными преимуществами, обусловленными нетоксичностью и полной биосовместимостью применяемых липидов, поскольку липиды являются основными структурными компонентами биологических клеточных мембран. Широкий диапазон возможных методик синтеза липосом также является преимуществом, поскольку позволяет варьировать размер получаемых липосом в широких пределах, например, позволяя капсулам-носителям лекарств проникать через самые маленькие капилляры (5-10 мкм), или же напротив, достигать накопления капсул-носителей непосредственно в опухоли, благодаря так называемому эффекту повышенной проницаемости и удержания (более известному под английским названием Enhanced Permeability and Retention, EPR).

Различные функциональные включения позволяют обеспечить липосомам новые преимущества в качестве носителей лекарственных препаратов. В частности, непосредственно в липосомальную мембрану можно включить наночастицы золота или магнетита (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). Частицы магнетита обладают магнитными и полупроводящими свойствами, а потому могут обеспечивать чувствительность к внешним электрическим и магнитным полям, частицы золота – к внешним электрическим полям и электромагнитным воздействиям. Воздействие сверхкоротких импульсов электрического поля длительностью 10 нс и напряженностью порядка  $1 \times 10^7$  В/м приводит к эффективной декапсуляции липосом – разрушению липосомальной мембраны и выходу капсулированных веществ в наружное пространство. Механизм этого эффекта аналогичен процессам, приводящим к необратимой электропорации мембран, однако особенностью данного случая является значительное усиление локального электрического поля проводящими неорганическими наночастицами, которые являются своего рода «антеннами», чувствительными к внешним управляющим физическим воздействиям и обеспечивающими высокую избирательность таких воздействий.

Другим подходом к достижению управляемого высвобождения лекарственных препаратов из магнитных липосом является использование внешнего магнитного поля. Внешнее магнитное поле не только позволяет локализовать магнитные капсулы-носители в определенном участке организма, но и так же приводит к высвобождению содержимого липосом, содержащих наночастицы магнетита в структуре липосомальной мембраны. Преимуществом внешнего магнитного поля является его полная безвредность для человека. В частности, экспериментально показано, что помещение раствора нанокomпозитных липосом между полюсами магнита, создающего поле интенсивностью 1,9 кЭ приводит к высвобождению содержимого липосом. При этом, в отличие от применения импульсного электрического поля, разрушения липосом не происходит - под действием внешнего магнитного поля липосомы обратимо изменяют свою форму со сферической на эллипсоидальную, что приводит к деформациям липосомальной мембраны и изменению ее проницаемости. Теоретический анализ этого эффекта указывает на то, что такие деформации обусловлены стремлением системы минимизировать магнитостатическую энергию магнитных липосом, при этом минимум свободной энергии магнитной липосомы достигается для формы эллипсоида с вытянутой полуосью, ориентированной вдоль поля, что соответствует полученным экспериментальным результатам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 18-29-02080).

1. Khomutov G.B., Kim V.P., Koksharov Yu.A., Potapenkov K.V., Parshintsev A.A., Soldatov E.S., Usmanov N.N., Saletsky A.M., Sybachin A.V., Yaroslavov A.A., Taranov I.V., Cherepenin V.A., Gulyaev Y.V., Nanocomposite biomimetic vesicles based on interfacial complexes of polyelectrolytes and colloid magnetic nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 532 (2017) P. 26–35.

## ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ПЛЕНОК

### EFFECT PULSED MAGNETIC FIELDS ON SORPTION PROPERTIES OF BACTERIAL CELLULOS

*Васильева Т.И., Глуценков В.А., Шарова Т.В., Хренова А.А., Кленова Н.А.*

Самарский национально исследовательский университет имени акад. С. Королева, E-mail vastaty@rambler.ru

Некоторые микроорганизмы способны внеклеточно синтезировать целлюлозу. Бактериальная целлюлоза отличается химической чистотой, наличием мелких, равномерно расположенных пор, отсутствием токсичности и аллергенности [1], переплетение ее волокон образует пористую губку, которая впитывает и удерживает большое количество жидкости [2]. Бактериальные целлюлозные пленки имеют уникальное строение, что позволяет в нее вводить разнообразные системы с сохранением высокой прочности на разрыв [3]. Одним из способов воздействия на различные химические системы могут быть импульсные магнитные поля. Появились разные работы по влиянию импульсных магнитных полей на химические и биологические реакции, например, импульсная обработка в слабом (до 0,5 Тл) магнитном поле модифицированной древесины [4-6].

Было исследовано влияние импульсного магнитного поля при определенных его параметрах: напряженности  $H$ , частоте  $f$ , количестве импульсов  $n$  на взаимодействие флавоноидов из водного растительного экстракта и раствора рутина с макромолекулами целлюлозы бактериальной целлюлозной пленки с пектином и без него, полученные при культивировании *Gluconacetobacter sucrofermentas* H-110 [7]. Флавоноиды как вещества для абсорбции представляют собой особый интерес, так как они обладают антиоксидантным, противовоспалительным, капилляроукрепляющим действием [8]. Пленки из бактериальной целлюлозы вымачивали в водных растительных экстрактах и растворах рутина, воздействовали импульсным магнитным полем и определяли концентрацию данных флавоноидов. О том, произошло ли связывание молекул рутина с целлюлозой, судили по достоверному уменьшению его концентрации в растительном экстракте после воздействия импульсными магнитными полями, а также по дальнейшему вымыванию флавоноидов из высушенных пленок бактериальной целлюлозы. Выдвинута гипотеза об усилении сорбционных свойств бактериальных целлюлозных пленок в условиях воздействия импульсных магнитных полей из-за увеличения подвижности микрофибрилл целлюлозы.

1. Basavaraj S. H., Gupta S. G. Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple // World Journal of Microbiology and Biotechnology. October 2010. Volume 26. Is. 10. V. 253. P. 1823.
2. Пиневиц А. В. Чудо - пленки, или Слово о бактериальной целлюлозе / А. В. Пиневиц // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2007. - № 3. – С. 33 - 39.
3. Malcolm, B. R. Cellulose: Molecular and Structural Biology, Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose / B. R. Malcolm [Eds.]. – Springer, 2007. – P. 355.
4. Воздействие слабых импульсных магнитных полей на модифицированную древесину / В. В. Постников, М.Н. Левин, Н. Н.Матвеев, Р.В. Скориданов, Н.С.Камалова, В.А. Шамаев // Письма в ЖТФ. 2005. Т3 1, №9. С.14-19.
5. Постников В.В., Камалова Н.С., Кальченко С.В. О возможном влиянии импульсного магнитного поля на образование ковалентных связей между макромолекулами целлюлозы в модифицированной древесине // Физика и химия обработки материалов. 2009. №6. С.91-93.
6. Постников В.В., Камалова Н.С., Саушкин В.В. Качественная оценка возможного влияния слабого импульсного поля на микроструктуру биопластика //Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения. 2013. Т.13. №2. С.186-188.
7. Grande, Cr.J. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications / Cr.J. Grande, F.G.Torres, C.M.Gomez, M.C. Vano // Acta Biomaterialia, 2009. 5. – P. 1605-1615.
8. Лобанова А.А, Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. №1. 2004. С. 47-52.

## ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ В ИСКРИВЛЁННОМ ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ

### PIEZOELECTRIC EFFECT IN CURVED LIPID BILAYER

*Романов С.А., Баширов П.В.*  
ФНКИЦ ФХМ ФМБА

Благодаря последним достижениям в области нанотехнологий и молекулярной инженерии появилась возможность создавать биомиметические наноматериалы - синтетические системы, имитирующие биологические структуры и процессы. Живые системы содержат огромное количество разнообразных наномасштабных каналов и пор, принцип организации которых может быть использован для разработки нанофлюидных биосенсоров, способных различать не только отдельные молекулы, но и отдельные элементы

структуры важнейших биологических макромолекул (полинуклеиновые кислоты, белки), что необходимо для развития методов одномолекулярного секвенирования нового поколения [1]. Принцип работы таких сенсоров заключается в регистрации импульсов уменьшения ионного тока (resistive impulse technique), текущего через наноканал, в ответ на частичное и кратковременное перекрытие его просвета исследуемой молекулой [2]. Хотя синтетические нанопоры активно используются для исследования отдельных макромолекул и демонстрируют высокую пропускную способность, их эффективность в качестве датчиков не соответствует характеристикам биологических ионных каналов. Основные проблемы заключаются в обеспечении контроля диаметра поры, физико-химических свойств ее поверхности, регуляции времени перемещения одиночной молекулы аналита через нанопору и предотвращения неспецифического взаимодействия с ее стенками.

В данной работе на примере мембранной нанотрубки (НТ), вытянутой из плоской бислоевой липидной мембраны [3], мы демонстрируем, что двумерная текучесть липидного бислоя позволяет контролировать как плотность поверхностного заряда внутренней стенки канала НТ, так и радиус его просвета с субнанометровой точностью. Нами показано, что электрическое поле индуцирует перераспределение заряженных липидов во внутреннем монослое НТ, что позволяет изменять плотность поверхностного заряда от нуля до чрезвычайно высокого значения  $1,7 \text{ e/nm}^2$  и таким образом регулировать ионную селективность канала.

В случае, когда состав липидного бислоя помимо заряженных входят конические липиды, изменение полярности прикладываемого сильного электрического поля вызывает вместе с перераспределением этих липидов изменение кривизны внутренней поверхности, что влияет на измерение диаметра просвета канала НТ. Таким образом мы продемонстрировали контролируемое изменение диаметра поры под действием электрического поля. С учётом того, что разрешающая способность наноскопических биосенсоров зависит от соотношения поперечного сечения молекулы аналита и сечения наноканала сенсора, наблюдаемый пьезоэлектрический эффект в мембранных НТ позволяет значительно улучшить динамическую функциональность таких наноструктур.

На основании этого выдвигается предположение о возможности использования липидного бислоя в качестве биосовместимого модификатора поверхности синтетических нанопор.

1. Wanunu M. 2012. Nanopores: A journey towards DNA sequencing. *Physics Life Rev.* 9 (2), 125–158.
2. Branton D., Deamer D.W., Marziali A., Bayley H., Benner S.A., Butler T., Jovanovich S.B. 2008. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26 (10), 1146—1153.
3. Frolov V.A., Lizunov V.A., Dunina-Barkovskaya A.Y., Samsonov A.V., Zimmerberg J. 2003. Shape bistability of a membrane neck: a toggle switch to control vesicle content release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (15), 8698–8703.

## ФУЛЛЕРЕН $C_{60}$ МОДУЛИРУЕТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОКСАНТРОНА $C_{60}$ FULLERENE MODULATES MEDICO-BIOLOGICAL ACTIVITY OF MITOXANTRONE

*Сало В.А., Бучельников А.С., Завьялова О.С., Лантушенко А.О., Евстигнеев М.П.*

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», г. Севастополь, viktoriya\_salo@mail.ru

Процесс гетероассоциации ароматических биологически активных соединений (БАС) с антибиотиками косвенно влияет на эффективность комплексообразования последних с ДНК и модулирует тем самым их медико-биологическую активность [1,2]. Учет такого влияния составляет основу теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД), описанной в работе [3]. Теория ИПД позволяет описывать наблюдаемый синергетический эффект, возникающий при совместном введении БАС и антибиотиков в биологическую систему и выражающийся в существенном изменении медико-биологической активности антибиотика. В теории ИПД устанавливается взаимосвязь между биологическими эффектами *in vitro* и физико-химическими параметрами (равновесные константы комплексообразования и концентрации веществ) исследуемых БАС и антибиотиков. Ключевой количественной величиной является так называемый фактор  $A_D$ , который представляет собой меру изменения биологического эффекта препарата при добавлении молекулы перехватчика.

Одним из негативных проявлений действия антибиотиков является большой набор побочных эффектов. Предполагается, что нивелировать побочные эффекты лекарственного препарата можно с помощью медико-биологического синергизма, возникающего при совместном использовании БАС и лекарственных препаратов, который связан с процессами нековалентного комплексообразования: гетероассоциации молекул и/или конкуренции за места посадки на ДНК. Противоопухолевый антибиотик митоксантрон (новатрон, NOV), используемый в клинической практике, обладает рядом побочных эффектов. Фармакологическое действие новатрона связано с интеркаляцией его в ДНК посредством водородных связей, которая ингибирует синтез ДНК и РНК.

Данное исследование посвящено изучению механизмов совместного использования митоксантрона с ароматическими ДНК-связывающимися лигандами: флаavin-мононуклеотид (FMN) /кофеин(CAF)/гидратированный фуллерен  $C_{60}$  ( $C_{60}$ FAS) методом УФ/видимой спектроскопии и оценке действия этой смеси на клетки буккального эпителия человека.

Результатом спектрофотометрического анализа явились концентрационные зависимости оптической плотности митоксантрона на длине волны максимума поглощения чистого NOV (660 нм), при постоянной концентрации NOV и варьируемых концентрациях лигандов. Была проведена количественная аппроксимация полученных кривых, и определены константы ассоциации молекул лигандов и митоксантрона, необходимые для расчета фактора  $A_D$ .

При проведении биологического эксперимента была оценена степень конденсации хроматина в интерфазных ядрах клеток буккального эпителия путем подсчета количества гранул гетерохроматина, концентрация NOV поддерживалась постоянной, а концентрации лигандов варьировали. Было выявлено, что с ростом концентрации лиганда наблюдается восстановление функциональной активности клеточного центра, что предположительно связано с существованием биологического синергизма между митоксантроном и ДНК-связывающими БАС. Следовательно, интерцепторно-протекторный механизм действия в системах «NOV-FMN-DNA», «NOV-CAF-DNA», «NOV-C<sub>60</sub>FAS-DNA» проявляется на клеточном уровне.

Полученные результаты использованы для установления взаимосвязи между биологическими механизмами *in vitro* и физико-химическими параметрами молекулярного взаимодействия при совместном использовании исследуемых веществ в рамках теории ИПД. Важно отметить, что значение фактора  $A_D$  полученного для C<sub>60</sub>FAS превышает значения для ароматических молекул (CAF и FMN), что указывает на большую эффективность C<sub>60</sub>FAS как интерцептора для NOV. Таким образом, между молекулами антибиотика и ароматическими ДНК-связывающимися лигандами существует выраженный медико-биологический синергизм, что согласуется с теорией ИПД. Важность этого процесса напрямую связана с возможностью регулирования эффективной концентрации антибиотика, т.е. с управлением противоопухолевой активностью NOV, что допускает потенциальную возможность использования комплексов «лиганд-антибиотик» в качестве новой лекарственной формы.

Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ № НШ-5889.2018.3.

1. Traganos F. *et al.* // *Cancer Res.*, 1991, V.51, P.3682-3689

2. Davies D.B. *et al.* // *Eur. Biophys. J.*, 2001, V.30, P.354-366.

3. Evstigneev M.P. *et al.* // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2019 [accepted]. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2019.04.003.

## ПЕПТИД-АНТИБИОТИК ХАЛЬЦИПОРИН: ВЛИЯНИЕ НА МОДЕЛЬНУЮ БИОЛОГИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ

## PEPTIDE-ANTIBIOTIC CHALCIPORIN: INFLUENCE ON THE MODEL BIOLOGICAL MEMBRANE

Сморыгина А.С.<sup>1,2</sup>, Матвеева А.Г.<sup>1,2</sup>, Сырямина В.Н.<sup>1,2</sup>, Бьонди Б.<sup>3,4</sup>, Формаджио Ф.<sup>3,4</sup>, Дзюба С.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической кинетики и горения, Новосибирск

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Физический факультет, Новосибирск

<sup>3</sup>Department of Chemical Sciences, University of Padova, Padova, Italy

<sup>4</sup>Institute of Biomolecular Chemistry, Padova Unit, CNR, Padova, Italy, E-mail: anna.smor.mr@gmail.com

После открытия антибиотиков, которые спасли миллионы жизней, стала расти и устойчивость бактерий к ним. Следствием устойчивости к антибиотикам являются рост медицинских расходов, более продолжительные госпитализации и рост смертности. Поэтому перспективным направлением развития являются препараты на основе новых типов антибиотиков – антимикробных пептидов. Это низкомолекулярные соединения, состоящие из аминокислот, зачастую являются амфифильными соединениями с ярко выраженной гидрофильной и гидрофобной частью. Их преимуществами являются широкий спектр действия, активность ко многим штаммам бактерий, а также трудность в развитии устойчивости. [1]

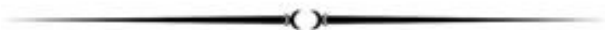
Антимикробные пептиды могут разрушать бактериальную мембрану различными способами. Их взаимодействие с мембраной можно описать следующей схемой: связывание с мембраной, ее возмущение и разрушение. Недавно было обнаружено, что одним из свойств пептидов является перераспределение молекул в мембране (жирных кислот, холестерина). Данные воздействия могут нарушать протекающие в мембране биохимические процессы – такие как синтез липидов, латеральная диффузия и транспорт молекул по поверхности мембраны, что также может обуславливать антимикробные свойства пептидов. [2]

В рамках проекта по изучению АМП разной длины в данной работе изучался пептид средней длины – хальципорин (16 аминокислот). Было исследовано влияние хальципорина на распределение стеариновой кислоты в модельной биологической мембране, а также процесс самоассоциации пептида в мембране. Для данных задач были использованы различные методы электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), позволяющие получать информацию о взаимодействиях и структурных изменениях для спин-меченых систем. В качестве модельной мембраны использовался липид 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), мембрана содержала хальципорин (обычный либо спин-меченый) и стеариновую кислоту, спин-меченую в пятом положении (5-ДСА).

Была проведена серия экспериментов, в которых методами импульсной дипольной ЭПР-спектроскопии сравнивалась локальная концентрация стеариновой кислоты (1 мол. %, 2 мол. %, 4 мол. %) в мембране при наличии и отсутствии пептида хальципорина (соотношение пептид/липид (П/Л) составляло 1:200. Обнаружено, что наличие хальципорина приводит к увеличению локальной концентрации стеариновой кислоты, что может быть интерпретировано как формирование локальных кластеров, обогащенных жирными кислотами. А также показано, что хальципорин самоассоциирует при П/Л=1/500, дальнейшее увеличение концентрации пептида в мембране приводит к увеличению числа молекул пептида в ассоциате. Возможно, процессы перераспределения стеариновых кислот связаны с процессом самоассоциации пептида в мембране.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-15-00021.

1. V. Brett Finlay, Robert E. W. Hancock. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections?. 2004. Nat Rev Micro. 2, 497-504;
2. Loose, C.; Jensen, K.; Rigoutsos, I.; Stephanopoulos, G. A Linguistic Model for the Rational Design of Antimicrobial Peptides. Nature 2006, 443 (7113), 867–869.



## ЛАЗЕРНЫЙ СИНТЕЗ НАНОПОРОШКОВ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

## LASER SYNTHESIS OF NANO-POWDERS FOR BIOCHEMICAL PHYSICS

*Снытников В.Н.<sup>1</sup>, Текуцкая Е.Е.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> - Институт катализа СО РАН, Россия, г. Новосибирск

<sup>2</sup> - ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Россия, г. Краснодар, e-mail: [tekytska@mail.ru](mailto:tekytska@mail.ru)

Проведённые исследования физических, химических, биологических применений приготовленных по различным технологиям нанопорошков оксидных материалов показывают, что их свойства могут сильно меняться, в том числе и в зависимости от размера наночастиц. Менее всего изучены биологические эффекты оксидных наночастиц при их размерах в несколько нанометров из-за сложности получения достаточно монодисперсных составов.

Среди методов синтеза, способных обеспечить возможность получение наноразмерных материалов с необходимыми свойствами и управление размерами получаемых наночастиц, можно выделить лазерные методы. Они получили в последнее время интенсивное развитие. Весьма технологичным в синтезах нанопорошков оказалось использование CO<sub>2</sub>-лазеров. С помощью непрерывного CO<sub>2</sub>-лазера умеренной мощности выше 100 Вт нам удалось продемонстрировать важные преимущества лазерного метода синтеза нанопорошков. К ним относится - высокая чистота и монодисперсность получаемых образцов, а также возможность регулировать размер наночастиц в диапазоне от единиц до десятков нанометров. Лазерные методы синтеза активно применяются для получения простых оксидов, например, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и многие другие, а также многокомпонентных соединений на их основе. Лазерным методом синтезируются не только чистые соединения, но модифицированные различными примесями. Очень важной особенностью этого метода является гибкость параметров приготовления, что приводит в ряде случаев к синтезу образцов с уникальными свойствами. Варьирование состава атмосферы (окислительная, восстановительная, нейтральная) при проведении процесса испарения, позволяет управлять зарядовыми состояниями примесных центров, а введение в оксидную матрицу наночастиц одиночных ионов редкоземельных металлов позволяет менять оптические свойства. Это позволяет создавать модельные, биологически активные системы.

Ожидается, что роль размера наночастицы может принципиально сказаться на закреплении на ее поверхности биологически активных различных состояний. При этом, носитель с размерами частиц в несколько нанометров может быть наделен новыми функциональными свойствами. В частности, может быть усилена активность в биологических системах.

Известно, что функциональные характеристики оксидных систем, включая SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и другие в значительной степени определяются наличием примесных и собственных дефектов. Примесные дефекты представлены преимущественно 3d<sup>n</sup>-элементами, которые всегда присутствуют в этих материалах независимо от метода синтеза. Другим типом дефектов, всегда присутствующим в оксидных системах, являются собственные дефекты в виде анионных вакансий в различных зарядовых состояниях. Такие дефекты обладают в ряде случаев характеристичными оптическими и измененными адсорбционными свойствами.

Оптические свойства этих частиц изучаются нами с помощью высокочувствительных методов оптической спектроскопии, а также спектроскопия поглощения и комбинационного рассеяния. Для идентификации электронного состояния элементов, стабилизированных в оксидных системах, для исследования адсорбированных соединений на поверхности наночастиц нами применяются методы фотолюминесцентной (ФЛ) спектроскопии, что позволяет исследовать очень малые концентрации примесных ионов и адсорбированных на поверхности активных соединений.

## МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ПРИРОДНЫМИ БИОПОЛИМЕРАМИ MODIFICATION OF THE SURFACE OF SILVER NANOPARTICLES BY NATURAL BIOPOLYMERS

*Текуцкая Е.Е.<sup>1</sup>, Сапелкин Е.<sup>1</sup>, Снытников В.Н.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> - ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Россия, г. Краснодар, e-mail: tekytska@mail.ru

<sup>2</sup> - Институт катализа СО РАН, Россия, г. Новосибирск

Развитие персонализированной медицины, повышение качества лечения связано в последнее время с разработкой функциональных нано- и микроструктур и систем на их основе. Предполагается, что посредством таких функциональных систем будет осуществляться доставка и высвобождение биологически активных веществ, проведение эффективного контроля окружающего пространства и визуализация тканей и органов в организме. Одной из ключевых проблем данного направления является биосовместимость получаемых наноструктур и их экранирование от действий иммунной системы.

В работе было показано, что высвобождение ионов из наночастиц серебра, их проникновение в клетку и токсичность зависит как от размера наночастиц, так и от применяемых оболочек и комплексообразователей, таких как цитрат, поливинилпирролидон, белки, полисахариды, ДНК.

Использовались золи наночастиц (НЧ) серебра сферической формы диаметром 12 нм ± 10%; 25 нм ± 10% и 70 нм ± 20%. Флуоресцентные спектры растворов наночастиц в присутствии различных биополимеров регистрировались на спектрофотометре Hitachi F-2700. Триптофановая флуоресценция человеческого сывороточного альбумина (HSA) в растворах наночастиц серебра регистрировалась в диапазоне 270 – 500 нм при возбуждении светом с длиной волны 290 нм.

Использование экспериментальных данных для диэлектрической проницаемости серебра, позволило рассчитать резонансную длину волны для НЧ диаметром 12 нм, которая оказалась равной 354 нм, что хорошо согласуется с экспериментом. Высота пика резонансного рассеяния составляла около 400 ед. для эталонного раствора серебра, и свыше 9000 единиц для раствора HSA+Ag. Полученный результат можно объяснить, если предположить, что молекулы HSA, взаимодействующие с НЧ серебра посредством диполь-дипольного механизма, образуют систему двух связанных резонаторов, что и приводит к усилению флуоресценции по сравнению с одиночной наночастицей. Расчеты, проведенные для пары HSA+Ag, позволили подтвердить это предположение, объяснив возрастание сечения рассеяния света при образовании ассоциатов. Поскольку присутствие молекул HSA приводит к увеличению интенсивности флуоресценции более, чем 20 раз, а концентрация молекул HSA и НЧ Ag сопоставимы по величине, и размеры молекул альбумина и наночастиц примерно одинаковы, то, было показано, в растворе образуются сложные ассоциаты, содержащее несколько молекул белка, покрывающие НЧ серебра. При этом на поверхности наночастицы образуется два слоя из альбумина: жестко связанный и слабо прикрепленный. В жестко связанном слое происходит взаимодействие ионов серебра, высвобождающихся из наночастиц, со свободными тиольными группами альбумина, приводящее к образованию сульфидов серебра. Низкая растворимость Ag<sub>2</sub>S снижает биодоступность и токсичность ионов серебра.

Добавление НЧ серебра в водные растворы ДНК увеличивало интенсивность флуоресценции с ростом концентрации НЧ в 15 раз относительно контрольных образцов. Увеличение диаметра НЧ серебра приводило к уменьшению интенсивности флуоресценции растворов ДНК, а также к уширению пика на спектрах флуоресценции и сдвига его в длинноволновую область. По-видимому, оболочка их молекул ДНК, образующаяся на поверхности НЧ серебра, уменьшается при увеличении размеров наночастицы.

Изучено влияние кислых полисахаридов и бинарных комплексов «полисахарид-флавоноид» на процессы сорбции и образования ассоциатов с НЧ серебра. Оценена устойчивость образующейся на НЧ серебра оболочки из полисахаридов.

Полученные результаты найдут применение в развитии персонализированной медицины, связанной с разработкой функциональных нано- и микроструктур на основе наночастиц, и в новом направлении медицины – тератоностике.

## ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ КРИОГЕЛЕЙ ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ OBTAINING POLYMER CRYOGELS FOR RECOGNITION OF NANOPARTICLES

*Федотова Е.А.<sup>1</sup>, Сеницына Е.С.<sup>1,2</sup>, Коржиков-Влах В.А.<sup>1</sup>, Тенникова Т.Б.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Институт Химии, Санкт-Петербург, ZagetEna@yandex.ru

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург

В настоящее время огромный интерес привлекают системы, которые созданы на основе принципа молекулярного импринтинга в полимерных матрицах (МИП). Образование предполимеризационного комплекса между молекулами-шаблона и функциональными мономерами, а затем последующие стадии сшивания и удаления шаблона позволяют получать матрицы, содержащие в структуре отпечатки шаблонов. Данные материалы могут многократно использоваться для выделения из сложных биологических смесей молекул, которые первоначально применялись в качестве шаблонов. Достоинствами данного подхода являются простота получения материалов и воспроизводимость получаемых результатов. На данном этапе преобладающее количество проводимых исследований посвящены созданию молекулярно-импринтированных систем для экстракции низкомолекулярных веществ, таких как лекарственные средства, гормоны, ионы металлов. Перспективным является направление получения отпечатков клеток и вирусов с возможностью последующего выделения. В качестве модели вируса могут быть использованы наночастицы соответствующего размера и на поверхности которых иммобилизованы белки.

Таким образом, целью представляемой работы является получение молекулярноимпринтированного криогеля на основе сополимера 2-гидроксипропилметакрилата с этиленгликольдиакрилатом, где в качестве шаблона использованы наночастицы. Получаемые матрицы должны обладать большим размером пор и иметь развитую систему проточных каналов, которая обеспечит отсутствие диффузионных ограничений для проникновения надмолекулярных объектов внутри поровой структуры материала. Для создания макропористых и супермакропористых матриц необходимым условием является присутствие порообразующих растворителей в реакционной среде, в качестве порогенов была использована вода. Реакцию проводили по свободно-радикальному механизму, в качестве инициатор применяли персульфат аммония и тетраметилэтилендиамин. Процесс сополимеризации 2- гидроксипропилметакрилата с этиленгликольдиакрилатом осуществляли в криоусловиях: при температуре  $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$  и в течение 24 часов в стальных картриджах. Для получения МИПов в полимеризационную смесь вводили модифицированные наночастицы на основе сополимера поли(молочной кислоты) с поли(этиленгликолем)-5000. В рассматриваемых системах протекал нековалентный импринтинг. После завершения синтеза шаблон удаляли. В качестве шаблона применяли частицы, которые получали методом наноосаждения, затем на поверхности частиц проводили реакцию ковалентной иммобилизации химотрипсина, емкость составила 40 микрограмм белка на грамм частиц. Размеры частиц и дзета-потенциал определяли методом динамического рассеивания света. Поровую структуру криогелей изучали методом сканирующей электронной микроскопии и рентгеновской компьютерной нанотомографии. Метод одноосного сжатия применяли для анализа механических свойств полученных образцов.

---

## ВИЗУАЛЬНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВНУТРЕННИХ ПОЛОСТЕЙ ДВУХ ХИРАЛЬНЫХ ФОРМ ДИФЕНИЛАЛАНИНОВЫХ НАНОТРУБОК

### INTERNAL CAVITIES OF TWO CHIRAL FORMS OF DIPHENYLALANINE NANOTUBES: DIFFERENCES ANALYZED BY VISUAL COMPARISON

*Филиппов С.В., Сивожелзов В.С.<sup>1</sup>, Быстров В.С.*

ИМПБ РАН - филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Пушкино, fsv141@mail.ru

<sup>1</sup>ИБК РАН, Пушкино, vsivo00@gmail.com

ИМПБ РАН - филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Пушкино, vsbys@mail.ru

Самоорганизация и самосборка сложных биомолекулярных структур является одним из важнейших явлений. Пептидные нанотрубки (НТ, ПНТ) на основе аминокислоты фенилаланина (Ф) и дифенилаланина (ФФ) [1] являются характерным примером таких самоорганизующихся молекулярных структур. Самосборка таких ПНТ в водных средах происходит достаточно быстро при определённых условиях, которые влияют на скорость их роста, на форму самоорганизующихся структур (их толщину и длину) и другие физические свойства [1]. Благодаря широкому спектру свойств эти структуры являются перспективными для различных применений в нанотехнологиях, наноэлектронике и биомедицине. Так, НТ на основе дифенилаланина (ФФ-НТ) исследуются для использования их как основы систем доставки лекарств. Помимо полной биосовместимости, они крайне удобны для введения в них химических и функциональных модификаторов. Например, показана их

пригодность для доставки лекарств, когда моделью доставляемого лекарства послужил краситель родамин Б (RhB) [2]. Если же их химически присоединить к фолиевой кислоте/магнитным наночастицам, ФФ-НТ становятся системами доставки противораковых и противовоспалительных препаратов [3, 4].

В тоже время известно, что в зависимости от конформации и типа стереоизомера (хиральности «левой» L или «правой» D) первичной структуры аминокислоты, свойства любого материала, собранного на их основе, также изменяются. При этом важным моментом является тот факт, что жизнь всегда использует только один из энантиомеров. С точки зрения хиральности, все макромолекулы белков и ферментов во всех живых организмах состоят в основном только из L-аминокислот. И усложнение этих макромолекул в возрастающей иерархии структур белков и ферментов приводит к закономерной смене и чередованию знака хиральности [5]. При этом биологическая активность лекарственных препаратов, имеющих также различную хиральность, может быть совершенно различной. «Правые» и «левые» лекарства, взаимодействуя с хиральными молекулами в организме, могут действовать по-разному. Поэтому возникает необходимость в чистых энантиомерах, так как часто только один из них обладает требуемым терапевтическим эффектом, тогда как второй антипод может в лучшем случае быть бесполезным, а в худшем — вызвать нежелательные побочные эффекты или даже быть смертельно токсичным [6].

С учётом всего вышесказанного становится ясно, что исследования конформационных особенностей ФФ-НТ крайне важны. Однако трёхмерные методы анализа 3D-моделей таких наноструктур не всегда удобны и информативны. И, в особенности, это касается разных хиральных форм ФФ-НТ, для которых, казалось бы, очевидные различия в пространственной организации двух форм крайне сложно однозначно определить, систематизировать и зафиксировать [1, 7, 8].

Одним из наиболее наглядных и информативных методов, способных выявить нюансы структурной организации разных изомерных форм одного соединения, является предлагаемый нами метод построения «гипсометрических» карт (био)макромолекул [9]. Особенно естественным выглядит применение данного метода к объектам, имеющим цилиндрическую форму (идеально «подходящую» для цилиндрического проецирования их внутренних и внешних поверхностей) — таким как ФФ-НТ.

В среде открытого 3D-редактора Blender при помощи разработанного нами ПО [9-11] были построены 3D-модели L и D форм ФФ-НТ (на основе данных рентгеновских структур этих НТ, взятых из баз данных, приведенных в [7, 8]). Полученные 3D-модели были использованы для построения «гипсометрических» карт внутренних полостей L и D форм ФФ-НТ.

«Гипсометрические» карты, помимо очевидных различий в составе атомных групп, выстилающих внутреннюю полость ФФ-НТ, показали L-форму более «рыхлой» и менее однородной. Например, просветы (белые пятна) у неё больше, и они менее однородны по форме и размеру. Это наблюдение подтверждается преобладанием в кодирующей раскраске, красных оттенков у D-формы и зелёных оттенков у L-формы. При этом расстояние от ближайшего к оси трубки атома у D-формы больше на  $5.01_{D_{FF}} - 4.781_{L_{FF}} = 0.23\text{Å}$ , что свидетельствует о большем диаметре внутренней полости D-FF —  $2 \times 0.23\text{Å} = 0.46\text{Å}$ . Также и внешний диаметр нанотрубки D-FF меньше на  $2 \times (14.31_{L_{FF}} - 13.88_{D_{FF}}) = 0.86\text{Å}$ . Отметим, что всё это хорошо согласуется с результатами экспериментов и модельных расчётов, полученными в работах [7, 8], свидетельствующими о более плотной упаковке самособранных D-FF нанотрубок.

Полученные при помощи визуально-дифференциального анализа данные об особенностях структурной организации внутренних полостей двух хиральных форм дифенилаланиновых нанотрубок хорошо согласуются с данными, полученными рядом более консервативных методов, что подтверждает состоятельность предлагаемого нами метода. Кроме того, при помощи нашего метода было получено большое количество дополнительных данных, пригодных для дальнейшего сравнительного анализа — визуального и расчётного.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-07-00354\_A и № 19-01-00519\_A).

1. Bystrov V.S., S.A. Kopyl, P. Zelenovskiy, O.A. Zhulyabina, V.A. Tverdislov, F. Salehli, N.E. Ghermani, V.Ya. Shur & A.L. Kholkin. Investigation of physical properties of diphenylalanine peptide nanotubes having different chiralities and embedded water molecules // *Ferroelectrics*, 2018, 525, 168–177.
2. Silva R.F., Araújo D.R., Silva E.R., Ando R.A., & Alves W.A. L-diphenylalanine microtubes as a potential drug-delivery system: characterization, release kinetics, and cytotoxicity. *Langmuir*, 2013, 29(32), 10205-10212.
3. Bonetti A., Pellegrino S., Das P., Yuran S., Bucci R., Ferri N., Meneghetti F., Castellano C., Reches M., Gelmi M.L. Dipeptide nanotubes containing unnatural fluorine-substituted  $\beta(2,3)$ -diaryl amino acid and l-alanine as candidates for biomedical applications // *Organic letters*, 2015, 17(18), 4468-4471.
4. Emtiazi G., Zohrabi T., Lee L.Y., Habibi N., & Zarrabi A. Covalent diphenylalanine peptide nanotube conjugated to folic acid/magnetic nanoparticles for anti-cancer drug delivery // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2017, 41, 90-98.
5. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А., Жулябина О.А., Яковенко Л.В. Периодическая система хиральных структур в молекулярной биологии. *Биофизика*, 2017, т.62 (3), с.421–432.
6. Тишков В.И. Регенерация кофакторов в биосинтезе хиральных соединений с помощью дегидрогеназ. *Вестник Моск. ун-та. Сер. 2. ХИМИЯ*. 2002. т. 43. № 6. с.381–388.
7. V.S. Bystrov, P.S. Zelenovskiy, A.S. Nuraeva, S. Kopyl, O.A. Zhulyabina, V.A. Tverdislov. Molecular modeling and computational study of the chiral-dependent structures and properties of the self-assembling



diphenylalanine peptide nanotubes // J. Mol. Mod, 2019. - doi:10.1007/s00894-019-4080-x.

8. V.S. Bystrov, P.S. Zelenovskiy, A.S. Nuraeva, S. Kopyl, O.A. Zhulyabina, V.A. Tverdislov. Chiral peculiar properties of self-organization of diphenylalanine peptide nanotubes: modeling of structure and properties // Mathematical Biology and Bioinformatics, 2019, 14 (1), 94 -124. - doi: 10.17537/2019.14.

9. Филиппов С.В., Полозов Р.В., Сивожелезов В.С. Визуализация пространственных структур (био)макромолекул в виде подобных гипсометрическим карт // Препринты ИПМ им. М.В. Келдыша, 2019, в печати.

10. Филиппов С.В. Программная платформа Blender как среда моделирования объектов и процессов естественно-научных дисциплин // Препринты ИПМ им. М. В. Келдыша, 2018, № 230, 42 с. - doi:10.20948/prepr-2018-230 URL: [http://keldysh.ru/papers/2018/prepr2018\\_230.pdf](http://keldysh.ru/papers/2018/prepr2018_230.pdf) (дата обращения: 28.11.2018).

11. Филиппов С.В., Сивожелезов В. С. Метод построения динамических молекулярных моделей в среде открытой 3D-платформы Blender на примере  $\beta_2$ -адренорецептора // Доклады Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика». Под ред. В. Д. Лахно. Том 7. Пущино: ИМПБ РАН, 2018. Статья № е45. - doi:10.17537/icmbb18.23.

### СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИНУЛИНАЗ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ИМИ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

### STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF INULINASES AND REGULARITIES OF THEIR SUPROMOLECULAR COMPLEXES FORMATION UNDER CONDITIONS OF VARIOUS MICROENVIRONMENT

*Холявка М.Г., Артюхов В.Г.*

Воронежский государственный университет, Воронеж, [holyavka@ Rambler.ru](mailto:holyavka@ Rambler.ru)

Изучение структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств инулиназ в нативном и иммобилизованном состояниях имеет высокое теоретическое и прикладное значение. Эти ферменты участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития органов. Инулиназы могут быть использованы в циклах производства сахаров с различной степенью полимеризации, в частности, фруктозы и фруктоолигосахаридов – неотъемлемых компонентов функционального питания, снижающих риск возникновения сахарного диабета, кариеса и ожирения.

Многие гликозидазы способны образовывать надмолекулярные комплексы при изменении их микроокружения, что обязательно необходимо учитывать при подборе условий и методов их иммобилизации, причем у некоторых из карбогидраз процессы ассоциации-диссоциации являются одним из механизмов регулирования их каталитической активности.

Целью данной работы является изучение структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств гомогенных и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы, закономерностей формирования ферментом надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения, определение типов взаимодействий между белковой глобулой и матрицами ряда синтетических ионитов и хитозана.

Для изучения надмолекулярной организации инулиназ в условиях различного микроокружения нами был разработан комплексный подход, заключающийся в сочетании атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния с методами инфракрасной спектроскопии, гель-хроматографии и электрофореза.

Выявлены закономерности образования надмолекулярных комплексов ферментом инулиназой: при концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  моль/л фермент на 70-80 % диссоциирован на субъединицы. В диапазоне концентраций  $5 \times 10^{-6}$ – $5 \times 10^{-4}$  моль/л преобладают димерные (до ~80 %) и тетрамерные формы фермента. Молекулы инулиназ функционально активны и в мономерной, и в других, преимущественно, димерных, формах.

Разработан алгоритм для составления быстрых прогнозов относительно пределов колебаний физико-химических и кинетических характеристик молекул инулиназ и экспресс-оценки их динамического состояния. Выявлены структурно-функциональные особенности инулиназ в условиях различного микроокружения (иммобилизация на полимерных носителях, действие УФ-облучения, варьирование величин pH, температуры, концентрации субстрата).

Изучена роль следующих процессов в проявлении функциональной активности инулиназы: а) формирование димеров с измененной пространственной структурой (при 45 и 55 °C / значениях pH 4,5, 5,0-6,5 / УФ-облучении в дозах до 453 Дж/м<sup>2</sup> для дрожжевой и растительной инулиназы и до 4530 Дж/м<sup>2</sup> для грибного фермента), б) образование тетрамеров и более крупных ассоциатов (при 61 °C и выше / pH 3,5 и 13,0 / УФ-облучении молекул дрожжевой и растительной инулиназы дозой 755 Дж/м<sup>2</sup>), в) диссоциация молекулы фермента на субъединицы (при 60 °C / pH 3,0).

Выполнен виртуальный скрининг лигандов для иммобилизации инулиназы. Определены вероятные сайты связывания полимерных матриц с молекулой фермента при адсорбционной иммобилизации. Разработан алгоритм для выявления молекулярного механизма адсорбционной иммобилизации инулиназы с использованием методов последовательного (каскадного) докинга и ИК-спектроскопии.

Созданы математические модели зависимости активности свободной и иммобилизованной инулиназы от значений температуры (20-95 °С), pH (3,0-8,5), концентрации инулина (до 1,2 мМ), а также модель учета кинетики реакции как инструменты для понимания и прогнозирования характеристик энзима в реакционной среде.

Оценены генотоксические и цитотоксические свойства препаратов инулиназы, иммобилизованной на различных синтетических носителях (АВ-17-2П, КУ-2, КУ-2-8чС, ВИОН КН-1). Показано, что эти сорбенты, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их к использованию в качестве катализаторов для промышленного получения фруктозы из растительного сырья.

Установлено, что иммобилизованные препараты дрожжевой и растительной инулиназы проявляют максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов клубней топинамбура, корней цикория и девясила, лукович георгина, которые являются перспективными для промышленного использования с целью получения фруктозы ферментативным путем.

### СРАВНЕНИЕ РАЗМЕРОВ И ЛОКАЛЬНОЙ ПОДВИЖНОСТИ ЛИНЕЙНЫХ АЛЬФА- И ЭПСИЛОН-ЛИЗИНОВЫХ ПЕПТИДОВ ОДИНАКОВОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

### COMPARISON OF THE SIZE AND LOCAL MOBILITY OF LINEAR ALPHA AND EPSILON-LYSINE PEPTIDES OF THE SAME MOLECULAR WEIGHT

*О. В. Шавыкин<sup>1</sup>, М. Ю. Ильяш<sup>1</sup>, Безродный В. В.<sup>1</sup>, С. Е. Михтанюк<sup>1</sup>, И. М. Неелов<sup>1</sup>, Денис Анатольевич Маркелов<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (Университет ИТМО), Кронверкский пр.49, Санкт-Петербург, 197101, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, i.neelov@mail.ru

Гомопептиды поли-L-лизина, состоящие из аминокислотных остатков лизина с  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминогруппами, имеют множество применений. Существует два основных типа таких линейных пептидов: поли ( $\alpha$ -L-лизин) цепи и поли ( $\epsilon$ -L-лизин) в соответствии с типом аминогрупп, которые образуют пептидные связи в основной пептидной цепи. Фрагменты этих поли ( $\alpha$ -L-лизиновых) и поли ( $\epsilon$ -L-лизиновых) цепей, а также их комбинации существуют также в поли-L-лизиновых дендримерах, поли-L-лизиновых дендриграфтах и поли-L-лизиновых щетках. Мы провели молекулярно-динамическое моделирование структуры и ориентационной подвижности в этих двух различных цепях поли-L-лизина, состоящих из одинакового числа мономеров лизина в водном растворителе, с явным учетом противоионов при температуре  $T = 300\text{K}$  и давлении  $P = 1\text{атм}$ . используя программный пакет Gromacs с силовым полем AMBER99SB-ildn. Было получено, что радиус инерции и расстояние между концами поли ( $\epsilon$ -L-лизина) больше, чем аналогичные величины для поли ( $\alpha$ -L-лизина) той же молекулярной массы. Соответственно, ориентационная подвижность вектора, соединяющего концы линейного поли ( $\epsilon$ -L-лизина) оказалась существенно меньше, чем линейного поли ( $\alpha$ -L-лизина). Локальная подвижность Н-Н вектора в  $\text{CH}_2$  группе лизина ближайшей к атому азота в поли ( $\epsilon$ -L-лизина), которая измеряется в экспериментах по ЯМР [1,3] также оказалась существенно меньше, чем подвижность аналогичной группы в поли ( $\alpha$ -L-лизине).

*Работа была поддержана грантом 08-08 правительства Российской Федерации и грантом РФФИ 19-03-00715.*

1. Neelov I.M., Markelov D.A., Falkovich S.G., Ilyash M.Yu., Okrugin B.M., Darinskii A.A. Mathematical simulation of lysine dendrimers: temperature dependences // Polymer Science, Series C. 2013, 55(1), 154–161.
2. Markelov D.A, Falkovich S.G., Neelov I.M., Ilyash M.Yu, Matveev V.V., Lahderanta E., Ingman P., Darinskii A.A. Molecular dynamics simulation of spin-lattice NMR relaxation in poly-L-lysine dendrimers. Manifestation of the semiflexibility effect // Physical Chemistry and Chemical Physics. 2015,17, 3214–3226.
3. Sheveleva N.N., Markelov D.A., Vovk M.A., Mikhailova M.E., Tarasenko I.I., Neelov I.M., Lahderanta E. NMR studies of excluded volume interactions in peptide dendrimers // Scientific Reports - 2018, Vol. 8, pp. 8916

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ И ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СУХИХ ОСТАТКОВ  
МИКРОКАПЕЛЬ ЛЁГОЧНОЙ ЖИДКОСТИ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

**A STUDY OF THE MORPHOLOGY AND CHEMICAL COMPOSITION OF DRY RESIDUES OF  
LUNG FLUID MICRODROPLETS BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY**

*Михеев А.Ю., Шляпников Ю.М., Морозов В.Н.*

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино,  
2miheev@gmail.com

Выдыхаемые капли лёгочной жидкости являются важным диагностическим ресурсом, благодаря которому можно обнаруживать лёгочные заболевания, не прибегая к инвазивным и болезненным процедурам бронхоальвеолярного лаважа. Отдельные капли лёгочной жидкости могут содержать биоматериал в концентрированном виде, который может быть подвергнут дальнейшему иммуноанализу на предмет выявления воспалительных факторов.

Для улавливания остатков каплей лёгочной жидкости были сконструированы специальные устройства - импактор и электростатический коллектор. Использование обоих типов устройств для сбора микрокапель позволило обойти физические ограничения каждого из них: импактор не может собирать частицы диаметром более 400 нм, а электростатический коллектор собирает аэрозоль только на проводящие поверхности. На первом этапе собранные на различных подложках (стекло, слюда, графит) сухие остатки каплей лёгочной жидкости выдерживали в парах различных растворителей и изучали изменение морфологии остатков с помощью атомно-силовой микроскопии. Это позволило сделать количественную оценку содержащихся в них липидов, а также солей и водорастворимых метаболитов. Содержание липидов составило 5-20 % от общего объема сухих остатков, а водорастворимых соединений – 80-95%.

Для выявления специфических биомаркеров, содержащихся в сухих остатках каплей лёгочной жидкости, их сбор проводили на активированной поверхности пленки из сшитой карбоксиметилцеллюлозы, способной к химической иммобилизации белков. Предварительно было изучено растекание остатков при 100% влажности на этой поверхности. Это связано с тем, что растекание - первый процесс, который происходит при химической иммобилизации белков, содержащихся в сухих остатках каплей лёгочной жидкости. Иммобилизованный белок детектировали суперпарамагнитными частицами, покрытыми специфическими антителами. В предварительных экспериментах показано, что при сборе импактором содержащийся в микрокаплях выдыхаемого воздуха иммуноглобулин А химически связывается с активированной поверхностью карбоксиметилцеллюлозы и успешно детектируется магнитными частицами с антителами к иммуноглобулину А человека.

Работа поддержана грантом РФФИ №15-15-00086.

**СИГНАЛЫ ЭЛЕКТРОННОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ И ИХ  
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ**

**ELECTRON MAGNETIC RESONANCE SIGNALS IN BIOLOGICAL TISSUES AND THEIR  
INTERPRETATION**

*Юртаева С.В.<sup>1</sup>, Ефимов В.Н.<sup>2</sup>, Сальников В.В.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>КФТИ ФИЦ КазНЦ РАН, Казань (svetlana.vish@rambler.ru)

<sup>2</sup>КГМУ, Казань

<sup>3</sup>КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, Казань

В настоящее время появляется все больше работ по исследованию биологических тканей выполненными методом ЭПР-спектроскопии, в которых спектры ЭПР демонстрируют относительно широкие сигналы, ширина которых варьирует от десятков и сотен эрстед до тысячи и более. К особенностям данных сигналов можно отнести ферромагнитное значение g-фактора ( $g \geq 2.1$ ), часто наблюдаемую зависимость сигнала от ориентации в магнитном поле, аномальное для сигналов ЭПР температурное поведение. К объектам, в которых обнаруживают такие сигналы, можно отнести опухоли (злокачественные и доброкачественные), ткани мозга, травмированные нервные ткани, плаценту, органы навигации у птиц и насекомых, магнетотактические бактерии. Природа данных сигналов вызывает неизменный интерес. Предполагается, что эти сигналы связаны с кристаллическими оксидами железа, образующимися в тканях в ходе процессов спонтанной биоминерализации железа. Результатом этих процессов является накопление в тканях различных кристаллических оксидов и гидроксидов железа, наиболее распространенными из которых являются ферригидрит ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) и магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

Считается, что в образовании таких частиц, прежде всего, участвует белок ферритин, в кристаллическом ядре которого может синтезироваться не только основной компонент ферригидрит, но и, в определенных условиях, магнетит. Ферритин принимает участие во множестве физиологических процессов; нарушение в его функционировании приводит ко многим патологиям, сопровождающимся накоплением железа в тканях, как это установлено, в частности, при нейродегенеративных и опухолевых процессах. Однако механизм образования биогенного магнетита не до конца понятен.

В настоящей работе изучено поведение сигналов электронного магнитного резонанса (ЭМР) в тканях различного происхождения (ткани крыс с моделями различных патологий, ткани злокачественных опухолей, ткани нервного ганглия и сердца виноградской улитки) в широком диапазоне температур. Проанализированы характеристики сигналов ЭМР в перечисленных тканях. Было обнаружено два типа сигналов более узкие, зависящие от ориентации в магнитном поле и более широкие не зависящие от ориентации. Установлены общие характеристики сигналов ЭМР, которые в случае ориентационно зависимых сигналов, свидетельствуют об образовании кристаллов магнетита в тканях: характерное немонокотное температурное поведение резонансного поля, ширины линии и интегральной интенсивности, наличие аксиальной и кубической компонент в анизотропии резонансного поля. Обнаружен Фазовый переход Вервея, характерный для магнетита. Обнаружены различные типы анизотропного поведения резонансного поля, характеризующие различную геометрию кристаллических включений. Изучение особенностей параметров этих сигналов позволило охарактеризовать различные пространственные формы накопления биогенного магнетита в виде цепочек из кристаллических частиц, пленок, пространственных массивов (кластеров) и отдельных кристаллических частиц. Температурное поведение сигнала, не зависящего от ориентации, соответствовало поведению наноразмерного ферригидрита в ферритине. Описанные сигналы ЭМР в биологических тканях и крови могут быть использованы для обнаружения аномального накопления кристаллических форм оксидов железа.

Методом просвечивающей электронной микроскопии получены изображения кристаллических частиц в некоторых образцах тканей, в частности были обнаружены кластеры, цепочки и замкнутые круговые структуры из нанокристаллов, подтверждающие результаты и выводы исследований методом ЭПР спектроскопии.

В настоящей работе на основе анализа характеристик сигналов показано, что обнаруженные два типа сигналов ЭМР (первый - зависящий от ориентации, второй - не зависящий от ориентации) принадлежат магнетиту и ферригидриту в ферритине соответственно.

Авторы глубоко признательны сотрудникам ИФМиБ Казанского федерального университета проф. Х.Л. Гайнутдинову, с.н.с. Г.Г. Яфаровой, с.н.с. А.А. Еремееву и н.с. Л.Н. Мурановой за предоставление образцов для исследования.

Работа выполняется при частичной поддержке Программы фундаментальных исследований президиума РАН «Электронный спиновый резонанс, спин-зависящие электронные эффекты и спиновые технологии. Направление: Развитие физических основ применения спиновых зондов и ЭПР спектроскопии для решения медико-биологических проблем».

1. Yurtaeva S. et al. Magnetic Resonance of Ferritin in Tumor Tissue // *Appl. Magn. Res.* 2012. vol. 42. P. 299-311.
2. Yurtaeva S. et al. EPR Detection of Iron Storage in Rat Tissues after Simulated Microgravity Model // *Appl. Magn. Res.* 2016. vol. 47. P. 555-565.
3. Юртаева С.В. и др. Сигналы ЭМР тканей спинного мозга после его травматического повреждения // Ежегодник КФТИ 2016. Изд. Казань: Физтехпресс 2017. С. 109-111.

## **Секция 7. Нейродинамика и нейробиология.**

## ЗРИТЕЛЬНЫЕ АГНОЗИИ И ДВОЙСТВЕННОСТЬ ЗРИТЕЛЬНОГО ОПОЗНАНИЯ

### VISUAL AGNOSIA AND VISUAL DUALITY OF THE IDENTIFICATION

*Александрова Н.Ш.*

Sprachbrücke e.V. Берлин, Германия, nina.alexandrova@gmx.net

Работа содержит предположение об организации зрительного восприятия и опознания человеком отдельных объектов (зрительный гнозис). Основанием для работы являются собственные наблюдения пациентов с односторонними, подтвержденными на КТ, органическими поражениями мозга в процессе восстановительной терапии (1, 2), исследование становления способности узнаваемо изображать объекты (3), а также анализ литературы (4-9). Основное внимание уделено анализу симптомов и компенсации лицевой и буквенной агнозий.

Зрительные стимулы различаются степенью своей уникальности. Природные объекты уникальны, рукотворные предметы могут быть как уникальными, так и серийного производства. В последнем случае различия приобретаются в процессе амортизации. При опознании объектов могут решаться разные задачи – от отнесения объекта к какой-либо категории (это – дом, это – лицо человека) или к группе внутри категории (это – деревянный дом, это – женское лицо) до опознания индивидуальных качеств объектов (это – мой дом, это – фото моего врача). Лицо как зрительный стимул всегда уникально: одной схеме «лицо» (два глаза, нос, рот, уши) соответствует бесчисленное множество лиц. Незнание лиц в синдроме лицевой агнозии выступает на первый план только потому, что узнать «в лицо» - всегда опознание индивидуальности, а узнавание предметов – это, чаще всего, отнесение их к какой-то категории. При данном синдроме страдает один из двух когнитивных механизмов, обеспечивающих зрительный гнозис, - индивидуализированное опознание зрительных стимулов. Индивидуализированное восприятие (опознание) проявляется с рождения и охватывает все зрительное пространство, здесь нет опознания по отдельным признакам или категориям. Индивидуализированное зрительное восприятие не тождественно целостному восприятию.

При зрительных агнозиях опознание реалистичных и схематичных изображений может нарушаться изолированно, а также может страдать способность схематично изображать знакомые предметы. Схематичные изображения объектов отражают главные функциональные или категориальные признаки этих объектов. Способность узнаваемо изобразить объект означает сформированность (в детстве) или сохранность (при мозговых поражениях) аналитико-синтетической деятельности по выделению в воспринимаемом объекте функциональных и категориальных признаков. Данная деятельность является вторым когнитивным механизмом, обеспечивающим зрительный гнозис. При его нарушении на первый план выступает нарушение опознания знаков - букв и цифр: для того, чтобы опознать в букве-картинке букву-графему, необходимо не только отвлечься от особенностей шрифта, но и быть способным к аналитико-синтетической деятельности определенного уровня. Аналитико-синтетическая зрительная обработка стимулов строится в онтогенезе и функционирует по принципу многоканального аппарата (как минимум, частично).

Зрительный гнозис, в норме отвечающий за опознание отдельных объектов, обеспечивается взаимодействием двух когнитивных механизмов: индивидуализированное восприятие (опознание) зрительных стимулов и аналитико-синтетическая деятельность, вычлняющая в индивидуализированном восприятии функциональные (топологические) схемы предметов. Два когнитивных механизма находятся в постоянном взаимодействии и проявляются в зависимости от качества зрительного стимула и задачи опознания. При зрительных агнозиях в результате одностороннего поражения мозга нарушается вклад одного из механизмов зрительного опознания, поэтому пациент вынужден опираться на сохранный механизм, что и обуславливает известную симптоматику зрительных агнозий и возможности компенсации.

1 Александрова Н.Ш. 1992 Алексия в структуре зрительно-гностических расстройств у больных с очаговыми поражениями головного мозга // Патология речи: история изучения, диагностика, преодоление. СПб С 97-106.

2 Александров А Е, Александрова Н Ш 2002 К проблеме организации зрительного гнозиса// Вторая международная конференция, посвященная 100 летию со дня рождения А Р Лурия Москва МГУ 2002 стр2

3 Александрова Н.Ш. 1999 Формирование способности схематического изображения объектов в онтогенезе (детские рисунки). Проблемы патологии развития и распада речевой функции. СПб 1999 С 25-31

4 Кок Е.П. Зрительные агнозии. Л.,1967

5 Вассерман Л.И., Дорофеева С.А., Меерсон Я.А. 1997 Методы нейропсихологической диагностики СПб, 1997

6 Глезерман Т.Б. 1986 Психофизиологические основы нарушения мышления при афазии. М.

7 Cogrow SL, Dalrymple KA, Barton JJ. Prosopagnosia: current perspectives. Eye Brain. 2016 Sep 26;8:165-175. doi: 10.2147/EB.S92838.

8 Busigny T, Joubert S, Felician O, Ceccaldi M, Rossion B. Holistic perception of the individual face is specific and necessary: evidence from an extensive case study of acquired prosopagnosia. Neuropsychologia. 2010 Dec;48(14):4057-92. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2010.09.017. Epub 2010 Sep 25.

9 Strappini F, Pelli DG, Di Pace E, Martelli M. Agnosic vision is like peripheral vision, which is limited by crowding. Cortex. 2017 Apr;89:135-155. doi: 10.1016/j.cortex.2017.01.012. Epub 2017

**ВЛИЯНИЕ ИМУНОФАНА НА СОДЕРЖАНИЕ ГАМК, ГЛУ И АСП В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ЦИКЛОФОСФАМИДНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ**

**EFFECT OF IMUNOFAN ON CONTENTS GABA, GLU AND ASP IN THE BRAIN OF RATS IN CYCLOPHOSPHAMIDE IMMUNOSUPPRESSION**

*Алиева Н.Н.*

Институт Физиологии им. Академика Абдуллы Караева, НАН Азербайджана, г. Баку  
nazaket-alieva@mail.ru

Между тимусом и гипоталамо-гипофизарной системой существуют тесные прямые и обратные связи [1-2]. Известно, что выключение функции гипофиза приводит к аплазии тимуса, снижению секреции его гормонов эпителиальными клетками и ускорению возрастной инволюции вилочковой железы [1]. Тимопоэтин I и тимопоэтин II индуцируют дифференциацию Т-клеток, способствуют их созреванию и обучению в тимусе, усиливают активность лимфоцитов на различные митогены. Тимопоэтин способен активировать гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось. Введение его в лекарственной форме (тимопентин) больным с депрессией и дисфункцией фагоцитов временно ослабляло агорафобию [3]. Гормоны тимуса, вырабатываемые эпителиальными клетками этого органа и включающие в себя группу тимозинов, сывороточный фактор тимуса, тимулин, ряд тимопоэтинов, а также некоторые функционально активные олигопептиды способны оказывать не только иммуномодулирующее действие на активность значительно более изученных иммуотрансмиттеров – цитокинов – но и самостоятельно влиять регулировать физиологическую активность различных систем организма, в первую очередь гормональных систем.

В работе изучено действие имунофана на содержание ГАМК, Глу и Асп в различных структурах головного мозга у трех месячных крыс при циклофосфамидной (ЦФА) иммуносупрессии.

Экспериментальное моделирование иммунологической недостаточности проводили классическим методом - путем интраперитонеального введения ЦФА в дозе 150 мг/кг массы тела. Ежедневно в течение 5 дней животным вводили внутримышечно имунофан в дозе 50 мкг/кг живого веса. Синтетический пептид имунофан представляет собой гексапептид Arg-alpha-Asp-Lys-Val-Tyr-Arg, который соответствует аминокислотной последовательности тимического пептида тимопоэтина в положениях 32-37.

Установлено, что у трех месячных крыс при ЦФА иммуносупрессии содержания ГАМК в тканях исследуемых структур головного мозга понижается: содержание ГАМК в тканях кора больших полушарий мозга составляет  $1,40 \pm 0,06$ , мозжечка -  $1,30 \pm 0,04$ , стволе мозга -  $1,04 \pm 0,04$ , гипоталамуса –  $1,81 \pm 0,08$  мкмоль/г. При этом содержание Глу и Асп относительно в тканях кора больших полушарий мозга составляет -  $5,70 \pm 0,14$  и  $4,71 \pm 0,13$ , мозжечка –  $5,82 \pm 0,16$  и  $3,76 \pm 0,11$ , стволе мозга –  $5,72 \pm 0,13$  и  $3,56 \pm 0,09$ , гипоталамуса –  $8,84 \pm 0,17$  и  $5,61 \pm 0,15$  мкмоль/г. Тенденция к изменению концентрации ГАМК, Глу и Асп в исследованных структурах головного мозга при ЦФА иммуносупрессии достигает достоверности.

После действия имунофана при ЦФА иммуносупрессии содержания ГАМК в тканях кора больших полушарий мозга составляет  $1,73 \pm 0,06$  мкмоль/г, мозжечка –  $1,61 \pm 0,06$ , стволе мозга –  $1,42 \pm 0,03$ , гипоталамуса –  $2,42 \pm 0,07$ . При этом содержание Глу и Асп относительно в тканях кора больших полушарий мозга составляет -  $5,14 \pm 0,12$  и  $4,02 \pm 0,11$  мкмоль/г, мозжечка –  $5,30 \pm 0,13$  и  $3,14 \pm 0,09$ , стволе мозга –  $5,01 \pm 0,11$  и  $3,04 \pm 0,10$ , гипоталамуса –  $7,66 \pm 0,15$  и  $4,86 \pm 0,14$ .

Высокая концентрация ГАМК в ткани мозга млекопитающих свидетельствует, что ее роль в нервной деятельности не ограничивается лишь медиаторной функцией. В случае нормального функционирования важнейших систем организма концентрация ГАМК в мозге поддерживается на стабильном уровне, что указывает на высокую пластичность обмена в ЦНС и на важность многообразных эффектов ГАМК, способствующей общему торможению активности нервных структур.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что имунофан при ЦФА иммуносупрессии корректирует содержание ГАМК, Глу и Асп в различных структурах головного мозга.

1. Киселева Н.М., Иноземцев А. Н. Возможная роль тимуса в работе стресс-лимитирующей системы // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. 2010. № 2. С. 13-20.
2. Reggiani P.C. et al. The thymus-neuroendocrine axis: physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin // Ann NY Acad Sci. 2009. Vol. 1153. P. 98-106.
3. Covelli V. et al. Role of thymic hormones in neuroimmunomodulation. Their use in patients with phobic disorders // Acta Neurol (Napoli). 1991. Vol. 13. № 5. P. 457-466.

## **ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ ГЛУТАМАТ- И ГАМК-ОПОСРЕДОВАННОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ В ХОДЕ ЭПИЛЕПТОПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ IN VITRO**

### **ALTERATIONS IN PROPERTIES OF GLUTAMATERGIC AND GABAERGIC SYNAPTIC TRANSMISSION DURING EPILEPTIFORM ACTIVITY IN VITRO**

*Амахин Д.В., Соболева Е.Б., Ергина Ю.Л., Постникова Т.Ю., Чижов А.В., Зайцев А.В.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН (ИЭФБ РАН), Санкт-Петербург

Эпилепсия - распространенное неврологическое нарушение, характеризующееся возникновением спонтанных судорог. Ряд особенностей активности нейронов во время эпилептического приступа могут быть воспроизведены в условиях переживающих срезов энторинальной коры и гиппокампа крысы. Методом патч-кламп в конфигурации "целая клетка" и с помощью теоретического моделирования исследовались изменения свойств синаптической передачи, происходящие в ходе эпилептоподобной активности в модели *in vitro*.

В ходе работы были описаны основные режимы эпилептоподобной активности в энторинальной коре, включая режимы генерации интериктальных разрядов (ИИР), опосредованных только ГАМКергическими нейронами или одновременно ГАМК- и глутаматергическими нейронами, а также иктальных разрядов (ИР), представляющих собой результат сложной интеграции возбуждающих и тормозных синаптических сигналов [1]. При помощи оригинальной методики были произведены оценки синаптических проводимостей, активирующихся в ходе спонтанных или вызванных внеклеточной стимуляцией ответов нейрона на разных этапах развития эпилептоподобного состояния [2]. Показано, что в ходе эпилептоподобного состояния происходит сдвиг потенциала реверсии ГАМКергических токов, а также запускаются пластические изменения возбуждающих синапсов на глутаматергических нейронах энторинальной коры и гиппокампа, имеющие разную направленность в этих отделах. В энторинальной коре вследствие эпилептоподобной активности происходит NMDA-рецептор-зависимая потенциация глутаматергических синапсов, сопровождаемая появлением кальций-проницаемых AMPA-рецепторов на постсинаптической мембране. В пирамидных нейронах СА1 гиппокампа происходит депрессия возбуждающих синапсов, зависящая от активации кальций-проницаемых AMPA-рецепторов.

Исходя из полученных экспериментальных данных, разработана математическая модель взаимодействующих нейронных популяций на основе CBRD-подхода (conductance-based refractory density approach), воспроизводящая как сами ИИР и ИР, так и их распространение по коре от эпилептического очага [3,4,5]. Показано, что в отсутствии динамики ионных концентраций математическая модель воспроизводит только ИИР [3]. При разных фиксированных концентрациях ионов хлора внутри клетки в модели воспроизводится динамика ГАМК- и глутамат-опосредованных синаптических проводимостей в ходе ИИР. Учет динамики внутри- и внеклеточных концентрации ионов в модели позволяет воспроизвести циклические смены режимов эпилептоподобной активности, а также кластеризацию элементарных залпов синхронизированной активности нейронов, приводящих к образованию ИР [5].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-315-20043.

1. Amakhin D.V. et al. 2016. Synaptic Conductances during Interictal Discharges in Pyramidal Neurons of Rat Entorhinal Cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 10:1–15.
2. Amakhin D.V. et al. 2018. Seizure-Induced Potentiation of AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission in the Entorhinal Cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 12:486.
3. Chizhov, A. et al. 2017. Computational model of interictal discharges triggered by interneurons. *PLoS One.* 12:e0185752.
4. Chizhov A.V. et al. 2019. Spatial propagation of interictal discharges along the cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508:1245–1251.
5. Chizhov A.V. et al. 2019. Mathematical model of Na-K-Cl homeostasis in ictal and interictal discharges. *PLoS One.* 14:e0213904.

## **ОКСИДАТИВНО-КОМПЕНСАТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ЭКСТРАКТА ШАФРАНА ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ НЕВРОЗНОГО СОСТОЯНИЯ**

### **OXIDATIVE-COMPENSATORY EFFECT OF SAFFRON EXTRACT IN THE REALIZATION OF NEUROSIS STATE**

*Бахшалиева А.Я.*

Институт Физиологии им. академика Абдуллы Караева, НАН Азербайджана, г. Баку. [afetfarm@mail.ru](mailto:afetfarm@mail.ru)

В настоящее время в общей структуре заболеваемости доминирующими являются невротические и психосоматические расстройства, среди которых по распространенности первое место занимают неврозы. В механизме патогенеза невроза важная роль принадлежит церебральной гипоксии, о чем свидетельствует литературный анализ последних лет. Следствием гипоксии (ишемии) различных органов, в том числе мозга,



является активация процессов перекисного окисления липидов мозга (ПОЛ). Известно, что при стрессе одним из патогенетических механизмов поражений мозга, содержащего большое количество полиненасыщенных жирных кислот, является изменение прооксидантно-антиоксидантного баланса, которое связано с избытком свободного кислорода, являющегося мишенью для радикалов и дефицитом антиоксидантных ферментов в нервных клетках.

Подтверждением гипотезы о церебральной гипоксии при неврозе явились положительные результаты терапии и профилактики невротических нарушений при применении различных антиоксидантов, обладающих антигипоксическим действием. Основываясь на практических данных о побочных эффектах химических препаратов, используемых в современной неврологии, ученые придают большой интерес исследованию свойства природных веществ и созданию натуральных препаратов. При этом весьма целесообразно исследование Шафрана (*Safranus sativus*) в невротической патологии, который обладает выраженной нейротропной активностью, проявляющейся успокоительным, тонизирующим, противосудорожным эффектом. Исходя из представлений о связи между лечебными и антиоксидантными свойствами шафрана, цель данной работы было изучение действия экстракта шафрана на процессы свободнорадикального окисления липидов при невротизации.

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 180-220 г. С учетом литературных данных о зависимости патологических нарушений, вызванных хроническим стресс-воздействием, от типа эмоциональной реактивности животных, исследование проводили у предварительно отобранных крыс, склонных к катотоническому замиранию. Неврозное состояние создали воздействием хронического эмоционально болевого стресса (ЭБС) в течение трех недель - приводящий у крыс к психовегетативным расстройствам, отрицательно-эмоциональную состоянию, классифицируемое как неврозоподобное. Животных разделили на следующие группы: интактные; контрольные – крысы, подвергавшиеся ЭБС; опытные – крысы, подвергавшиеся ЭБС на фоне введения экстракта шафрана. Экстракт шафрана вводили перорально в дозе 250 мг/кг веса (2мл) перед каждым сеансом ЭБС в течение 21 дня. При невротизации под действием хронического ЭБС на 7, 14 и 21 дни эксперимента исследовали динамику изменения вторичного продукта ПОЛ - малонового диальдегида (МДА) по методу Asakava T., Matsushita S. (1980) в гипоталамусе и сенсомоторной коре. Затем изучали восстановление функционального состояния животных после прекращения (спустя 1 неделю) невротического воздействия.

Результаты проведенных экспериментов показали, что развитие неврозного состояния при хроническом воздействии ЭБС сопровождается увеличением количества МДА у обеих групп животных. В ходе экспериментов динамика свободнорадикального окисления исследуемых групп отличалась определенной спецификой. К концу невротизации под влиянием хронического ЭБС в контрольной группе количество МДА увеличивалось в гипоталамусе более чем четырехкратно ( $p < 0,001$ ), а в сенсомоторной коре приблизительно в 2,9 раза ( $p < 0,01$ ) по сравнению с интактной группой. У крыс, получавших экстракт шафрана, свободнорадикальное окисление отмечалось намного меньше и увеличение составляло в гипоталамусе в 2,9 раза ( $p < 0,01$ ), в сенсомоторной коре в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактной группой.

Полученные данные при восстановлении функционального состояния являются более интересными и информативными. После прекращения невротизации (спустя 1 недели) результаты сравнивались с невротическими показателями каждой группы. Количество МДА в гипоталамусе контрольной группы уменьшалось на 22,6% ( $p < 0,01$ ), а в опытной группы на 59% ( $p < 0,001$ ). В сенсомоторной коре контрольной группы уменьшение составляло 24,5% ( $p < 0,05$ ) и в опытной группы 52,7% ( $p < 0,01$ ). У невротизированных групп на фоне экстракта шафрана наблюдалось восстановление почти до интактного уровня.

Результаты исследования подтверждают тот факт, что развитие неврозного состояния сопровождается окислительным стрессом, приводящим к нарушению структуры мембран нервных клеток. При этом в центральной нервной системе, особенно в гипоталамусе, который входит в состав структур лимбико-ретикулярного комплекса мозга, в том числе и в сенсомоторной коре - участвующей в организации эмоций - происходит изменение чувствительности нейронов к нейромедиаторам и олигопептидам, ведущее к формированию “застойного” эмоционального возбуждения. Таким образом можно предположить, что воздействие экстракта шафрана при невротизации оказывает антиоксидантное действие, которое препятствует развитию патологии, а также ускоряет восстановление функционального состояния после прекращения невротизации. На основании полученных нами данных можно сделать заключение о возможности использования экстракта шафрана алиментарным путем для профилактики невроза.

## РОЛЬ ИЕРАРХИЧЕСКИХ СЕТЕЙ МОЗГА В РАЗВИТИИ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

## ROLE OF THE HIERARCHIC BRAIN NETWORKS IN DEVELOPMENT OF RADIATION DAMAGE TO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

***Белокопытова К.В.<sup>1,2</sup>, Белов О.В.<sup>1,3</sup>, Базян А.С.<sup>4</sup>***

<sup>1</sup>Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

<sup>2</sup>Молдавский государственный университет, Кишинев

<sup>3</sup>Государственный университет «Дубна», Дубна

<sup>4</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

В последние годы накапливаются данные, свидетельствующие о высокой чувствительности отдельных элементов центральной нервной системы (ЦНС) к повреждающему действию ионизирующей радиации. Актуальность изучения нейрофизиологических эффектов, обусловленных воздействием радиации, определяется рядом научно-практических задач, среди которых важное место занимает планирование сеансов радиотерапии и радиохирургии, обеспечение радиационной безопасности персонала, работающего в полях излучений физических установок, подготовка межпланетных пилотируемых полетов. Вместе с тем, неясными остаются многие молекулярные и клеточные механизмы ответа мозга на облучение. Представляет интерес выяснение роли иерархических сетей мозга в формировании и развитии радиационного повреждения ЦНС.

Иерархические сети реализуют целенаправленное эмоционально мотивированное поведение. В основе этого процесса лежит соматотопия — строго специфический контроль мышечных реакций мозгом. Соматотопией обладает двигательная кора и экстрапирамидная система мозга, базальные ганглии. Сигнал из всех областей коры спускается к дорзальному стриатуму, затем к ядрам бледного шара и далее идет к черной субстанции. В черной субстанции сигнал делится на три части. Первая часть сигнала запускает таламокортикальные сети, возвращая сигнал в кору и стриатум. Вторая часть сигнала из черной субстанции активирует ретикулярные ядра и индуцирует соматотопическое поведение наряду с двигательной корой. Третья часть сигнала через моноаминергические системы запускает мезо-кортико-лимбические структуры мозга и индуцирует эмоционально мотивационный контроль нейронных сетей и поведения. Это непрерывно функционирующие системы циклических ревербирационных сигналов, контролируемых эмоционально насыщенной когнитивной картой мозга, которая реализуется интеграцией нейронов места, времени, мониторинга и координатной сетки гиппокампа с нейронами зрительной, слуховой и периформной коры и формирует контекст окружающей среды, связывая внешние воздействия с внутримозговыми процессами.

Исследования радиационного воздействия на нейроны с использованием методов компьютерного моделирования трехмерной проекции клеток гиппокампа крыс в сочетании с треками ионов углерода (<sup>12</sup>C) показали, что частота возникновения структурных нарушений этих нейронов невелика [1]. В то же время, в наших экспериментах по влиянию различных видов ионизирующих излучений на концентрацию моноаминов в мезо-кортико-лимбических структурах мозга выявлено нарастающее усиление радиационного эффекта, связанное с уменьшением концентрации моноаминов в зависимости от времени в гиппокампе и гипоталамусе облученных крыс [2,3]. При этом наблюдаемая в целом картина метаболизма моноаминов может указывать на наличие определенных компенсаторных механизмов, индуцируемых в ответ на облучение, и способных частично восстанавливать функции моноаминергических систем [4].

Полученные результаты можно объяснить непрерывно функционирующими системами циклических ревербирующих сигналов, которые контролируются эмоционально насыщенной когнитивной картой мозга. Исходно слабые нарушения при циклическом ревербирующем процессе постепенно накапливаются и усиливаются, приводя с течением времени к глобальным нарушениям.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-01005-офи-м.

1. Belov O., Batmunkh M., Incerti S., Lkhagva O. Radiation damage to neuronal cells: Simulating the energy deposition and water radiolysis in a small neural network // *Physica Medica*. 2016. V. 32. No 12. P. 1510-1520.
2. Belov O., Belokopytova K., Kudrin V., Molokanov A., Shtemberg A., Bazyan A. Neurochemical insights into the radiation protection of astronauts: distinction between low- and moderate-LET radiation components // *Physica Medica*. 2019. V. 57. P. 7-16.
3. Belokopytova K., Belov O., Gaevsky V., Narkevich V., Kudrin V., Krasavin E., Bazyan A. Neuromediator exchange dynamics in rats at late periods after exposure to <sup>60</sup>Co gamma-rays // *Med Radiol Radiat Safety*. 2017. V. 62 (2). P. 5-12.
4. Belov O., Belokopytova K., Bazyan A., Kudrin V., Narkevich V., Ivanov A., Severiukhin Yu., Timoshenko G., Krasavin E. Exposure to <sup>12</sup>C particles alters the normal dynamics of brain monoamine metabolism and behaviour in rats // *Physica Medica*. 2016. V. 32. No 9. P. 1088-1094.

**СОПОСТАВЛЕНИЕ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ, ЗАРЕГИСТРИРОВАННОЙ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ****COMPARISON OF THE NEURONAL FIRING ACTIVITY REGISTERED BY DIFFERENT METHODS***Бибииков Н.Г.*

АО Акустический институт имени акад Н.Н.Андреева, nbibikov1@yandex.ru

В течении уже более 70 лет для регистрации нейронной активности используют микроэлектроды с диаметром кончика порядка микрона. С помощью таких электродов при перемещении их в мозговой ткани обычно удается добиться существенного превышения амплитуды спайков одиночного элемента над бишумом. Однако, обращает на себя внимание тот факт, что при перемещении электрода на 50-100 микрон регистрируется не более одного одиночного элемента, хотя число клеток, находящихся в непосредственной близости от его кончика, явно существенно больше. Из этого с очевидностью следует, что используемый метод обладает определенной избирательностью. В результате получаемые результаты могут не вполне адекватно отражать истинное соотношение разных нейронных элементов в исследуемой структуре. В качестве примера можно указать на недавние результаты исследования нейронов латеральной верхней оливы - важного центра, обеспечивающего сравнение уровней звукового сигнала на двух ушах. На протяжении длительного времени здесь регистрировались экстраклеточно нейроны тонического типа с выраженной временной суммацией [1]. Только недавно для регистрации в этом ядре использовали внутриклеточные электроды с окрашиванием выходящих аксонов [2]. При этом выяснилось, что практически все нейроны, формирующие выходной путь из ядра, характеризуются фазическим ответом на начало или резкие инкременты амплитуды сигнала и отличаются очень малой постоянной времени суммации. Сам потенциал действия этих клеток сравнительно мал и при стандартной внеклеточной регистрации регистрировался крайне редко. Таким образом методика регистрации может существенно изменить наши взгляды на функционирование исследуемого центра мозга. Здесь мы рассмотрим возможное влияние методик регистрации на активность нейронов, расположенных в другом ядре слухового пути, которое также исследовалось на протяжении весьма длительного времени. Полукружный торус (гомолог задних бугров четверохолмия) является основным интегративным центром слухового пути большинства низших позвоночных в том числе амфибий. Электрофизиологи исследовали этот центр среднего мозга лягушек, в режиме обездвижения или после операции, проведенной под наркозом, по крайней мере, тремя методами. В большинстве работ, выполненных в разных лабораториях [3-4] использовали стандартные внеклеточные микроэлектроды. Результаты этих работ качественно совпадали. Было выявлено большое разнообразие реакций со значительным преобладанием ответов тонического типа. Однако, в одной из лабораторий исследователи применяли внутриклеточную регистрацию без использования поисковых стимулов [5]. При нахождении электрода в слуховой зоне добивались плотного контакта с произвольной клеткой и только после этого начинали предъявлять животному звуковые сигналы и регистрировать внутриклеточные ответы. Полученные этим методом результаты качественно отличались от данных, регистрируемых с помощью стандартных микроэлектродов. Ответы, как правило, характеризовались очень большой постоянной времени суммации. Часто обнаруживались клетки, не реагирующие на несколько первых предъявления стимула и даже генерирующие ответ только после определенного числа последовательно предъявляемых звуковых стимулов. Совершенно иной вариант регистрации нейрональной активности применялся в течение нескольких последних лет в нашей лаборатории. Использовали микроэлектроды с невысоким входным сопротивлением, обеспечивая выделение отдельных нейронных элементов программными методами. Результаты этой работы также отличались от полученных с помощью стандартных микроэлектродов. Резко возросла вероятность регистрации спонтанной активности и почти все выделенные клетки хорошо воспроизводили временное течение сложных амплитудно-модулированных сигналов. Есть основания считать, что при использовании данного метода предпочтительно регистрируется активность сравнительно мелких интернейронов с тонической активностью. Следовательно, данные, полученные в разных лабораториях, свидетельствует, что при характеристике преобразований информации в исследуемых нейронных структурах нужно использовать данные, полученные с помощью различных методических приемов. Работа поддерживалась грантом РФФИ 16-04-01066.

1. Greene NT, Davis KA. Discharge patterns in the lateral superior olive of decerebrate cats. *Journal of Neurophysiology* 2012.108:1942–1953
2. Franken TP, Joris PX, Smith PH. Principal cells of the brainstem's interaural sound level detector are temporal differentiators rather than integrators. 2018. *Elife*. 7. PMID 29901438 DOI:10.7554/eLife.33854.
3. Бибииков НГ. Обработка сигналов в слуховом пути позвоночных. Lambert Academic Publishing Saarbrücken. 2012.ISBN:978-3-8443-555-0. 102с.
4. Feng AS, Ratnam R Neural basis of hearing in real-world situations. *Annu. Rev. Psychol.* 2000. 51: 699–725.
5. Rose GJ.; Gooler DM. Function of the anuran central auditory system. In: Feng, AS.; Narins, PM.; Fay, RH.; Popper, AH., editors. *Hearing and Sound Communication in Amphibians*. Springer Handbook of Auditory Research. Springer-Verlag; New York: 2007.

## ПОИСК ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ В Ca<sup>2+</sup>-АКТИВНОСТИ АСТРОЦИТОВ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ И МОДЕЛИ

### THE SEARCH FOR CONSISTENT PATTERNS IN ASTROCYTIC Ca<sup>2+</sup>-ACTIVITY: EXPERIMENTAL DATA AND MODELS

*Бразже А.Р.<sup>1,2</sup>, Постнов Д.Э.<sup>3</sup>, Семьянов А.С.<sup>2,1</sup>*

<sup>1</sup>каф. биофизики, биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва; [brazhe@biophys.msu.ru](mailto:brazhe@biophys.msu.ru)

<sup>2</sup>отдел молекулярной нейробиологии ИБХ РАН им. М. М. Овчинникова и Ю. А. Шемякина, Москва

<sup>3</sup>отдел оптики и биофотоники, Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов

Астроциты — специализированные глиальные клетки — необходимы для нормальной нейрональной активности, синаптической передачи и нейро-сосудистого сопряжения. Благодаря обилию мельчайших отростков («листочков»), астроциты находятся в тесном взаимодействии с синаптическими контактами, обеспечивая удаление нейромедиатора из синаптической щели, секрецию ко-агонистов к нейрональным рецепторам и других сигнальных молекул, обеспечивая и внесинаптический, паракрынный путь передачи сигналов в нервной ткани.

Астроциты электрически невозбудимы, но об активности данных клеток можно судить по изменению уровня флуоресценции зондов-репортеров концентрации внутриклеточного кальция. Наличие кальциевых сигналов в астроцитах ассоциировано с синхронизацией работы нейронов, ответами локального кровотока. В последнее время широкое распространение получили генетически кодируемые белковые флуоресцентные зонды на внутриклеточный кальций, позволяющие избирательно окрашивать астроциты и визуализировать Ca<sup>2+</sup>-динамику во всех клеточных компартментах, от самых тонких отростков до тел клеток. Увеличение объема доступных данных динамической микрофлуориметрии (Ca-имаджинг) требует создания адекватных решений для обработки и интерпретации астроцитарной кальциевой активности. При этом следует учитывать, что эти подходы должны отличаться от анализа нейрональной активности, поскольку кальциевая активность в астроцитах подразумевает отдельных локализованных источников сигнала и наличие широких распределений по размерам и длительностям отдельных событий кальциевой сигнализации. При обработке данных кальциевого имаджинга приходится учитывать возможность артефактов движения, а также то, что относительно низкий уровень фоновой флуоресценции генетически кодируемых индикаторов приводит к сильно скошенному распределению мгновенных значений регистрируемого сигнала флуоресценции, что существенно затрудняет анализ активности в локальных областях.

Мы рассматриваем разрабатываемый нами набор алгоритмов для обработки и анализа экспериментальных данных кальциевой активности в астроцитах — компенсацию артефактов движения, определения локальных значений фонового уровня флуоресценции, подавление шума и поиск значимых локальных флуктуаций флуоресценции относительно фонового уровня. Для подавления шума и реконструкции отдельных эпизодов повышения уровня флуоресценции используется понижение размерности данных, факторизация сигнала на пространственные и временные компоненты и частичная реконструкция после отбрасывания незначимых элементов. Далее мы рассматриваем интерпретацию наблюдаемой динамики: статистику размеров и длительностей кальциевых событий, скорости нарастания и спада флуоресценции и др. Наблюдаемые кальциевые события можно также интерпретировать как стохастический процесс, но открытым остается вопрос о наличии или отсутствии определенных закономерностей или повторяющихся паттернов активации на уровне отдельных клеток или астроцитарного синцития. Рассматриваются подходы к поиску таких закономерностей с использованием символического представления данных и упрощенных динамических моделей, основанных на данных.

Для дальнейшего понимания механизмов, вовлеченных в инициацию и распространение событий кальциевой сигнализации необходимо создание нелинейных математических моделей, описывающих предполагаемые биофизические механизмы кальциевой динамики в астроцитах. Мы рассматриваем такие распределенные модели, реализованные на реалистичных пространственных паттернах, а также закономерности кальциевой динамики в этих моделях, определяемые локальной морфологией астроцита.

---

## ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ Кальциевой АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ МОНОАСТРОЦИТАРНЫХ КУЛЬТУР КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА В НОРМЕ И ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОКСИИ

### FEATURES OF FUNCTIONAL CALCIUM ACTIVITY OF PRIMARY CORTEX ASTROCYTIC CELLS CULTURES IN NORMAL AND HYPOXIC CONDITION

*Бурмистров Д.Е.<sup>1</sup>, Кривоносов М.И.<sup>1</sup>, Мищенко Т.А.<sup>1,2</sup>, Ведунова М.В.<sup>1</sup>, Митрошина Е.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, Нижний Новгород

За последнее десятилетие значительно усилился интерес к исследованию роли клеток глии и, в частности, астроцитов в функционировании ЦНС. Это связано с постепенным накоплением данных о том, что глиальные клетки не только выполняют трофическую функцию, но и могут непосредственно участвовать в когнитивных функциях и обработке информации в головном мозге. Последние экспериментальные данные свидетельствуют о

том, что астроциты формируют функциональный синцитий и могут обмениваться сигнальными молекулами [1]. Так, например, одно из проявлений коллективной активности астроцитов - кальциевые волны в астроцитарных конгломератах [2]. Межастроцитарные взаимодействия осуществляются через щелевые межклеточные каналы (гартонтакты), состоящие из особых белков-коннексинов. Через них осуществляется обмен ионов, метаболитов и нейромодуляторов, опосредующих межастроцитарную сигнализацию [3]. Особый интерес представляет исследование активности астроцитарных конгломератов при гипоксическом повреждении головного мозга. Гипоксия является одним из важнейших патогенетических компонентов при развитии целого ряда патологий головного мозга, включая ишемический инсульт, нейродегенеративные заболевания, опухоли головного мозга. В течение последних нескольких лет появились первые данные об изменении в экспрессии коннексинов 43 астроцитами при гипоксии [4], что может существенно влиять на функциональность астроцитарной сети, однако данных о функциональной активности астроцитарных сетей при гипоксическом воздействии имеется на сегодня крайне мало. Целью работы являлось исследование функциональной активности клеток первичных моноастроцитарных культур головного мозга в норме и при моделировании гипоксии.

Материалом для исследований служили первичные культуры астроцитов, полученные из коры головного мозга новорожденных мышей линии C57BL/6 (P1-P3). Моделирование острой нормобарической гипоксии проводилось на 21DIV согласно работе [5]. Для активации астроцитарной сети применялся АТФ (10 мкМ). Исследование метаболической кальциевой активности астроцитарных культур проводилось с применением мультিকлеточного кальциевого имиджинга. Был использован внутриклеточный кальциевый краситель Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB1) (Invitrogen) и конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM 510 (Zeiss, Германия). Для анализа полученных данных применялся оригинальный программный комплекс кальциевого имиджинга CalciumCV. Алгоритм включал в себя фильтрацию исходного сигнала, оценку параметров шума, выравнивание смещения астроцитов во время съёмки, построение базовой линии сигнала, вычисление относительного изменения концентрации кальция, детектирование кальциевых событий. Исследован ряд характеристик кальциевых событий, таких как: средняя площадь события на кадре, средняя площадь области на кадре, относительная площадь событий на кадре, количество областей на кадре и другие. Между парами временных характеристик проведено вычисление корреляций.

Установлено, что гипоксия приводит к угнетению спонтанной кальциевой активности. Через 7 суток после моделирования гипоксии количество клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность, снижается с  $55,2 \pm 3,2\%$  клеток до  $40,3 \pm 2,1\%$ , ( $p=0,05$ , ANOVA) частота осцилляций не изменялась (интактные -  $1,95 \pm 0,13$  осц/мин, гипоксия  $2,3 \pm 0,16$  осц/мин), изменения длительности осцилляций также не зарегистрировано (Интактные  $8,24 \pm 0,18$  с, Гипоксия -  $8,0 \pm 0,16$  с). В нормальных условиях при воздействии АТФ увеличивается степень взаимной корреляции между астроцитами, что говорит об увеличении синхронизации кальциевой активности и формировании астроцитарной сети. После моделирования гипоксического повреждения аппликация АТФ не вызывает подобного эффекта. Таким образом, нами показано, что гипоксическое воздействие приводит к разобщению астроцитарных сетей в первичных культурах астроцитов коры головного мозга.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (гранты №17-04-01128, 18-015-00391, 18-315-20003), гранта Президента РФ МК-1485.2019.4, а также при поддержке государственного задания (проекты 17.3335.2017/4.6 и 6.6379.2017/8.9).

1. Rouach N, Koulakoff A, Giaume C. Neurons set the tone of gap junctional communication in astrocytic networks // *Neurochem Int.* 2004. Vol. 45(2-3):265-72.
2. A. Verkhratsky and M. Nedergaard. Physiology of Astroglia // *Physiol Rev.* 2018 Vol. 98(1): 239–389.
3. Pannasch U, Rouach N. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior // *Trends Neurosci.* 2013. Vol. 36(7):405-17
4. Beckmann A. et al. Oxygen-Glucose Deprivation in Mouse Astrocytes is Associated with Ultrastructural Changes in Connexin 43 Gap Junctions // *Neuroscience.* 2019. Vol. 397:67-79
5. Vedunova M.V. et al. // *Oxid Med Cell Longev.* 2015. Vol. 2015:45390.

## **ВЛИЯНИЕ ПРИНУДИТЕЛЬНОЙ ПИЩЕВОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА УРОВЕНЬ ДОФАМИНА В ЦНС КРОЛЬЧАТ**

### **INFLUENCE OF FORCED FOOD DEPRIVATION ON DOPAMINE LEVEL IN THE CNS OF RABBITS**

*Гаджиева Э.Т.*

Азербайджанский Государственный Педагогический Университет, Баку

Обмен биогенных аминов связан с функциональным состоянием нервной системы. Одной из важнейших аминергических систем головного мозга является дофаминергическая система. Она оказывает существенное модуляторное действие на психофизиологические состояния животных и человека [1]. Дофамин является предшественником норадреналина и играет самостоятельную роль в нейрохимических механизмах мозга. Дофаминергические нейроны вовлечены в обеспечение целого ряда жизненно-важных функций, включая движение, пищевое поведение, сон, аффективное поведение, внимание, обучение и память [2]. Стресс разных

видов вызывает существенные изменения в состоянии дофаминергической системы в мозге у людей [3] и крыс [4].

При изучении биогенных аминов в стрессорных ситуациях организма были использованы самые разнообразные модели экстремального воздействия. Одной из них является лишение животных пищи.

Целью данной работы было изучение содержания дофамина в митохондриях различных структур головного мозга 3-х месячных кроликов при различных сроках пищевой депривации и на фоне восстановления пищевого режима.

В качестве объекта исследования были использованы 3-х месячные кролики, содержащиеся в стандартных условиях вивария на протяжении всего периода эксперимента. Животные были разделены на следующие группы: а) контрольная группа – интактные особи; б) опытная группа была разбита на подгруппы с учетом длительности периода (1, 3 и 5 суток) пищевой и на фоне 7-ми суточного восстановления пищевого режима.

Согласно полученным результатам, у интактных животных в митохондриальной фракции исследуемых структур мозга содержание дофамина составляет: в орбитальной коре -  $118 \pm 6,2$  нг/г свежей ткани, сенсомоторной -  $134 \pm 5,5$ , лимбической -  $148 \pm 5,3$ , зрительной -  $142 \pm 5,6$  стволе мозга -  $151 \pm 5,2$  и гипоталамусе -  $286 \pm 10,5$ . После односуточной пищевой депривации содержание дофамина в вышеуказанных структурах мозга понижается на 11%, 8%, 13%, 13% и 14%, соответственно. В гипоталамусе понижение содержания дофамина составляет 20% по сравнению с данными контрольных животных. На 3-и сутки пищевой депривации содержание дофамина существенно понижается и составляет: в орбитальной коре -  $97 \pm 3,0$  нг/г свежей ткани, сенсомоторной -  $115 \pm 4,1$ , лимбической -  $118 \pm 3,9$ , зрительной -  $115 \pm 4,2$ , стволе мозга -  $118 \pm 3,5$  и гипоталамусе -  $205 \pm 8,9$ . На 5-е сутки пищевой депривации в орбитальной коре содержание дофамина понижается до  $87 \pm 2,8$  нг/г, в сенсомоторной - до  $101 \pm 3,7$  нг/г, лимбической – до  $107 \pm 3,1$ , зрительной – до  $99 \pm 3,3$ , стволе мозга – до  $103 \pm 3,0$ , гипоталамусе - до  $180 \pm 7,1$ , что составляет 26%, 25%, 28%, 30%, 32% и 37%, соответственно, по сравнению с контролем.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что в зависимости от сроков пищевой депривации, в содержании дофамина выявляются существенные изменения.

На фоне 7-ми суточного восстановления пищевого режима в содержании дофамина прослеживается тенденция к повышению, что составляет: в орбитальной коре  $111 \pm 3,5$  нг/г свежей ткани, сенсомоторной -  $125 \pm 4,9$ , лимбической -  $138 \pm 3,6$ , зрительной -  $135 \pm 4,3$ , стволе мозга-  $139 \pm 4,6$  и гипоталамусе -  $246 \pm 7,6$ .

Дофаминергическая система участвует в механизмах регуляции пищевого поведения [5]. В заключении можно предположить, что пищевая депривация как специфический фактор уменьшает содержание дофамина в митохондриях различных структур головного мозга экспериментальных животных.

1. Hansenne M., Ansseau M. Catecholaminergic function and temperament in major depressive disorder: a negative report / Psychoneuroendocrinology. 1998. Vol. 23. № 5. P. 477-483
2. Iversen S.D., Iversen L.L. Dopamine: 50 years in perspective // Trends Neurosci. 2007. Vol. 30. P. 188–193
3. Pani L. et al. The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system // Mol. Psychiatry. 2000. Vol. 5. №1. P. 14-21.
4. Пшенникова М.Г. Катехоламины, оксид азота и устойчивость к стрессорным повреждениям: влияние адаптации к гипоксии // Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2002. Т. 88. №4. С. 485-495
5. Jong-Woo S. Network of hypothalamic neurons that control appetite // BMB Rep. 2015. Vol. 48. № 4. P. 229-233

## ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ КОМАНДНЫХ НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ У ОБУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

### CHANGES OF THE PROPERTIES OF SEROTONIN RECEPTORS OF SNAIL'S COMMAND NEURONS IN LEARNED ANIMALS

Гайнутдинов Х.Л.<sup>1</sup>, Андрианов В.В.<sup>1</sup>, Богодвид Т.Х.<sup>1,2</sup>, Винарская А.Х.<sup>3</sup>, Дерябина И.Б.<sup>1</sup>, Муранова Л.Н.<sup>1</sup>, Силантьева Д.И.<sup>1</sup>, Балабан П.М.<sup>3</sup>

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; E-mail: kh\_gainutdinov@mail.ru

<sup>2</sup>Поволжская академия физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия

<sup>3</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва; Россия

Вопросы о механизмах обучения и памяти стоят давно. Установлено, что у моллюсков основным медиатором, который опосредует оборонительное поведение и обучение на основе оборонительных рефлексов, является серотонин (5-НТ) [1,2,3]. Усиление оборонительных реакций наблюдается и при инъекции 5-НТ внутрь организма животного [4]. В последнее время развивается концепция о том, что существенную роль в механизмах формирования памяти у моллюсков играет внесинаптическая передача 5-НТ [5]. Этот путь может быть одним из механизмов, посредством которых нейрон регулирует трансляцию во время обучения. Так, было

показано, что 5-НТ-индуцированное долгосрочное облегчение сенсомоторного синапса у аплизии зависит от усиленной экспрессии генов и синтеза белка [6,7]. Выделив изолированно мотонейрон, они продемонстрировали, что 5-НТ-зависимый синтез белка локализован именно в мотонейроне. У виноградной улитки за внесинаптический выброс 5-НТ отвечают модуляторные нейроны педального ганглия [3]. Одним из участков связывания, на который действует 5-НТ, могут являться внесинаптические 5-НТ-рецепторы [8]. Доказательством являются эффекты антагонистов 5-НТ рецепторов метиотепина (МЕТ), метилсергида и других [9,10]. Исходя из выше изложенного, нами было проведено исследование реакции серотониновых рецепторов командных нейронов LPa3 и RPa3 интактных и обученных улиток на аппликацию 5-НТ и МЕТ, который является антагонистом рецепторов 5-НТ первого типа.

Для экспериментов была выбрана виноградная улитка *Helix lucorum*, нервная система которой хорошо описана. В качестве подготовки к основной работе у половины улиток вырабатывали оборонительный условный рефлекс на постукивание по раковине [8,11]. Условным стимулом служило двойное постукивание по раковине, которое в норме не вызывало оборонительной реакции у животного. В качестве безусловного стимула использовался дувок струи воздуха в отверстие легочной полости, что вызывало у животных безусловную оборонительную реакцию закрытия пневмостома. Доказательством обучения животных является активный контроль, в качестве которого служило применение несочетанного предъявления условного и безусловного стимулов, в том же количестве и в тех же временных интервалах, что и при сочетанном предъявлении этих стимулов.

Анализ электрических характеристик проводили на командных нейронах оборонительного рефлекса LPa3 и RPa3. Поскольку эти нейроны в норме являются молчащими, то использовался одноэлектродный метод стимуляции клетки - для вызова потенциала действия (ПД) через регистрирующий микроэлектрод на клетку подавали импульс тока прямоугольной формы продолжительностью 1 с; величина тока стимуляции подбиралась минимальной для генерации потенциала действия [4]. При этом использовался минимальный ток, необходимый для генерации 3-5 ПД. Регистрировали следующие параметры нервных клеток: мембранный потенциал покоя –  $V_m$  (исходное значение перед началом серии тактильных раздражений или электрической стимуляции и его величина в ходе эксперимента) и порог генерации ПД -  $V_t$  (пороговый потенциал). В основной части экспериментов исследовали реакции нейронов LPa3 и RPa3 на аппликацию (в течение 30 мин) следующих веществ в раствор, омывающих препарат интактных и обученных улиток: 5-НТ, 5-гидрокситриптофана (5-НТР), предшественника синтеза серотонина, МЕТ; все в концентрации  $4 \times 10^{-5}$  М/л. На одном препарате регистрировали ответ только одного нейрона (начиная с LPa3), чтобы избежать фонового влияния предыдущих веществ. В отдельной серии экспериментов был проведен сравнительный анализ  $V_m$  и  $V_t$  нейронов LPa3 и RPa3; измерения проводились на обоих нейронах в каждом препарате интактных и обученных улиток.

В первой серии экспериментов было продемонстрировано, что  $V_m$  и  $V_t$  командных нейронов LPa3 интактных улиток не отличаются достоверно от таковых у нейронов RPa3. Это позволило нам объединить результаты измерений для двух нейронов. Эти результаты похожи на полученные нами ранее [12]. Было найдено, что аппликации 5-НТ и 5-НТР вызывают значительное уменьшение  $V_m$  интактных и обученных улиток, но не вызывают изменений  $V_t$  у интактных улиток. Однако они вызывают возрастание  $V_t$  у обученных улиток. МЕТ в контрольной группе приводит к уменьшению  $V_m$  нейронов LPa3 и RPa3 и его увеличение до первоначального уровня при последующей аппликации серотонина. У обученных животных МЕТ также приводит к уменьшению  $V_m$ , но последующая аппликация серотонина не меняет  $V_m$ . Результаты показывают, что ответы командных нейронов на экстраклеточную аппликацию 5-НТ, 5-НТР и МЕТ изменяются после ассоциативного обучения.

Таким образом, в наших экспериментах найдено, что аппликация 5-НТ и 5-НТР вызывают достоверное снижение  $V_m$  командных нейронов интактных и обученных улиток. Аппликация 5-НТ и 5-НТР не вызывает каких-либо изменений порогового потенциала этих нейронов у интактных улиток. Однако в противоположность им аппликация 5-НТ и 5-НТР на командные нейроны обученных улиток вызывает увеличение порогового потенциала. Т.е., показано, что у обученных улиток, в отличие от интактных, повышается пороговый потенциал в ответ на аппликацию 5-НТ и 5-НТР, что показывает снижение возбудимости этих нейронов в реакции на внеклеточный 5-НТ после обучения. Было показано, что при аппликации антагониста 5-НТ- рецепторов метиотепина происходит уменьшение мембранного потенциала нейронов LPa3 и RPa3 и его увеличение при последующей аппликации 5-НТ. Остальные электрические характеристики не изменяются. Это говорит о том, что обучение приводит к снижению возбудимости командных нейронов обученных животных в ответ на аппликацию 5-НТ. С другой стороны, возбудимость этих нейронов повышается после самой процедуры обучения [12,13,14]. Тем не менее, факт того, что процедура обучения приводит к изменению реакции командных нейронов на аппликацию серотонина, заслуживает внимания, и является еще одним коррелятом обучения на уровне нейрональной сети, особенно, если помнить о важной роли 5-НТ в феномене выработки условных оборонительных рефлексов [15].

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-015-00274).

1. Glanzman D.L. et al. Depletion of serotonin in the nervous system of *Aplysia* reduces the behavioral enhancement of gill withdrawal as well as the heterosynaptic facilitation produced by tail shock // J. Neurosci. 1989. Vol. 12. P. 4200-4213.

2. Гайнутдинов Х.Л. и др. Воздействие нейротоксинов 5,6-дигидрокситриптамина и р-хлорфенилаланина на параметры электрической активности командных нейронов при долговременной сенситизации и обучении у виноградной улитки // Журн. высш. нервн. деят. 1999. Т.49. № 1. С. 48-58.
3. Balaban P.M. et al. A single serotonergic modulatory cell can mediate reinforcement in the withdrawal network of the terrestrial snail // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2001. Vol. 75. No 1. P. 30-50.
4. Andrianov V.V. et al. Modulation of defensive reflex conditioning in snails by serotonin // *Front. Behav. Neurosci.* 2015. Vol. 9. Article 279.
5. Сахаров Д.А. Биологический субстрат генерации поведенческих актов // Журн. общей биол. 2012. Т. 73. № 5. С. 324–348.
6. Villareal G. et al. The role of rapid, local, postsynaptic protein synthesis in learning-related synaptic facilitation in *Aplysia* // *Curr. Biol.* 2007. Vol. 17. No 23. P. 2073-2080.
7. Liu R.-Y. et al. The requirement for enhanced CREB1 expression in consolidation of long-term synaptic facilitation and long-term excitability in sensory neurons of *Aplysia* // *J. Neurosci.*, 2011. Vol. 31. No 18. P. 6871–6879.
8. Bogodvid T.K. et al. Responses of premotor interneurons to serotonin application in naïve and learned snails are different // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2017. Vol. 11. Article 403.
9. Абрамова М.С. и др. Метиотепин-чувствительные серотониновые рецепторы включены в постсинаптический механизм сенситизации оборонительной реакции виноградной улитки // Журн. высш. нервн. деят. 2005. Т. 55. № 3. С. 385–392.
10. Andrianov V.V. et al. Effects of serotonin receptor antagonist methiothepin on membrane potential of premotor interneurons of naïve and learned snails // *BioNanoScience.* 2018. Vol. 8. No. 1. P.379-383.
11. Гайнутдинова Т.Х. и др. Длительность сохранения изменений электрических характеристик командных нейронов при выработке условного оборонительного рефлекса у улитки // Журн. высш. нервн. деят. 2003. Т. 53. № 3. С. 388-391.
12. Гайнутдинов Х.Л. и др. Изменение электрических характеристик командных нейронов при выработке условного оборонительного рефлекса у виноградной улитки. Журн. высш. нервн. деят. 1996. Т.46. С.614-616.
13. Mozzachiodi R. et al. Changes in neuronal excitability serve as a mechanism of long-term memory for operant conditioning // *Nature Neurosci.* 2008. Vol. 11. P. 1146-1148.
14. Гайнутдинов Х.Л. и др. Изменение возбудимости нейрональной мембраны как клеточный механизм обучения и памяти // *Успехи физиологических наук.* 2011. Т. 42. № 1. С. 33-52.
15. Балабан П.М. Молекулярные механизмы модификации памяти // Журн. высш. нервн. деят. 2017. Т. 67. № 2. С. 131-140.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЭПР СПЕКТРОСКОПИИ ДИНАМИКИ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ОГРАНИЧЕНИИ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА

## THE INVESTIGATIONS BY EPR SPECTROSCOPY OF NITRIC OXIDE DYNAMICS DURING DISORDERS OF MOTOR ACTIVITY AND SPIN CORD INJURY

*Гайнутдинов Х.Л.<sup>1,2</sup>, Яфарова Г.Г.<sup>1,2</sup>, Андрианов В.В.<sup>1,2</sup>, Балтина Т.В.<sup>1</sup>, Богодвид Т.Х.<sup>1,3</sup>, Еремеев А.А.<sup>1</sup>, Зефиоров Т.Л.<sup>1</sup>, Лавров И.А.<sup>1</sup>*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; E-mail: kh\_gainutdinov@mail.ru

<sup>2</sup> Казанский физико-технический институт – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань; <sup>3</sup> Поволжская академия физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия

Травма спинного мозга (SCI) связана с серьезными неврологическими нарушениями и остается тяжелой медицинской проблемой, причем существующие методы лечения до сих пор не позволяют устранить потерю трудоспособности вследствие утраты важнейших моторных и двигательных функций у большинства пациентов [1]. Одной из проблем, возникающих при SCI, является ограничение двигательной активности (ДА), которая является существенной социальной проблемой, вызванной образом жизни, профессиональной деятельностью, длительным постельным режимом и т.д. При этом существенно уменьшаются потребление тканями кислорода и активность окислительных процессов. Также отмечается перестройка нейрогуморальных регуляций вегетативно-висцеральных функций, особенно сердечно-сосудистой системы. Известно, что повреждение тканей после SCI происходит в два этапа. За первичной травмой следует фаза вторичной травмы, которая длится в период времени между несколькими днями и неделями в ответ на обилие цитотоксических молекул, чрезмерный воспалительный ответ, активацию сигнальных путей и приводит к гибели нервных клеток [2]. К процессам вторичного повреждения может приводить образование активных форм кислорода и азота [3]. Известно, что NO является медиатором физиологических и патофизиологических процессов, включая иммунорегуляцию, передачу нервных импульсов (нейротрансмиссия), высвобождение гормонов и вазодилатацию [4, 5]. Имеется значительное число исследований, демонстрирующих, что NO включен в механизмы вторичной травмы СМ [3, 6]. Тем не менее, идут споры о роли NO в травме ЦНС, в том



числе недостаточно исследований динамики продукции NO на разных этапах SCI [7]. Предположительно, роль NO при данной патологии зависит от диапазона концентрации, типа клетки-источника и среды, в которой был получен NO.

Нами был применен метод ЭПР спектроскопии для оценки продукции NO по интегральной интенсивности комплекса  $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$  в тканях спинного мозга, сердца и печени крыс как после SCI, так и после ограничения ДА. [8]. Формирование комплекса  $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$  в тканях крыс нами описано ранее [8, 9]. Основные измерения проводились на спектрометре ЭПР ER 200E SRC X-диапазона фирмы "Брукер" (9.50 GHz). Было найдено, что продукция NO в исследованных тканях после длительного ограничения ДА увеличивается в 2-3 раза. В то же время динамика продукции NO при SCI является волнообразной и различной в исследованных тканях: уровень продукции NO во всех тканях в острой фазе болезни уменьшается, затем наблюдалось увеличение; в хроническом периоде в ткани спинного мозга продукция NO оставалась повышенной, а в сердце и печени возвращалась к исходному уровню. Таким образом, показано, что при рассмотрении последствий травмы СМ необходимо учитывать компонент ограничения ДА.

1. Singh A. et al. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury // Clin. Epidemiol. 2014. Vol. 6. P. 309–331.
2. Anwar M.A. et al. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury // Front. Cell. Neurosci. 2016. Vol. 10. Article 98.
3. Su F. et al. A modified compression model of spinal cord injury in rats: functional assessment and the expression of nitric oxide synthases // Spinal Cord. 2015. Vol. 53. P. 432–435.
4. Steinert J.R. et al. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia // Neuroscientist. 2010. Vol. 16. No 4. P. 435-452.
5. Gainutdinov Kh.L. et al. EPR study of the intensity of the nitric oxide production in rat brain after ischemic stroke. Applied Magnetic Resonance // 2011. Vol. 40. No 3. P. 267-278.
6. Yafarova G.G. et al. Nitric oxide production in the rat spinal cord, heart and liver after spinal cord injury // BioNanoScience. 2016. Vol. 6. No 4. P. 332-334.
7. Яфарова Г.Г. и др. Влияние блокатора NO-синтазы L-NAME на функциональное состояние нейромоторного аппарата при травматической болезни спинного мозга // Бюлл. экспер. биол. мед. 2016. Т. 162. № 9. С. 295-299.
8. Гайнутдинов Х.Л. и др. Исследование методом ЭПР-спектроскопии интенсивности продукции оксида азота в тканях сердца крыс при гипокинезии // Биофизика. 2013. Т. 58. Вып. 2. С. 276-280.
9. Andrianov V.V. et al. Changes of nitric oxide content in the rat hippocampus, heart and liver in acute phase of ischemia // Applied Magnetic Resonance. 2016. Vol. 47. No 9. P. 965-976.

## ЭФФЕКТЫ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ОКСИДА АЗОТА НА ВОЗБУДИМОСТЬ КОМАНДНЫХ НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

### THE EFFECTS OF CHANGES IN THE LEVEL OF NITRIC OXIDE ON THE EXCITABILITY OF THE COMMAND NEURONS OF TERRESTRIAL SNAIL

*Гайнутдинов Х.Л.<sup>1</sup>, Богодвид Т.Х.<sup>1,2</sup>, Андрианов В.В.<sup>1</sup>, Дерябина И.Б.<sup>1</sup>, Муранова Л.Н.<sup>1</sup>, Силантьева Д.И.<sup>1</sup>, Хамадеева И.<sup>1</sup>.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; E-mail: kh\_gainutdinov@mail.ru

<sup>2</sup>Поволжская академия физической культуры, спорта и туризма, Казань, Россия

Оксид азота (NO) является одним из наиболее важных посредников, который участвует в функционировании разнообразных систем организма. NO играет роль внутри- и межклеточного посредника, выполняет различные сигнальные функции, участвует также в нейромодуляции. Эффекты NO связаны с его влиянием на ионные каналы, секрецию медиатора, обмен ионов кальция, метаболизм клетки и ее геном. Найдено, что NO является зависимым от активности регулятором внутренней возбудимости нейронов [1]. Показано, что NO играет роль межклеточного мессенджера и сигнальной молекулы также у моллюсков. Обнаружено, что NO координирует ряд поведенческих программ у моллюсков, найдено, что NO участвует в процессах обучения и памяти. Недавно стало известно, что NO необходим, как для обучения, так и для стирания памяти [2]. Показано участие NO в пластических изменениях синаптической передачи в различных системах, в том числе для нервной системы виноградной улитки. Имеются данные, что NO может служить внутриклеточным модулятором нейрональной возбудимости [1]. Речь идет об NO, который продуцируется в самом нейроне. Эффекты являются двойственными, противоположными для разных типов клеток.

С другой стороны, в рамках проблемы клеточных механизмов обучения была показана важная роль мембранных характеристик нейронов, постоянного натриевого тока в механизмах нейрональной пластичности [3]. Следующим аспектом является исследование процессов нейромодуляции, необходимых для формирования

долговременной памяти [4]. Некоторые авторы считают, что долговременные изменения возбудимости, вызванные обучением, являются механизмами метапластичности новой памяти. Контроль внутренней возбудимости нейрона и синаптической пластичности может осуществляться аденилатциклазной системой и системой NO. Поэтому целью данной работы было исследование эффектов неспецифического блокатора NO-синтазы L-NAME и донора NO нитропруссид натрия на электрические характеристики командных нейронов оборонительного поведения виноградной улитки.

Для экспериментов была выбрана виноградная улитка *Helix lucorum*, нервная система которой хорошо описана. Анализ электрических характеристик проводили на командных нейронах оборонительного рефлекса LPa3 и RPa3. Поскольку эти нейроны в норме являются молчащими, то использовался одноэлектродный метод стимуляции клетки - для вызова потенциала действия (ПД) через регистрирующий микроэлектрод на клетку подавали импульс тока прямоугольной формы продолжительностью 1 с; величина тока стимуляции подбиралась минимальной для генерации потенциала действия [4, 5]. При этом использовался минимальный ток, необходимый для генерации 3-5 ПД. Регистрировали следующие параметры нервных клеток: мембранный потенциал покоя –  $V_m$  и порог генерации ПД -  $V_t$  (пороговый потенциал). В основной части экспериментов исследовали реакции нейронов LPa3 и RPa3 на аппликацию (в течение 30 мин) следующих веществ в раствор, омывающих препарат интактных и обученных улиток: нитропруссид натрия (SNP) - донора NO (в концентрации  $10^{-4}$  моль/л) и блокатора NO-синтазы L-NAME в концентрации  $10^{-4}$  моль/л.

Мы в наших экспериментах имитировали изменение уровня NO за счет применения донора NO SNP и блокатора NO-синтазы L-NAME. Нами было найдено, что SNP вызывал гиперполяризационное смещение  $V_m$ , а L-NAME, наоборот, вызывал деполяризационное смещение  $V_m$  нейронов LPa3 и RPa3. Этот результат демонстрирует возможность модуляции величины мембранного потенциала за счет изменения уровня продукции NO. Исходя из него, можно также объяснить наши данные по увеличению скорости обучения при воздействии донора NO SNP и ее снижения при действии L-NAME [6].

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-015-00274).

1. Steinert J.R. et al. Nitric oxide is an activity-dependent regulator of target neuron intrinsic excitability. // *Neuron*. 2011. Vol. 71. No 2-3. P. 291–305.
2. Balaban P.M. et al. Nitric oxide is necessary for labilization of a consolidated context memory during reconsolidation in terrestrial snails. *Eur. J. Neurosci*. 2014. Vol. 40. No 6. P. 2963–2970.
3. Гайнутдинов Х.Л. и др. Изменение возбудимости нейрональной мембраны как клеточный механизм обучения и памяти // *Успехи физиологических наук*. 2011. Т. 42. № 1. С. 33-52.
4. Andrianov V.V. et al. Modulation of defensive reflex conditioning in snails by serotonin // *Front. Behav. Neurosci*. 2015. Vol. 9. Article 279.
5. Bogodvid T.K. et al. Responses of premotor interneurons to serotonin application in naïve and learned snails are different // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017. Vol. 11. Article 403.
6. Muranova L.N. et al. Effects of NO donors and inhibitors of NO synthase and guanylate cyclase on the acquisition of a conditioned defense food aversion response in edible snails // *Bull. Experim. Biol. Med*. 2016. Vol. 160. No 4. P. 414.



## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ПЛАСТИЧНОСТИ EPIGENETIC CONTROL IN THE FORMATION OF NEURAL PLASTICITY

*Л.Н. Гринкевич*

ФГБН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

В последние годы в понимании механизмов пластичности мозга осуществлен значительный прорыв, главным образом связанный с развитием эпигенетики к которой относят посттранскрипционные модификации гистонов и метилирование ДНК, а также регуляцию экспрессии генов с помощью микроРНК (miRNAs). Показано, что эпигенетические процессы играют чрезвычайно важную роль в функционировании организма, сопрягая генетический аппарат клетки с окружающей средой, обеспечивая адаптацию к изменяющимся условиям через регуляцию экспрессии генов, вовлекаемых в пластические перестройки. При этом, в формировании долговременной памяти (ДП) не только вовлекаются различные модификации гистонов и метилирование ДНК, но их нарушения приводят к значительным когнитивным расстройствам причем, через воздействие на эпигенетические процессы возможно их восстановление. Пионерские работы в этой области выполнены в лаборатории Э. Кандела на животных с простой нервной системой, а именно моллюсках в начале двухтысячных годов [1]. С тех пор количество работ растет в геометрической прогрессии. Однако нерешенных задач остается значительно больше чем решенных. Трудность исследований заключается во множестве сигнальных систем, интеграция которых необходима для успешного обучения и многообразием регуляторных процессов, взаимодействующих на уровне генома и определяющих какие гены будут экспрессироваться. Наименее изученными являются функции miRNAs [2]. miRNAs представляют собой высоко консервативные, небольшие РНК, способные подавлять до 70% матричных РНК (mRNAs). То есть для огромного количества

белков закодирована miRNA, их убийца. Показана важная роль miRNAs в регуляции развития ЦНС и формировании ДП, причем дисфункция ряда miRNAs часто является причиной заболеваний, сопровождаемых когнитивными нарушениями, что делает эти miRNAs привлекательными для терапевтических целей. Кроме того, miRNAs выходя во внеклеточное пространство могут служить межклеточными коммуникаторами и потенциально биомаркерами для диагностики болезней. Однако функции большинства miRNAs остаются неизученными.

В настоящее время наши исследования сосредоточены на выяснении роли микроРНК в формировании ДП, а также на взаимодействии различных регуляторных путей, обеспечивающих пластические перестройки. Для чего мы используем выработку рефлекса пищевой аверсии у моллюска *Helix*. Нами показано, что при консолидации ДП происходит значительная индукция как ацетилирования, так и метилирования гистонов. В регуляцию данных процессов вовлекаются и активаторные, и тормозные пути, причем как их избыточная активация, так и ингибирование могут нарушать формирование ДП. Учитывая, что miRNAs образуются из pre-miRNAs с участием фермента Dicer, а его блокада приводит к нарушению экспрессии miRNAs [3], мы провели исследования по влиянию ингибирования Dicer на формирование ДП у *Helix* с использованием Поли-L-лизина (PLL). PLL инъецировали спустя разные сроки после тренировок. Показано, что ингибирование Dicer в интервале от 1 до 3-х часов после обучения приводит к ухудшению формирования ДП. То есть в этот период экспрессируются miRNAs функционально важные для формирования ДП. В данное время в ЦНС *Helix* нами наблюдалась также активация регуляторного каскада MAPK/ERK и MAPK/ERK-зависимые эпигенетические модификации гистонов. Полученные данные могут указывать на наличие скоординированности индукции хроматиновых перестроек и экспрессии микроРНК, а также отражать ведущую роль MAPK/ERK в этих процессах. Первые данные о возможности такой координации появились в литературе. Обобщая результаты собственных исследований и литературные данные, мы построили регуляторную сеть, позволяющую описывать синхронизацию эпигенетических процессов в формировании ДП.

С целью дальнейшего изучения функций индивидуальных miRNAs нами также осуществлено секвенирование miRNAs из ЦНС *Helix* с помощью miRNA-seq (данные представлены в NCBI Sequence Read Archive (SRA)) и показано наличие нескольких консервативных miRNAs, играющих важную роль в механизмах пластичности и формирования ДП у позвоночных животных. В связи с сложностью устройства ЦНС позвоночных животных, применение моделей обучения на животных обладающих простыми нервными системами для изучения интегративных механизмов формирования ДП является перспективным. В докладе также будут обсуждены способы регуляции эпигенетических процессов, позволяющие улучшать когнитивные способности, в том числе с применением новейшей технологии CRISPR/CAS9.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01681 и Программой фундаментальных научных исследований ГА на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 63).

1. Guan Z. et al. Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure // *Cell*. 2002. V. 111. P.483.
2. Chen W, Qin C. General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development // *RNA Biol*. 2015.V.12.P. 701
3. Watashi K. et al. Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis // *J Biol Chem*. 2010. V. 285. P. 24707.

---

## СОПОСТАВЛЕНИЕ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ НАПРАВЛЕННОЙ СВЯЗАННОСТИ МЕЖДУ СТРУКТУРАМИ МОЗГА КРЫС WAG / RIJ– ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

## COMPARISON OF METHODS FOR ASSESSING DIRECTIONAL CONNECTIVITY BETWEEN THE BRAIN STRUCTURES OF WAG/RIJ RATS — GENETIC MODELS OF ABSENCE EPILEPSY

***А.А. Грищенко<sup>1,\*</sup>, Т.М. Медведева<sup>1,2</sup>, С.М. van Rijn<sup>3</sup>, М.В. Сысоева<sup>4,5</sup>, И.В. Сысоев<sup>1,5</sup>.***

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

<sup>2</sup>Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Россия, Москва

<sup>3</sup>Donders Centre for Cognition, Radboud University, Nijmegen, Netherlands

<sup>4</sup>Саратовский Государственный Технический Университет им. Ю.А. Гагарина, Россия, Саратов

<sup>5</sup>Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Саратов,

vili\_von@mail.ru

Абсансная эпилепсия представляет собою широко распространённую среди детей и подростков (до 50 % случаев [1]) форму эпилепсии не ясной до конца этиологии, основные проявления которой заключаются в частичной или полной потере сознания на краткое время [2] – продолжительность приступа составляет, как правило, порядка 5–10 с.

В данной работе анализировались 130-минутные записи внутричерепных ЭЭГ (сигналы локальных потенциалов) от 5 самцов крыс линии WAG/Rij, по 28 разрядов у каждого животного. Все разряды были

спонтанными. Каждое животное рассматривалось индивидуально. Длина отобранных разрядов составляла не менее 6 с, а также бралось пять секунд до и после разряда. Каждый разряд разбивался на шесть интервалов, на которых и производился расчёт мер. Время начала разряда для удобства принималось за 0, а время окончания за T, исследуемые интервалы, выбранные в соответствии с результатами работы [3], обозначались следующим образом:

- 1) [-5; -3] с до начала разряда (фоновая активность);
- 2) [-2; 0] с — преиктальная активность, во время которой, как правило, уже обнаруживаются изменения в связанности, приводящие к инициации разряда;
- 3) [0; 2] с — начало разряда, соответствует в основном интервалу потери связанности, обнаруженному в [3];
- 4) [2; 4] с — поддержание разряда;
- 5) [T-2; T] с — стадия завершения разряда;
- 6) [T; T+2] с — постиктальная стадия.

Данные в работе анализировались тремя различными методами: методом линейной причинности по Грейнджеру [4], методом нелинейной адаптированной причинности по Грейнджеру [5], с помощью энтропии переноса [6].

В результате, для рассмотренных животных согласно энтропии переноса и линейной причинности по Грейнджеру сила связи в паре отведений FC→PC значимо выше, чем в обратном направлении. Известно, что лобная и теменная кора у крыс линии WAG/Rij тесно связаны и это проявляется в том числе во время пиковых разрядов.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта No 19-12-00201.*

1. Megiddo I., Colson A., Chisholm D., Dua T., Nandi A., Laxminarayan R. Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model // *Epilepsia*. 2016. V. 57. No. 3. P. 464–474. doi: 10.1111/epi.13294
2. Holmes G.L., McKeever M., Adamson M. Absence seizures in children: Clinical and electroencephalographic features // *Annals of Neurology*. 1987. V. 21. No. 3. P. 268–273.
3. Sysoeva M.V., Lüttjohann A., van Luijteleaer G., Sysoev I.V. Dynamics of directional coupling underlying spike-wave discharges // *Neuroscience*. 2016. V. 314. P. 75–89.
4. Clive WJ Granger. Investigating causal relations by econometric models and cross-spectral methods // *Econometrica: Journal of the Econometric Society*. 1969. P. 424–438.
5. Maksim V. Kornilov, Tatiana M. Medvedeva, Boris P. Bezruchko, Ilya V. Sysoev. Choosing the optimal model parameters for Granger causality in application to time series with main timescale // *Chaos, Solitons & Fractals*, 82. 2016. 11-21.
6. Schreiber, T. Measuring Information Transfer // *Physical Review Letters* 85. 2000. 461–464.

## РЕГИСТРАЦИЯ И АНАЛИЗ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОННОЙ СЕТИ IN VITRO REGISTRATION AND ANALYSIS OF ELECTRIC ACTIVITY OF NEURAL NETWORK IN VITRO

*Денисов А.А.<sup>1,2</sup>, Булай П.М.<sup>1</sup>, Питлик Т.Н.<sup>1</sup>,  
Досина М.О.<sup>2</sup>, Пашкевич С.Г.<sup>2</sup>, Кульчицкий В.А.<sup>2</sup>, Черенкевич С.Н.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, denisov<a>bsu.by

<sup>2</sup>Институт физиологии НАНБ, Минск, Беларусь

Культивируемые диссоциированные нейроны, образующие связи *in vitro*, являются уникальной системой, представляющей живую биологическую нейронную сеть, развивающуюся в полностью искусственных условиях. Данная перспективная модель для изучения базовых механизмов функционирования нервной ткани требует применения специальных инструментов для интерфейса с нейронами. Наиболее прямой метод взаимодействия с культивируемыми нейронами основан на использовании микроэлектродных матриц для регистрации и стимуляции электрической активности. Современные решения, использующие микроэлектронные полупроводниковые датчики со встроенными усилителями, могут иметь десятки тысяч регистрирующих электродов. Тем не менее, классический подход, основанный на использовании пассивных планарных микроэлектродов, по-прежнему актуален для современных приложений. Основными преимуществами традиционных планарных микроэлектродных массивов являются простота конструкции и (в случае прозрачной подложки) возможность визуализации развития клеток с помощью стандартного инвертированного микроскопа.

Типичные системы взаимодействия с культивируемыми нейронами включают микроэлектродные датчики, усилители и стимуляторы, интерфейсные платы, программное обеспечение для сбора и обработки данных. Современные специализированные интегральные микросхемы для записи биопотенциалов и сбора

данных позволяют создавать относительно простые решения для многоканальной регистрации. Нами разработана расширяемая многоканальная система усиления с модульным дизайном, предназначенная для работы с культивируемыми нейронными сетями.

Для взаимодействия с культивируемыми нейронами разработан 64-канальный микроэлектродный датчик электрической активности, состоящий из плоской стеклянной основы с прозрачными проводящими электродами из оксида индия-олова и изоляции на основе фоторезиста. Для обеспечения жизнедеятельности нейронов на датчике размещается мини-инкубатор из полидиметилсилоксана. Электронная часть 64-канальной системы усиления основана на элементной базе фирмы Intan Technologies, США. Для проведения экспериментов диссоциированные нейроны новорожденных крыс выращивали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе на сенсорах, покрытых поли-D-лизинном, в течение по меньшей мере 10 дней *in vitro*. Анализ полученных данных проводили с применением специального программного обеспечения, разработанного на основе существующих проектов с открытым исходным кодом.

С применением разработанной системы регистрации получены характерные паттерны электрической активности биологической нейронной сети, включающие как отдельные спайки, так и локальную и нейросетевую пачечную активность. В результате анализа полученных данных установлена временная корреляция паттернов активности в различных областях сети, свидетельствующая о наличии сформированных функциональных синаптических связей между группами нейронов *in vitro*.

Несмотря на простую двумерную структуру и ограниченные размеры, нейронная сеть *in vitro* демонстрирует сложное поведение. Одной из известных особенностей функционирования нейронных сетей *in vitro* является чрезвычайное разнообразие пространственно-временных паттернов электрической активности, затрудняющее их анализ. Актуальной задачей является разработка специальных методов для дискриминации стохастических и детерминированных сетевых событий, поскольку биологическая нейронная сеть *in vitro* рассматривается как перспективная экспериментальная модель для изучения механизмов обучения. Конечная цель экспериментов с такими сетями – воспроизведение процессов обучения и памяти, характерных для мозга. Однако, несмотря на интенсивную научную работу в данном направлении в течение последних двух десятилетий, эта цель в настоящее время не считается явным образом достигнутой.

Один из подходов к снижению вариабельности электрической активности и повышению предсказуемости реакции на внешние стимулы может быть основан на формировании упорядоченной нейронной сети.

Рассматриваемая экспериментальная модель представляет собой двумерную сеть, поскольку она формируется на плоской подложке. Современные методы культивирования клеток дают возможность создавать трехмерные клеточные структуры с топологией, напоминающей нейронные сети *in vivo*. Подобная сеть *in vitro* имеет более продолжительный и сложный ответ на внешнюю стимуляцию по сравнению с двумерной.

Дальнейшее развитие разрабатываемых нами методов в области взаимодействия с биологическими нейронными сетями *in vitro* включает вышеупомянутые подходы и направлено на создание упорядоченной трехмерной нейросетевой структуры, иммобилизованной на планарном сенсоре. С этой производится отработка методов формирования упорядоченных структур из нейронов в гидрогелевой основе с применением методов 3D-печати.

---

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СВОЙСТВА ГАМК-ЭРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА, СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬЦИЙ-ПРОНИЦАЕМЫЕ КАИНАТНЫЕ ИЛИ AMPA-РЕЦЕПТОРЫ

### IDENTIFICATION AND PROPERTIES OF HIPPOCAMPAL GABA-ERGIC NEURONS CONTAINING CALCIUM-PERMEABLE KAINATE OR AMPA-RECEPTORS

Зинченко В. П.<sup>1</sup>, Гайдин С. Г.<sup>1</sup>, Теплов И. Ю.<sup>1</sup>, Косенков А.М.<sup>1</sup>, Сергеев А.И.<sup>1</sup>,  
Долгачева Л. П.<sup>1</sup>, Тулеуханов С.Т.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт клеточной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия, vprz@mail.ru

<sup>2</sup> Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, Алматы, Казахстан, sultan.tuleuhanov@kaznu.kz

Кальций-проводящие каинатные и AMPA рецепторы (CP-KAR) и (CP-AMPA) обладают уникальными свойствами, позволяющими им наряду с NMDA рецепторами играть ведущую роль в регуляции синаптической передачи в нейронах различного типа. Суммарный эффект активаторов этих рецепторов в нейронной сети зависит от соотношения тормозных и возбуждающих сигналов. Так, активация CP-KARs может вызывать увеличение высвобождения глутамата и усиление синаптической передачи [1]. С другой стороны, агонисты Ca<sup>2+</sup>-проницаемых KA/AMPA рецепторов увеличивают секрецию ГАМК [2] и тормозят синаптическую передачу. Активация CP-KA рецепторов, локализованных в пресинаптической мембране в ГАМКергических нейронах индуцирует секрецию ГАМК и повышает тоническое торможение пирамидальных нейронов [3]. CP-AMPA рецепторы участвуют во множественных формах синаптической пластичности, включая долговременные потенциацию и депрессию [4]. Особенно интенсивно данный процесс протекает в постнатальный период.

Кроме того, аномальная экспрессия CP-AMPA отмечена при наркотической зависимости и нарушениях памяти [5]. CP-AMPA локализованы в интернейронах постсинаптически [6]. Они увеличивают дендритный входной сигнал, усиливают секрецию ГАМК и подавляют активность определенных популяций нейронов в сети. CP-AMPA, как и KARs, отличаются отсутствием десенситизации. Механизм, с помощью которого CP-KA и CP-AMPA-рецепторы усиливают высвобождение нейротрансмиттеров, во многом неясен.

Две минорные популяции нейронов, содержащие CP-KAR, или CP-AMPA, идентифицированы нами в культуре клеток гиппокампа по характерному  $Ca^{2+}$ -сигналу в ответ на агонисты этих рецепторов домоевую кислоту (DA) и АТРА. В качестве антагониста CP-AMPA использовали NASPM. Обе субпопуляции нейронов положительно окрашивались антителами против глутаматдекарбоксилазы 65/67, что указывало на ГАМКергичность этих нейронов. Обе субпопуляции нейронов генерировали быстрый, высокоамплитудный и продолжительный  $Ca^{2+}$ -сигнал без десенситизации в ответ на аппликацию DA. Селективный агонист CP-KAR, АТРА, увеличивал концентрацию свободного кальция в цитозоле  $[Ca^{2+}]_i$  только в одной субпопуляции ГАМКергических нейронов.  $Ca^{2+}$ -сигнал, индуцированный DA во второй субпопуляции, полностью подавлялся ингибитором CP-AMPA, NASPM. NASPM увеличивал амплитуду кальциевого ответа на DA в нейронах, содержащих CP-KAR, демонстрируя, что ГАМКергические нейроны, содержащие CP-AMPA, иннервируют ГАМКергические нейроны, содержащие CP-KAR. Причем, в иннервации участвуют метаботропные ГАМК(B) рецепторы. Увеличение активности тормозных нейронов, содержащих CP-KAR, коррелирует с DA-индуцированным снижением активности большой субпопуляции возбуждающих, нейронов, что указывает на их иннервацию тормозными нейронами, содержащими CP-KAR. Показано, что быстрое повышение  $[Ca^{2+}]_i$  в ГАМКергических нейронах, содержащих CP-KAR, подавляет гипервозбуждение в большой популяции нейронов в культуре. Таким образом, в работе идентифицированы два подтипа ГАМКергических нейронов, содержащих CP-KAR и CP-AMPA. Эти нейроны генерируют высокоамплитудный  $Ca^{2+}$  - сигнал без десенситизации в ответ на аппликацию агонистов KA рецепторов и иннервируют различные субпопуляции нейронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки МОН РК по гранту AP05133528.

1. Lauri S.E. et al. Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses // *Neuropharmacology* 2001. Vol. 41. P. 907.
2. Cobb S.R. et al. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons // *Nature* 1995. Vol. 378. P. 75.
3. Jiang L. et al. 2001. A kainate receptor increases the efficacy of GABAergic synapses *Neuron* Vol. 30.P. 503.
4. Asrar S. et al.  $Ca^{2+}$  Permeable AMPA Receptor Induced Long-Term Potentiation Requires PI3/MAP Kinases but Not Ca/CaM-Dependent Kinase II // *PLoS ONE* 2009. Vol. 4. e4339.
5. Jason D. Shepherd Memory, plasticity, and sleep – a role for calcium permeable AMPA receptors? // *Front. Mol. Neurosci.*, 2012 <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00049>
6. Albuquerque C. et al. Detection of Neurons Expressing Calcium- Permeable AMPA Receptors Using Kainate-Induced Cobalt Uptake // in *Ion Channel Localization: Methods in Pharmacology and Toxicology*. Eds. A. Lopatin, C.G. Nichols. Humana Press, p. 297 2001.

## ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОГО СЕПСИСА НА КОГНИТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ И НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ У МЫШЕЙ

### RESEARCH OF THE INFLUENCE OF EXPERIMENTALLY INDUCED SEPSIS AT COGNITIVE ABILITIES AND NEUROLOGICAL EFFECTS IN MICE

*Илюкина Н.А.<sup>1</sup>, Белоусова И.И.<sup>2</sup>, Кузьмина Д.М.<sup>1,2</sup>, Лапшин Р.Д.<sup>2</sup>, Старкина О.В.<sup>1</sup>, Василев Ч.Л.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Россия; [letjagaletjaga@yandex.ru](mailto:letjagaletjaga@yandex.ru)

Сепсис является результатом мощного неконтролируемого воспалительного ответа системы врожденного иммунитета против патогенов и также является одной из основных причин смерти в мире. Специфические лекарственные средства для лечения сепсиса пока не существуют. Иммуноглобулиновые препараты для венозного введения содержат иммуноглобулины класса G, полученные от большой группы здоровых доноров плазмы. Препараты содержат антитела к антигенам многих бактерий, вирусов и даже к некоторым антигенам собственного организма – то есть являются полиспецифичными [1]. В последнее время были разработаны технологии для дополнительного увеличения их полиспецифичности. В одном из вариантов повышение полиспецифичности достигалось воздействием низких концентраций ионов железа Fe(II). Подобные препараты имеют терапевтический потенциал [2].

Но даже после перенесенной болезни состояние пациентов остается под пристальным вниманием врачей, так как после тяжелого сепсиса у людей развиваются иммунологические осложнения, когнитивные и физические нарушения, что приводит к неспособности вернуться к работе и снижению показателей качества жизни. Более половины выживших после тяжелого сепсиса, ежегодно выписываемых из больницы, умирают в течение 5 лет [3]. Диагностика, механизмы возникновения и лечение когнитивных нарушений после сепсиса до сих пор остаются неясными.

Чтобы исследовать механизмы, лежащие в основе когнитивных нарушений у выживших после сепсиса пациентов, была разработана мышиная модель экспериментально индуцированного полибактериального сепсиса с лечением модифицированным ионами Fe(II) иммуноглобулиновым препаратом.

Целью настоящей работы является изучение когнитивных и неврологических последствий у мышей, перенесших экспериментально индуцированный сепсис и оценка влияния на состояние животных иммуноглобулинового препарата, модифицированного ионами Fe(II). В связи с этим были поставлены следующие задачи: оценить процент выживших после сепсиса животных, провести поведенческое фенотипирование выживших животных контрольной группы и получавшей исследуемый препарат с целью выявления изменений общего здоровья, нарушений сенсомоторных функций и когнитивных изменений.

Полибактериальный сепсис вызывали посредством внутривентральных инъекций человеческой фекальной суспензии самцам мышей C57BL/6. В отличие от других моделей сепсиса для данного метода характерен более длительный период развития системного воспаления – сходного с тем, что характерно для клинической картины, наблюдаемой у пациентов. Также преимуществом выбранной модели является возможность вызвать сепсис различной степени тяжести путем изменения количества вводимой фекальной суспензии. После индукции сепсиса мыши получали дозы нативного и модифицированного иммуноглобулина G. Контрольные животные получали инъекции физиологического раствора. Оценку функционального состояния нервной системы проводили спустя 4 недели после заражения.

Моделирование бактериального сепсиса в контрольной группе вызывало смертность 64% мышей. Проведено исследование сенсомоторных функций, координации и мышечного тонуса, а также когнитивных изменений у выживших животных. Проведено патоморфологическое исследование внутренних органов выживших животных. Согласно литературным данным, в мозге мышей, перенесших сепсис, с помощью световой и электронной микроскопии выявляются признаки выраженной нейрональной дегенерации [4].

Таким образом, проведена оценка показателей выживаемости в новой модели бактериального сепсиса. Получены образцы тканей головного мозга для исследования анатомических изменений, лежащих в основе обнаруженных в ходе эксперимента когнитивных изменений.

1. Gonnert F.A., Recknagel P. et al. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model // J. of Surgical Research. 2011. V. 170, P. 123-134.
2. Djoumerska-Alexieva I., Roumenina L. et al. Intravenous immunoglobulin with enhanced polyspecificity improves survival in experimental sepsis and aseptic systemic inflammatory response syndromes // J. Mol. Med. 2015. V. 21. P. 1002-1010.
3. Chavan S.S., Huerta P.T., Robbiati S. et al. HMGB1 Mediates Cognitive Impairment in Sepsis Survivors // Mol. Med. 2012. V. 18. №1. P. 1359.
4. Белобородова Н.В., Острова И.В. Сепсис-ассоциированная энцефалопатия (обзор) // ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ, 2017, Т.13, №5, С.121-139.

## **МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА «ТЕМНО-СВЕТЛАЯ КАМЕРА» ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ТРЕВОГИ**

### **LIGHT-DARK BOX TEST MODIFICATION IN NEUROBIOLOGICAL RESEARCHES OF ANXIETY**

*Кравченко С.В.<sup>1</sup>, Каде А.Х.<sup>1</sup>, Рыбакова О.Г.<sup>1</sup>, Гравченко М.А.<sup>1</sup>, Шадже Е.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар, E-mail: ksv.1991@yandex.ru

<sup>2</sup>ГБУЗ РА "Тахтамукайская ЦРБ", а. Тахтамукай

Поведенческое тестирование – группа методов в нейробиологии, позволяющая понять основные механизмы интегративной деятельности нервной системы, которые впоследствии могут быть применены в моделировании её работы и при разработке систем искусственного интеллекта [1]. Моделирование депрессии, тревожных расстройств, хронического психоэмоционального стресса и др. позволяет изучить этиологию и патогенез психических нарушений и протестировать средства их коррекции. Широко распространённым тестом является «темно-светлая камера», основанная на склонности грызунов избегать освещенные места, противостоящей склонности к исследованию нового окружения [2]. Для его выполнения необходима установка



из двух сообщающихся отсеков – затемненного и ярко освещенного. Оценивается время, проведенное животным в каждом отсеке, количество переходов и другие параметры [3, 4]. Для успешного выполнения теста «темно-светлая камера» и получения достоверных данных, необходимо соблюдать условия, исключающие влияние посторонних факторов на поведение животных, особенно при исследовании тревожности. Одним из таких факторов является запах предыдущих животных, для удаления которого после каждого тестирования дно и стенки установки очищают моющими средствами [5].

Целью данной работы явилась модификация теста «темно-светлая камера» для применения в нейробиологических исследованиях проявлений тревоги.

Исследование выполнено на 40 нелинейных самцах крыс массой  $170 \pm 25$  г. Каждое животное проходило тест «темно-светлая камера» [2, 4], в протокол выполнения которого авторами были внесены модификации. Установка, использовавшаяся для выполнения теста, представляла собой емкость  $60 \times 30 \times 30$  см, разделенную на два равных отсека перегородкой с отверстием. Один отсек имел стенки белого цвета и ярко освещался, стенки другого были черными, и он закрывался крышкой. Дно установки было съёмным и позволяло устанавливать пленку, которая заменялась после каждого животного по алгоритму. Вначале тестирования крыса помещалась в освещенный отсек установки с размещенной на дне пластиковой пленкой, после чего в течение 5 минут оценивалось время, проведенное в нем. После завершения теста животное извлекалось из установки и помещалось в домашнюю клетку, пленка с болюсами дефекации и иными следами пребывания крысы извлекалась, боковые стенки очищались по стандартным методикам. Полученные величины пребывания животных в светлом отсеке в секундах были обработаны в программе «Statistica 12» (StatSoft Inc., США) при помощи инструментов описательной статистики и представлены в виде медианы, нижнего (25%) и верхнего (75%) квартилей ( $Me(Q1-Q3)$ ).

Во время нахождения в установке крысы демонстрировали стандартное поведение животных в тесте «темно-светлая камера» – после помещения в светлый отсек и изучения обстановки, животные переходили в темный отсек. В течение теста крысы демонстрировали переходы из одного отсека в другой, выглядывание из светлого отсека в темный и наоборот, вертикальную активность с опорой на стенку установки передними лапами и без неё, поочередное нахождение в каждом отсеке. Медиана времени нахождения в светлом отсеке в секундах составила 252(185-284). У крыс не наблюдалось повешенного внимания к участкам, где были фекальные болюсы и пятна уринации предыдущего животного, что говорит о надежной защите дна установки пленкой и предотвращении влияния следов пребывания предыдущего животного на поведение следующего. Так же использование пленки вместо очистки дна установки моющими средствами перед каждой процедурой тестирования позволяет оптимизировать время подготовки к тестированию следующего животного.

Изменения, внесенные в тест «темно-светлая камера» позволяют эффективно применять его в нейробиологических исследованиях тревоги, при этом использование одноразовой пластиковой пленки вместо очистки дна установки детергентами перед каждой процедурой тестирования позволяет оптимизировать процесс подготовки установки к очередному тесту, исключая искажение результатов следами пребывания предыдущих животных в установке.

1. Gao Z., Shi Q., Fukuda T., Li C., Huang Q. An overview of biomimetic robots with animal behaviors //Neurocomputing. 2019. Т. 332. Стр. 339-350.
2. Serchov T., van Calker D. Light/Dark Transition Test to Assess Anxiety-like Behavior in Mice //Neuron. 2015.
3. Belovicova K., Bogi E., Csatlosova K., Dubovicky M. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats //Interdisciplinary toxicology. 2017. Т. 10. №. 1. Стр. 40-43.
4. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.
5. Seibenhener M. L., Wooten M. C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice //JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2015. №. 96. Стр. e52434.



## ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ У КРЫС

### USING TRANSCRANIAL ELECTRICAL STIMULATION FOR PSYCHO-EMOTIONAL DISTURBANCE CORRECTION IN RATS

*Кравченко С.В.<sup>1</sup>, Каде А.Х.<sup>1</sup>, Лупна А.А.<sup>1</sup>, Диденко В.К.<sup>1</sup>, Шадже Е.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар, E-mail: ksv.1991@yandex.ru

<sup>2</sup>ГБУЗ РА "Тахтамукайская ЦРБ", а. Тахтамукай

Наиболее распространенной группой психических расстройств являются тревожные расстройства – примерно 30-40% населения сталкивались как минимум с одним тревожным эпизодом. Для данной группы характерна частая коморбидность с другими нарушениями психики [1]. Изучение механизмов возникновения тревожных расстройств выявило их взаимосвязь с изменением функционирования митохондрий. Возникающий из-за нарушений в работе митохондрий оксидативный стресс, обуславливают роль митохондриальных нарушений в патогенезе депрессии и тревожности [2]. Потенциальным способом коррекции тревожных расстройств может стать применение транскраниальной электростимуляции – ТЭС-терапии, разработанной в 1985 г. проф. В.П. Лебедевым. В его основе лежит селективная активация структур антиноцицептивной системы головного мозга под влиянием тока особых характеристик – чередование постоянного тока силой 3 мА и импульсного тока силой 1,5-2 мА, частотой 77 Гц, длительностью импульса  $3,75 \pm 0,25$  мс, в соотношении 2-5:1. Выделение эндогенных опиоидных пептидов, таких, как  $\beta$ -эндорфин обеспечивает гомеостатический, стресс-протекторный, органопротективный и другие эффекты ТЭС [3].

Целью данного исследования явилась оценка эффективности транскраниальной электростимуляции для коррекции тревогоподобного поведения у крыс.

Исследование выполнялось на 145 белых нелинейных самцах крыс с исходной массой тела -  $170 \pm 25$  г. Поскольку исследование выполнялось на животных, для характеристики состояния крыс корректным термином будет «патологическое тревогоподобное состояние», являющееся аналогом тревожного расстройства у человека. Индикатор тревогоподобных состояний — тревогоподобное поведение. Патологическое тревогоподобное состояние у крыс формировалось на фоне ротенон-индуцированного паркинсонизма, моделируемого по методикам, описанным Н.А. Малиновской [4]. В процессе формирования ротенонного паркинсонизма погибло 25% животных, что предусмотрено использованной моделью. Выжившие крысы разделялись на две группы по 40 животных: с экспериментальной моделью паркинсонизма без лечения (сравнения) и с экспериментальной моделью паркинсонизма, которым проводили 7 сеансов ТЭС-терапии с помощью модифицированного двухпрограммного электростимулятора «ГРАНСАИР-03» (основная). Оценка тревогоподобного поведения выполнялась в тесте «темно-светлая камера». Оценивались общий уровень горизонтальной активности (общее количество пройденных секторов) и уровень горизонтальной активности в центре (количество пройденных секторов в центральной части). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью «Statistica 12». Гипотеза о типе распределения проверялась посредством критерия Шапиро-Уилка. Поскольку распределение отличалось от нормального, использовались методы непараметрической статистики. Данные представлялись в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me(Q1-Q3)). Для парного сравнения двух независимых групп использовался U-критерий Манна-Уитни (MW-test). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

До прохождения крысами основной группы ТЭС-терапии, показатели общей горизонтальной активности группы сравнения (41(21-51)) и основной (33(18-56)) не имели различий ( $p = 0,792$ ). Горизонтальная активность в центре у группы сравнения (5,5(2-9)) и основной (4,5(2-8,5)) так же не демонстрировали различий ( $p = 0,546$ ). После недельного курса ТЭС-терапии, крысы основной группы демонстрировали в 2,63 раза больший уровень ( $p=0,009$ ) общей исследовательской активности (58(2-85)), чем крысы из группы сравнения (22(6-28)). Кроме того, крысы из основной группы после прохождения ТЭС показали в 1,5 раза больший уровень ( $p=0,037$ ) исследовательской активности (3(2-6) центра арены, чем крысы из группы сравнения (2(2-2))).

Полученные результаты свидетельствуют о снижении выраженности тревогоподобного поведения у крыс после 7-дневного курса ТЭС-терапии, в сравнении с крысами, не подвергавшимися её воздействию. Это позволяет сделать вывод об эффективности транскраниальной электростимуляции для коррекции тревогоподобного поведения у крыс с ротенонной интоксикацией и анксиолитической активности испытанного метода.

1. Ладыженский М. Я., Городничев А. В., Костюкова Е. Г. Актуальные тенденции в терапии тревожных расстройств // Современная терапия психических расстройств. 2014. №. 3. Стр. 15-22.
2. McCann R. F., Ross D. A. So happy together: The storied marriage between mitochondria and the mind // Biological psychiatry. 2018. Т. 83. №. 9. Стр. e47-e49.
3. Липатова А. С. Поляков П.П., Каде А.Х. [и др.] Влияние транскраниальной электростимуляции на выносливость крыс с разной устойчивостью к стрессу // Биомедицина. 2018. №. 1. Стр. 84-91
4. Малиновская Н. А., Моргун А.В., Панина Ю.А. [и др.] Крысиные ротенонные модели болезни Паркинсона (обзор литературы) // Научные труды SWorld. 2012. Т. 43. №. 4. Стр. 77-86.

**МЕТОД ЛОКАЛЬНОЙ АППРОКСИМАЦИИ СПЕКТРАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧИ КЛАССИФИКАЦИИ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ: НЕЙРОСЕТЕВОЙ ПОДХОД**

**THE METHOD OF LOCAL APPROXIMATIONS OF SPECTRAL POWER TO SOLVE THE PROBLEM OF EEG PATTERN RECOGNITION: NEURAL NETWORK APPROACH**

*Д.М. Лазуренко*

НИТЦ Нейротехнологий Южного федерального университета (ЮФУ), Ростов-на-Дону, Россия,  
dmlazurenko@sfedu.ru

Нейросетевые методы классификации электрографических паттернов биоэлектрической активности мозга человека получили значительное развитие с появлением технологии немышечного и невербального канала коммуникации и управления в контуре интерфейсов «Мозг-Компьютер» (ИМК). Согласно мнению ведущих специалистов, решение задачи идентификации специфических паттернов электроэнцефалограммы (ЭЭГ), сопряжённых с произвольно генерируемыми командам управления, лежит в области разработки новых подходов и методов, способных к интеллектуальному поиску закономерностей в биологических сигналах и реконфигурации собственной архитектуры в процессе их функционирования. Повышение эффективности нейроинтерфейсов, прежде всего, связано с интеграцией возможностей и преимуществ различных классификаторов биоэлектрической активности мозга, прежде всего, в нейросетевом базисе. Целью настоящего исследования являлась разработка нового нейросетевого подхода для идентификации и классификации специфических ЭЭГ-паттернов, сопровождающих произвольное выполнение идеомоторных актов верхними и нижними конечностями.

В исследовании приняли участие 15 обследуемых (10 мужчин и 5 женщин) в возрасте от 23 до 42 лет (средний возраст  $32.5 \pm 9.5$  года). Замкнутый контур интерфейса «Мозг-компьютер» включал в себя: усилитель биопотенциалов «Энцефалан-131» (Медиком-МТД) и программное обеспечение Krinc-BCI, предназначенное для детектирования и классификации мысленно выполняемых движений конечностями в режиме реального времени. Регистрация ЭЭГ осуществлялась монополярно от 13 стандартных отведений по международной системе «10-20»: F7, F8, F3, Fz, F4, C3, Cz, C4, P3, Pz, P4, O1, O2. В основе разработанного нейросетевого метода классификации ЭЭГ лежал специализированный комитет Радиально-базисных (RBF) функций с определением порога дискриминации классов методом медианы и анализом протяжённых паттернов ответов RBF-сетей. Входом для каждой нейронной сети являлись признаки, извлекаемые из ЭЭГ методом быстрого преобразования Фурье, а именно, спектральная мощность (SpM). Для учета временной структуры паттернов ЭЭГ применялся разработанный интерпретатор последовательности ответов нейронных сетей. Задача интерпретатора состояла в организации кооперативной работы нейронных сетей, которая была направлена на минимизацию ошибок классификации. Особенности разработанного нейросетевого метода классификации ЭЭГ являлись: использование градиентного метода настройки компонентов вектора ширины RBF-функций с регуляризацией; использование медианного способа определения порога для построения дискриминирующих границ между целевыми классами; детектирование ЭЭГ-паттерна мысленного движения посредством анализа длины и содержания последовательности ответов каждой RBF-сети комитета; формирование новых метрик идеомоторных ЭЭГ-паттернов на основе показателей спектральной мощности различных областей коры больших полушарий головного мозга.

Сравнительный анализ показал, что разработанный нейросетевой метод локальной аппроксимации спектральной мощности, основанный на использовании специализированного комитета RBF-функций, позволяет повысить надёжность и точность классификации целевых идеомоторных паттернов ЭЭГ, в среднем, до  $82 \pm 1.2\%$ , по сравнению с методом Случайных Деревьев (78%), классификатором Фишера (79%) и методом Линейной Регрессии (77%). В условиях снижения размерности признакового пространства до шести отведений ЭЭГ (F3, F4, C3, C4, Cz, Pz) и трёх частотных диапазонов (альфа, гамма-1 и гамма-2) точность классификации идеомоторных ЭЭГ-паттернов достоверно возросла, причём практически у всех тестируемых моделей классификаторов. Указанный прирост точности для метода Случайных Деревьев составил до 8%, классификатора Фишера – 6%, Линейной Регрессии - 5%. Разработанный метод локальной аппроксимации спектральной мощности на основе RBF-функций продемонстрировал прирост точности детектирования целевых паттернов ЭЭГ на 7-9% в различных тестовых выборках, позволив повысить точность классификации до 89-90%.

Опираясь на полученные результаты, есть основания полагать, что разработанный метод локальной аппроксимации спектральной мощности ЭЭГ-паттернов активности мозга может быть положен в основу перспективных самообучающихся моделей нейронных сетей с реконфигурируемой (в т.ч., достраиваемой при повышении сложности решаемой задачи) архитектурой, что является предметом проводимых нами в настоящее время исследований. Указанный подход, с одной стороны, позволит значительно повысить надёжность канала невербальной и немышечной коммуникации в рамках технологии нейроинтерфейсов, с другой – с практической точки зрения решить задачу трансфера технологии из исследовательских лабораторий в среду конечного пользователя.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки № 2.955.2017/4.6

**РОЛЬ КИНАЗ PAK4 И MAP3K5 В АДАПТАЦИИ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР НЕРВНЫХ КЛЕТОК К ДЕЙСТВИЮ ГЛЮКОЗНОЙ ДЕПРИВАЦИИ IN VITRO**

**THE ROLE PAK4 AND MAP3K5 KINASES IN THE ADAPTATION OF PRIMARY HIPPOCAMPAL CULTURES TO THE ACTION OF GLUCOSUS DEPRIVATION IN VITRO**

*М.М. Логинова<sup>1</sup>, Т.А. Мищенко<sup>1,2</sup>, Ведунова М.В.<sup>1</sup>, Е.В. Митрошина<sup>1,2</sup>*

1 - Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород

2 - Приволжский исследовательский медицинский университет, г. Нижний Новгород

Исследование молекулярно-клеточных механизмов, участвующих в реализации адаптации нервных клеток к ишемическому повреждению – одна из наиболее актуальных задач как нейробиологии, так и фундаментальной медицины. Глюкозная депривация рассматривается как один из основных факторов повреждения клеток головного мозга при ишемическом повреждении. Длительное нарушение энергетического обмена нейронов приводит к нарушению процессов синаптической передачи, гибели клеток и разрушению нейронных сетей головного мозга. Одним из потенциальных молекулярных триггеров, участвующих в реализации защитных функций клетки являются ферменты киназы, входящие в состав различных метаболических путей. В настоящее время роль многих нейрональных внутриклеточных киназ при действии повреждающих факторов ишемии остается неизученной. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение роли киназ в адаптации нервных клеток к действию глюкозной депривации и в реализации различных типов клеточной смерти (апоптоз/некроз), индуцируемых моделируемым стресс-фактором.

Объектом исследования явились первичные культуры клеток гиппокампа головного мозга, полученные от эмбрионов мыши (E18). Моделирование глюкозной депривации *in vitro* выполнялось на 14 день культивирования первичных культур. Оценка жизнеспособности первичных культур выполнялась с помощью окрашивания бис-бензимидамом и пропидий иодидом. Для регистрации кальциевой активности клеток первичных культур гиппокампа применялся кальций-чувствительный краситель Oregon Green 488. Регистрации временных серий флуоресценции осуществлялась с помощью конфокального микроскопа Zeiss 510 LSM. Дифференциальное маркирование апоптоза и некроза проводилась с помощью окрашивания аннексином V и пропидий иодидом.

В работе было исследовано около 50 киназ, среди них киназы c-Raf, PAK4, MAP2K1, MAP2K2, p38a, p38b, которые участвуют в RAS/MAPK сигнальном пути, который является одним из ключевых и наиболее хорошо изученных сигнальных путей, и киназы p38MAPK, JNK3, MAP3K5, NIK, участвующие в каскаде, активируемом TNF-а-рецептором, активация которого влияет на активность иммунных клеток, индукцию апоптоза, воспаления и ингибирует опухолегенез и репликацию вируса. Анализ жизнеспособности первичных культур нервных клеток показал, что киназы PAK4 и MAP3K5 являются необходимыми для поддержания жизнеспособности первичных культур нейронов. Ингибитор PAK4 достоверно снижал число живых клеток на 7 сутки в 1,3 раза. Была проведена оценка роли данных киназ в адаптации первичных культур коры головного мозга к глюкозной депривации на 7 сутки. Показано, что глюкозная депривация вызывает достоверное снижение жизнеспособных клеток (в группе «Глюкозная депривация» 77,8±4,92%, «Интактная» 96,05±2,29%). Блокада киназ PAK4 (68,46±2,28%) и MAP3K5 (42,23±3,36%) приводила к достоверному снижению числа живых клеток по сравнению с группой «Глюкозная депривация».

На втором этапе работы было проведено исследование роли киназ PAK4 и MAP3K5 в функциональной активности первичных клеточных культур. В интактных культурах наблюдалась спонтанная кальциевая активность, процент работающих клеток составлял 57,32±11,74. На 7 сутки после внесения ингибиторов происходило достоверное снижение спонтанной кальциевой активности (при аппликации PAK4 - 2,79±1,49%, при MAP3K5 - 33,68±12,49% работающих клеток). Показано, что глюкозная депривация приводит к угнетению кальциевой активности. Зарегистрировано достоверное снижение числа работающих клеток (46,345±11,6%) по сравнению с интактной группой. При моделировании глюкозной депривации и добавлении ингибитора PAK4 киназы число работающих клеток составляло 10,78±4,29%, а при добавлении ингибитора MAP3K5 - 13,67±5,03%. Также, в экспериментальных группах происходило снижение частоты кальциевых осцилляций. Таким образом, ингибирование киназ PAK4 и MAP3K5 приводит к снижению кальциевой активности, как при нормоксии, так и при моделировании глюкозной депривации.

На третьем этапе исследования была проведена оценка типов клеточной смерти при моделировании глюкозной депривации и блокаде PAK4 и MAP3K5 киназ.

Исследование выполнено при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (проект №18-015-00391, 18-315-20003 и 17-04-01128), а также гранта Президента Российской Федерации МК-1485.2019.4.

**ПАТОЛОГИЯ СТРУКТУРЫ СВЯЗЕЙ В МОЗГЕ, ВЕДУЩАЯ К РАЗВИТИЮ ПИК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ: МОДЕЛИРОВАНИЕ СЛОЖНЫМИ ИЕРАРХИЧЕСКИ ОРГАНИЗОВАННЫМИ СЕТЯМИ ОСЦИЛЛЯТОРОВ**

**PATHOLOGY OF THE COUPLING STRUCTURE IN THE BRAIN LEADING TO SPIKE-WAVE DISCHARGE DEVELOPMENT: MODELING BY COMPLEX HIERARCHICAL ORGANIZED NETWORKS OF OSCILLATORS**

***T. M. Medvedeva, M. V. Sysoeva<sup>1</sup>, A. Lüttjohann<sup>2</sup>, G. van Luijtelaa<sup>3</sup> and I. V. Sysoev<sup>4,5</sup>***

<sup>1</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
Россия, Москва, golova93tanya@gmail.com

<sup>2</sup>Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., Россия, Саратов

<sup>3</sup>Вестфальский университет имени Вильгельма, Мюнстер, Германия

<sup>4</sup>Университет Неймегена имени святого Радбода Утрехтского, Неймеген, Нидерланды

<sup>5</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

<sup>6</sup>Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Россия, Саратов

Для понимания механизмов возникновения абсансной эпилепсии важно построить модели, которые воспроизвели бы основные её особенности: спонтанное возникновение пик-волновых разрядов (ПВР) на электроэнцефалограмме и их спонтанное завершение, химическую активность нейронов, вовлечение специфических областей мозга. В настоящее время существует ряд численных моделей, способных воспроизводить те или иные особенности данного заболевания на различных уровнях детализации [1].

Открытым остаётся вопрос о том, каково значение структуры нейронной сети для возникновения ПВР. Моделирование связей между структурами мозга как сосредоточенными элементами является заметным упрощением. Важная проблема некоторых существующих моделей в том, что в них нейроны каждой из рассматриваемых структур формируют интегральный сигнал, который передаётся потом в другие структуры. Однако в действительности нейроны имеют индивидуальные проекции на нейроны другой структуры, причём далеко не на все, в то же время они могут быть не связаны с рядом находящимися нейронами той же структуры.

Предложенная модель представляет собой продолжение работы [2], в которой описана модель, построенная путём прямого моделирования. Она организована в два уровня: первый уровень состоит из трёх структур: это модель соматосенсорной области коры мозга, которая считается фокусом эпилепсии [3], модель таламуса (поскольку в модели нет деления нейронов на возбуждающие и тормозящие, нельзя говорить о том, моделью какого конкретно ядра таламуса является этот слой) и модель внешнего входа — нейронов периферии. Для моделирования укрупнённых нейронов каждого типа были использованы уравнения ФицХью-Нагумо [4].

В отличие от предложенной нами ранее модели в текущей отсутствует шум, что обеспечивает воспроизводимость результатов и возможность стабильной генерации разрядов с помощью отобранных матриц. В том числе этим обусловлено наличие подсети, генерирующей нормальную активность, так как раньше эту функцию как раз и выполнял шум.

Существенным улучшением модели с физиологической точки зрения является наличие в модели разных типов клеток — возбуждающих и тормозных. Кроме того, частота генерации разрядов теперь зависит от свойств сети, а не от свойств системы ФицХью-Нагумо. Отдельно смоделированы процессы инициации и поддержания разряда, причём инициация теперь происходит иначе — не с помощью воздействия внешнего входа, а путём усиления внутрикоровых связей.

Кроме того, модель предполагает различные виды инициации разряда, такие как кратковременное постепенное повышение внутренних связей между нейронами коры, гармоническая стимуляция и повышение связей от нейронов внешнего входа. Возможность применения высокочастотной импульсной стимуляции для прерывания разрядов представляет собой основную практическую значимость модели [5, 6].

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, грант № 19-72-10030.

1. Destexhe A. Network models of absence seizures // *Neuronal Networks in Brain Function, CNS Disorders, and Therapeutics*. Academic Press. 2014. P. 11–35
2. Tatiana M. Medvedeva, Marina V. Sysoeva, Gilles van Luijtelaa, Ilya V. Sysoev. Modeling spike-wave discharges a complex network of neuronal oscillators // *Neural Networks*. 2018. V. 98. P. 271–282
3. Meeren HK, Pijn JP, van Luijtelaa EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22:1480–1495
4. R. FitzHugh, Mathematical models of threshold phenomena in the nerve membrane // *Bull. Math. Biophysics*. 1955. V. 17. P. 257–269.
5. Bal, T., Debay, D. and Destexhe, A. (2000) Cortical feedback controls the frequency and synchrony of oscillations in the visual thalamus. *J. Neurosci*. 20, 7478–7488.
6. Blumenfeld, H. and McCormick, D.A. (2000) Corticothalamic inputs control the pattern of activity generated in thalamocortical networks. *J. Neurosci*. 20, 5153–5162.

**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TRKB РЕЦЕПТОРОВ И ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА HIF1 В ПОСТГИПОКСИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ НА ФОНЕ ПРЕВЕНТИВНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА BDNF**

**FEATURES OF TRKB RECEPTORS AND HIF1 EXPRESSION IN THE POSTHYPOXIC PERIOD IN THE CONTEXT OF PREVENTIVE CHRONIC OF NEUROTROPHIC FACTOR BDNF APPLICATION**

Мищенко Т.А.<sup>1,2</sup>, Митрошина Е.В.<sup>1</sup>, Усенко А.В.<sup>1</sup>, Епифанова Е.А.<sup>1</sup>, Бабаев А.А.<sup>1</sup>, Ведунова М.В.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, Нижний Новгород

В последнее десятилетие одним из направлений нейробиологии является поиск ключевых молекул, принимающих участие в формировании резистентности организма к гипоксическому повреждению. Особое внимание уделяется нейротрофическому фактору BDNF и гипоксия-индуцированному фактору HIF-1. BDNF участвует онтогенезе, дифференцировке, созревании нейронов, формировании синаптических контактов, и обладает сильным нейропротекторным эффектом при воздействии различных стресс-факторов в постнатальном периоде развития [1]. HIF-1 $\alpha$  является ключевой субъединицей HIF-1, экспрессия которой зависит от концентрации кислорода в клетке и является основной ответной реакцией клетки на гипоксию [2]. Мы предположили, что одним из возможных молекулярных механизмов антигипоксического и нейропротекторного действия BDNF связан с регуляцией экспрессии нейротрофином данного транскрипционного фактора. Кроме того, не менее важным остается вопрос о значимости уровня экспрессии высокоафинных рецепторов к BDNF - TrkB рецепторов - в эффективности реализации нейротрофическим фактором BDNF своих нейропротективных свойств.

Целью работы являлась оценка уровня экспрессии TrkB рецепторов и HIF-1 $\alpha$  в клетках первичных культур гиппокампа на фоне превентивного хронического применения нейротрофического фактора BDNF.

Материалом для исследований служили первичные культуры клеток, полученные из эмбриональной ткани гиппокампа мыши линии C57BL/6 (18 день гестации). Добавление нейротрофического фактора BDNF (1 нг/мл) и селективного блокатора рецептора TrkB (ANA-12) (1 мкМ) производилось ежедневно, начиная с 3-го дня культивирования *in vitro*. Моделирование острой нормобарической гипоксии проводилось на 21DIV согласно работе [3]. Для оценки уровня экспрессии TrkB-рецепторов (ген TrkB), и транскрипционного фактора HIF1 $\alpha$  (ген HIF-1 $\alpha$ ) был применен метод количественного реал-тайм ПЦР-анализа. Тотальная РНК была выделена из образцов через 24 часа после моделирования гипоксии (22 DIV) с использованием набора Extract RNA (Евроген). Затем был проведен синтез кДНК с использованием MMLV обратной транскриптазы (Евроген) и случайного праймера. Количественный РТ-ПЦР был произведен с помощью qPCRmix-HS SYBR (Евроген) на амплификаторе Applied Biosystems 7500 RT-PCR. Обработка результатов производилась методом  $\Delta\Delta C_t$  с использованием референсного образца, уровень экспрессии целевых генов в котором принимается за единицу. Нормализация производилась относительно референсного гена.

Установлено, что гипоксия приводит к значимому повышению уровня экспрессии TrkB рецепторов в первичных культурах клеток гиппокампа. Через 24 часа после моделируемого стресса уровень TrkB рецепторов превысил значения интактной группы в 1.6 раз. Схожие изменения были установлены в группе с хроническим применением BDNF. Напротив, в группах «ANA-12» и «BDNF+ANA-12» через 24 часа после гипоксического воздействия уровень экспрессии был в 33.3 и 40.6 раза ниже значений интактной группы.

Гипоксия приводит к двукратному усилению экспрессии HIF-1 $\alpha$ , что согласуется с имеющимися литературными данными. Хроническое применение BDNF позволяет предотвратить повышение продукции HIF-1 $\alpha$ , в группе «Гипоксия+BDNF» уровень экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, было в 2.7 раза ниже, чем в интактных культурах и в 5.3 раза ниже, чем в группе «Гипоксия». Блокада TrkB рецепторов не предотвращает данный эффект нейротрофического фактора головного мозга, в группе «Гипоксия+ANA12» также отмечается достоверное снижение уровня экспрессии HIF-1 $\alpha$ .

Таким образом, мы предполагаем, что одним из механизмов нейропротекторного действия хронического применения BDNF при моделировании острой гипоксии является предотвращение усиления экспрессии фактора HIF-1 $\alpha$ . Данный эффект BDNF не связан с активацией рецепторов TrkB.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (гранты №17-04-01128, 18-015-00391, 18-315-20003), гранта Президента РФ МК-1485.2019.4, а также при поддержке государственного задания (проекты 17.3335.2017/4.6 и 6.6379.2017/8.9).

1. Skaper S.D. Neurotrophic Factors: An Overview // *Methods Mol Biol.* 2018. Vol.1727.
2. Smith T.G. et al. The human side of hypoxia-inducible factor // *Br J Haematol.* 2008. Vol. 141.
3. Vedunova M.V. et al. // *Oxid Med Cell Longev.* 2015. Vol. 2015:45390.

## РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЙ РЕЦЕПТОРОВ В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ THE ROLE OF DIFFERENT STATES OF RECEPTORS IN SYNAPTIC PLASTICITY

Мурзина Г.Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва  
E-mail: gbmurzina@mail.ru

Согласно существующим экспериментальным данным состояния и количество рецепторов на постсинаптической мембране лежат в основе величины и изменений эффективности синаптической пластичности. Обучение и память, т.е. процессы продолжительностью до многих часов и лет, зависят от них. Изменения внутриклеточных процессов, вызываемых внешними воздействиями, в конечном итоге приводят либо к изменению эффективности соответствующих рецепторов (вследствие их де- или фосфорилирования, де- или метилирования и т.д.), либо к изменению количества рецепторов на мембране (вследствие изменения вязкости мембраны, активации или ингибирования их синтеза, изменения скоростей их эндо- и экзоцитоза или внутриклеточного транспорта).

Как показало моделирование и анализ полученных экспериментальных результатов исследования депрессии ацетилхолинового тока нейронов виноградной улитки на клеточном аналоге привыкания при воздействии ингибиторов ряда протинкиназ и протеинфосфатаз или уменьшении вязкости мембраны, наблюдаемые изменения входящего тока являются результатом перераспределения мембранных и внутриклеточных ацетилхолиновых рецепторов вследствие изменения скоростей их транспорта [1]. Это было подтверждено результатами воздействия на внутриклеточный транспорт рецепторов, осуществляемый как по примембранным актиновым нитям, так и внутри нейрона [2,3]. С изменениями количества ацетилхолиновых рецепторов на мембране могут быть связаны также как кратковременные, так и длительные процессы, определяющие воздействие на нервные клетки одного из популярных и широко применяемых в настоящее время в медицине ноотропных отечественных препаратов – ноопепта [4].

Используемая для расчетов математическая модель описывает основные процессы от аппликации медиатора до регистрации вызванного ацетилхолинового тока, процессы эндо- и экзоцитоза рецепторов и их латеральную диффузию на мембране (с учетом геометрических характеристик нейрона виноградной улитки), основные внутриклеточные транспортные процессы рецепторов и зависимость коэффициента латеральной диффузии рецепторов от состояния примембранной «актиновой решетки» [5].

Необходимо отметить, что согласно результатам моделирования полученные изменения ацетилхолинового тока частично могут быть связаны также с изменениями состояний ацетилхолиновых рецепторов. На состояния рецепторов влияют изменения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  (вследствие непосредственного взаимодействия ионов с рецепторами и их перехода в десенситизированное состояние), а также дефосфорилирование/фосфорилирование рецепторов различными протинфосфатазами/протеинкиназами, приводящие к их отсоединению/взаимодействию как с белками примембранного матрикса, так и отдельными рецепторами. Это вызывает переход рецепторов из «свободного» (лабильного) в «связанное» (кластерное) состояние. Возникновение десенситизированного состояния рецепторов приводит к уменьшению ответа нейрона, а лабильного – к перераспределению рецепторов между отдельными локусами мембраны или мембранным и внутриклеточным пулом рецепторов, следствием чего является возникновение гетеросинаптической пластичности или депрессии тока. В то же время кластеризация рецепторов приводит к фиксации некоторого их количества на отдельных локусах мембраны (преимущественно синаптической, что может являться основой долговременной памяти), а также вследствие исключения этих рецепторов из процесса диффузии, к увеличению общего количества мембранных рецепторов за счет их дополнительного транспорта из примембранного пула.

Математическое моделирование кластеризации рецепторов позволяет определить физические характеристики процесса, возможные его механизмы и необходимые условия длительного существования.

Работа поддержана РФФИ (грант № 17-00-00052).

1. Pivovarov A.S. et al. Mobility of acetylcholine receptors in command *Helix lucorum* neurons in a cellular analog of habituation. *Invert.Neurosci.* 2013. V. 13(2). P. 135.
2. Пивоваров А.С. и др. Роль актиновых микрофиламентов в депрессии вызванных ацетилхолином токов в нейронах виноградной улитки на клеточном аналоге привыкания // *ЖВНД* 2012. Т. 62(2). С. 222.
3. Пивоваров А.С. и др. Роль миозинов в депрессии чувствительности нейронов виноградной улитки к ацетилхолину на клеточном аналоге привыкания // *ЖВНД* 2013. Т. 63(4). С. 470.
4. Мурзина Г.Б., Пивоваров А.С. Модуляция ноопептом вызванного ацетилхолином входящего тока в нейронах виноградной улитки // *Биофизика*. 2019. Т. 64(3). С. 507.
5. Мурзина Г.Б. Влияние латеральной диффузии рецепторов на депрессию холиночувствительности нейронов. *Биофизика*. 2013. Т. 58(3). С.516.

**ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ГЕТЕРОДИМЕРНОГО РЕЦЕПТОРА К ЭРИТРОПОЭТИНУ НА БИОЭНЕРГЕТИКУ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА В ПОСТИШЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОД У МЫШЕЙ**

**ACTIVATION OF HETERODIMERIC RECEPTOR TO ERYTHROPOIETIN INFLUENCES ON THE BRAIN MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS DURING POSTISCHEMIC PERIOD IN MICE**

*Пчелин П.В., Глявина М.М., Логинов П.А., Щелчкова Н.А., Мухина И.В.*

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, ptch.pv@gmail.com

Ишемическое повреждение головного мозга продолжает быть одной из основных причин инвалидизации и смертности населения. Известно, что инсульт сопряжен с нарушением функционального состояния митохондриального аппарата и процессов клеточного дыхания. За прошедшие 17 лет было многократно показано, что цитокин эритропоэтин (ЕРО) при взаимодействии с рецепторами, способен повышать резистентность клеток мозга к повреждающим факторам ишемического стресса. Однако поскольку взаимодействие ЕРО с гомодимерным рецептором сопряжено со стимуляцией гемопоэза, его применение в качестве препарата может привести к тромботическим осложнениям у пациентов. В связи с этим, ряд исследований последних лет был направлен на поиск негемопоэтических дериватов ЕРО, опосредующих тканепротективное действие через гетеродимерный рецептор. Тем не менее, механизмы антигипоксического действия дериватов ЕРО, в частности, карбамилированного дарбепоетина (CdЕРО), связанные с митохондриальным аппаратом клеток мозга, остаются неизученными, в связи с чем цель данного исследования представляется актуальной. В дополнение к этому необходимо учитывать, что медикаментозная помощь пациентам может осуществляться как в раннем, так и в позднем периоде т.н. «терапевтического окна», которое составляет в среднем 1-6 часов после ишемии, что может влиять на характер действия препаратов.

Цель исследования: оценка влияния активации гетеродимерного рецептора к эритропоэтину агонистом CdЕРО на биоэнергетику и функциональное состояние митохондриального аппарата клеток мозга после ишемии/реперфузии у мышей при введении в ранний и поздний период «терапевтического окна».

Объект исследования: ткань больших полушарий головного мозга самцов мышей линии C57/BL6, полученная на 4, 10 и 20 сутки после моделирования ишемии/реперфузии (модель: транзиторная окклюзия средней мозговой артерии, 1 час). В качестве положительного контроля был выбран известный терапевтический агент цитиколин, обладающий выраженными нейропротекторными свойствами. Введение препаратов CdЕРО (ООО «Фармапарк», Россия), цитиколина (препарат Цераксон<sup>®</sup>, Ferrer Internacional S.A., Испания) и физраствора в контрольной группе осуществлялось внутривенно через 1 час (первая схема введения) и 6 часов (вторая схема введения) после моделирования ишемии. Оценка дыхания и функционального состояния митохондриального аппарата мозга производилась на респирометре высокого разрешения Oroboros Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Австрия). Изучение влияния препаратов на содержание белков теплового шока 70-кДа (Hsp70) в мозге, как показатель клеточного стресса, осуществлялось с применением метода иммуноферментного анализа.

Было выявлено, что введение CdЕРО приводит к стимуляции дыхания в процессе окислительного фосфорилирования (комплекс I, глутамат-малат) в отдаленном постischemическом периоде (20 сутки) на 36% ( $P=0,0095$ ) в сравнении с контролем, что соотносится с повышением сопряжения процессов окисления и фосфорилирования на 10 и 20 сутки ( $P=0,0238/0,0048$ ) и наблюдается только при второй схеме введения препарата (6 часов после ишемии). В свою очередь, цитиколин оказывает стимулирующее действие на величину потребления кислорода при отсутствии процесса окислительного фосфорилирования (комплекс I, глутамат-малат): на 34% ( $P=0,0286$ ) по сравнению с контролем на 10 сутки, что, вероятно, обусловлено повышением протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий. Данный эффект сопровождается статистически значимым увеличением (в 1,5 раза,  $P=0,0159$ ) содержания белков теплового шока Hsp70 по сравнению с контролем. Необходимо отметить, что описанное влияние цитиколина проявляется только при первой схеме введения препарата (1 час после ишемии) и может являться показателем индукции клеточного стресса на 10 сутки постischemического периода.

Таким образом, активация гетеродимерного рецептора агонистом CdЕРО при введении в поздний период «терапевтического окна» приводит к отсроченному (после 10 суток) улучшению функционального состояния и активности митохондриального аппарата мозга. CdЕРО, в сравнении с известным нейропротектором цитиколином, оказывает более положительный эффект на состояние клеточной дыхательной цепи, не приводит к выраженному повышению клеточного стресса в постischemический период.

Полученные результаты дополняют представления об антигипоксических механизмах действия гормона эритропоэтина, а также его дериватов, активирующих гетеромерные рецепторы в клетках головного мозга при ишемии/реперфузии.

## **РОЛЬ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПОЛИФОСФАТА В НЕЙРОНАХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МЕХАНОРЕЦЕПТОРА РЕЧНОГО РАКА**

### **ROLE OF INORGANIC POLYPHOSPHATE IN NEURONS AND GLIAL CELLS OF CRAYFISH STRETCH RECEPTOR**

*Негинская М.А., Бережная Е.В.*

Южный Федеральный Университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону, E-mail: nma@sfnu.ru

Неорганические полифосфаты – это биополимеры, состоящие из фосфатных остатков, которые соединены между собой фосфоангидридными. Полифосфаты обнаружены практически во всех живых организмах. В данном проекте изучались реакции нейронов и глиальных клеток механорецептора речного рака на неорганические полифосфаты различной длины (14 и 130 фосфатных остатков).

Для изучения электрофизиологических реакций нейронов использовался метод внеклеточной регистрации генерации потенциалов действия. Увеличение частоты генерации ПД наблюдалось только в ответ на добавление длинного (100 мкМ) полифосфата. Характер реакций свидетельствовал о деполяризации нейрональной мембраны, что может происходить благодаря увеличению концентрации ионов кальция в цитозоле. Однако применение ингибиторов пуриновых рецепторов (PPADS (100 мкМ) и сурамина (100 мкМ)) не привело к изменению электрофизиологической реакции на добавление длинного полифосфата, что может указывать на регуляцию ответа через потенциал-зависимые ионные каналы плазматической мембраны. Длинный полифосфат также вызывал увеличение уровня некроза глиальных, окружающих нейрон, вероятно, через активацию P2Y рецепторов глии, так как этот эффект ингибировался антагонистом пуриноцепторов PPADS (100 мкМ).

При помощи кальциевого зонда Fluo-4 были изучены изменения уровня ионов кальция в нейронах и глиальных клетках при воздействии неорганических полифосфатов различной длины. Было установлено, что короткий полифосфат (100 мкМ) вызывает увеличение уровня кальция в областях тел нейронов и дендритной части нейронов. В областях тел нейронов данное увеличение содержания кальция вероятно связано с выходом ионов  $Ca^{2+}$  из депо эндоплазматического ретикулума (ЭР) и митохондрий, так как кальциевый ответ частично ингибировался ингибитором кальциевой АТФазы ЭР, тапсигаргином (5 мкМ), и снижался при ингибировании митохондриальной поры циклоспорином А (4 мкМ). Добавление длинного полифосфата не вызывало долгосрочного изменения уровня кальция в нейронах и глиальных клетках.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что функции неорганического полифосфата в нервной ткани сильно зависят от его длины. Длинный полифосфат может регулировать электрофизиологическую активность нейронов, вероятно через модуляцию активности потенциал-зависимых ионных каналов плазматической мембраны, а также участвовать в регуляции смерти глии, тогда как короткий полифосфат не влияет на электрофизиологическую активность нейронов, но может вызывать активацию кальциевого сигнала в глиальных клетках вероятно за счет выхода кальция из внутриклеточных депо.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 17-04-01728А.

---

## **ОСОБЕННОСТИ РИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ СУБТАЛАМИЧЕСКОГО ЯДРА У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА**

### **CHARACTERISTICS OF RHYTHMIC NEURONAL ACTIVITY OF THE SUBTALAMIC NUCLEUS IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE**

*Незвинский А.А.<sup>1</sup>, Белова Е.М.<sup>1</sup>, Попов В.А.<sup>2</sup>, Томский А.А.<sup>2</sup>, Седов А.С.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ФИЦ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

<sup>2</sup>Центр Нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, 125047, Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, д. 16

Ритмическая нейронная активность распространена во всей нервной системе. Считается, что проявление ритмической активности – фундаментальное свойство нервной системы, необходимое для передачи информации между отдельными частями нервной системы. В то же время набирает популярность предположение, согласно которому, возникновение чрезмерной синхронизации ритмической активности в базальных ганглиях является одной из основных причиной двигательных расстройств у пациентов с болезнью Паркинсона. Об этом, в частности, свидетельствует тот факт, что при проведении операции глубокой стимуляции мозга в субталамическом ядре, у пациентов с брадикинезией и ригидностью наблюдается подавление выраженной активности в бета-частотном диапазоне (13-30 Гц). Таким образом, мы поставили перед собой **цель**, используя данные микроэлектродных исследований, обнаружить и классифицировать одиночные ритмические нейроны и сопоставить их характеристики с неритмическими нейронами.



Данные были получены во время 7 плановых стереотаксических операций в Центре нейрохирургии им. Н.Н.Бурденко у пациентов с болезнью Паркинсона. Записи активности одиночных нейронов прошли стадию первичной обработки в программе Spike2, включающей в себя выделение отдельных спайков по форме и амплитуде. Спектральный анализ импульсных последовательностей проводился при помощи программы NeuroExplorer. Далее были рассчитаны частоты разрядов (спайков), коэффициенты вариации межимпульсных интервалов, гистограммы и отображения Пуанкаре распределений межимпульсных интервалов, коэффициенты выраженности частотных диапазонов.

В записях активности одиночных нейронов субталамического ядра семи пациентов при помощи спектрального анализа нам удалось найти 50 одиночных ритмических нейронов. В группу альфа-активности было выделено 28 нейронов, имеющих пик на частоте 7-13 Гц, 22 нейрона – в группу бета-активности с пиком на частоте 13-20 Гц. Подробнее применяемые методы и результаты описаны в статье [1]. Наши результаты вносят вклад в понимание тонких характеристик активности ритмических нейронов субталамического ядра, в дальнейшем могут быть использованы для улучшения процедуры вживления стимулирующих электродов, а также фундаментального понимания циклов обработки и передачи информации в подкорковых структурах мозга человека.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-015-00140.

1. Белова Е.М., Незвинский А.А., и др. Активность нейронов субталамического ядра у пациентов с болезнью Паркинсона. Физиология человека. 2018. Т. 44. № 4. С. 402-411.

## ПОСТИНСУЛЬТНАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ С АФАЗИЕЙ: ДАННЫЕ ДИФФУЗИОННО-ВЗВЕШЕННОЙ ТРАКТОГРАФИИ

### THE BRAIN POST-STROKE PLASTICITY IN PATIENTS WITH APHASIA: DIFFUSION-WEIGHTED TRACTOGRAPHY DATA

**Несмеянова Е.С., Майорова Л.А.<sup>1,2</sup>, Петрушевский А.Г.<sup>1</sup>, Шкловский В.М.<sup>1</sup>, Иванова Е.Г.<sup>3</sup>, Алферова В.В.<sup>1</sup>**

Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, lenanesmeianova@gmail.com

<sup>1</sup>Центр патологии речи и нейрореабилитации, Москва

<sup>2</sup>ФГБУН Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

Исследования в области нейрореабилитации значительно продвинулось благодаря бурному развитию в последние десятилетия таких неинвазивных технологий нейровизуализации, как функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ) и **диффузионно-тензорная визуализация (ДТВ)**. В данной работе было исследовано течение постинсультной афазии для нахождения определенных предикторов восстановления функции речи среди показателей диффузии трактов белого вещества.

В текущем исследовании приняли участие пациенты (41 человек, 24 женщины, средний возраст 60 лет, SD = 10.61 лет, разброс по возрасту - 36-88 лет) с нарушением речи вследствие ишемического левополушарного инсульта, проходившие курсы реабилитации в Центре патологии речи и нейрореабилитации ДЗМ. Для получения диффузионно-взвешенных изображений использовали протокол со следующими параметрами: матрица = 70×70, поле обзора = 192×192 мм<sup>2</sup>, толщина среза = 2.7 мм, размер вокселя = 2.7 × 2.7 × 2.7 мм<sup>3</sup>; TR = 6000 мс, TE = 95 мс, EPI - фактор = 70, b = 1000 сек/мм<sup>2</sup>.

С использованием масок трактов из стандартизированного атласа *John Hopkins University White Matter Tractography* из диффузионно-взвешенных изображений были извлечены следующие параметры: фракционная анизотропия (FA), средний коэффициент диффузии (MD), коэффициенты радиальной (RD) и осевой диффузии (AD) для основных трактов белого вещества: верхнего продольного пучка (SLF), нижнего лобно-затылочного пучка (IFOF), крючковидного пучка (UF) и мозолистого тела (CC), а также кортикоспинального тракта (CST)). Состояние речевой функции оценивали с помощью стандартизированных психологических тестов [1].

В рамках данного исследования были рассмотрены результаты обследований пациентов на этапах восстановления после инсульта: 3 месяца и 12 месяцев. При первоначальном обследовании пациенты имели более низкие значения FA почти во всех исследованных трактах левого полушария. Среднее значение FA для первого периода - 0.36(0.08), для второго - 0.45(0.09), что соответствует данным предыдущих исследований [2-4]. Что касается других параметров диффузии, у пациентов в раннем периоде восстановления были более высокие значения MD, AD, RD для трактов левого полушария, чем в позднем – соответственно 1.07(0.17)/0.90(0.09) 10<sup>-3</sup> мм<sup>2</sup>/сек, 1.32(0.18)/1.10(0.12) 10<sup>-3</sup> мм<sup>2</sup>/сек и 0.95(0.10)/0.82(0.08) 10<sup>-3</sup> мм<sup>2</sup>/сек.

Для выявления паттернов, характерных для восстановления моторного и сенсорного компонентов речевой функции, был проведен корреляционный анализ данных ДТВ и нейропсихологического тестирования. Только параметр FA для левого UF был значимо связан с балльными показателями оценки восприятия речи (коэффициент корреляции 0.331, p = 0.014).

Таким образом, в ходе настоящего исследования было выявлено увеличение анатомической коннективности для тракта UF в левом полушарии, что оказалось связанным с восстановлением речевой функции (сенсорного компонента). Роль UF в осуществлении речевой функции в настоящее время является дискуссионной, так как функции данного тракта до конца не известны. Предполагается, что данный тракт является частью вентрального пути обработки речевой информации и играет роль в семантической обработке речи, обеспечивая связь вентральной височной коры и латеральной фронтальной области [6]. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу данного предположения. Предметом дальнейшего исследования является уточнение сроков выявленных паттернов изменения анатомической коннективности, а также сопоставление их с данными фМРТ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-15-10419.

1. Luria A.R. Traumatic Aphasia: Its Syndromes, Psychology and Treatment. Berlin, New York: DE GRUYTER MOUTON, 1970.
2. Brown C.J. et al. Prediction of Motor Function in Very Preterm Infants Using Connectome Features and Local Synthetic Instances. 2015. P. 69–76.
3. Puig J. et al. Diffusion tensor imaging as a prognostic biomarker for motor recovery and rehabilitation after stroke // *Neuroradiology*. 2017. Vol. 59, № 4. P. 343–351.
5. Ivanova M. V. et al. Diffusion-tensor imaging of major white matter tracts and their role in language processing in aphasia // *Cortex*. 2016. Vol. 85. P. 165–181.
6. Parker G.J.M. et al. Lateralization of ventral and dorsal auditory-language pathways in the human brain // *Neuroimage*. 2005. Vol. 24, № 3. P. 656–666.

#### **PCI-34051 ИНГИБИТОР HDAC8 СНИЖАЕТ НЕКРОЗ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ**

#### **INHIBITOR HDAC 8 PCI-340051 REDUCES GLIAL CELL NECROSIS UPON PHOTODYNAMIC DAMAGE**

*Никул В.В., Демьяненко С.В.*

Лаборатория "Молекулярная нейробиология" Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, nikul.vi@yandex.ru, demyanenkosvetlana@gmail.com

Фототромботический инсульт увеличивает содержание HDAC8 в клетках коры мозга мышей в ранний восстановительный период [1]. В связи с этим нами были проведены исследования влияния ингибитора HDAC8 с 4200-кратной селективностью по сравнению с другими изоформами HDACs PCI-34051 на некроз и апоптоз нервных клеток. Была использована модель *in vitro* изолированного рецептора растяжения речного рака *Astacus leptodactylus*, поскольку, PCI-34051, как производное гидроксамовой кислоты, обладает низкой способностью преодолевать ГЭБ [2]. Окислительный стресс в системе «нейрон-глия» создавался с помощью фотодинамического (ФД) воздействия. Фотосенсибилизатором служил алюмофталоцианин Фотосенс (НИОПИК, Москва), а источником света - полупроводниковый лазер (670 нм, 0,4 Вт/см<sup>2</sup>). Раствор PI 34051 (10 мкМ) добавляли в кювету с рецептором растяжения рака за 25 минут до начала облучения, регистрируя импульсную активность нейронов. Визуализация некроза и апоптоза ядер клеток проводилась через 8 часов после прекращения облучения (время, необходимое для развития апоптоза) методом двойного флуорохромирования препарата пропидиум-йодидом (100 мкМ), проникающим только в некротические клетки, и флуорохромом Hoechst-33342 (100 мкМ), выявляющим апоптозные клетки с фрагментированными ядрами.

PCI-34051 не влиял на апоптоз глии, но защищал глиальные клетки от ФД индуцированного некроза, увеличивая время жизни нейронов. Таким образом, селективные ингибиторы HDAC8 могут рассматриваться в качестве перспективных нейропротекторных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 16-04-01135.

1. Demyanenko S. et al. Expression of class I histone deacetylases in ipsilateral and contralateral hemispheres after the focal photothrombotic infarction in the mouse brain// *Transl Stroke Res*. 2018. Vol. 9(5). P.471-483.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА МНОГОМЕРНОГО ШКАЛИРОВАНИЯ В АНАЛИЗЕ ЭЭГ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ ИСПЫТУЕМЫХ НА БОЛЬНЫХ С ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ**

**USING THE METHOD OF MULTIDIMENSIONAL SCALING IN THE ANALYSIS OF THE EEG FOR CLASSIFYING THE SUBJECTS INTO PATIENTS WITH DYSIRCULATORY ENCEPHALOPATHY AND HEALTHY INDIVIDUALS**

***Омельченко В.П., Кижеватова Е.А.***

Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение Высшего образования Ростовский государственный медицинский университет Министерства Здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Электроэнцефалограмма широко применяется как вспомогательный метод диагностики нарушений функциональной работы головного мозга, в том числе и проявления когнитивных нарушений у больных с дисциркуляторной энцефалопатией.

Результаты многочисленных исследований однозначно свидетельствуют о том, что регистрируемая с помощью стандартной ЭЭГ биоэлектрическая активность головного мозга является производной корковых процессов, в которых находит отражение когнитивная активность. Таким образом, достаточно актуальным является исследование биоэлектрической активности головного мозга у больных с энцефалопатиями и следующим им нарушениями когнитивных функций для выявления основных параметров ЭЭГ, что будет являться **дополнительным критерием** в верной постановке диагноза.

Цель работы – применение метода многомерного шкалирования (МШ) для анализа ЭЭГ, демонстрация применения информационных технологий для повышения информативности компьютерного анализа ЭЭГ при ранней оценке нарушения когнитивных функций у больных с дисциркуляторной энцефалопатией.

В данном исследовании приняли участие 60 человек: больные с дисциркуляторной энцефалопатией и контрольная группа (когнитивно здоровые лица). В группе больных с дисциркуляторной энцефалопатией было 12 женщин (40%) и 18 мужчин (60%). Средний возраст больных с дисциркуляторной энцефалопатией имел значение  $69,1 \pm 2,6$  ( $p \geq 0,95$ ) лет. Контрольную группу составили здоровые лица со средним возрастом  $52 \pm 3,1$  года, общая численность которых была 30 человек: 16 женщин (53%) и 14 мужчин (47%).

Запись биоэлектрической активности головного мозга (Фоновая запись: состояние расслабленное, глаза закрыты) осуществлялась на 16-канальном электроэнцефалографе «Энцефалан-131-03». Во время съема ЭЭГ всем пациентам проводили пробы и когнитивные тесты: «ФонОГ», «ФонЗГ», «Слова», «Счет» и «Растения» (сценарий ЭЭГ разработан авторами и запатентован). Диагностика когнитивных расстройств базировалась на субъективных жалобах пациента, опросе его родственников, оценке неврологического статуса, результатах психологического тестирования. Клиническую оценку состояния больных осуществляли при помощи врачей-неврологов на базе кафедры «нервных болезней и нейрохирургии». Для клинической оценки психологического состояния больных были выбраны наиболее часто предъявляемые на приеме врача симптомы: снижение настроения, тревога, общая слабость, головная боль, проблемы взаимоотношения с окружающими, неспособность справиться со сложившейся ситуацией, нарушение режима бодрствование-сон, жалобы на плохую память, снижение интеллектуальных способностей.

В результате выполнения исследования ЭЭГ-данных и проведенного анализа методом многомерного шкалирования, нами были сделаны следующие выводы:

- при сравнении отведений ЭЭГ по тестам «Фон ОГ», «Фон ЗГ», «Растения», «Счет» у здоровых испытуемых координаты МШ совпадали практически по всем тестам, в некоторых случаях имелось отличие между тестом «Счет» (или «Растения») и остальными тестами; у пациентов с энцефалопатией отсутствовало совпадение точек при выполнении этих тестов;

- МШ для анализа ЭЭГ по тестам «Фон ОГ», «Фон ЗГ», «Буква», «Лишнее» показало, что у здоровых пациентов наблюдается совпадение координат по тестам «Фон ОГ», «Фон ЗГ», «Буква», формировалась область точек теста «Лишнее»; у больных отсутствовало совпадение координат по этим тестам, но результаты объединялись в группы;

- анализ ЭЭГ здоровых пациентов по тестам «Фон ОГ», «Фон ЗГ», «Слова» показал практически полное совпадение координат по тестам; для испытуемых с ДЭП - более хаотичное распределение точек, в некоторых случаях формировались области, определяющие один из тестов;

- при сравнении амплитуд ЭЭГ по отведениям выявлено: вертикальное расположение точек, соответствующих одному отведению, у здоровых пациентов практически во всех тестах; для больных - локализации данных по тестам в некоторых случаях и полное отсутствие вертикального расположения точек по отдельному отведению.

В результате проведенного исследования получен вывод о том, что МШ позволяет классифицировать здоровых и больных испытуемых по ЭЭГ-показателям на ранней стадии. С помощью этого метода в дальнейшем возможно проведение анализа состояния здоровья пациента и выявление степени заболевания.

**ВЫЗВАННАЯ РИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ПРОСТЫХ КОГНИТИВНЫХ ЗАДАЧ****EVOKED RHYTHMIC ACTIVITY OF THE HUMAN BRAIN IN SIMPLE COGNITIVE TASKS***Павловская М.А.*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского,  
г. Ростов-на-Дону, mpavlovskaya@mail.ru

Исследования мозговой активности имеют основополагающее значение для изучения нейрофизиологических механизмов когнитивных процессов (восприятие, внимание, память, принятие решения и обучение) адаптивного поведения человека. При объединении информации, приходящей из разных источников в мозг, на основании иерархического принципа отфильтровываются нерелевантные сигналы. Предъявление стимула приводит к запуску осцилляторной мозговой активности популяции нейронов и ее синхронизации или десинхронизации, а прекращение стимуляции приводит к затуханию колебаний. Частота и периодичность суперпозиции ритмов зависит от функционального состояния, уровня бодрствования, баланса внимания, значимости и модальности стимулов [1, 2]. Предположительно, одним из механизмов работы мозга является фазово-амплитудная координация ритмов, которая заключается в том, что фаза низкочастотных колебаний модулирует амплитуду более высокочастотных осцилляций [3 – 5]. Однако в настоящее время отсутствуют данные о механизмах, лежащих в основе взаимодействия ритмической активности мозга в условиях игнорирования или привлечения внимания к отдельным стимулам в паттерне.

В тестировании с добровольным письменным согласием приняли участие 86 студентов ЮФУ без патологий сенсорных систем. Были использованы процедуры прямой (маскер предшествует целевому стимулу) и обратной (целевой стимул предшествует маскеру) маскировок звуковой или зрительной модальностей. В ответ на целевые стимулы по инструкции необходимо нажимать соответствующую клавишу датчика. Целевые слуховые стимулы предъявлялись с частотой 1 и 1,2 кГц, интенсивностью 60 дБ; зрительные – вспышки яркостью 9 кД, длительностью 1 мс; вероятность 0,15; 0,5 и 0,85. Слуховой маскер с частотой 1,1 кГц, интенсивностью 90 дБ; зрительный – 9 кД, 5 мс. Межмаскировочные интервалы были 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 с. Регистрация ЭЭГ, времени реакции и режим стимуляции осуществляются с помощью компьютерного энцефалографа-анализатора «Энцефалан-131-03» (Таганрог, Россия). Были выбраны следующие частотные интервалы 0,5–3 Гц для дельта, 4–7 Гц – тета, 8–13 Гц – альфа и 14–24 Гц – бета диапазонов. Оцифрованная ЭЭГ экспортируется в среду MATLAB, где проводится дальнейшая обработка.

Адаптивная фильтрация дельта-, тета-, альфа- и бета-ритмов ССП, отражающих изменение корково-подкорковых и корково-корковых связей, в условиях одно- и разномодальной маскировки позволяет изучить соотношение указанных ритмов в анализе целевого и маскирующего стимулов. Так дифференцировка целевых стимулов связана с повышением дельта-ритма и снижением тета-ритма ССП, охватывающего волну ожидания, компоненты негативности рассогласования и *P3b*, независимо от модальности и порядка следования стимула. Сокращение вероятности целевого стимула приводит к росту выраженности дельта-волны ССП. Восприятие маскера связано с десинхронизацией дельта-ритма и доминированием тета-ритма ССП, контролирующего компоненты *N1*, *N2*, *P2* ССП, независимо от модальности и порядка следования стимула. Предполагается, что увеличение дельта колебаний ССП связано с привлечением внимания к целевому стимулу, а тета – с игнорированием маскировочного стимула. Флуктуация авторитмичности альфа-ритма ССП (лобный и теменно-затылочный фокусы) зависит от модальности, порядка следования и значимости стимула, которая модулирует или организует межмодальную сенсомоторную интеграцию посредством направления внимания на стимул. Показано, что независимо от порядка следования стимулов (прямая или обратная маскировка) и значимости стимулов (целевой или маскер) дельта ритмический диапазон ССП коррелирует с 2 Гц вызванным ритмом, тета – 5 Гц, альфа фронтальный – 7-8 Гц, альфа париетально-окципитальный – 9-10 Гц.

Таким образом, использование процедуры маскировки позволяет изучить взаимодействие таламо-фронтальной системы внимания (контролирующей *N1*, *P2*, *N2* и *P3a* компоненты ССП) в диапазоне тета-колебаний, и таламо-париетальной (модулирует волну ожидания, негативность рассогласования и компонент *P3b*) в дельта-ритме. Исследования показали, что синхронизация мозговых колебаний в конкретных частотных диапазонах приводит к изменениям восприятия, внимания и рабочей памяти, которые можно объяснить с использованием теорий мультиплексирования [3] или взаимосвязи ритмов [4, 5].

1. Pavlovskaya M.A. Physiological Mechanisms of Intermodal Interactions in the Sensory Masking // International Journal of Psychophysiology. 2014. V. 94, Issue 2. P. 205.
2. Пономарев Валерий Александрович. Скрытые источники электроэнцефалограммы и связанных с событиями потенциалов и их значение: диссертация ... доктора Биологических наук: 03.03.01. – СПб, 2016. - 676 с.
3. Panzeri S., Brunel N., Logothetis N.K., Kayser C. Sensory neural codes using multiplexed temporal scales // Trends Neurosci. 2010. 33. P. 111–120.
4. Fries P. A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence // Trends Cogn. Sci. 2005. 9. P. 474–480.
5. Harmony T. The functional significance of delta oscillations in cognitive processing // Frontiers in Integrative Neuroscience. 2013. V. 7. P. 1–10.

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РНК-ЗАВИСИМОЙ АДЕНОЗИНДЕАМИНАЗЫ 2 ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИАЛУРОНИДАЗА-ЗАВИСИМОЙ ЭПИЛЕПСИИ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГИППОКАМПА**

**GENE EXPRESSION CHANGES OF ADAR2 IN HYALURONIDASE-DEPENDENT SEIZURE MODEL IN PRIMARY HIPPOCAMPAL CULTURES**

*Першин В.И., Гурьев Е.Л., Проданец Н.Н.<sup>1</sup>, Соколов Р.А., Мухина И.В.<sup>1</sup>*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

<sup>1</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

Внеклеточный матрикс мозга (ВКМ) играет большую роль в ЦНС. Показана его роль в таких высших функциях как память, внимание, обучение и др. В то же время, при его разрушении, вызванном травмами мозга, нейровоспалительными и нейродегенеративными процессами может приводить к развитию эпилепсии. Однако детальный молекулярный механизм развития данного заболевания до сих пор не изучен.

РНК-редактирование является одним из ключевых процессов поддержания гомеостаза. Одним из белков, связанных с данным процессом является РНК-зависимая аденозиндеаминаза 2 (ADAR2). Данный белок экспрессируется преимущественно в нервной системе, в нейронах и локализован в ядре. Одной из его функций заключается в редактировании пре-мРНК Q/R сайта GluA2 субъединицы AMPA рецептора. Нарушения процессов редактирования данной субъединицы приводит к избыточной кальциевой проницаемости AMPA рецептора, способного приводить к перевозбуждению и эксайтотоксичности. Соответственно, РНК-зависимая аденозиндеаминаза 2, может являться возможной причиной в развитии эпилептогенеза.

Целью данной работы являлось изучить изменения пространственной локализации в клетках, генной экспрессии ADAR2, а также эффективности редактирования Q/R сайта GluA2 субъединицы данным белком при моделировании гиалуронидаза-зависимой эпилепсии в первичной культуре гиппокампа.

Исследования проводились на первичных культурах гиппокампа мыши линии C57BL/6 J. Разрушение гиалуронового матрикса производилось путем добавления в культуральную среду раствора гиалуронидазы (75ед./мл). Взятие образцов на анализ осуществлялось спустя двое суток после разрушения внеклеточного матрикса. Оценка эффекта разрушения ВКМ, а также изменения локализации ADAR2 проводилась методом иммуноцитохимии с помощью конфокального микроскопа LSM 880 и люминесцентный микроскоп AxioScore A1. Характеристика изменения сетевой активности осуществлялась с помощью методов кальциевого имиджинга, а также регистрации биоэлектрической активности на мультиэлектродных матрицах MEA 60. Изучение изменения экспрессии гена ADAR2 было выполнено с помощью метода ПЦР-РВ; оценка эффективности редактирования Q/R сайта осуществлялось с помощью рестрикционного анализа.

Проведенные исследования показали статистически достоверное повышение длительности, а также снижении частоты кальциевых осцилляций в ответ на разрушение гиалуроновой кислоты. Экспрессия гена ADAR2 при разрушении гиалуронового матрикса, тоже была подвержена значительным изменениям (в 18 раз, по сравнению с интактной группой). Кроме того, было детектировано повышение интенсивности флуоресценции ADAR2, а также смещение локализации с ядерной зоны в область цитоплазмы, в то же время, согласно данным рестрикционного анализа, при разрушении гиалуронана, спустя двое суток, изменений в эффективности редактирования Q/R сайта GluA2 транскрипта не было обнаружено.

Согласно полученным результатам можно предположить наличие запуска компенсаторного механизма, повышающего степень экспрессии гена ADAR2, в ответ на разрушение ВКМ, поскольку увеличение тока кальция в клетку пагубно влияет на функционирование клеток, увеличение же экспрессии РНК-зависимой аденозиндеаминазы, при неизменной эффективности редактирования Q/R сайта, может являться гомеостатической реакцией на данное воздействие.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 18-44-520016).

**МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СОПРЯЖЕНИЯ НАРУШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В МОЗГЕ ПРИ РАЗВИТИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: НОВЫЙ ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ГИБЕЛИ КЛЕТОК**

**MATHEMATICAL MODEL OF COUPLING BETWEEN ENERGY METABOLISM AND ELECTRIC ACTIVITY DISTURBANCE IN THE BRAIN DURING NEURODEGENERATIVE DISEASES DEVELOPMENT: PROPOSED NEW MECHANISM OF CELL DEATH**

*Мысин И.Е.<sup>1</sup>, Попова И.Ю.<sup>1</sup>, Осипов А.А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, Пущино, imysin@mail.ru

<sup>2</sup>Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, aosypov@gmail.com

Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей дисфункцией нервной системы и включают болезнь Альцгеймера, Паркинсона, эпилепсию и др. Общим для них является гипометаболизм глюкозы в мозге, кот. является основным иницирующим фактором, а возникающая нейронная дисфункция дополнительно способствует метаболическому дисбалансу через положительную обратную связь [1,2].

Мы провели теоретическое исследование последствий нарушения энергетического метаболизма в нервной ткани на подробной биофизической модели метаболического сопряжения между нейронами и астроцитами в условиях афферентной стимуляции, имитирующей выброс глутамата в пресинаптическую щель. Данная модель является развитием модели, предложенной ранее [3]. В модели представлены 4 компартмента: нейрон, астроцит, межклеточное пространство и кровеносный сосуд. Внутри нейронов и астроцитов моделируются два субкомпартамента: цитозоль и митохондрии. Моделируются основные пути энергометаболизма: гликолиз, цикл Кребса и окислительное фосфорилирование. Между капиллярами и клетками через межклеточное пространство происходит транспорт глюкозы, лактата и кислорода. В капилляре концентрации веществ меняются за счет оттока в клетки и поступления из общего кровотока. Впервые учитывается внеклеточная концентрация калия. В модели учитываются пассивные токи натрия и калия через мембрану нейрона и астроцита. Дополнительно на мембране нейрона моделируются потенциал-зависимые натриевые, калиевые и кальций-зависимые калиевые каналы с помощью формализма Ходжкина-Хаксли. Сопряжение между метаболизмом и динамикой ионов осуществляется путем моделирования Na/K-АТФазы, которая присутствует на мембране нейронов и астроцитов.

Основным результатом представленного модельного исследования стало обнаружение феномена аденилатного коллапса, суть которого состоит в необратимом падении концентрации АТФ после достижения критического порогового значения. Данный эффект возникает в результате обращения реакции, катализируемой аденилаткиназой. При высоких значениях АТФ равновесие реакции смещено в сторону образования АДФ из АТФ и АМФ. При достижении порога равновесие смещается в противоположную сторону, т.е. происходит образование АМФ и АТФ из АДФ. Если данная ситуация сопровождается высоким расходом АТФ, то весь пул адениновых нуклеотидов переходит в АМФ. Однако АМФ не фосфорилируется, в отличие от АДФ, в гликолизе и окислительном фосфорилировании, поэтому система быстро приходит к истощению АТФ.

Разработанная нами модель [4] позволила выявить существование критического режима, при переходе к которому клетка резко снижает энергетический потенциал, что приводит к угасанию метаболизма и может спровоцировать избирательную клеточную гибель. Приводящие к этому состоянию перегрузки возбуждения электрической активности на фоне ослабления энергометаболизма соответствуют наблюдаемым в экспериментах процессам при различных моделях эпилептогенеза. Результатом этих процессов является повреждение клеток под действием эксайтотоксичности по механизму метаболического коллапса, названного нами аденилатным, что в свою очередь приводит к избирательной клеточной гибели и формированию патологической гистоморфологии [5] и абнормальной сетевой электрической активности [6].

Работа была выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» 2018г.

1. Zilberter Y., Zilberter M. The vicious circle of hypometabolism in neurodegenerative diseases: Ways and mechanisms of metabolic correction // J. Neurosci. Res. 2017. V. 95. No 11. P. 2217–2235.
2. Samokhina E. et al. Chronic inhibition of brain glycolysis initiates epileptogenesis // J. Neurosci. Res. 2017. V. 95. No 11. P. 2195–2206
3. Jolivet R. et al. Multi-timescale modeling of activity-dependent metabolic coupling in the neuron-glia-vasculature ensemble. // PLoS Comput. Biol. 2015. Vol. 11, № 2. e1004036
4. И. Е. Мысин, И. Ю. Попова, А. А. Осипов // Матем. биология и биоинформ. 2018. том 13, выпуск 2, 591–608.
5. Samokhina E. et al. Selective hippocampal cell damage and mossy fiber sprouting induced by chronic impairment of cerebral glucose metabolism (in press)
6. Malkov A. et al. Seizure-induced reduction in glucose utilization promotes brain hypometabolism during epileptogenesis // Neurobiol. Dis. 2018. V. 116. P. 28–38.

**ТЕМНОВОЕ И СВЕТОИНДУЦИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО РАЗОБЩИТЕЛЯ МИТОФЛУОРЕСЦЕИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА**

**DARK AND LIGHT-INDUCED EFFECT OF THE MITOCHONDRIAL UNCOUPLER MITOFLUORESCIN ON THE ELECTRICAL ACTIVITY OF MOLLUSCAN NEURONS**

***Л.Б. Попова, А.Л. Камышева, Т.И. Рокицкая, Г.А. Коришунова, Р.С. Кирсанов, Е.А.Котова, Ю.Н. Антоненко***  
НИИФХБ имени А. Н. Белозерского, МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва 119991, Россия  
E-mail: lala@genebee.msu.ru; тел. (495)9393189; факс: (495)9393181

Разобшители окислительного фосфорилирования в митохондриях в последнее время вызывают значительный интерес как перспективные соединения для создания медицинских препаратов, в частности, благодаря своим нейропротекторным свойствам. В связи с этим в ряде лабораторий предпринимаются попытки создания разобшителей, обладающих новыми полезными свойствами. Так, нами синтезирован эффективный разобшитель mitoFluo на основе известного красителя флуоресцеина (Denisov et al. Chem. Commun. 2014). Особенностью этого разобшителя является наличие яркой флуоресценции, позволяющей судить о его накоплении в клетках и их компартаментах. Хорошей моделью для изучения действия разобшителей на нервные клетки является электрическая активность нейронов моллюсков. Ранее (Popova et al. BBA 2018) нами было показано, что классические разобшители, такие как карбонилцианид м-хлорфенил гидразон (КЦХФ) и 2,4-динитрофенол (ДНФ) вызывают деполяризацию плазматической мембраны нейронов и расширение спайков, причем эти эффекты опосредованы, по всей видимости, действием разобшителей на митохондрии нейронов. В настоящей работе мы изучили действие митофлуоресцеина (mitoFluo), протонофорного разобшителя, представляющего собой конъюгат флуоресцеина с децил(трифенил)фосфонием, на электрическую активность нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis*. Показано, что mitoFluo снижает потенциал плазматической мембраны нейронов и модифицирует спайковую активность, вызывая расширение спайков, снижение их амплитуды и увеличение частоты. Длительное воздействие высоких (десятки микромолей) концентраций mitoFluo приводит к полному подавлению электрической активности нейронов. Качественно, влияние mitoFluo на активность нейронов подобно соответствующим эффектам классического митохондриального разобшителя КЦХФ, но обнаруживается при гораздо более длительном воздействии и больших концентрациях. Отличительной особенностью mitoFluo является его фотоиндуцированное действие на электрическую активность нейронов. Наблюдаемые при освещении в присутствии mitoFluo изменения параметров активности нейронов близки к светоиндуцированным эффектам известного фотосенсибилизатора бенгальского розового, но менее выражены. Предполагается, что действие mitoFluo на электрическую активность нейронов как митохондриального разобшителя, и как фотосенсибилизатора, опосредовано изменениями концентрации ионов кальция в цитоплазме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 16-14-10025).

1. Denisov S.S. et al. A mitochondria-targeted protonophoric uncoupler derived from fluorescein // Chem Commun (Camb). 2014. Vol. 50. P. 15366-15369.
2. Popova L.B. et al. Protonophoric action of triclosan causes calcium efflux from mitochondria, plasma membrane depolarization and bursts of miniature end-plate potentials // Biochim.Biophys.Acta. 2018. Vol. 1860. P. 1000-1007.

**НЕЛИНЕЙНЫЕ И ПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ РЕЗОНАНСЫ В ОРГАНАХ ЗРЕНИЯ И СЛУХА ЧЕЛОВЕКА  
NONLINEAR AND PARAMETRIC RESONANCES IN THE ORGANS OF VISION AND HEARING**

***Прокопьев В.Е.***

Институт сильноточной электроники СО РАН (ИСЭ СО РАН), Томск, Prokop@ogl.hcei.tsc.ru

Проблема взаимодействия интенсивного акустического и лазерного излучения с органами зрения и слуха человека и животных представляет многосторонний научный и практический интерес. Интерес здесь могут представить не только такие вопросы, как опасность лазерного излучения для глаз человека, изучение различных нелинейных эффектов и фотохимических процессов в органах зрения, но и особенности восприятия органами зрения когерентного лазерного излучения, по-видимому, отсутствовавшего на всем предшествующем периоде эволюции живых организмов.

Инфракрасное излучение He-Ne в диапазоне длин волн  $0.95 \div 1.15$  мкм впервые было обнаружено невооруженным глазом человека как видимое излучение с длиной волны близкой ко второй гармонике, почти сразу после открытия этого лазера в работе [1]. Этот эффект был принят за нелинейное преобразование лазерного излучения в тканях глаза. Позже эти результаты были воспроизведены в более широком диапазоне длины волны (0.8 - 1.6 мкм) с наносекундными (НС) импульсными лазерами на парах металлов [2,3, 4] и с использованием параметрического генератора света [5] с длительностью импульса 10 нс. В этих экспериментах

преобразование ИК излучения в видимую область спектра происходило, как правило, в результате прямого попадания лазерного луча на сетчатку глаза при длительной адаптации глаза к темноте.

В настоящее время в связи созданием ИК фемтосекундных (ФС) лазерных источников появилась возможность изучения механизмов взаимодействия ИК света не только при прямом попадании излучения на сетчатку, но и отражённого от объектов внешней среды при нормальных условиях освещённости.

В настоящей работе исследуются механизмы взаимодействия ИК лазерного излучения ФС и НС длительности с глазом, приводящие в визуализации объектов при нормальных условиях освещённости и проведены сравнение акустических (звуковых) сигналов возникающих в органах слуха человека при филаментации ФС лазерного излучения в воздухе.

1. Василенко Л.С., Чеботаев В.П., Троицкий Ю.В. // ЖЭТФ. 1965. т.48. с. 777.

2. Прокопьев В.Е. // Биофизика.1980. т. XXV. вып.5. с.727-729.

3. Прокопьев В.Е. // Биофизика.1980. т. XXV. вып.2. с. 305-306.

4. Прокопьев В.Е. // Биофизика.1985. т. XXX. вып.1. с.129-132.

5. Дмитриев В. Г., и др. //Квантовая электроника.1979.6. №4. с.803-809.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В ШВАННОВСКИХ КЛЕТКАХ В НОРМЕ И ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ КРЫСЫ**

### **STUDY OF CHANGES IN THE CONTENT OF PROTEIN IN SCHWANN CELLS IN NORMAL AND IN THE DAMAGE OF RATS SOMATIC NERVES**

*Пронин А.С., Рузавина Е.Н., Крутова Н.С., Ревин В.В.*

г. Саранск, Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, кафедра биотехнологии, биоинженерии и биохимии  
proninbio@gmail.com

Огромное значение, как теоретическое, так и практическое имеет проблема регенерации поврежденных периферических нервов. Повреждения нервов могут быть вызваны различными факторами: травмами опорно-двигательного аппарата, токсическими воздействиями, дефектами образования миелина, нарушениями аксонального транспорта, гипоксией и многими другими факторами. При изучении регенерации соматических нервов отдельное внимание следует уделить изучению изменениям количества структурных белков входящие в миелиновый слой. По изменению концентрации белков миелиновой фракции, можно судить о процессах, которые происходят при регенерации в соматических нервах.

Содержание общего белка в седалищном нерве крысы составило 307,7 мкг на 1 мг массы нерва, содержание белка миелиновой фракции – 33,91 мкг/мг. Через сутки после повреждения содержание общего белка в проксимальном участке уменьшилось на 15% ( $p<0,05$ ) и на 33% ( $p<0,05$ ) в дистальном участке по сравнению с интактным нервом. Через семь суток после аксонотомии количество общего белка уменьшилось на 44 % ( $p<0,05$ ) в проксимальном и на 56% ( $p<0,05$ ) в дистальном отрезке. К 30 суткам в проксимальном отделе происходит достоверное повышение содержания белка на 27% ( $p<0,05$ ) по сравнению с 7 сутками. В дистальном отделе снижение содержания общего белка составило 60% ( $p<0,05$ ) по сравнению с исходным показателем.

Содержание белка миелиновой фракции изменялось через 1 сутки после повреждения снизилось на 10% ( $p<0,05$ ) и 19% ( $p<0,05$ ) в проксимальном и дистальном отрезках соответственно; через 7 суток – на 32% ( $p<0,05$ ) и 40% ( $p<0,05$ ) по отношению к интактному нерву.

По истечении 30 суток в проксимальном отделе содержание белка миелиновой фракции увеличилось на 13% по сравнению с 7 сутками, но оставалось ниже, чем в интактном нерве на 21% ( $p<0,05$ ). В дистальном участке содержание белка миелиновой фракции продолжало уменьшаться и составило 60% ( $p<0,05$ ) по сравнению с интактным нервом.

К 30 суткам мы наблюдали достоверно выраженные регенерационные процессы в проксимальном участке поврежденного нерва, что сопровождается повышением содержания общего белка и белка миелиновой фракции.

Таким образом, регенерация нервного волокна наблюдается только в проксимальном участке. На всем протяжении дистального отрезка развивается валлеровская дегенерация, которая проявляется разрушением осевых цилиндров, их фрагментацией и распадом миелина, на что указывает снижение количества белка миелиновой фракции.



## ИССЛЕДОВАНИЕ ОШИБОК СМЕЩЕНИЯ И НАПРАВЛЕНИЯ В ИЛЛЮЗИИ ПЕРЕСЕЧЕНИЯ

### INVESTIGATION OF DISPLACEMENT AND DIRECTIONAL ERRORS IN THE ILLUSION OF INTERSECTION

*Ракчеева Т.А.*

Институт машиноведения РАН, Москва, rta\_ra@list.ru.

Информационные технологии, необходимость быстрых реакций в ситуациях, связанных с визуальными оценками показаний многочисленных приборов, заставляют обратить особое внимание на точность зрительных оценок, объективно свойственных человеку. Целью данной работы является экспериментальное исследование оптико-геометрических факторов влияния на проявления зрительной иллюзии пересечения (Поггендорфа), достаточно убедительные объяснения природы которой, несмотря на множество гипотез, на сегодняшний день отсутствуют. При прохождении наклонной линии за непрозрачной полосой систематическая ошибка зрительного восприятия состоит, как известно, в том, что линия до пересечения с полосой и её продолжение за полосой не составляют единой прямой линии. Задача исследования состояла в определении характера функциональной зависимости иллюзии пересечения от параметров таких факторов, как ширина экранирующей полосы  $S$  и угол наклона линии  $\alpha$ . Исследовались такие величины, как ошибка позиции «выходного» фрагмента вдоль полосы и ошибка направления «выходного» фрагмента.

Для выполнения этой работы написано компьютерное программное обеспечение, позволяющее экспериментально исследовать количественные оценки указанных факторов, влияющих на проявление иллюзии пересечения [1,2]. По предъявленному видимому «входному» фрагменту линии, проходящей за непрозрачной полосой, испытуемому надлежало продолжить «мышью» видимый «выходной» ее фрагмент. Свободными параметрами для испытуемого являлись: начальная точка фрагмента линии, программно «закрепленная» на выходной стороне полосы, и его направление. Каждый эксперимент состоял из серии тестов, параметризующей величины исследуемых факторов  $S$  и  $\alpha_0$  в определенных диапазонах значений.

Полученные результаты показали, что иллюзия Поггендорфа в виде систематической ошибки смещения линии вдоль полосы статистически достоверно регистрируется у всех испытуемых в различных экспериментальных конфигурациях. На существование иллюзии значимо не влияет ни горизонтально-вертикальная ориентация экранирующей полосы, ни инверсия линии относительно полосы, ни цвет теста, а зависит только от ширины полосы и наклона линии (в литературе известен и ряд других факторов инвариантности иллюзия пересечения). В количественном отношении статистически достоверно проявление линейного характера *зависимости* величины иллюзии смещения от ширины полосы  $S$ , коэффициент линейности зависит от направления линии  $\alpha_0$ , и существенно нелинейного характера зависимости от угла наклона линии, «степень нелинейности» зависит от ширины полосы  $S_0$ . Иллюзия направления линейно зависит от  $\alpha$  и не зависит от  $S$ . Круговой диапазон ориентации полосы демонстрирует периодические свойства величины иллюзии смещения и направления. Регрессионные модели дают функциональные зависимости величины иллюзии от исследуемых факторов. Дополнительные эксперименты подтвердили аддитивные свойства иллюзии Поггендорфа при пересечении нескольких полос, сохраняя при этом характер зависимости для каждой из них.

Полученные результаты свидетельствуют также о *направлении иллюзии смещения*: систематическая ошибка «выходного» фрагмента во всех проведенных экспериментах направлена в сторону «входного» фрагмента линии. Этот эффект хорошо иллюстрируется графическими представлениями, где вместе приведены объективные и визуально воспринимаемые «выходные» точки линии как для фактора ширины полосы, так и для фактора угла наклона линии. При этом внешние линии представляют реальные данные, а внутренние – визуально воспринимаемые, что свидетельствует о внутренней направленности иллюзия смещения во всех экспериментах. Выявленный эффект направления иллюзии подтвердил гипотезу автора о том, что иллюзия Поггендорфа характеризуется инвариантным свойством сокращать расстояние между «входной» и «выходной» точками пересечения линии с полосой. Тенденция устойчиво сохраняется при всех параметрах ширины полосы и наклона линии, независимо от ориентации полосы, инверсии прямой, композиции полос и цвета [2,3].

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы: 1) *человек ментально стремится сблизить точки «входа» и «выхода» линии.* 2) *он хорошо держит направление, но деформирует метрические оценки.* Важным приложением результатов исследования иллюзии пересечения представляется корректировка зрительных оценок в работе человека-оператора.

1. Ракчеева Т.А. Метрические факторы оптико-геометрической иллюзии пересечения. Десятые юбилейные Курдюмовские чтения: Синергетика в общественных и естественных науках. Труды международной междисциплинарной конференции. 2015. С.142-146.
2. Ракчеева Т.А. Жолудев Е.П. Исследование факторов зрительной иллюзии пересечения. Математика Компьютер Образование. XXII международная конференция (МКО). 2015. Том 22. С.100.
3. Ракчеева Т.А. Метрические инварианты иллюзии пересечения. Международная конференция «Машины, технологии и материалы для современного машиностроения». Сб. тез. 2018. С.160.

**ФРАКТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ У ДЕТЕЙ В БЕССОЗНАТЕЛЬНОМ СОСТОЯНИИ (ПРИ ЭПИЛЕПСИИ И ВЕГЕТАТИВНОМ СОСТОЯНИИ)**

**FRactal ANALYSIS OF EEG DATA IN CHILDREN IN UNCONSCIOUS STATE (WITH EPILEPSY AND VEGETATIVE STATE)**

*Семёнова Н.Ю., Захаров В.С.<sup>1</sup>*

НИИ НДХиТ, Москва, [senatka@yandex.ru](mailto:senatka@yandex.ru),

<sup>1</sup> МГУ, Москва, [vszakharov@yandex.ru](mailto:vszakharov@yandex.ru)

С развитием компьютерных электроэнцефалографов разрабатываются новые математические методы анализа данных ЭЭГ. В последнее время активно развивается теория динамических систем и фрактальных множеств, Фракталом, по самому общему определению Б.Мандельброта, называется структура, состоящая из частей, которые в каком-то смысле подобны целому.

Временные ряды также обладают свойством самоподобия. Электроэнцефалограмма (ЭЭГ) представляет собой временной ряд, то есть последовательность измеренного биоэлектродного потенциала мозга во времени. Интерпретация функционального состояния мозга по визуальной оценке ЭЭГ достаточно часто бывает неоднозначной и противоречивой, так как нейрофизиологические системы человека весьма сложны. Возможно, применение методов теории динамических систем и фрактальных множеств к анализу электроэнцефалографических данных позволит получить новые знания о механизмах функционирования нейронных систем мозга.

Цель настоящей работы - применить методы исследования нелинейных динамических систем для выявления нейрофизиологических закономерностей функциональных систем мозга по данным ЭЭГ. Были проанализированы данные ЭЭГ, записанные на цифровом энцефалографе «Nicolet», полученные при обследовании здоровых детей в возрасте 10-13 лет, больных эпилепсией в момент клинического приступа (абсанса), с характерными энцефалографическими паттернами, детей в вегетативном состоянии (ВС) после тяжелой черепно-мозговой травмы (тЧМТ). У детей в ВС при визуальном анализе ЭЭГ преобладали доминирование медленноволновой активности, диффузная полиморфная активность, низкая амплитуда, сглаженность зональных различий.

Для 8 каналов ЭЭГ, отводящих биопотенциалы с различных зон мозга с помощью процедуры Такенса были определены динамические характеристики системы по временному ряду. Строился аттрактор - "портрет" в фазовом пространстве, т.е. в пространстве, координатами которого являются переменные, описывающие поведение системы. Образы аттракторов в двумерном фазовом пространстве различались у здоровых детей, во время абсансного приступа и у детей в ВС. Восстановленный аттрактор для больного ребенка был значительно "проще", имеют вид, характерный для детерминировано-хаотической системы. Для каждой размерности вложения ( $m$ ) - наименьшего числа независимых переменных, определяющих установившееся движение динамической системы, - вычислялась корреляционная размерность ( $D_c$ ), и строилась ее зависимость от  $m$ . Затем определялось, при каком значении  $m$  достигалось насыщение зависимости  $D_c(m)$ . Соответствующее значение  $D_c$  является оценкой фрактальной размерности аттрактора динамической системы. Восстановленная размерность вложения и корреляционная размерность аттрактора динамической системы несут информацию о степени сложности системы и характере ее поведения. Результаты вычисления по описанной выше процедуре корреляционной размерности  $D_c$  по данным ЭЭГ, полученным у здорового ребенка с организованным типом ЭЭГ, у детей с абсансной эпилепсией и у детей в ВС после тЧМТ, значительно различались.

Анализ показал, что нейрофизиологическая система при ВС устроена относительно просто, с небольшим количеством управляющих переменных. Формирование такой устойчивой патологической, детерминированной системы (доминанты) является причиной ограничения функции мозга (как и во время абсанса у больного с эпилепсией). Нелинейный анализ данных ЭЭГ выявил, что при бессознательном состоянии во время эпилептического приступа или при вегетативном состоянии динамическая нейрофизиологическая система менее сложная и управляется небольшим, ограниченным числом параметров.

Существует мнение, что фармакологический бензодиазепиновый тест при вегетативном состоянии выявляет функциональные резервы головного мозга. Проба считается положительной, если визуально на фоне исходной ЭЭГ появляются альфа- и бета-волны. При введении бензодиазепамина у детей с положительной пробой нелинейный анализ выявил повышение фрактальной размерности, что указывает на усложнение функционирования нейрональной системы. Изменение величины фрактальной размерности при повышении введенной дробной дозы препарата было индивидуальным у каждого пациента.

Таким образом, введение препарата БД ряда вызывает усложнение динамической нейрофизиологической системы, оказывая активирующее действие на БЭА. Выявлено влияние дозы БД на динамические характеристики БЭА мозга, это могло бы быть использовано для расчета оптимальной дозы препарата.

Использование нелинейного анализа данных ЭЭГ позволяет показать новые аспекты, углубить понимание нейрофизиологии мозга, а данная модель объяснить некоторые аспекты действия препаратов при назначении лечения, показать модель лечебного воздействия.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРОТИВОСУДОРОЖНОГО ДЕЙСТВИЯ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ В 4-АМИНОПИРИДИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ IN VITRO**  
**MOLECULAR MECHANISM OF THE ANTICONVULSANT EFFECT OF THE LOW-FREQUENCY ELECTRICAL STIMULATION IN 4-AMINOPYRIDINE MODEL OF EPILEPSY IN VITRO**

*Смирнова Е.Ю.<sup>1,2</sup>, Чижев А.В.<sup>1,2</sup>, Зайцев А.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, [elena.smirnova@mail.ioffe.ru](mailto:elena.smirnova@mail.ioffe.ru)

Порядка 65 миллионов людей в мире страдают эпилепсией и 30% случаев не поддаются медикаментозному лечению. Поэтому разрабатываются альтернативные методы лечения, и наиболее многообещающим подходом является низкочастотная стимуляция очагов эпилептической активности. Эффективность метода была неоднократно показана на животных моделях эпилепсии и в клинике. Однако механизм противосудорожного действия стимуляции остается невыясненным. Перед нами стояла задача с помощью фармакологического инструмента и математического моделирования изучить механизм антиконвульсивного эффекта низкочастотной электрической стимуляции (НЧЭС) в срезах гиппокампа и энторинальной коры 3х-недельной крысы Вистар в 4-аминопиридиновой модели эпилепсии. НЧЭС увеличивает интервал между иктальными разрядами, причем эффект не зависит от зоны стимуляции (радиальный слой зоны СА1 гиппокампа, субикулум или глубокие слои энторинальной коры) и частоты (0,2, 1 и 3 Гц). Чтобы определить роль глутаматных и ГАМКергических рецепторов в наблюдаемом противосудорожном эффекте, мы изучили влияние двух факторов, НЧЭС и специфического блокатора синаптического рецептора, и их взаимодействие методом двухфакторного дисперсионного анализа. Хотя блокада каждого из синаптических рецепторов (АМПА, НМДА, ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>B</sub>) привела к существенному изменению интервала между иктальными разрядами, взаимодействие факторов было детектировано только при блокаде ГАМК<sub>B</sub> рецепторов с помощью 5 мкМ CGP55845. При блокаде ГАМК<sub>B</sub> рецепторов НЧЭС становится неэффективной. На основе этих данных мы предположили, что НЧЭС приводит к активации пресинаптических ГАМК<sub>B</sub> рецепторов, которые, в свою очередь, ингибируют кальциевые каналы. Уменьшение входа кальция приводит к ослаблению выброса медиатора и, как следствие, к уменьшению вероятности возникновения иктального разряда. Чтобы проверить данную гипотезу, были использованы математическое моделирование и метод парной стимуляции.

В разработанную ранее математическую модель эпилептической активности «Эпилептор-2» [1] было заложено действие НЧЭС, выраженное в уменьшении синаптической проводимости и амплитуды спонтанного входного сигнала. Численный эксперимент показал, что НЧЭС приводит к разрежению иктальных разрядов. В заключение, мы изучили эффекты стимуляции и действия агониста ГАМК<sub>B</sub> рецепторов на возбуждающие постсинаптические токи, вызванные парной стимуляцией в 4-аминопиридиновом растворе. В нормальных условиях амплитуда ответа на второй импульс существенно ниже ответа на первый (pair-pulse ratio (PPR) < 1), тогда как при НЧЭС и под действием агониста ГАМК<sub>B</sub> рецепторов PPR существенно увеличивается. Это свидетельствует об ослаблении выброса медиатора в ответ на первый импульс.

Все полученные результаты служат в защиту предположения о том, что НЧЭС оказывает противосудорожное действие в 4-аминопиридиновой модели in vitro посредством активации ГАМК<sub>B</sub> рецепторов на пресинаптической мембране, которые, оказывая ингибирующие действие на кальциевые каналы, ослабляют выброс медиатора, а значит, уменьшают амплитуду всплесков синаптического возбуждения, приводящего к патологической гиперсинхронизации нейронов.

Работа выполнена за счет средств грантов РФФИ (проекты № 17-75-10082 и № 16-15-10201).

1. Chizhov A.V. et al. Minimal model of interictal and ictal discharges "Epileptor-2" // PLoS Comput Biol 14(5): e1006186. Nat Commun. 2016. Vol. 7. P. 13599.

## ИЗУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА В ОБЛАСТИ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

## EXPLORING PROSPECTS FOR OPTOGENETIC APPROACH IN BIOMEDICAL RESEARCH

*Сорокина Л. Е.<sup>1</sup>, Петренко В. И.<sup>1</sup>, Халилов С.И.<sup>2</sup>, Кучеренко А. С.<sup>1</sup>*

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь

<sup>1</sup> Кафедра общей и клинической патофизиологии Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь, e-mail: leya.sorokina@mail.ru

<sup>2</sup> Кафедра общей физики Физико-технического института ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь, e-mail: server.khalilov.94@mail.ru

Сегодня на пересечении молекулярной биологии и передовых лазерных технологий стремительно развивается новое междисциплинарное направление – оптогенетика, в рамках которой разрабатывается обширный арсенал для изучения механизмов формирования памяти и поведения, функциональной диагностики и терапии нейродегенеративных, психогенных патологий и других социально-значимых заболеваний человечества.

«Классический дизайн» оптогенетического исследования включает четыре основных элемента: доставка генетической конструкции, внедрение светочувствительных белков, доставка светового пучка и собственно регистрация результатов эксперимента [1]. Разработанные и внедренные в практику последние достижения оптогенетики основаны на использовании генетически кодируемых светочувствительных ионных каналов, представляющие собой белковые молекулы, которые в последующем подвергаются воздействию различных комбинаций фотостимуляции. Данный этап работы происходит с использованием дорогостоящих лазерных установок, которые способны создавать различного типа импульсы.

В работах по оптогенетике при выполнении эксперимента используют многомодовые волокна. Волокна с волноводным параметром  $V > 2.4$ , называются многомодовым и характеризуется числом мод (например, при  $V = 3.8$ , волокно имеет следующий модовый спектр:  $HE_{11}^+, HE_{11}^-, TE_{01}, TM_{01}, HE_{21}^0, HE_{21}^0, EH_{11}^0, HE_{11}^0, HE_{31}^0, HE_{31}^0, HE_{12}^0$ ). Каждая мода, имеет собственную длину биения и при распространении по волокну в поперечном сечении меняет распределение интенсивности. На торце волокна может образовываться различные модовые комбинации, с различными распределениями интенсивности, который освещает нужный участок в головном мозге испытуемого [2].

Пользуясь частными решениями векторного волнового уравнения в циркулярно и линейно поляризованном базисе, был построен модовый состав волокна при  $Z = 0.5$  м.,  $\lambda = 480$  нм.,  $p = 3.5$  мкм., с весовыми коэффициентами:  $IV = 5, HE_{11} = 0.3$ , на языке программирования C# [3].

Распределение интенсивности имеет вид бублика, с нулем интенсивности по центру, т.е. при освещении данной модовой комбинацией на исследуемый участок, где центр не будет освещен и может находиться белок. Также, данный тип мод, переносит орбитальный-угловой момент, способный захватывать и переносить микрообъекты [4]. Таким образом, чтобы избежать вышеперечисленных проблем при эксперименте, необходимо использовать одномодовые волокна, которые в поперечном сечении на любой длине волокна, имеют Гауссову моду с равномерно распределенной интенсивностью.

Учитывая, что современные оптогенетические технологии располагают широким арсеналом инструментов, становится возможным обозначить и основные области применения оптогенетики, способные сформировать глобальные рынки в области биомедицинских исследований: изготовление новых лекарственных препаратов для терапии заболеваний головного мозга, зрительных нарушений, лечение сердечно-сосудистых заболеваний за счет контроля светом двигательной активности миокарда, а также получения нового типа кардиостимуляторов, разработка новейших протезов, управляемых светом, создание интерактивных карт взаимосвязей для развития искусственного интеллекта.

Приведенный анализ рынков основных отраслей, где могут быть внедрены разработки, демонстрирует колоссальные возможности для роста не только научной сферы, но и экономики. Таким образом, обладая огромным потенциалом развития и большим количеством прорывных технологий, оптогенетика открывает широкий спектр возможностей перед современным человечеством.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия и развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК», договор №11541ГУ/2017)

При частичной поддержке Программы развития КФУ им. В.И. Вернадского 2015-2020 г.

1. Deisseroth K. et al. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci* 2006; 26(41): 10380–10386, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006>.
2. Zhang F. et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 2007; 446(7136): 633–639, <https://doi.org/10.1038/nature05744>.
3. Smedemark-Margulies N., Trapani J.G. Tools, methods, and applications for optophysiology in neuroscience. *Front Mol Neurosci* 2013; 6:18, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00018>.
4. Williams J.C., Denison T. From optogenetic technologies to neuromodulation therapies. *Sci Transl Med* 2013; 5(177): 177ps6, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003100>.

**ОЦЕНКА СВЯЗАННОСТИ МЕЖДУ ОБЛАСТЯМИ МОЗГА МЕТОДОМ РЕКОНСТРУКЦИИ СЕТИ НЕЙРООСЦИЛЛЯТОРОВ ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЗАПИСЯМ ЛОКАЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ**

**ESTIMATION OF COUPLING BETWEEN BRAIN AREAS BY MEANS OF RECONSTRUCTION OF NEUROOSCILLATOR NETWORK FROM EXPERIMENTAL RECORDINGS OF LOCAL FIELD POTENTIALS**

*I. V. Sysoev<sup>1,2</sup>, A. Lüttjohann<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, [ivssci@gmail.com](mailto:ivssci@gmail.com)

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

<sup>3</sup>Вестфальский университет имени Вильгельма, Мюнстер, Германия

Взаимодействие между отделами мозга активно изучается уже несколько десятилетий. Основным источником информации при этом являются электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и магнитоэнцефалограммы (МЭГ), сигналы локальных потенциалов поля (внутричерепные ЭЭГ) и сигналы отдельных нейронов, снимаемые как внеклеточно, так и внутриклеточно. Для исследования связанности применялись самые различные меры, как ненаправленные (корреляционная функция, функция когерентности, функция взаимной информации), так и разработанные принципиально для выделения направленного взаимодействия (энтропия переноса, причинность по Грейнджеру, частная направленная когерентность [1]), как линейные, так и нелинейные [2,3].

При использовании направленных методов диагностики взаимодействия, основанных на построении эмпирических прогностических моделей, таких как причинность по Грейнджеру и частная направленная когерентность, решающим компонентом успеха является правильный выбор структуры модели, как это уже было неоднократно показано, в том числе при исследовании связанности в мозге по сигналам локальных потенциалов [4]. Однако несмотря на различные оптимизации, в том числе введение нелинейности разных типов [5,6], подбора временных лагов, используемых при реконструкции вестора состояния по скалярному временному ряду, и дальностей прогноза [4], использования неравномерного вложения, все построенные модели представляли собою фактически многомерные отображения последования. В то же время в последние годы существенного прогресса удалось добиться в области реконструкции ансамблей динамических систем с непрерывным временем, включая системы с запаздыванием в собственной динамике и запаздыванием в связях. В том числе был разработан подход по реконструкции ансамблей обобщённых осцилляторов ван дер Поля [7]. Подход даёт возможность по векторным временным рядам колебаний ансамбля (по одному скалярному ряду от каждого элемента) реконструировать систему связей и собственные нелинейные функции отдельных элементов, если они могут быть представлены в виде осцилляторов типа ван дер Поля, Рэля, ФитцХью—Нагумо или иных систем второго порядка.

В данной работе разработанный в [7] подход адаптируется для сигналов локальных потенциалов крыс при абсансных приступах. Применимость подхода обосновывается тем, что во время пик-волновых разрядов колебания отдельных нейронов синхронизуются и их динамику можно упрощённо моделировать в виде системы связанных осцилляторов второго порядка с шумом [8]. С использованием данного подхода нам удалось получить ряд характеристик сигналов индивидуальных отведений и связей, согласующихся с общими выводами работы [4].

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, грант № 19-12-00201.

1. Boris P. Bezruchko, Dmitry A. Smirnov. *Extracting Knowledge From Time Series: An Introduction To Nonlinear Empirical Modeling / Springer Series In Synergetics*. Springer, 2010.
2. Sakkalis, V. Review of advanced techniques for the estimation of brain connectivity measured with EEG/MEG // *Computers in Biology and Medicine*. 2011. Vol. 41, Iss. 12. P. 1110–1117.
3. Gourevitch B., Le Bouquin-Jeannes R., Faucon G. Linear and nonlinear causality between signals: methods, examples and neurophysiological applications // *Biological Cybernetics*. 2006. Vol.95(4). P.349–369.
4. Marina V. Sysoeva, Evgenia Sitnikova, Ilya V. Sysoev, Boris P. Bezruchko, Gilles van Luijtelaaar. Application of adaptive nonlinear Granger causality: Disclosing network changes before and after absence seizure onset in a genetic rat model // *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 226 (2014), P. 33–41.
5. Yonghong Chen, Govindan Rangarajan, Jianfeng Feng, Mingzhou Ding, Analyzing Multiple Nonlinear Time Series with Extended Granger Causality, *Phys. Lett. A*. 324(1) (2004) 26–35.
6. Daniele Marinazzo, Mario Pellicoro, and Sebastiano Stramaglia. Nonlinear parametric model for Granger causality of time series. *Phys. Rev. E* 73, 066216 (2006).
7. Ilya V. Sysoev. Reconstruction of ensembles of generalized Van der Pol oscillators from vector time series // *Physica D*, 2018, Vol. 384–385, P. 1–11.
8. М.В. Сысоева, Г.Д. Кузнецова, И.В. Сысоев. Моделирование сигналов электроэнцефалограмм крыс при абсансной эпилепсии в приложении к анализу связанности между отделами мозга // *Биофизика*, 2016 **61**(4): 782–792.

**ПАТОЛОГИЯ СТРУКТУРЫ СВЯЗЕЙ В МОЗГЕ, ВЕДУЩАЯ К РАЗВИТИЮ ПИК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ: РЕКОНСТРУКЦИЯ ПО ВРЕМЕННЫМ РЯДАМ ЛОКАЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ**

**PATHOLOGY OF THE COUPLING STRUCTURE IN THE BRAIN LEADING TO SPIKE-WAVE DISCHARGE DEVELOPMENT: RECONSTRUCTION FROM TIME SERIES OF LOCAL FIELD POTENTIALS**

***Сысоева М.В.<sup>1,2</sup>, Медведева Т.М.<sup>3,4</sup>, van Luijtelaaar G.<sup>5</sup>, Сысоев И.В.<sup>2,4</sup>***

<sup>1</sup> Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., Саратов, Россия

<sup>2</sup> Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Саратов, Россия

<sup>3</sup> Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

<sup>4</sup> Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

<sup>5</sup> Radboud University Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands

Изучение мозга, в том числе функциональных связей между его структурами в норме и при различных патологиях — одновременно фундаментальная проблема науки, имеющая самостоятельную ценность, и основополагающий этап при диагностике, лечении и профилактике неврологических заболеваний, самым распространённым из которых является эпилепсия. Сложность и широта постановки задачи требуют междисциплинарных подходов, опирающихся на достижения из нескольких областей знаний: физики (методы нелинейной динамики), математики (методы математической статистики), информатики (методы нейроинформатики, анализ больших объёмов данных), биологии (методы экспериментальной нейрофизиологии) и медицины (исследование и лечение неврологических заболеваний). Все эти подходы были объединены в данной работе в приложении к исследованию эпилептиформной активности.

В ходе данного исследования был разработан адаптированный метод анализа связанности подсистем человека и животных, подстраивающийся под временные и частотные особенности конкретных экспериментальных временных рядов. Изначально работоспособность адаптированного метода была проверена на большом количестве традиционных тестовых примеров, как это было сделано ранее в [1]. Затем был осуществлён подбор параметров математических моделей реальных данных электроэнцефалограмм аналогично способу, предложенному в [2], и только потом стало возможно применить эти модели для анализа связанности отделов головного мозга. В результате приложения к экспериментальным данным стало ясно, что предложенных ранее критериев для подбора оптимальных параметров метода недостаточно, чтобы уверенно говорить об адекватности полученных результатов. Поэтому исследования переместились в плоскость комбинирования методов математического моделирования из первых принципов (прямое моделирование) и методов построения модели путём решения обратной задачи (обратное моделирование).

На первом этапе реализации прямого метода были разработаны математические модели, способные воспроизводить наиболее существенные особенности электрической активности мозга крыс с генетической склонностью к абсансной эпилепсии, проявляющиеся до и во время эпилептического разряда. Одновременно, при реализации обратного метода моделирования была показана эффективность применения адаптированного метода причинности по Грейнджеру для определения направленной связанности между различными отделами мозга. Проведено сопоставление результатов, полученных в ходе анализа экспериментальных и модельных сигналов, которое, с одной стороны, выявило ряд артефактов метода, а с другой, — доказало его эффективность для исследования механизмов функционирования мозга в норме и при патологии. Второй этап реализации прямого метода моделирования абсансной эпилепсии осуществлялся с помощью большой иерархически организованной сети нейроосцилляторов.

Благодаря использованию подстраиваемых под особенности данных современных методов анализа связанности были получены новые физиологические результаты. Во-первых, на разных наборах данных обнаружены таламо-кортикальные механизмы инициации, поддержания и прекращения абсансных эпилептических разрядов. Процесс инициации раньше всего начинается между теменной и фронтальной долями коры больших полушарий (разными слоями соматосенсорной коры), далее в этот процесс вовлекаются почти все кортико-таламические пары, в меньшей степени — таламо-таламические, и совсем не участвует гиппокамп. За процесс поддержания абсансного разряда отвечает петля положительной обратной связи между соматосенсорной корой и каудальной частью ретикулярного ядра таламуса. Процесс прекращения обнаружен при взаимодействии роstralной части ретикулярного ядра таламуса и коры (петля отрицательной обратной связи).

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 19-12-00201.

1. I.V. Sysoev, M.V. Sysoeva. Detecting changes in coupling with Granger causality method from time series with fast transient processes // *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 2015, Vol. 309, P.9-19.

2. M.V. Sysoeva, I.V. Sysoev. Mathematical modeling of encephalogram dynamics during epileptic seizure // *Technical Physics Letters*, 2012, Vol. 38 (№2), P.151-154.

## ОСОБЕННОСТИ КОГНИТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОЙ ГИПОМАГНИТНОЙ СРЕДЫ

## PECULIARITIES OF COGNITIVE PROCESSES OF RATS IN CONDITIONS OF MODERATE HYPMAGNETIC ENVIRONMENT

*Хусаинов Д.Р.<sup>1</sup>, Коренюк И.И.<sup>1</sup>, Туманянц К.Н.<sup>1</sup>, Хорольская К.Д.<sup>2</sup> Шахматова В.И.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Таврическая академия ФГОАУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия; gangliu@yandex.ru

<sup>2</sup>Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение «Гимназия №11 имени К.А. Тренева»

<sup>3</sup>ФГОАУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет

В настоящей работе была поставлена задача выяснить особенности формирования условнорефлекторной деятельности крыс, находящихся в условиях умеренного электромагнитного экранирования. Гипомагнитная среда моделировалась с помощью камеры изготовленной из железа “динамо”, размером 2×3×2 м, в основе действия которой служит экранирующий эффект соленоидов Гельмгольца. Коэффициент экранирования постоянной составляющей магнитного поля, измеренный феррозондовым магнитометром, по вертикальной составляющей равен 4.375, а по горизонтальной – 20. В исследовании использовано 60 белых крыс (самцов) весом 180-200 г, одного возраста (6 месяцев), содержащиеся в стандартных условиях вивария. Из представленной выборки 30 животных были сгруппированы в три контрольные группы по 10 особей; остальные 30 – экспериментальные, подвергались четырнадцатидневному экранированию. В течении этого времени парные группы контроль-эксперимент тестировались в установке «Шелтер», «Электростимуляция», «лабиринт Барнс».

В установке «Шелтер» выявлены достоверные различия между группами контроль-эксперимент на 4-ые, 5-ые и 8-ые сутки. В указанные дни животные экспериментальной группы демонстрировали большую успешность избегания в противоположный отсек и набирали на  $3,46 \pm 1,12$  ( $p < 0,05$ ) баллов больше, чем контрольная группа. Следовательно, крысы, которые находились в гипомагнитных условиях продемонстрировали более высокую скорость формирования условной реакции активного избегания (УРАИ) в первый восьмидневный отрезок времени. В тесте «Электростимуляция» мы провели исследование болевой чувствительности крыс, которая в четырнадцатидневный период проявила следующую периодичность: с третьих по седьмые (включительно) сутки наблюдалось выраженное снижение болевого порога крыс, а на 9 – 11-е сутки, наоборот, его увеличение. Следовательно, у крыс экспериментальной группы в первую неделю экранирования развивается гипералгезия, что усиливает их мотивацию к избеганию болевого фактора в установке «Шелтер», и это может быть причиной ускоренного формирования УРАИ.

Для того, чтобы минимизировать влияние сопутствующих факторов, в частности, болевой чувствительности, на когнитивные процессы, было проведено аналогичное исследование в тесте «лабиринт Барнс». В результате отличий между контрольной и экспериментальной группами во всех показателях не обнаружено.

Таким образом, можно утверждать, что умеренная гипомагнитная среда не оказывает значимого влияния на когнитивные процессы в четырнадцатидневном интервале воздействия. Наблюдаемый эффект ускоренного формирования УРАИ у животных экспериментальной группы связан с усилением болевой чувствительности крыс в первую неделю экранирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках инициативной части государственного задания № 6.5452.2017/8.9 Минобрнауки России в сфере научной деятельности темы «Временная организация физиологических систем человека и животных: феноменология и механизмы генерации и регуляции микро- и мезоритмов».

Работа выполнена на оборудовании КП ФГОАУ ВО КФУ им. В. И. Вернадского «Экспериментальная физиология и биофизика».

**ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА – ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 ПРИ НАРУШЕНИИ НЕЙРОТРАНСМИССИИ В НЕЙРОНАХ КОРЫ МОЗГА МЫШЕЙ С МУТАЦИЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА SIP1**

**PROTECTIVE EFFECT OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE - INTERLEUKIN-10 DURING DISTURBANCE OF NEUROTRANSMISSION IN THE CORTICAL NEURONS WITH MUTATION OF TRANSCRIPTION FACTOR SIP1**

Туровская М.В.<sup>1</sup>, Енифанова Е.А.<sup>2,3</sup>, Тарабыкин В.С.<sup>2,3</sup>, Бабаев А.А.<sup>2</sup>, Туровский Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, m\_turovskaya@mail.ru

<sup>2</sup>Нижегородский государственный университет имени Лобачевского, Нижний Новгород

<sup>3</sup>Институт клеточной биологии и нейробиологии, Медицинский Университет Шарите, Берлин

Sip1 (Zeb2) – транскрипционный фактор, участвующий в регуляции нейрогенеза. Мутации гена Sip1 у человека ведут к формированию различных патологий, включая болезнь Гиршпрунга и синдром Мовата-Вильсона [1]. Одной из самых часто встречаемых характеристик синдрома Мовата-Вильсона является эпилепсия [2]. Возникновение эпилептических приступов часто ассоциировано с нарушением баланса возбуждения и торможения в коре головного мозга, гиппокампе и др. Нейроны коры мозга, полученные из гомозиготных мышей с мутацией Sip1, имеют сниженную чувствительность к активаторам AMPA- и NMDA-рецепторов *in vitro*, что может являться признаком сигнальной недостаточности [3]. Изменения в транспорте и внутриклеточной концентрации ионов кальция играют ключевую роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, дифференцировка, секреция, сокращение, а также передача нервного импульса, иммунный ответ и т.п. [4]. Целью данного исследования стало изучение Ca<sup>2+</sup>-сигнализации нейронов коры мозга гомозиготных мышей с мутацией транскрипционного фактора Sip1 во время моделирования эпилептиформной активности *in vitro*.

Для получения мутантных Sip1-мышей проводилось кондиционное удаление гена Sip1 в нейронах с использованием линии мышей, несущих ген NexCre. Эксперименты по регистрации уровня цитозольного кальция в клетках (10 дней *in vitro*), нагруженных флуоресцентным кальциевым зондом Fura-2, проводили с помощью системы анализа изображений «Cell observer» (Carl Zeiss, Германия), на базе моторизованного микроскопа Axiovert 200M. Моделирование эпилептиформной активности *in vitro* производилось двумя способами: 1) с помощью удаления ионов магния из экстраклеточной среды и 2) ингибирования ГАМК(A)-рецепторов нейронов с помощью добавления 10 мкМ бикикулина. Для выделения суммарной РНК из первичной культуры нейронов использовали набор реагентов Mag Jet RNA (Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР-РВ проводили в 48-луночном амплификаторе «Dtlite5» (ДНК-Технология, Москва, Россия).

В работе показана связь мутации транскрипционного фактора Sip1 с нарушением нейротрансмиссии в коре мозга *in vitro*. С помощью флуоресцентной микроскопии установлено, что в нейронах коры мозга, полученных из гомозиготных мышей с мутацией Sip1 (Sip1<sup>fl/fl</sup>), подавлены Ca<sup>2+</sup>-сигналы в безмагниевого среде и на фоне ингибитора ГАМК(A)-рецепторов – бикикулина. Для нейронов коры мозга мышей дикого типа характерны синхронные высокочастотные Ca<sup>2+</sup>-осцилляции с большой амплитудой, происходящие во всех нейронах сети в ответ на безмагниевого среду и бикикулин. В отличие от нейронов коры мозга мышей дикого типа, в культурах Sip1<sup>fl/fl</sup>-нейронов регистрируются только одиночные Ca<sup>2+</sup>-импульсы или затухающие Ca<sup>2+</sup>-осцилляции и только в единичных нейронах, тогда как большая часть популяции клеток не реагирует на эти стимулы. Данная сигнальная недостаточность Sip1<sup>fl/fl</sup>-нейронов коррелирует с подавленным уровнем экспрессии генов, кодирующих субъединицы основных возбуждающих рецепторов – NMDA, AMPA и каинатных, протеинкиназ – PKA, JNK, CaMKII, а также транскрипционного фактора – Hif1α. Данные нарушения частично отменяются при выращивании Sip1<sup>fl/fl</sup>-нейронов в средах с добавлением 1 нМ противовоспалительного цитокина – интерлейкина-10 (IL-10). IL-10 увеличивает экспрессию вышеуказанных генов, но не до уровня экспрессии в клетках дикого типа. При этом, амплитуды Ca<sup>2+</sup>-сигналов в ответ на аппликацию селективных агонистов NMDA-, AMPA- и каинатных рецепторов также увеличиваются и растет доля нейронов, реагирующих Ca<sup>2+</sup>-осцилляциями на безмагниевого среду и бикикулин. Таким образом, противовоспалительный цитокин – IL-10 восстанавливает нейротрансмиссию в нейрональных сетях с мутацией транскрипционного фактора Sip1 за счет регуляции экспрессии генов, кодирующих сигнальные белки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ – МК-677.2019.4.

1. Conidi A. et al. Aptamers and their potential to selectively target aspects of EGF, Wnt/beta-catenin and TGFbeta-smad family signaling // Int. J. Mol. Sci. 2013a. Vol. 14. P. 6690.
2. Ivanovski I. et al. Phenotype and genotype of 87 patients with Mowat-Wilson syndrome and recommendations for care // Genet. Med. 2018. Vol. 20. P. 965.
3. Turovskaya M.V. et al. Sip-1 mutation causes a disturbance in activity of NMDA- and AMPA-, but not kainate receptors of neurons in cerebral cortex // Neurosci. Lett. 2017. Vol. 650. P. 180.
4. Berridge M.J. et al. Calcium-a life and death signal // Nature. 1998. Vol. 395. P. 645.



## МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТОВ АЛЬФА2-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ IN VITRO. РОЛЬ АСТРОЦИТОВ И НЕЙРОГЛИАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

### NEUROPROTECTIVE MECHANISMS OF THE ALPHA2-ADRENERGIC RECEPTORS AGONISTS DURING ISCHEMIA-REPERFUSION IN VITRO. THE ROLE OF ASTROCYTES AND NEUROGLIAL INTERACTIONS

Туровский Е.А., Туровская М.В., Гайдин С.Г.

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, turovsky.84@mail.ru

Инсульт сопровождается повреждением и гибелью нейронов, происходящим за счет эксайтотоксической секреции глутамата и его накопления в экстраклеточном пространстве, нарушения трансмембранных градиентов и ацидоза [1]. Глутамат в эксайтотоксических концентрациях активирует возбуждающие рецепторы глутамата и увеличивает концентрацию ионов кальция в цитозоле ( $[Ca^{2+}]_i$ ) клеток мозга, что вызывает усиление образования свободных радикалов, активацию липидных пероксидаз, протеаз, фосфолипаз, развитие окислительного стресса и накопление свободных жирных кислот в цитозоле [2, 3]. Адренергические рецепторы широко представлены в мозге, подразделяются на несколько типов –  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 и экспрессируются как в нейронах, так и глиальных клетках. Агонисты  $\alpha$ 2-адренорецепторов, широко используемые для лечения неврологического дефицита, гипертензии, анальгезии, но могут также применяться в качестве нейропротекторов для защиты и профилактики инсультов [4]. Молекулярные и клеточные механизмы, активируемые  $\alpha$ 2-адренергическими рецепторами с целью защиты мозга от ишемического повреждения, нуждаются в детальном изучении и стали целью настоящего исследования.

Исследования проводились на нейроглиальных клеточных культурах гиппокампа, полученных из новорожденных крыс породы Sprague Dawley. Для измерения динамики  $[Ca^{2+}]_i$  клетки (10 дней *in vitro*) загружались кальций-чувствительным зондом Fura-2 и далее моделировались ишемия-подобные условия с помощью депривации глюкозы и кислорода в экстраклеточной среде *in vitro* [3]. Для изучения эффектов агонистов  $\alpha$ 2-адренорецепторов на OGD-индуцированную инициацию процессов апоптоза и некроза использовалось двойное окрашивание пропиридиум иодидом и флуоресцентным субстратом каспазы-3, NucView488. Для визуализации АТФ-содержащих везикул, астроциты окрашивали с помощью хинакринина [5]. Секрецию везикул регистрировали методом TIRF-микроскопии. Для анализа изменения экспрессии генов, вызванного добавлением агонистов  $\alpha$ 2-адренорецепторов, использовался метод полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Проведенные исследования нейропротекторных свойств агонистов  $\alpha$ 2-адренергических рецепторов показали их противовоспалительное и антиапоптотное действие во время ишемии и реоксигенации, реализуемое за счет изменения базового уровня экспрессии генов-регуляторов этих процессов. На уровне  $Ca^{2+}$ -сигналикации, эффект агонистов  $\alpha$ 2-адренергических рецепторов приводит к ингибированию глобального повышения  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках гиппокампа во время OGD *in vitro* и к уменьшению числа клеток, погибающих по пути некроза. В механизм защитного действия агонистов  $\alpha$ 2-адренергических рецепторов вовлечена  $Ca^{2+}$ -зависимая секреция АТФ астроцитами.

Секрецией астроцитами глиотрансмиттеров (в частности секрецией АТФ) в ответ на активацию  $\alpha$ 2-адренергических рецепторов может объясняться защитное действие альфа-2 агонистов при сопряженных с гипертоническим нейрональных сетей патологиях, таких как эпилепсия [6] и печёночная энцефалопатия [7]. Ввиду того, что эффекты агонистов  $\alpha$ 2-адренергических рецепторов рассматриваются зачастую в контексте их действия только на нейроны, полученные нами результаты, могут внести существенный вклад в понимание функционирования нейроглиальных сетей в норме и при патологии, что может иметь потенциальное значение при разработке более эффективных препаратов, предназначенных для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Президента РФ (МК-626.2018.4 и МК-677.2019.4).

1. Xing C. et al. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke // *Int. J. Stroke*. 2012. Vol. 7. P. 37844.
2. Siesjo B. Mechanisms of ischemic brain damage // *Crit. Care Med*. 1988. Vol. 16. P. 954.
3. Turovskaya M. et al. Taxifolin protects neurons against ischemic injury *in vitro* via the activation of antioxidant systems and signal transduction pathways of GABAergic neurons // *Mol. Cell. Neurosci*. 2019. Vol. 96. P. 10.
4. Zhang Y. et al. Neuroprotection by Alpha 2-Adrenergic Agonists in Cerebral Ischemia // *Curr. Neuropharmacol*. 2005. Vol. 3. P. 317.
5. Akopova I. et al. Imaging exocytosis of ATP-containing vesicles with TIRF microscopy in lung epithelial A549 cells // *Purinergic signal*. 2012. Vol. 8. P. 59.
6. Szot P. et al. The anticonvulsant and proconvulsant effects of alpha2-adrenoreceptor agonists are mediated by distinct populations of alpha2A-adrenoreceptors // *Neuroscience*. 2004. Vol. 126. P. 795.
7. Calligaris L. et al. Efficacy of clonidine in hyperammonemia induced hyperexcitability syndrome // *Paediatr. Anaesth*. 2013. Vol. 23. P. 202.

**УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ВЫЖИВАНИИ И СМЕРТИ НЕЙРОНОВ И  
УДЕЛЕННЫХ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ АКСОТОМИИ РЕЦЕПТОРА РАСТЯЖЕНИЯ РАКА**  
**THE INVOLVEMENT OF CALCIUM SIGNALING IN SURVIVAL OF NEURONS AND  
REMOTE GLIAL CELLS AFTER AXOTOMY OF THE CRAYFISH STRETCH RECEPTOR**

*Хайтин А.М., Рудковский М.В., Узденский А.Б.*

Лаборатория молекулярной нейробиологии, Академия биологии и биотехнологии,  
Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: auzd@yandex.ru

Аксотомия (АТ) вызывает дегенеративные изменения и смерть нервных клеток или приводит к их регенерации. Глиальные клетки поддерживают выживание поврежденных нейронов. Недавно показано, что аксотомия приводит к смерти части нервных клеток не только вблизи от места перерезки аксона, но и удаленных на значительное расстояние [1]. Молекулярные механизмы этих процессов пока недостаточно изучены. Ионы  $Ca^{2+}$  является центральным вторичным мессенджером в клеточном метаболизме и реакциях системы нейрон-глия на повреждения. Но конкретная роль  $Ca^{2+}$  в выживании или смерти удаленных глиальных клеток (УГК) после АТ остается невыясненной. Мы изучили влияние аксотомии на смерть и выживание глиальных клеток в изолированном рецепторе растяжения рака (РРР), удаленных от места перерезки аксона, а также участие  $Ca^{2+}$  в этих процессах. Изолированный РРР – простой естественный нейроглиальный препарат, состоящий из рецепторной мышцы, укрепленного на ней одиночного механорецепторного нейрона (МРН) и окружающей глиальной оболочки. Были изучены различные пути проникновения  $Ca^{2+}$  в цитозоль, а также роль некоторых  $Ca^{2+}$ -зависимых сигнальных путей в выживаемости и смерти УГК после аксотомии РРР. Была использована методика выделения РРР, которая позволяет изолировать его, не нарушая целостности аксона. Такие интактные (Int) препараты служили контролями [1,2]. Концентрацию  $Ca^{2+}$  в цитозоле  $[Ca^{2+}]_c$ , в цитозоле определяли с помощью флуоресцентного зонда Fluo-4.

Перерезка аксона МРН вызывала повышение уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле, аксоне и особенно в глиальной оболочке в течение первых 40 минут. Аксотомия не меняла частоту и амплитуду нервных импульсов, но снижала продолжительность импульсации МРН. После АТ повышался уровень некроза и апоптоза УГК, окружающих 2-мм проксимальный сегмент аксона МРН на расстоянии 5-7 мм от места перерезки. Для выяснения механизмов передачи сигнала о повреждении аксона МРН к УГК было изучено влияние различных элементов кальциевого сигнального пути. Тройная концентрация  $Ca^{2+}$  в физиологическом растворе усиливала АТ-индуцированный апоптоз УГК, но снижала уровень некроза. Кальциевый ионофор иономицин резко снижал продолжительность импульсации МРН в интактных и аксотомированных РРР. Он вызывал апоптоз глии, который в АТ-препаратах был выше на 130%. Ионы  $Cd^{2+}$ , блокирующие кальциевые каналы, повышали длительность импульсации МРН в контрольных и аксотомированных РРР. Циклоспорин А, блокирующий высокопроницаемые митохондриальные поры, сокращал длительность импульсации аксотомированных нейронов на 43%. Тапсигаргин, блокатор  $Ca^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикулума (SERCA), достоверно снижал продолжительность импульсации интактных, но не аксотомированных МРН на 32%. Он повышал некроз УГК как в интактных, так и аксотомированных РРР, но вызывал апоптоз УГК только в аксотомированных препаратах. Ингибирование рианодиновых рецепторов ЭР рианодином и дантроленом дала разные результаты: рианодин не влиял на смерть УГК, а дантролен стимулировал АТ-индуцированный апоптоз, но снижал некроз УГК. Блокатор  $Ca^{2+}$ -зависимых  $K^+$ -каналов мауротоксин стимулировал апоптоз УГК в обеих группах препаратов. Ингибирование протеинкиназы РКС стауроспорином стимулировало апоптоз, но снижало некроз УГК после аксотомии МРН. Ингибирование кальмодулин-киназы II с помощью KN-93 снижало некроз УГК, но ингибирование кальмодулина флуфеназином не влияло на их смерть.

Таким образом, аксотомия подавляла функциональную активность МРН и стимулировала некроз и апоптоз УГК. Разные элементы поддержания кальциевого гомеостаза участвовали в регуляции некротических и апоптотических процессов в УГК после аксотомии РРР. Проникновение  $Ca^{2+}$  в цитозоль стимулировало апоптоз и некроз глиальных клеток. Высокопроницаемые митохондриальные поры, через которые  $Ca^{2+}$  мог выходить в цитозоль, регулировали импульсацию аксотомированного нейрона. Работа SERCA по выкачиванию  $Ca^{2+}$  из цитозоля УГК в аксотомированном РРР обладала как противонекротическим, так и противоапоптотическим действием. Кальмодулин-киназа II регулировала некроз УГК. Протеинкиназа РКС и  $Ca^{2+}$ -зависимые  $K^+$ -каналы оказывали противоапоптотическое действие на УГК в аксотомированных РРР.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ № 6.6324.2017/8.9.

1. Khaitin A.M., Rudkovskii M.V., Uzdensky A.B.  $Ca^{2+}$  mediates axotomy-induced necrosis and apoptosis of satellite glial cells remote from the transection site in the isolated crayfish mechanoreceptor // Mol. Cell. Neurosci., 2018, 88: 7–15
2. Khaitin A.M., Rudkovskii M.V., Uzdensky A.B. The method of isolation of the crayfish abdominal stretch receptor maintaining a connection of the sensory neuron to the ventral nerve cord ganglion // Invert. Neurosci., 2015, 15: 176.

**ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ОБМЕНА ГАМК В ЦНС КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТОЛУОЛА**  
**DYNAMICS OF CHANGES IN GABA METABOLISM IN THE CNS OF RATS UNDER**  
**EXPOSURE OF TOLUENE**

**Фараджев А.Н., Агаева С.В.**

Азербайджанский Государственный Педагогический Университет, г. Баку

Интоксикация толуолом в первую очередь поражает ЦНС, вызывая серьезные структурные и функциональные изменения. Согласно данным последних лет, ведущим фактором нейротоксического влияния толуола на ЦНС является его воздействие на нейротрансмиттерные и рецепторные системы мозга [1-4].

Целью настоящей работы было изучение влияния толуола (внутрибрюшинно, 5 дней, 1000 мг/кг) на обмен ГАМК в тканях структур головного мозга месячных крыс.

Результаты проведенных исследований, показали что у месячных крыс в контроле содержание ГАМК составляет в кора больших полушарий мозга  $2,48 \pm 0,08$ , в мозжечке  $2,15 \pm 0,07$ , в стволе мозга  $1,81 \pm 0,05$ , в гипоталамуса  $2,91 \pm 0,11$  мкмоль/г. После действия толуола содержания ГАМК в тканях коры больших полушарий мозга, мозжечка, ствола мозга и гипоталамуса увеличивается и становится равным  $3,87 \pm 0,11$  мкмоль/г,  $3,68 \pm 0,15$ ,  $2,79 \pm 0,11$  и  $4,10 \pm 0,14$ , что составляет 56%, 71%, 54% и 41% по сравнению с данными контрольной группы. Содержание свободной Глу у месячных крыс в тканях избранных структур ЦНС после воздействия толуола снижается. Таким образом, в контроле содержание свободной Глу в ткани коры больших полушарий головного мозга составляет -  $4,42 \pm 0,13$ , мозжечке -  $4,73 \pm 0,16$ , стволе мозга -  $4,90 \pm 0,11$ , в гипоталамуса -  $5,45 \pm 0,17$  мкмоль/г. После действия толуола у месячных крыс содержания Глу в кора больших полушарий мозга - 33%, в мозжечке - 40%, в стволе мозга - 35%, в гипоталамуса - 26% уменьшается. При этом содержание свободной Асп в тканях исследованных структур ЦНС также уменьшается: в кора больших полушарий мозга - 37%, в мозжечке - 41%, в стволе мозга 36%, в гипоталамуса - 28%.

Результаты следующих серий опытов показали, что после воздействия толуола активность ГДК в изучаемых структур головного мозга повышается. Это повышение в ткани коры больших полушарий составляет 51%, в мозжечке - 78%, в стволе мозга - 61%, в ткани гипоталамуса - 48%. Активность фермента ГАМК-Т в указанных условиях в тканях коры больших полушарий головного мозга, мозжечка, ствола мозга и гипоталамуса по сравнению с контролем понижается на 32, 47, 41 и 29%, соответственно.

Результаты проведенных исследований показали, что в нормальных условиях у интактных крыс содержание свободных медиаторных аминокислот - ГАМК, Глу и Асп распределено неравномерно в изучаемых отделах мозга. Вероятно, что это связано с уровнем ГАМК-, Асп- и Глутергических нейронов в этих отделах головного мозга. ГАМК представляет собой основной ингибитор нейротрансмиссии в ЦНС. Эта аминокислота действует, связываясь с ГАМК-рецепторами — лигандзависимыми каналами, в которых участок связывания нейромедиатора и ионный канал составляют один макромолекулярный комплекс. Поскольку ионный канал, входящий в состав ГАМК-рецептора, селективно пропускает внутрь нейрона анионы хлора, активация ГАМК-рецептора приводит к гиперполяризации нейрона и, таким образом, тормозит запуск потенциала нейропередачи.

Основные изменения системы ГАМК при воздействии на организм толуола связаны с увеличением активности ГДК и угнетением ГАМК-Т. В условиях интоксикации толуолом происходит нарушение равновесия между образованием ГАМК с преобладанием процесса ее синтеза. Увеличенное содержание ГАМК в нейронах головного мозга может способствовать временному сохранению нервных клеток при неблагоприятных условиях функционирования организма.

1. Liu Ch.L. et al. Effects of toluene exposure during brain growth spurt on GABAA receptor-mediated functions in juvenile rats // *Toxicol. Sci.* 2007. Vol. 95. № 2. P. 443-451.
2. Chan M.H. et al. Toluene exposure during the brain growth spurt reduced behavior responses to nicotine in young adult rats: A potential role for nicotine acetylcholine receptors in fetal solvent syndrome // *Toxicol. Sci.*, 2008. Vol. 101, № 2. P. 286-293.
3. Perrine S.A. et al. Binge toluene exposure alters glutamate, glutamine and GABA in the adolescent rat brain as measured by proton magnetic resonance spectroscopy // *Drug Alcohol Depend.* 2011. Vol. 115. №1-2. P. 101-106.
4. Chan M.H. et al. Toluene exposure during the brain growth spurt reduced behavioral responses to nicotine in young adult rats: a potential role for nicotinic acetylcholine receptors in fetal solvent syndrome // *Toxicol. Sci.* 2008. Vol. 101. №2. P. 286-293.

## ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ АМПЛИТУДЫ, МОЩНОСТИ И ЧАСТОТЫ ЭЭГ МУЖЧИН И ЖЕНЩИН ОТ 16 К 45 ГОДАМ

### FEATURES MEN'S AND WOMEN'S DYNAMICS OF AMPLITUDE, POWER AND FREQUENCY OF THE EEG AT 16 TO 45 YEARS

*Чадова И.Н.*

Частное профессиональное образовательное учреждение Медицинский Колледж «Авиценна», г. Ставрополь, innachadova@yandex.ru

Не изученными остаются различия параметров фоновой ЭЭГ лиц мужского и женского пола в репродуктивный период (от 16 до 45 лет). Однако именно фоновые показатели отражают системные свойства коры головного мозга и определяют динамические изменения показателей во время деятельности [4]. Целью исследования являлось выявление общих и различных закономерностей фоновой ЭЭГ лиц женского и мужского пола в течение репродуктивного возраста.

Использован 21-канальный электроэнцефалограф «Нейрон-Спектр-4/ВП». В исследовании приняли участие 47 мужчин и 65 женщин. В обеих половых группах с помощью корреляционного анализа и Т-критерия Стьюдента установлено снижение мощности и амплитуды ЭЭГ (средней, максимальной и полной) с возрастом, преобладающее в задних отделах скальпа и в правом полушарии, затрагивающее преимущественно медленные дельта и тета ритмы ЭЭГ и усиливающееся к концу репродуктивного периода. В женской группе в большинстве отведений скальпа, кроме его левой передней области, обнаружено снижение с возрастом ( $P < 0,05$ ) амплитуды и мощности большинства частотных спектров: дельта, тета, альфа и бета В. У лиц мужского пола такая регрессия выявлена только в диапазоне альфа-ритма ЭЭГ в единичных отведениях. Уменьшение амплитуды и мощности спектров их дельта и тета ритмов ЭЭГ установлено исключительно в завершающей стадии репродуктивного периода - при переходе от ранней зрелости к поздней зрелости в небольшом числе отведений (в правых и левых лобных, и центральном). В ранний период, при переходе от юношества к зрелости, у мужчин по Т-критерию Стьюдента наоборот зафиксирован рост амплитуды и мощности высокочастотных компонентов ЭЭГ (альфа, бета Н, бета В) в центрально-задних областях левого полушария на фоне их снижения у лиц женского пола. Это объясняется с точки зрения более поздней стабилизации гормональных, ростовых и формообразовательных процессов у лиц мужского пола. В передней доле левого полушария в обеих половых группах имеет место усиление амплитуды и мощности бета Н и бета В ритмов ЭЭГ от 16 к 45 годам, проявляющееся в большем числе случаев и на большей поверхности скальпа (в теменном P3A1, фронтальных Fp1A1, F3A1 и височных T5A1, T3A1 отведениях) у мужчин по сравнению с женщинами (F7A1, Fp1A1). Обсуждается компенсаторная роль такой динамики. Установлены противоположные изменения ( $P < 0,05$ ) частоты ритмов ЭЭГ у обоих полов от 16 к 45 годам: постепенный рост у женщин и снижение у мужчин. В нее снова вовлекались преимущественно медленные дельта и тета ритмы ЭЭГ и правое полушария. Рост амплитуды и мощности и снижение частоты медленных ритмов ЭЭГ у женщин от 16 к 45 годам указывает на наличие между этими параметрами реципрокных связей, предположительно являющихся проявлением еще одного механизма компенсации, заключающегося в восполнении недостающего параметра за счет другого. У мужчин таких связей не обнаружено. Преобладающее снижение амплитуды и мощности ЭЭГ женщин в течение репродуктивного периода по сравнению с мужчинами связывается с более нестабильным гормональным фоном первых, способствующим более быстрому истощению с возрастом энергетического компонента их церебральной активности. Усиленную регрессию амплитуды и мощности медленных ритмов ЭЭГ объясняют научные сведения о влиянии на эти ритмы снижения уровня стероидов к климаксу [2]. Кроме того, близкое расположение осцилляторов дельта и тета ритмов ЭЭГ в глубинных церебральных структурах [3], указывающее на их более раннее филогенетическое происхождение и, соответственно, на менее прогрессивную их организацию по сравнению с более поверхностной быстрой ритмикой, объясняет большую зависимость их амплитудно-мощностных показателей от возрастного фактора у обоих полов [1].

1. Водолажская М. Г., Водолажский Г. И., Чадова И.Н. Подробное исследование онтогенетических изменений параметров ЭЭГ мужчин и женщин в течение репродуктивного периода // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2015. № 5. С. 614-626.

2. Кичигина В.Ф. Механизмы регуляции и функциональное значение тета-ритма: роль серотонинергической и норадренергической систем // Журнал высшей нервной деятельности. 2004. № 1. С. 101-119.

3. Куксова Н.С. К вопросу об источниках генерации медленной активности на ЭЭГ // XX съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова. Тезисы докладов. Москва: Изд-во «Русский врач», 2007. С. 294.

4. Шеповальников А. Н., Цицерошин М. Н. Анализ пространственно-временной организации ЭЭГ – путь к познанию нейрофизиологических механизмов интегративной деятельности мозга // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2007. Т. 57, № 6. С. 663-672.

## **МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОНОВ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЭРИТРОПОЭТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА IN VITRO**

### **MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF NEURONS AFTER STIMULATION OF ERITROPOETIN RECEPTOR**

***Широкова О.М.<sup>1</sup>, Соколов Р.А.<sup>1,2</sup>, Першин В.И.<sup>1,2</sup>, Мухина И.В.<sup>1,2</sup>***

<sup>1</sup> - ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> - Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, [shirokovaom@gmail.com](mailto:shirokovaom@gmail.com)

Активация эритропоэтиновой системы головного мозга может быть перспективной стратегией для лечения различных нейродегенеративных и психоневрологических заболеваний благодаря запуску не только цитопротекторных, но и нейротропных механизмов.

Целью проекта является проведение корреляций между функциональными и структурными перестройками, происходящих в зрелых нейронах при воздействии карбамилированного дарбэпоэтина in vitro.

В качестве модели для изучения влияния активации эритропоэтинового рецептора на метаболическую и биоэлектрическую активность нейрон-глиальных сетей гиппокампа использовали первичные клеточные культуры, полученных из эмбрионов мышей линии C57BL/6 (E18). Эксперименты проведены на 21-23-й дни развития культуры in vitro (DIV) при длительности воздействия CdEPO (100 нг/мл) составила 24 часа. Биоэлектрическую активность оценивали с использованием метода локальной фиксации потенциала (patch clamp), метаболическую активность определяли по изменению концентрации внутриклеточного кальция. Ультраструктурные характеристики исследовались с использованием классического метода просвечивающей электронной микроскопии.

Воздействие CdEPO в течение 24 часов на нейроны зрелой первичной культуры гиппокампа не влияет на основные характеристики биоэлектрической активности (на частоту спонтанного возникновения одиночных потенциалов действия, спонтанную пачечную активность клеток, характеристики потенциалов действия нейронов (амплитуду фазы деполяризации, пороговый потенциал, амплитуду фазы гиперполяризации), емкость мембраны), но оказывает незначительное действие на метаболическую активность в частности, длительность кальциевых событий в нейронах, повышается, а в глиальных клетках снижается частота возникновения спонтанных кальциевых волн. Количество зрелых ассиметричных контактов под влиянием CdEPO не изменяется, но происходит изменение внутренней организации дендритных шипиков - повышается число шипиков с эндоплазматическим ретикулумом и/или шипиковым аппаратом внутри.

Таким образом, активация эритропоэтинового рецептора в зрелых нейрон-глиальных сетях не оказывает влияние на электрогенез потенциала действия в нейронах первичной культуры гиппокампа, но активирует синаптогенез, обуславливающий появление в шипиках не характерной для данной клеточной модели такой органеллы как шипиковый аппарат. Наличие шипикового аппарата является результатом пластических изменений в синапсе, что отражается на увеличении длительности кальциевых осцилляций в нейронах. Кроме того, отмечено снижение частоты кальциевых осцилляций в глиальных клетках, что свидетельствует о их вовлечении в ответ на CdEPO.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00877.

## **ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МАГНОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ И ПАРВОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ НЕЙРОННЫХ СИСТЕМ В УСЛОВИЯХ МИКРОГРАВИТАЦИИ**

### **FUNCTIONAL CONDITION OF MAGNOCELLULAR AND PARO-CELLULAR NEURAL SYSTEMS IN THE CONDITIONS OF MICROGRAVITATION**

***Шошина И.И.<sup>1</sup>, Соснина И.С.<sup>2</sup>, Зеленский К.А.<sup>2</sup>, Карпинская В.Ю.<sup>3</sup>, Ляховецкий В.А.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия, [shoshinaii@mail.ru](mailto:shoshinaii@mail.ru)

<sup>2</sup>Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия, [radostniyden@mail.ru](mailto:radostniyden@mail.ru)

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, [karpinskaya78@mail.ru](mailto:karpinskaya78@mail.ru)

Магноцеллюлярная и парвоцеллюлярная нейронные системы обеспечивают передачу информации из каудальных во фронтальные отделы головного мозга в составе дорзального и вентрального путей. Системы являются нейронным субстратом механизмов глобального и локального анализа изображений, взаимодействуют на разных уровнях обработки информации и обеспечивают целостность восприятия [1]. Рассогласование взаимодействия магно- и парвоцеллюлярной нейронных систем, соответственно механизмов глобального и локального анализа изображений, приводит к стойким сенсорным нарушениям, наблюдающимся при психопатологии, в частности при шизофрении [1-4]. В ходе изучения функционального состояния этих систем в условиях хронического стресса показано повышение чувствительности магноцеллюлярной системы

[5], обеспечивающей глобальный механизм анализа зрительной информации. Полученные данные позволили предположить, что в условиях экстремальных воздействий возможно изменение характера взаимодействия оппонентных нейронных систем в результате повышения чувствительности магноцеллюлярной системы. С этой целью было предпринято исследование по изучению функционального состояния и характера взаимодействия магно- и парвоцеллюлярной нейронных систем в условиях «сухой» иммерсии, используемой для моделирования физиологических эффектов невесомости.

В исследовании приняли участие 10 добровольцев. Регистрировали контрастную чувствительность зрительной системы с помощью метода визоконтрастометрии [6] в разных диапазонах пространственных частот, основываясь на представлениях о том, что нейроны магноцеллюлярной системы, чувствительны к низким пространственным частотам, парвоцеллюлярной системы - к высоким пространственным частотам. В качестве стимулов использовали элементы Габора. Установлено повышение контрастной чувствительности в диапазоне низких пространственных частот на третий день нахождения в условиях иммерсии и через день после окончания эксперимента, по сравнению с фоновыми значениями. В остальной период времени нахождения в иммерсии испытуемые демонстрировали контрастную чувствительность такую же, как и до начала эксперимента. Чувствительность в диапазоне высоких пространственных частот в эксперименте не изменялась. Таким образом, в условиях экстремальных воздействий, в частности в условиях микрогравитации, изменяется чувствительность магноцеллюлярной нейронной системы.

Выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант №19-013-00036).

1. Шошина И.И., Шелепин Ю.Е. Механизмы глобального и локального анализа зрительной информации при шизофрении. - СПб.: ВВМ. 2016.
2. Shoshina I.I., Shelepin Yu. E. Contrast Sensitivity in Patients with Schizophrenia of Different Durations of Illness // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2015. V. 45 (5). P. 512-516.
3. Shoshina I.I., Shelepin Y.E., Vershinina E.A., Novikova K.O. The spatial-frequency characteristics of the visual system in schizophrenia // Human Physiology. 2015. V. 41(3). P. 251-260.
4. Shoshina I., Shelepin Y., Konkina S., Pronin S, Bendera A. Studies of the Parvocellular and Magnocellular Visual Channels in Health and Psychopathology // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2014. V. 44(2). P. 244-248.
5. Shoshina I.I. et al. The matched functioning of magnocellular and parvocellular visual pathways is the biomarker of stress // International Journal of Psychophysiology. 2018. V. 131. P. 93.
6. Шелепин Ю.Е., Колесникова Л.Н., Левкович Ю.И. Визоконтрастометрия. СПб.: Наука. 1985.

## **ОБЪЕКТИВИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ ПСИХИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ: МОНИТОРИНГ ХАРАКТЕРА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕХАНИЗМОВ ГЛОБАЛЬНОГО И ЛОКАЛЬНОГО АНАЛИЗА ЗРИТЕЛЬНОЙ ИНФОРМАЦИИ**

### **OBJECTIVIZATION OF MENTAL STATE: MONITORING A CHARACTER OF INTERACTION GLOBAL AND LOCAL ANALYSIS OF VISUAL INFORMATION**

***Шошина И.И., Сергиенко Р.А.<sup>1</sup>, Завьялова Е.С.<sup>1</sup>***

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, shoshinaii@mail.ru

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск

Проблема диагностики и мониторинга функционального состояния является одной из ключевых в медицине и физиологии, особо остро она проявляется в связи с субъективностью оценки психического состояния. Цель проводимых исследований – продемонстрировать возможность использования зрительных функций в качестве прогностических критериев и маркеров психического состояния. Неоднократно показано нарушение целостности восприятия при различных психотических расстройствах, в частности при шизофрении [1], что позволяет говорить о привлекательности методов оценки особенностей зрительного восприятия для диагностики и мониторинга психического состояния.

С точки зрения теории пространственно-частотной фильтрации зрительная система представлена совокупностью пространственно-частотных каналов, настроенных на восприятие определенного диапазона пространственных частот. Условно можно выделить основные из них – крупноклеточные магноцеллюлярные и мелкоклеточные парвоцеллюлярные каналы, обеспечивающие работу механизмов глобального и локального анализа информации, взаимодействие которых, в свою очередь, определяет целостность восприятия. Нейроны магноцеллюлярной системы, чувствительны к низким пространственным частотам, парвоцеллюлярной системы - к высоким пространственным частотам. Средние пространственные частоты обрабатываются обеими системами, поэтому особенности восприятия в этом частотном диапазоне могут отражать согласованность их взаимодействия. Магно- и парвоцеллюлярная система обеспечивают первичную фильтрацию зрительной информации, которая в составе дорзального и вентрального потоков передается во фронтальные отделы для опознания объектов и принятия решения. Взаимодействие нейронных систем происходит на разных уровнях

обработки информации, что возможно оценить, варьируя, например зрительную задачу. С помощью визоконтрастометрии установлено, что при шизофрении наблюдается рассогласование в работе магно- и парвоцеллюлярной систем, соответственно, механизмов глобального и локального анализа, а характер рассогласования определяется стадией развития психоза [1-3]. Таким образом, показана важность согласованной работы магно- и парвоцеллюлярной систем, соответственно, механизмов глобального и локального анализа информации, для обеспечения психического состояния, соответствующего норме.

В связи с тем, что психические расстройства рассматриваются, как результат дезадаптации, возникла гипотеза об изменении характера взаимодействия этих систем и механизмов в условиях хронического стресса. В качестве модели хронического стресса использовали профессиональное выгорание. В исследовании приняли участие 27 испытуемых, степень «выгорания» которых оценивали с помощью методики диагностики уровня профессионального выгорания В.В. Бойко. Методика позволяет определить ведущие симптомы выгорания и оценить его выраженность с позиции теории развития общего адаптационного синдрома. Измеряли контрастную чувствительность с помощью метода визоконтрастометрии [4] в задаче обнаружения элементов Габора, центральная пространственная частота которых соответствовала в низкочастотном диапазоне - 0.4 цикл/град, среднечастотном - 3.6 цикл/град, высокочастотном диапазоне - 17.8 цикл/град.

Результаты исследования свидетельствуют о доминировании среди симптомов выгорания: неадекватного эмоционального реагирования, эмоционально-нравственной дезориентации и редукции профессиональных обязанностей. Испытуемые с признаками профессионального выгорания, по сравнению с испытуемыми без признаков выгорания, демонстрировали гиперчувствительность в диапазоне низких пространственных частот и снижение контрастной чувствительности в диапазоне средних и высоких частот. Таким образом, и в условиях эмоционального выгорания показано изменение чувствительности нейронных систем, обеспечивающих глобальный и локальный анализ зрительной информации. В связи с чем можно говорить о том, что степень рассогласования в работе механизмов глобального и локального анализа может служить маркером психического состояния.

Поддержано Красноярским краевым фондом поддержки научной и научно-технической деятельности (№ 2017052402493).

1. Шошина И.И., Шелепин Ю.Е. Механизмы глобального и локального анализа зрительной информации при шизофрении. - СПб.: ВВМ. 2016.
2. Shoshina I.I., Shelepin Yu. E. Contrast Sensitivity in Patients with Schizophrenia of Different Durations of Illness // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2015. V. 45 (5). P. 512-516.
3. Shoshina I.I., Shelepin Y.E., Verzhinina E.A., Novikova K.O. The spatial-frequency characteristics of the visual system in schizophrenia // Human Physiology. 2015. V. 41(3). P. 251-260.
4. Шелепин Ю.Е., Колесникова Л.Н., Левкович Ю.И. Визоконтрастометрия. СПб.: Наука. 1985.

---

## АВТОМАТИЧЕСКОЕ ИСПРАВЛЕНИЕ АРТЕФАКТОВ В ВИДЕ СКАЧКА ЭЭГ-СИГНАЛА AUTOMATIC REMOVAL OF ARTIFACTS EVOKED BY IMPEDANCE JUMP IN EEG SIGNAL

*Щербина Д.Н.*

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, dnsherbina@srfedu.ru

Информативность показателей, рассчитываемых на основании электроэнцефалографического (ЭЭГ) сигнала, существенно зависит от помех немозгового происхождения. Каскад процедур препроцессинга нативного сигнала как правило включает: (1) выделение и выбраковку участков с существенными бессистемными помехами из-за смещения сенсоров при движениях субъекта; (2) нормализацию сигнала путем пересчета относительно общего референта и частотной фильтрации в требуемом диапазоне; (3) детекцию и режекцию стандартных физиологических артефактов, связанных с движениями глазных яблок и сердечной деятельностью. Однако, артефакты в виде резкого скачка потенциала (в различных классификациях их называют abrupt impedance change, electrode pop) остаются после указанных процедур практически в неизменном виде. Особенности артефакта в виде скачка потенциала:

1. Регистрируется только в одном канале (что говорит о техногенной природе) в виде резкого отклонения от нулевой линии в течение 4-10 мс на 100-200 мкВ в негативную сторону.
2. Из-за применения фильтра высоких частот плато после скачка превращается в затухающий осциллятор с экспоненциальным спадом с постоянной времени, обратно пропорциональной граничной частоте фильтра. Так при фильтрации выше 1 Гц сигнал возвращается до нуля примерно через 300 мс, затем 1-2 раза колеблется около нуля и через 1.5-2 с становятся неразличимым на фоне высокочастотной активности. Кроме того, из-за эффекта Гиббса могут возникать высокочастотные биения сразу после скачка.
3. Получившееся отклонение (waveform) в виде треугольника с быстрым передним фронтом и пологим задним при спектральном анализе Фурье вносит вклад во все анализируемые диапазоны: от дельта до гамма.

4. Закономерности появления скачков в связи с другими событиями (стимулами, нажатиями, морганиями) не выявляются и, по-видимому, связаны с микродвижениями электрода при подсыхании геля или деформациях эластичной электродной шапочки. Иногда на одном канале ЭЭГ за время часовой записи может быть несколько похожих скачков.

Артефакты данного типа присутствуют не во всех записях и достаточно редки, следовательно, их устранению не уделяется большого внимания. Именно поэтому они могут остаться незамеченными и привести к искажениям информационных показателей количественной ЭЭГ, которые, например, в методе усредненных связанных с событием потенциалов (ССП), достигают пиковой амплитуды 5-20 мкВ. Единичные локальные отклонения в 100-150 мкВ при усреднении 30-60 эпох могут существенно исказить форму суммарного СПП, поэтому из-за артефакта в одном отведении приходится выбраковывать качественный сигнал в других отведениях. При анализе протяженных сигналов исключать из анализа весь канал из-за 1-2 локализованных во времени артефактов нецелесообразно. Чтобы дефект не распространился на другие каналы важно устранить данный высокоамплитудный артефакт до преобразований с использованием усредненного электрода (common average reference, CAR, математически соответствует вычитанию среднего из всех каналов, рутинно проводится для стабилизации матричных преобразований при подборе решений ICA, обратной задачи ЭЭГ). Методы компонентного анализа не способны локализовать данный артефакт целиком, в частности, передний острый пик классифицируется отдельно от позднего медленного колебания. Обнаружение характерного для данного артефакта паттерна на спектрограмме возможно, однако он будет перекрываться с паттернами нормальных физиологических сигналов.

Для обнаружения артефакта в виде скачка потенциала предложен новый метод кросскорреляционного «трафаретного» поиска 2D шаблона вдоль 2D гистограммы значений сигнала (match template). Хорошее обнаружение для сигнала с частотой оцифровки 250 Гц показали характеристики решетки с временным шагом 0.08 с и амплитудным шагом 40 мкВ (примерно 1 сигма распределения). Для надежного обнаружения паттерна использовались два прохода со смещением на полшага вдоль оси времени. Паттерн поиска представлял собой матрицу со столбцом положительных значений для детекции переднего фронта, спереди и снизу ограниченного отрицательными значениями. Аналогией может быть рецептивное поле для детекции краев на изображении, только в данном случае это поле более сложной формы. Тестирование конкретных паттернов показало оптимальный порог обнаружения на уровне нормализованной корреляции  $r=0.4-0.5$ .

Для режекции артефактов была разработана процедура подбора характеристик сегментной функции, имитирующей скачок, которая вычиталась из исходного сигнала. Процедура включала уточнение моментов начала и окончания скачка и аппроксимацию предварающего и последующего отрезков полиномами 8 степени.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки № 2.955.2017/4.6.

## ФОРМАЛИЗОВАННОЕ ОПИСАНИЕ СПОНТАННОГО ОБУЧЕНИЯ НЕСКОЛЬКИМ ЯЗЫКАМ FORMALIZED DESCRIPTION OF SPONTANEOUS LEARNING IN MULTIPLE LANGUAGES

<sup>1</sup>Alexandrova N.Sh., <sup>2,3</sup>Antonets V.A., <sup>2,3</sup>Nuidel I.V., <sup>2,3</sup>Shemagina O.V., <sup>2,3</sup>Yakhno V.G.

<sup>1</sup>Sprachbrücke E.V. Берлин, Германия,

<sup>2</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,

<sup>3</sup>ИПФ РАН, Нижний Новгород

nina.alexandrova@gmx.net, yakhno@appl.sci-nnov.ru

При изучении спонтанного освоения детьми нескольких языков в различных языковых средах существуют следующие особенности [1-8]:

- В раннем возрасте (до трех лет) при двуязычном воспитании дети с одним доминирующим языком приближаются в этом языке к уровню монолингвов, но значительно отстают в другом языке. Сбалансированные же билингвы (вход каждого из языков примерно равен по времени) в обоих языках находятся «посередине», заметно отставая от уровня монолингвов [1]. Общий словарь монолингва предстает как максимум, которого можно достичь в этом возрасте.

- Сходная закономерность просматривается на основе наблюдений [2]: доминирование одного из языков при переходе к фразовой речи более благоприятно, чем при сбалансированном двуязычии.

- У билингвов наблюдается общая тенденция «уменьшения» каждого из освоенных языков [3]. В детстве и более старшем возрасте они обладают меньшим пассивным словарем и хуже оперируют вербальными стимулами, чем монолингвы.

- Естественный билингвизм возникает лишь при длительно сохраняющейся потребности общаться на обоих языках. Двуязычная среда является только необходимым условием становления билингвизма, но не его причиной. Ребенок может не освоить второй язык, несмотря на то, что слышит его ежедневно [4].



- При естественном билингвизме языки могут не только развиваться и совершенствоваться в течение жизни, но также могут останавливаться в развитии, обедняться и даже подвергаться полному стиранию (непатологическому). В одноязычной среде языковой регресс возможен лишь при тяжелой болезни [5-8].

- В популяции здоровых детей раннее многоязычие не всегда сочетается с высоким интеллектом и успешностью обучения в школе. Возможны также затруднения при изучении иностранных языков логическим способом [4].

Была разработана феноменологическая модель спонтанного обучения и формирования языков общения. В модели использованы следующие переменные: количество активных алгоритмов операций над образами окружающей среды; поток внешних или внутренних сигналов, которые осознаются субъектом; количество инструментальных алгоритмов, которые связаны с 1-м и со 2-м языками; пороговая переменная, определяющая переключение динамической системы освоения языков при активизации использования одного из них. Анализ возможных режимов функционирования модели проводился с помощью стандартных радиофизических методов анализа релаксационных систем. Удалось определить области параметров, при которых режимы функционирования модели соответствуют экспериментально зафиксированным данным при обучении детей: а) показано, что при больших порогах включения механизмов обучения и осознанного восприятия потока внешних сенсорных сигналов возможно блокирование спонтанного обучения; б) режимы модели подтверждают возможность снижения объема каждого языка по сравнению со случаем обучения только одному языку; в) продемонстрированы режимы, при которых происходят переключения от освоения двух языков к обучению только одному языку и торможению другого, или торможению обучения обоих языков.

Данная работа выполнена при поддержке Министерства Образования и Науки РФ, проект №14.Y26.31.0022

1. Hoff E., Core C. Input and Language Development in Bilingually Developing Children // *Semin Speech Lang.* 2013; 34: 215—226. doi: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1353448>

2. Александрова Н.Ш. Может ли естественный билингвизм быть вреден? Вестник РУДН. Серия: Вопросы образования: языки и специальность. 2017. Т. 14. № 2. С. 211—216

3. Bialystok E., Luk G., Peets K.F., Yang S. Receptive vocabulary differences in monolingual and bilingual children // *Biling (Camb Engl)*. 2010 Oct; 13(4): P. 525–531. doi: 10.1017/S1366728909990423

4. Александрова Н.Ш. Двухязычная среда - причина естественного билингвизма или лишь необходимое условие? // От билингвизма к транслингвизму: про и контра. Материалы III Международной научно-практической конференции Москва, РУДН, 1-2 декабря 2017 г. 142-148

5. Александрова Н.Ш. Родной язык, иностранный язык и языковые феномены, у которых нет названия // Вопросы языкознания. 2006 №3. С. 88-100.

6. Köpke B. Language attrition at the crossroads of brain, mind, and society <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00981119/document> Submitted on 20 Apr 2014

7. Александрова Н.Ш. Билингвизм— адаптация в языковой сфере? //VI Международная конференция по когнитивной науке: тезисы докладов, Калининград, 23–27 июня 2014 г., С. 114–115.

8. Александрова Н.Ш., О чем говорят единичные наблюдения естественного билингвизма? Может ли помочь математика? // Казань, 2017

## **Секция 8. Биофизическое образование.**

## ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОФИЗИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ИНТЕГРАЦИИ DEVELOPMENT OF BIOPHYSICAL EDUCATION TRENDS IN THE CONDITIONS OF INTEGRATION

*Антипов С.С.*

Балтийский федеральный университет им. И.Канта, г. Калининград,  
Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пушкино, Московская область  
Воронежский государственный университет, г. Воронеж *ss.antipov@gmail.com*

На сегодня подготовка огромного количества узкоспециализированных студентов не позволяет отвечать потребностям, как научного рынка труда, так и рынка труда высокотехнологического сектора экономики. Это связано с достаточно интенсивным научно-технологическим развитием, автоматизацией многих процессов, развитием систем хранения, передачи и обработки информации, а также переходом на более глубокий уровень манипуляций как с веществом, так и с отдельными частицами или молекулами. Помимо этого существуют определенные барьеры для студентов отдельных биологических, физических или химических специальностей к объектам, методам или концепциям исследования, что негативно отражается как на качестве их подготовки, так и на их мотивации к познанию. Таким образом, интеграция естественно-научных направлений подготовки является чрезвычайно актуальной и перспективной на старших курсах обучения, но наиболее целесообразным это представляется в рамках магистерской программы, что дает возможность студентам скорректировать свой образовательный трек. При этом наличие возможности для студентов сначала в интерактивном или теоретическом, а затем и в реальном формате изучить концепции построения междисциплинарных исследований, методическую базу, особенности исследований биологических объектов, возможности использования их физико-химических свойств для построения искусственных структур и принять участие в современных междисциплинарных исследованиях является крайне востребованным. В целом, научно-образовательное сообщество давно созрело для создания таких меж-, или даже мультидисциплинарных, магистерских программ, более того, подготовка "универсального специалиста" является одним из основных вызовов современных реалий как в России, так и в Мире.

На сегодня существует достаточно большое количество вузов и научных центров, в которых проходит подготовка студентов по классическим естественно-научным направлениям. При этом наблюдается тенденция к снижению доли учебных биофизических дисциплин в образовательных программах. При этом им на смену вводят разделы молекулярной биологии, биоинформатики и биотехнологии, не смотря на то, что понимание базовых процессов закладывается как в базовом курсе биофизики, так и в отдельных спецкурсах. Существуют хорошо известные биофизические центры и научные школы, демонстрирующие как достаточно высокий уровень исследований, так качество магистерских и кандидатских диссертаций. Однако на сегодня до сих пор не пересмотрены концептуальные принципы биофизического образования с учетом требований современности.

С каждым годом выпускается все больше публикаций посвященных исследованиям гибридных молекул созданных на базе белков, ДНК и их комплексов. Более того, существует тенденция к развитию исследований с использованием установок уровня «Mega-science» биологических макромолекул и их комплексов, которые представляют огромный как фундаментальный, так и практический интерес. При этом на биологических направлениях существуют единичные дисциплины позволяющие студентам или магистрам сформировать представление о таких установках, а на физических направлениях – раскрывающие особенности проведения исследований биологических молекул с использованием таких установок. Ситуация усугубляется тем, что существуют планы по созданию трех установок класса «Mega-science» в рамках национального проекта «Наука» на территории России. Таким образом, уже через четыре-пять лет в России нужно будет подготовить как сессионных пользователей, так и постоянных сотрудников этих станций способных работать с биологическим материалом и интерпретировать получаемые результаты. Без сомнения, существующие методические наработки необходимо учитывать и использовать при разработке учебных программ, особенно магистерских, но в динамично развивающихся областях знания базироваться только на них уже не представляется возможным, как с точки зрения проведения исследования, так и с точки зрения подготовки востребованных специалистов для реального сектора экономики. Таким образом, общую концепцию междисциплинарной подготовки студентов можно сформулировать как "от-био-к-нано", и главную роль в продвижении этого тренда должны на себя взять биофизические центры и крупные университеты, обладающие необходимой образовательной и научной инфраструктурой, сложившимися коллаборациями и кадрами.

Данное исследование было поддержано из средств субсидии, выделенной на реализацию Программы повышения конкурентоспособности БФУ им. И.Канта.

**ПОДГОТОВКА БИОФИЗИКОВ В ВОРОНЕЖСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ:  
СОСТОЯНИЕ, ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ТРЕНДЫ**

**TRAINING OF BIOPHYSICISTS AT VORONEZH STATE UNIVERSITY: STATE,  
EDUCATIONAL TRENDS**

*Артюхов В.Г., Наквасина М.А.*

Воронежский государственный университет, Воронеж, E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Кафедра биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета Воронежского государственного университета осуществляет подготовку бакалавров и магистров по направлению «Биология», а также медицинских биофизиков по специальности «Медицинская биофизика».

Выпускники-бакалавры по профилю «Биофизика» готовятся к исследовательской и научно-производственной деятельности в области биотехнологии, медицины, молекулярно-клеточной биологии. Профилизация (12 человек) начинается со второго семестра второго курса и включает лекционные, практические и лабораторные занятия по дисциплинам: «Биофизические методы исследований», «Биофизика мембранных и клеточных процессов», «Коммерциализация продуктов – результатов медико-биологических исследований» (2 курс); «Физика ферментов», «Компьютерные исследования и моделирование биопроцессов» (3 курс), «Спецпрактикум» (2-3 курсы); «Структура и функции биомакромолекул и их комплексов», «Радиационная и фотобиофизика», «Биофизика неионизирующих излучений» (4 курс). Учебная научно-исследовательская практика, основной задачей которой является знакомство со структурой и особенностями процесса научной деятельности, реализуется после 2 курса на кафедре и на базе Института биофизики клетки РАН. В ходе информационно-аналитической практики на 2 курсе студенты приобретают навыки поиска, реферирования и анализа научной информации с использованием информационных баз данных сети Интернет. На 3 курсе осуществляется производственная научно-исследовательская практика «Физико-химические методы исследования в биологии», на 4 курсе — производственная информационно-аналитическая и преддипломная, основными задачами которых являются систематизация, расширение и закрепление профессиональных знаний в области биофизики, а также теоретическое и экспериментальное завершение выпускной работы бакалавра. Особенности (проблемы) подготовки бакалавров: ранняя специализация (без освоения общих дисциплин «Биохимия», «Молекулярная биология», «Математические методы в биологии»), резкое снижение количества аудиторных (контактных) часов, в том числе лекционных.

План подготовки магистров по программе «Биофизика» включает спецдисциплины: «Молекулярная биология и биофизика», «Физико-химические основы межклеточных взаимодействий», «Биофотоника и фотодинамические эффекты», «Фотофизика, фотохимия и фотоиммунология компонентов крови» (1 курс); «Физико-химические основы регуляторных процессов в биосистемах», «Молекулярная и надмолекулярная организация белковых комплексов» (2 курс). В течение всего периода обучения проводятся научно-исследовательская работа и научно-исследовательский семинар, целью которого является подготовка студентов к активному участию в научных семинарах, конференциях, симпозиумах и съездах. Главная проблема магистратуры: осуществление планового набора (13 человек) на 70-80 % из числа выпускников бакалавриата кафедры и на 30-20 % из выпускников педагогических, технологических и сельскохозяйственных университетов, уровень подготовки которых существенно ниже. Другие проблемы обучения магистров: «крен» в направлении педагогической подготовки, сдача выпускного государственного экзамена не по специальности, а по педагогике; трудности адаптации бакалавров других профилей к биофизическим исследованиям и усложнение работы преподавателей с «неоднородной» группой студентов; учет потребностей рынка труда и работодателей в подготовке магистров и в этой связи необходимость постоянного обновления материально-технической базы в условиях сокращения ставок ППС и учебно-вспомогательного персонала.

ВГУ с 2017-2018 учебного года осуществляет подготовку медицинских биофизиков. Выпускники этой специальности, которым присваивается квалификация «Врач-биофизик», готовятся к медицинской и научно-исследовательской видам профессиональной деятельности. Кафедра биофизики и биотехнологии должна осуществлять реализацию общих и специальных дисциплин: «Общая биофизика», «Медицинская биофизика», «Биофизические основы функциональной диагностики», «Лучевая диагностика и терапия», «Инструментальные методы диагностики», «Общая и медицинская радиобиология», «Медицинская электроника», «Молекулярная биофизика», «Биофизические основы клинично-лабораторной диагностики», «Биофизика клетки», «Бионанотехнологии», «Биофизика органов и систем», «Биофизические основы гомеостаза», «Квантовая биофизика», «Механизмы биологического действия неионизирующих излучений», «Молекулярно-клеточные основы развития патологий», учебной практики, производственной научно-исследовательской работы. В этой связи необходимо увеличение штата ППС с постоянным повышением их квалификации в ведущих научных и медицинских учреждениях РФ, учебно-вспомогательного персонала, аудиторного фонда, совершенствование материально-технической базы и расширение направлений научной работы кафедры в соответствии с ключевыми проблемами медико-биологической науки.

Образовательный процесс на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского госуниверситета базируется на следующих принципах: фундаментальность образования, интеграция дисциплин физико-химической биологии, обеспеченность направления научно-исследовательской работы каждого студента необходимой материально-технической базой.

## **ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ОБУЧЕНИЮ ФИЗИКЕ СТУДЕНТОВ НЕ ФИЗИЧЕСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ**

### **INNOVATIVE APPROACHES IN TEACHING PHYSICS TO STUDENTS OF NON-PHYSICAL SPECIALTIES**

**Дигурова И.И.<sup>1</sup>, Крайнова Е.Ю.<sup>2</sup>, Дигуров Р.В.<sup>3</sup>, Гурова Н.Н.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>РНИМУ им. Н.И Пирогова, Москва, digurova56@mail.ru

<sup>2</sup>ЯГМУ, Ярославль, celena.6363@mail.ru

<sup>3</sup>МФТИ, Долгопрудный, roman.digurov@yandex.ru

<sup>3</sup>СФУ, Красноярск, nina-guro@mail.ru

При обучении физике студентов не физических специальностей (будущих врачей, провизоров, технологов, экологов и других) преподаватели часто сталкиваются с недостаточным пониманием важности освоения предмета. Также роль физики порой недооценивается учащимися при освоении курса «Концепция современного естествознания». Изучение предметов в старших классах проводится на выборной основе, что привело к ухудшению подготовки по физике в средней школе. А в условиях продолжительного демографического спада ряд ВУЗов, в частности, медицинские, отменили вступительный экзамен по физике. Низкий уровень исходных знаний, иногда перерыв в учебе, часто необходимость сочетания учебы и работы – все это снижает учебную самостоятельность студентов. Результативность же во многом зависит не только от организации обучения и его методического обеспечения, но и от инновационных подходов, экономически эффективных как для студента, так и для образовательного учреждения, и, что очень важно, повышающих мотивацию.

Одним из подходов является установление преемственности изучения конкретных разделов физики в школе и ВУЗе, а также межпредметных связей и практического применения рассматриваемых тем. Составление соответствующих схем практиковалось нами в ряде ВУЗов: ЯГМУ, НИТУ МИСИС, СФУ

➤ при выполнении учебно-исследовательской работы (написании рефератов и подготовке докладов) студентами лечебного и педиатрического факультетов по разделам курса медицинской физики. Предложенные темы связаны с изучением основ физических методов диагностики, в том числе лабораторной (например, рефрактометрические методы исследования в медицине), и лечения (например, применение фонофореза в травматологии). Такие темы для докладов и рефератов целесообразнее предлагать студентам, уже имеющим среднее медицинское образование;

➤ при проведении экспериментальных исследований (например, по специальности «Технология художественной обработки материала»). Схемы показывают, какие разделы физики необходимо знать для того, чтобы понять физическую основу функционирования используемых при выполнении данного эксперимента приборов;

➤ при написании рефератов по курсу «Концепция современного естествознания» студентами специальности «Природопользование»;

➤ при планировании работы студенческого научного кружка по физическим основам гемореологии.

Ресурсосберегающей педагогической технологией являлась интеграция студенческого научного общества в выполнение плановой научно-исследовательской работы кафедры физики. В деятельности кружка применялись инновационные подходы: метод сквозного обучения и лонгитюдного эксперимента в соответствии с современными тенденциями непрерывного образования. Это способствовало активизации познавательной и творческой деятельности студентов. Занятия в кружке не только популяризировали гемореологию и гемодинамику, но и повышали мотивацию к изучению важных для будущего врача разделов общей и медицинской физики, формировали стойкие межпредметные связи и способствовали выполнению принципа метапредметности, что ведет к универсальной надпредметной деятельности.

Предложенные подходы к обучению ориентированы на выработку у студентов не физических специальностей навыков превращения основных физических методов в средства качественного решения профессиональных задач.

---

## **ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В УНИВЕРСИТЕТСКИХ КУРСАХ «МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ В БИОЛОГИИ» И «БИОФИЗИКА»**

### **INFORMATION TECHNOLOGIES IN MATHEMATICAL MODELS IN BIOLOGY AND BIOPHYSICS UNIVERSITY COURSES**

**Дьяконова А.Н., Плюснина Т.Ю., Фурсова П.Ю., Хрущев С.С., Ризниченко Г.Ю.**

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, Москва, alex.diakonova@gmail.com

Кафедра биофизики биологического факультета МГУ проводит два общефакультетских курса: «Математические модели в биологии» и «Биофизика». В рамках курсов студенты знакомятся с математическим моделированием и выполняют практические задачи. Одной из задач курсов является обучение студентов

составлению математических моделей и их анализу при помощи численных методов на компьютере. В докладе будет рассказано, каким образом преподаватели кафедры используют информационные технологии (ПО, веб-сайты, методы онлайн проверки знаний) для улучшения качества преподавания.

Для упрощения доступа студентов к материалам курса «Математические модели в биологии» был разработан сайт mathbio.ru, который содержит актуальные записи лекций Г.Ю. Ризниченко, описания семинарских занятий, виртуальную лабораторию с интерактивными симуляциями основных моделей, рассматриваемых в курсе. Сайт доступен для студентов в любой момент при условии наличия доступа к интернету.

Помимо этого, в курсах «Математические модели в биологии» и «Биофизика» используются онлайн-оценка знаний студентов при помощи платформы Moodle. В докладе мы обсудим, как такой способ проверки знаний коррелирует с традиционными способами – письменными контрольными работами и устным экзаменом.

---

## **ОСОБЕННОСТИ УЧЕБНОГО КУРСА «МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНОГО ТВОРЧЕСТВА» ДЛЯ МАГИСТРАНТОВ-БИОФИЗИКОВ И БИОХИМИЧЕСКИХ ФИЗИКОВ**

### **PECULIARITIES OF THE TRAINING COURSE «METHODOLOGY OF SCIENTIFIC CREATIVITY» FOR UNDERGRADUATES-BIOPHYSICS AND BIOCHEMICAL PHYSICISTS**

*Медведев Л.Н.*

Сибирский федеральный университет, Красноярск, lenemed@mail.ru

Номенклатура учебных дисциплин бакалавриата естественно-научного направления претерпела определенные изменения по сравнению со специалитетом. Укрупненные блоки нивелируют специфику традиционных специальных дисциплин при существенном уменьшении объема аудиторных занятий. Вследствие этого резко ограничилось возможности преподавателя осветить принципиальные вопросы истории и методологии соответствующих областей знания. Особое значение данное обстоятельство приобрело при подготовке биофизиков, поскольку физические и биологические дисциплины заметно отличаются по соотношению теории и эмпирики и частным вопросам методологии. Поэтому бакалавры с трудом стали представлять реальные пути прироста научного знания, тем более, что, судя по социологическим опросам, подавляющее большинство из них за период обучения не прочитали ни одной научно-популярной и художественной книги о науке и ее деятелях. По представлениям среднестатистического студента научные открытия, в лучшем случае, совершаются по принципу «сел, подумал, открыл». Естественно, что тем большее значение стал приобретать отдельный курс по методологии науки, предлагаемый магистрантам-биофизикам и биохимическим физикам под названием «Методология научного творчества». Его задача ясна по определению: ознакомить с существом методологии науки, т.е. раскрыть общие подходы и методы, используемые в научном поиске.

Однако по ходу практической реализации курса, начатой в 2010 году, обнаружился ряд сложностей, которые следовало учитывать и постепенно преодолевать. Во-первых, методологический, гуманитарный характер курса, т.е. «размытость» понятий и терминов гносеологии по сравнению с однозначностью и четкостью физических, химических и биологических. Во-вторых, имеющаяся учебно-методическая литература написана либо с уклоном в гносеологию и философию науки, либо представляет изложение научного метода фактически в виде инструкций, наподобие положений техники безопасности. В том и другом случае лишена современных, реальных примеров, наглядно иллюстрирующих положения метода. В частности, например, возникла проблема объяснения состоятельности научного метода: должна ли соблюдаться вся батарея требований без исключения, а если нет, то имеются ли среди них критические. В-третьих, неубедительно акцентируется специфическая сложность поиска научной истины, т.е. открытие ранее неизвестных фактов и законов, что, собственно и составляет существо науки как социально-культурного института. Поэтому магистранты слабо представляют причины ошибок, заблуждений и возникновения паранаучных представлений. Следовательно, возникает иллюзия, что они есть следствие некачественно выполненного поиска. В-четвертых, в них не представлены или отражены абстрактно и неубедительно современные проблемы психологии, этики и организации научных исследований. В частности, отсутствуют рекомендации по практической подготовке заявки на грант, только вскользь упоминается проблема оценки качества научной продукции и профессиональной состоятельности ученого. В этой связи стоит упомянуть такую характерную деталь, как незнание магистрантами до нашего курса различия между ученой степенью и ученым званием.

Таким образом, стало очевидным, что модернизация курса должна быть нацелена на современную практику научных исследований. С учетом указанных обстоятельств к 2019 году на кафедре биофизики Сибирского федерального университета произошло существенное обновление содержания данного курса: тематики лекций, семинарских занятий, видов самостоятельной работы и контрольных испытаний. Была введена совершенно новая тема «Паранаучность как современная форма докритического мышления», значимая

именно для биофизиков, поскольку основные заблуждения и паранаучные представления в естествознании носят по сути биофизический характер. Несколько тем были объединены в цикл «Психология науки». Были разработаны и внедрены учебные материалы по темам «Этика научной работы», «Грантовое финансирование научных исследований», «Оценка качества научной продукции и профессиональной состоятельности исследователя», «Изобразительные возможности научной аргументации», «Математика как элемент культуры и инструмент биофизического исследования». Завершением самостоятельной работы стало выполнение проекта «Творческая биография ученого». В проекте магистрант должен раскрыть четырнадцать основных составляющих деятельности ученого. Среди них: краткая биография; мотивы выбора профессии и области науки; состояние области знания до его работ; педагогическая деятельность; значение методологии в научном поиске; основные достижения; жизнь вне науки и другие моменты. Завершается курс контрольным испытанием, представляющим решение тестового задания из 74 вопросов, охватывающих все темы, предусмотренные программой.

Работа частично поддержана грантом №ГПК-32/15 благотворительного фонда Владимира Потанина. Автор признателен руководству института фундаментальной биологии и биотехнологии (директор – проф. В.А. Сапожников) и зав. кафедрой биофизики проф. В.А. Кратасюк за внимание к реализации проекта.

## ОБРАЗЫ И МОДЕЛИ В БИОФИЗИКЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ IMAGES AND MODELS IN BIOPHYSICS AND MOLECULAR BIOLOGY

*Нечипуренко Ю.Д.*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, nech99@mail.ru

Начало цитологии ведёт отчёт с изображения пор пробкового дерева, которые опубликовал физик Роберт Гук в книге «Микрография» (1665) и изображения клеток, которые сделал Антони ван Левенгук в книге «Тайны природы» (1695). Молекулярная биология ведёт свой отсчет с 1953 года, когда была предложена визуальная модель трёхмерной структуры молекулы ДНК [1]. Молекулярная биология родилась на стыке химии, физики и биологии и уже накопила достаточно устоявшихся представлений, которые могут быть наглядно продемонстрированы не только научному сообществу, но и широкому кругу читателей, в том числе подросткам, которые интересуются наукой.

В соавторстве с Егором Егоровым мы изложили современные представления молекулярной биологии и биофизики в книге «Живой дом», которая вышла в издательстве «Арт Волхонка» в 2018 году в серии «Про...» [2]. Основная специализация издательства – художественные альбомы и литература по искусству, и выходу этой книги предшествовала работа по построению архитектоники книги. Редактор книги Елена Борисова реализовала визуально-порционный, «разворотный» тип подачи материала, а Егор Егоров дополнил рукопись оригинальными фотографиями клеток и набросками, в которых место сложных макромолекулярных белковых комплексов (РНК-полимеразы и др.) заняли образы, рисованные антропоморфные персонажи – «переписчики», «переносчики» и т.п.

Нам удалось вместе с художником издательства Ольгой Золотухиной создать оригинальный художественный альбом, в котором научные представления соединены с визуальными образами, ранее мало использованными в познавательной литературе. Опыт научных и познавательных статей и книг, в которых можно встретить элементы комикса и современного художественного осмысления знаний биофизики, молекулярной и клеточной биологии, был также использован нами в данной работе (см. [3-7]).

Научная книга обычно включает в себя модели и формулы, художественная – образы и метафоры. В научно-художественной, познавательной книге авторы привлекает и то и другое. Таким образом, эти два способа описания мира (посредством моделей и образов) дополняют друг друга. К примеру, планетарная модель атома Резерфорда может быть описана на языке художественных образов иначе: представим карлика в цирке, который крутит вокруг себя обручи. Ядро атома – карлик, а движение обручей сходно с электронными оболочками. Такой образ не более далёк от реальности, чем стандартная «планетарная модель». Не только подросткам, но и взрослым простые и наглядные цирковые образы ближе, чем опосредованные научные модели. Подобным образом в нашей книге мы рассказываем про ДНК, которая представляется как своеобразные чётки – двойная нить бусинок.

Данная книга находится в ряду познавательных книг, которые выпустил автор в стиле «нон-фикшн» литературы, предыдущие книги были посвящены биографиям великих поэтов и писателей: Ломоносову, Пушкину, Гоголю [8-11]). Своеобразному синтезу науки и искусства также посвящена книга [12]).

Книга вышла при поддержке гранта Правительства Москвы и авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность издательству «Арт Волхонка» за поддержку в работе над книгой и плодотворные обсуждения.

1. Watson J.D. and Crick F.H.C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid // Nature. 1953. Vol. 171. P. 737–738.

2. Егор Егоров, Юрий Нечипоренко. Живой дом. Москва, издательство «Арт Волхонка», 2018.
3. Нечипуренко Ю.Д. Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами. Ижевск, ИКИ, 2015.
4. Борис Режабек, Юрий Нечипоренко. Нанороботы живой клетки. Альманах «Хочу всё знать», СПб, издательство «Дом детской книги», 2017.
5. Юрий Нечипоренко, Борис Режабек. Нанороботы и жизнь // Биомолекула, 2017  
<https://biomolecula.ru/articles/nanoroboty-i-zhizn>
6. Юрий Нечипоренко, Егор Егоров, Ольга Золотухина. Как клетка убирает мусор // Биомолекула, 2018  
<https://biomolecula.ru/articles/kak-kletka-ubiraet-musor>
7. Флоранс Пино. Тайная война микробов. Москва, издательство «Пешком в историю», 2016.
8. Юрий Нечипоренко. Ярмарочный мальчик (жизнь и творения Николая Гоголя). Москва, издательство «ЖУК», 2009.
9. Юрий Нечипоренко. Помощник царям (жизнь и творения Михаила Ломоносова). Москва, издательство Московского университета, 2001.
10. Юрий Нечипоренко. Пушкин. Издательство «Октопус», Москва, 2017.
11. Юрий Нечипоренко. Плыви, силач! (Молодые годы Александра Пушкина). Издательство «Август», Москва, 2018.
12. Юрий Нечипоренко. Маленькие сказки. Издательство «ОГИ», 2019 (в печати).

---

## РАЗВИТИЕ МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫХ СВЯЗЕЙ БИОФИЗИКИ КАК ПУТЬ К ФУНДАМЕНТАЛИЗАЦИИ ВЕТЕРИНАРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

## DEVELOPMENT OF INTERDISCIPLINARY TIES OF BIOPHYSICS AS A WAY TO THE FUNDAMENTALIZATION OF VETERINARY-BIOLOGICAL EDUCATION

*Олешкевич А.А.*

ФГБОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени  
Скрябина К.И., 109472, Москва, ул. Скрябина, 23; e-mail: [komsotita@gmail.com](mailto:komsotita@gmail.com)

Фундаментализация образования — это системное обогащение учебного процесса знаниями и методами творческого мышления, выработанными фундаментальными науками. К которым относят естественные науки, т. е. науки о природе во всех её проявлениях, и, прежде всего, самую первую (в историческом смысле) науку и природе — ФИЗИКУ (от *греч. φύση* – природа, *φυσική* – физика). Фундаментальность рассматривается как категория качества образования и образованности личности. Задачами фундаментального образования являются, во-первых — обеспечение оптимальных условий для воспитания гибкого и многогранного научного мышления, различных способов восприятия действительности; во-вторых, создание внутренней потребности в саморазвитии и самообразовании на протяжении всей жизни человека. Основой фундаментализации является создание системы и структуры образования, направленных не на узкоспециализированные знания, а на методологически важные, долгоживущие и инвариантные знания, что способствует целостному восприятию научной картины окружающего мира, интеллектуальному расцвету личности и её адаптации в быстро изменяющихся социально-экономических и технологических условиях. Основа теоретических знаний закладывается при изучении фундаментальных дисциплин математического и естественнонаучного циклов и, следовательно, возрастают требования физическому образованию. Для повышения качества образования необходимо применять новые методологические подходы, основанные на интегрировании разных курсов. Таким образом, проблема эффективной реализации междисциплинарных связей в высших учебных заведениях является актуальной, поскольку именно эти связи объединяют в единое целое все структурные элементы учебного процесса (содержание, формы, методы и средства обучения) и способствуют повышению эффективности фундаментального образования в целом. Межпредметные связи формируются и реализуются в процессе обучения: физика — биофизика; физика — физиология; физика — рентгенология — радиобиология; радиобиология — терапия; физика, химия — диагностика, терапия; химия — фармакология — терапия. Формирование этих связей — гибкий, динамичный, непрерывный процесс; цель которого – повышение уровня профессиональной подготовки квалифицированных специалистов. Реализация межпредметных связей курсов математики, физики и химии повышает уровень математической, естественнонаучной и, как следствие, профессиональной подготовки студентов академии.



## БИОФИЗИЧЕСКИЕ НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС BIOPHYSICAL RESEARCH AND EDUCATIONAL PROCESS

*Плутахин Г. А.*

ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ, г. Краснодар

В агропромышленном комплексе в современных условиях применяют интенсивные технологии выращивания сельскохозяйственных культур, животных и птицы. При этом используются передовые методы воздействия на объекты сельскохозяйственного производства, способствующие экологичности и улучшению потребительских свойств конечного продукта. Значение в этом случае приобретают неструктивные методы контроля качества получаемой продукции и протекания технологических процессов. Такой подход требует подготовки специалистов, способных находить и использовать современные подходы в указанном направлении, для чего необходимо знание теоретических основ и умение использовать их на практике.

Во всех производственных процессах агропромышленного комплекса широко применяют биофизические методы, поэтому курс биофизики приобретает большое значение в контроле производства и научных исследованиях. Биофизические исследования в аграрном вузе носят в большей степени прикладной характер. Это приводит к особым требованиям при формировании учебных программ, подборе тем лекций и лабораторных работ и должно формировать компетенции, которые необходимы в профессиональной деятельности специалистов для применения полученных знаний при решении конкретных задач, встречающихся в жизни. Актуальным является умение самостоятельно заниматься своим обучением.

В Кубанском ГАУ биофизика преподается на шести направлениях факультетов биологического профиля, для которых разработаны учебные программы, учебные пособия по биофизике и биологической физике, рабочие тетради для выполнения лабораторных работ [1, 2]. Темы лабораторных работ выбраны с расчетом дать обучающимся знания и сформировать у студентов навыки, используемые в дальнейшем при подготовке выпускных квалификационных работ и кандидатских диссертаций.

Теория и практика в биофизике логически делятся на три направления: биологическая термодинамика, электрические и магнитные явления, оптика в биологии. По двум последним из них подготовлены лабораторные работы с использованием современного оборудования и методов, применяемых на практике. Дисциплина преподается специализированной кафедрой, а биофизические методы в научных исследованиях используют дипломники и аспиранты разных факультетов.

В процессе выполнения лабораторных работ большое внимание уделяется привлечению студентов к исследовательской и поисковой деятельности. Так как при данной форме обучения студент вовлечен в активные действия, в его памяти сохраняется до 75 процентов изучаемого материала.

Наиболее часто применяются электрические и электромагнитные методы исследований биологических объектов. Так, активно проводятся работы по влиянию низкочастотных электромагнитных излучений на выживаемость микроорганизмов, качество мяса при изготовлении мясных изделий и др. [3]. Изучена дисперсия сопротивления биологических тканей переменному току при исследовании черенков винограда для разработки метода направленной электростимуляции. Дисперсионные кривые тушек и органов цыплят-бройлеров при их хранении в холоде, при замораживании и оттаивании дали возможность разработать критерии, позволяющие оценивать степень нативности мясных полуфабрикатов. Скорость выхода электролитов из семян томатов, измеренная в течение тридцати минут, дала возможность определить их потенциальную всхожесть без проращивания.

Достаточно эффективно изучается применение электрохимической активации водных растворов в технологических процессах и научных исследованиях путем использования анолита и католита. Особое место занимает бесконтактная электроактивация водных растворов, при которой изменяется только окислительно-восстановительный потенциал. Такой раствор обладает свойствами широко применяемой в последнее время «водородной воды», но получают его значительно проще.

Оптические методы использованы в оценке концентрации отдельных составляющих сложной смеси каротиноидов в их экстракте из овощей, а также из пигментированных органов растений по суммарным спектрам поглощения. По параметрам быстрой и замедленной флуоресценции хлорофилла в высечках флаговых листьев пшеницы проведена оценка влияния агроприемов на протекание первичных процессов фотосинтеза. Данным способом изучено влияние новых регуляторов роста на выращивание риса в засоленных рисовых чеках. Замедленная флуоресценция хлореллы применяется в оценке токсичности водных растворов и почв.

В заключение следует сказать о внедрении биофизических исследований в учебный процесс: большинство тем лабораторных работ является следствием научных деятельности студентов и аспирантов Кубанского ГАУ.

1. Плутахин Г. А., Кошаев А. Г. Биофизика. – СПб: Лань, 2012. 240 с.
2. Зобенко В. Я., Плутахин Г. А. Краткий курс биологической физики. – Саратов: Ай Пи Эр Медиа, 2018. 229 с.
3. Plutakhin, G. A., Dmitriev, V. I., Vasiliev, N. S. Research on effects of low frequency magnetic fields on survival and morphology of *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2018. P. 601.

**НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОФИЗИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В СИБИРСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ**

**NEW TRENDS IN THE DEVELOPMENT OF BIOPHYSICAL EDUCATION AT THE SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY**

*Суковатая И.Е., Кратасюк В.А.<sup>1</sup>*

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, irasu@yandex.ru

<sup>1</sup> Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск, Valkrat@mail.ru

Мировые тенденции развития высшего образования продиктованы стремительным изменением его ландшафта в условиях возрастающей международной конкуренции, роста информационных потоков, цифровой трансформации экономики и всех сфер жизни. Все эти факторы изменяют в мировом контексте компетенции, которые должны формироваться у сегодняшних выпускников естественнонаучных специальностей для их успешной профессиональной деятельности и социальной гибкости на региональном, национальном и глобальном рынке, а также отвечать запросам всех стейкхолдеров (абитуриентов, работодателей и др.). В связи с этим конструирование и реализация новых постоянно обновляемых моделей образования, интегрированных в международное образовательное пространство, является актуальной задачей при подготовке современных специалистов в области биофизиков.

На основе исследований лучших практик реализации образовательных программ в области биофизики в ведущих американских, европейских и российских университетах, а также возможности их применения в контексте программы международной конкурентоспособности Сибирского федерального университета (Проект 5-100) представлен новый подход кафедры биофизики СФУ в создании современных конкурентоспособных образовательных программ, в том числе и на международном рынке для всех уровней высшего образования, в том числе и на английском языке: программы бакалавриата (профиль «Биофизика», направление «Биология», профиль «Биохимическая физика», направление «Физика»), магистратуры (направление «Биология»: «Биофизика» и «Biological Engineering» (на английском языке), направление «Физика», магистерская программа «Биофизика»), программы аспирантуры и программы PhD «Biophysics» на английском языке, а также специализированной семестровой программы «Bioluminescent Biotechnologies» на английском языке.

Развитие новых моделей биофизического образования было сосредоточено на трех направлениях: интернационализированных образовательных программ (Internationalization of the Curriculum - IoC); формирование системы обучения через интеграцию науки и образования, постоянное обновление контента и технологий обучения в условиях цифровой трансформации, системы оценивания, направленной на повышение качества преподавания и обучения через интеграцию в международное пространство; а также формирование англоязычной среды и усиление развития международных компетенций преподавателей и студентов.

Дизайн образовательных программ и методического обеспечения сфокусирован на сдвиге от преподавания к обучению, большей интеграции науки в образовательный процесс, возможности реализации индивидуальной образовательной траектории (student centered learning), смешанной модель обучения (blended learning) с использованием электронной информационной образовательной среды вуза на базе LMS Moodle. В реализации образовательных программ участвуют иностранные визит профессора, приглашенные на полный курс/модуль, а также иностранные преподаватели - штатные сотрудники университета. Разработаны требования и шаблоны к образовательным программам и их учебно-методическому обеспечению для реализации на иностранном языке в смешанных группах для всех студентов, как иностранных, так и российских, с фокусом на студентоцентрированное преподавание и обучение в соответствии с европейскими стандартами и рекомендациями по обеспечению качества - ESG: от преподавания к обучению, совершенствование методов оценивания достигнутых результатов обучения, гибкие траектории обучения и др. По всем дисциплинам учебного плана англоязычных программ разработаны и изданы силлабусы и гиды на английском языке, разработаны электронные курсы на английском. Модульная структура образовательных программ помогает не только сделать первые шаги по разработке программы, но и поднять на новый уровень академическую мобильность и программы академического обмена студентов и преподавателей кафедры и вузов-партнеров, в том числе и зарубежных.

Фундаментальное биофизическое образование призвано обеспечить формирование у обучающихся биосферно-ноосферного мировоззрения и набора ключевых компетенций для научно-исследовательской, информационной и образовательной деятельности в области биофизики, биоинженерии и биотехнологии, биоинформатики, биохимии и медицинской биологии, биоэкологии, геномики и протеомики для исследования живой природы и ее закономерностей. Большая часть образовательного процесса – практики и научно-исследовательская работа, которые проводятся как на базе исследовательских институтов и университетов-партнёров, так и в современной хорошо оборудованной научной лаборатории СФУ «Лаборатория биоллюминесцентных биотехнологий», организованной под руководством лауреата Нобелевской премии по химии – Осаму Шимомуры, являющегося лидером одной из самых сильнейших научных групп, занимающейся фундаментальным исследованием феномена испускания света живыми организмами – биоллюминесценцией. Биоллюминесценция - это не только удивительное природное явление, это уникальный инструмент для обучения студентов современной биохимии и биофизике, молекулярной биологии и биотехнологии, а также позволяет визуализировать многие биологические, химические и физические процессы.

**МЕТОДЫ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ В ЗАДАЧАХ МАЛОГО ПРАКТИКУМА ПО КУРСУ “БИОФИЗИКА” НА БИОЛОГИЧЕСКОМ ФАКУЛЬТЕТЕ МГУ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА**

**METHODS OF MATHEMATICAL MODELING IN HANDS-ON SEMINARS IN THE SMALLER BIOPHYSICS LABORATORY COURSE AT THE BIOLOGICAL FACULTY OF THE LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY**

*Фурсова П.В., Дьяконова А.Н., Плюснина Т.Ю.*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва

Курс «Биофизика» является обязательной дисциплиной для всех студентов 3-го курса бакалавриата биологического факультета МГУ. Лекции дополняются Малым практикумом – занятиями, на которых студенты выполняют учебные задачи. Подготовка и выполнение этих задач помогают усвоить лекционный материал.

Одним из разделов курса «Биофизика» является «Кинетика биологических процессов». Среди основных освещаемых тем можно выделить моделирование триггерных и автоколебательных систем. Необходимая теоретическая база (качественная теория дифференциальных уравнений, основы решения уравнений в частных производных) подробно излагается ранее в курсе «Математические модели в биологии».

Математические задачи малого практикума построены по следующей общей схеме: формализация некоторого биологического явления в виде дифференциальных уравнений, теоретический анализ полученной модели, численное решение системы уравнений на компьютере, интерпретация результатов в биологических терминах. Основное внимание уделяется зависимости поведения модели от значений параметров.

При построении модели обсуждаются вопросы «перевода» на математический язык особенностей рассматриваемой биологической системы. Например, чему соответствуют линейные или квадратичные члены, как отразить в уравнениях наличие положительной или отрицательной обратной связи между составляющими системы.

Теоретическое исследование модели обязательно включает в себя нахождение стационарных состояний, анализ их типа и устойчивости. Проводится построение параметрических диаграмм. В зависимости от условий задачи, подобное исследование может быть полностью аналитическим или выполняться с применением графических методов.

Численное решение системы уравнений проводится на основе проведенного теоретического анализа. Построенные графики решений должны демонстрировать все возможные типы поведения системы.

Интерпретацию полученных результатов с точки зрения исследуемого биологического явления студенты проводят самостоятельно при подготовке отчета о выполнении задачи.

В настоящий момент задачи по математическому моделированию, выполняемые студентами, охватывают 3 темы – популяционная динамика (взаимодействие двух видов), ферментативная кинетика (субстратное и продуктное ингибирование), внутриклеточные колебания кальция. Готовится расширение банка задач, чтобы студентам всех кафедр предлагать наиболее близкие для их специализации биологические системы.



**ОБУЧЕНИЕ ФИЗИКЕ В МЕДИЦИНСКОМ ОБРАЗОВАНИИ**

**TRAINING PHYSICS IN MEDICAL EDUCATION**

*Д.С. Шерматов*

Кафедра медицинской физики и биологии с основами информационных технологий  
ТГМУ им. Абуали ибни Сино, Таджикистан  
erkin\_sermatov@list.ru

В этом году 80 лет со дня организации кафедры физики Таджикского государственного медицинского университета имени Абуали ибни Сино. Кафедра работает над подготовкой, освоением и дальнейшим развитием нового курса физики, специализированного, с учётом запросов медицины. За этот период новый профилированный курс претерпел ряд значительных изменений.

В Законе Республики Таджикистан «О высшем и послевузовском профессиональном образовании» определено, что важной задачей обновления профессионального образования на компетентностной основе является профессиональное образование усиленной практической направленности с сохранением фундаментальных основ образования. Образование нового формата будет играть большое значение в сохранении фундаментальных наук, развитии прикладных наук, которые необходимы для стабильного развития в Республике Таджикистан.

Развитие медицины и физики всегда были тесно переплетены между собой.

Законны физики руководят всеми живыми процессами. Благодаря исследованиям в физике, человек смог достичь невероятных результатов в изучении определенных сфер, далеко продвинувшись в освоении новых методов работы. Физика стала неотъемлемой частью жизни человека.

Принимая во внимание комплексный характер этого курса и значительные изменения, которые он претерпел в процессе своего развития, считаем целесообразным проанализировать эти вопросы также применительно к основным этапам формирования этого курса.

Обучение студентов медицинского образования естественнонаучным дисциплинам (физика, математика), согласуется с требованиями Государственного образовательного стандарта, и направлено на решение проблемы формирования профессиональных компетенции будущих специалистов. К основным компетенциям, которыми должен овладеть студент-медик в процессе изучения дисциплин естественнонаучного профиля, согласно ГОС, относятся следующие: использовать на практике методы естественнонаучных, медико-биологических и клинических наук в различных видах профессиональной деятельности; педагогической деятельности; способность и готовность выявлять естественнонаучную сущность проблем, возникающих в ходе профессиональной деятельности, использовать для их решения соответствующий физико-химический и математический аппарат; способность и готовность к работе с медико-технической аппаратурой, используемой в работе с пациентами. Формирование вышеперечисленных компетенций является неотъемлемой частью профессиональной подготовки врача, способного осуществлять деятельность в условиях современной медицины.

При подготовке будущих специалистов-медиков для обучения физике используются на занятиях материалы межпредметного содержания[1-3].

Так как у будущих медиков знания по физике в профессиональной деятельности находят непосредственное применение, что способствует развитию у студентов мотивации, в результате развиваются основные профессиональные умения и навыки. Многие ученые-педагоги считают, что при обучении физике будущих специалистов медиков является целесообразным особенно изучение приборов и аппаратуры медицинского назначения с целью диагностики и лечения.

В изучении физики формирование профессиональной мотивации должно означать формирование комплекса мотивов и потребностей, так как без мотива не бывает деятельности, следовательно, в деятельности мотив можно считать основным структурным компонентом. При изучении предмета профессиональная мотивация подразумевает создание потребности в изучении предмета для дальнейшего применения полученных знаний в будущей профессиональной деятельности.

Процесс обучения необходимо организовать так, чтобы обучение физике будущих специалистов-медиков являлось средством развития профессиональных умений. Можно констатировать, что применение данного подхода даст возможность решить, как задачи профессиональной подготовки, так и содержательных задач обучения физике.

Так как реализация содержания учебного материала, деятельности по его изучению способствует развитию у студентов мотивационных потребностей, в данном случае использование в процессе обучения физике этого подхода можно считать средством активизирования у студентов учебно-познавательной деятельности.

Изучение физики обеспечивает студентам медикам приобретение навыков и умений, необходимых при изучении ряда специальных медицинских (физиологии, функциональной диагностики, физиотерапии, рентгенологии и радиологии, общей гигиены и др.) и фармацевтических дисциплин (технологии лекарственных веществ) и др.

Реализации профессионального подхода при обучении физике будущих специалистов врачей обеспечивается с использованием на занятиях материалов взаимосвязанных по этим предметам.

Анализ имеющейся литературы по использованию на занятиях межпредметных материалов показал, что их использование активизирует деятельность студентов по изучению отдельных предметов, следовательно, повышает результативность процесса обучения в целом [4-6].

Изложение учебного материала находится в тесной связи с задачами общемедицинской и клинической подготовке будущих специалистов врачей общего профиля.

Например, в нашем исследовании применение результатов физики для изучения жизненных процессов в познании и толковании более глубоких взаимосвязей с целью систематизации и обобщения знаний об организме человека в целом и физических процессах в нем протекающих, а также об отдельных частях организма. Студентов необходимо обучить физическим методам исследования и физической аппаратуре в медицине. Использование в учебном процессе физических приборов и аппаратур по мере их изучения приобретает общенаучный, обобщенный характер, в результате знания углубляются и конкретизируются. Усвоение методов физики является основой для разработки новых современных методов диагностики и лечения в клинике.

Необходимые теоретические межпредметные связи используются с целью усвоения студентами целостных теорий, применяются при раскрытии основных положений общенаучных законов и теорий, которые изучаются на занятиях по родственным предметам.

Для развития высшего медицинского образования в настоящее время на кафедре используются государственные стандарты, определяющие отбор содержания для профессионального образования, являющиеся основой при разработке программ обучения по предметам.

## Секция 8. Биофизическое образование.

Использование в курсе физики, преподаваемом для студентов медицинских специальностей, материалов профессионального содержания играет большую роль. Это дает возможность учитывать следующие факторы:

1. Применение материалов, имеющих биофизическое и медицинское содержание, способствует мотивированию учебно-познавательной деятельности студентов-медиков. Так как межпредметные материалы позволяют использовать для решения медицинских задач физические знания, то это усиливает сосредоточенность студентов на занятиях и является стимулом к изучению предмета;

2. Умение применять для объяснения медицинских явлений знания из смежных дисциплин способствует расширению дальнейших профессиональных возможностей студентов и повышает их профессиональную подготовку;

3. Умение использовать навыки межпредметных знаний из различных областей наук, углубленное внимание к компетентностному подходу преподавания школьных предметов оказывают со стороны учителя положительное влияние на учебно-познавательную деятельность студентов;

Учитывая вышеприведенные положения, а также основные требования к содержанию учебного материала, можно констатировать, что внедрение в учебный процесс методологических материалов и материалов межпредметного содержания при обучении физике студентов-медиков является актуальным, так как в медицине широко применяются физические методы, и её интенсивное развитие в современный период имеет неразрывные связи с физикой и биофизикой.

1. Максимова, В.Н. Межпредметные связи и совершенствование процесса обучения [Текст]: Книга для учителя / В.Н. Максимова. - М.: Просвещение, 1984. - 143 с.
2. Шерматов Д.С. Интегрированное обучение физике с теоритическими и клиническими кафедрами/ Д.С. Шерматов, Б.Б. Сафаров, Б.М. Хочаев// Вестник Таджикского национального университета. -2016. - № 6/15 (880). - С.269-271.
3. Шерматов Д.С. О межпредметных связях в преподавании физики в медицинских вузах/ Материалы Международной школы семинара «Физика в системе высшего и среднего образования» // Д.С. Шерматов – Москва, 2011. -С.237-240.
4. Антонов В.Ф. Физика и биофизика Учебник для вузов/В.ф. Антонов, А.М. Черныш, Е.К. Козлова, А.В. Коржуев. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. -480 с.
5. 5.Кац, Ц.Б. Биофизика на уроках физики [Текст]: Книга для учителя. - 2-е изд., перераб. / Ц.Б. Кац. - М.: Просвещение, 1988. -159 с.
6. Шерматов Д.С. Лекции по медицинской и биологической физике. [Текст]: Учебное пособие для студентов медвузов /Д.С. Шерматов, А.А. Туйчиев. – Душанбе, 2016. -292 с.

## **Секция 9. Биоинформатика и системная биология.**

**ПОИСК ПАТТЕРНОВ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РВМС ЧЕЛОВЕКА ПРИ СТАРЕНИИ**  
**IDENTIFICATION OF PATTERNS OF GENE EXPRESSION CHANGES IN HUMAN РВМС**  
**DURING THE AGING PROCESS**

*Алексеев А.А.*

МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, alekseev@physics.msu.ru

Изучение процесса старения, особенно старения человека с позиции системной биологии является актуальным, но всё ещё недостаточно развитым направлением современной науки. Сделанные шаги по формированию систем биомаркеров [1], а также поиск возраст-ассоциированных генов [2] недостаточны для формирования исходных данных при построении обобщённой теории старения человека, объясняющей накопленный фактический материал по патофизиологии старения [3]. В настоящее время известен набор основных взаимосвязанных процессов на нижних уровнях организации биологической системы, который, если взять его в совокупности, и даёт наилучшее из имеющихся определение старения [4]. При этом недостаточно изучена связь этих процессов с изменениями в экспрессии различных генов. Даже для белков, для которых подтверждена связь с продолжительностью жизни (например, для известного комплекса mTOR), и сигнальные пути которых достаточно изучены, не ясна роль в старении, в том числе связь изменения их экспрессии с основными процессами старения. К сожалению, работ, в которых изучается изменение экспрессии генов в различных типах клеток человека при старении, не очень много [2,5]. При этом задачу анализа данных усложняет межиндивидуальная и межполовая вариабельность, которая приводит к тому, что графиках зависимости экспрессии гена от возраста «облако точек» с большим разбросом и с малым коэффициентом корреляции для линейной регрессии. Разведочное сравнение данных экспрессии генов, усреднённых по возрастным группам, не привело нас к интересным находкам. Это подтолкнуло нас к разработке иного подхода.

Для того, чтобы его отработать, нами были использованы данные из открытой базы данных GEO, которая содержит данные экспрессии клеток различных тканей человека, причём для некоторых датасетов указан возраст и пол индивидов. Мы взяли датасет GSE53165 [6], в котором представлены, в частности, образцы для более чем 700 мужчин в широком диапазоне возрастов. Данные представляют собой результаты изменения экспрессии 414 генов РВМС человека, а точнее monocyte-derived dendritic cells (MoDCs).

Для анализа профилей экспрессии каждого гена для всех образцов, нами был использован метод усреднения «скользящее среднее», который позволяет, как мы думаем, выделить собственно средне-популяционное изменение экспрессии каждого гена от возраста, избавившись в значительной степени от межиндивидуальной вариабельности. Были использованы различные величины окон усреднения, и опытным путём была определена оптимальная величина этого окна, с которой и производились дальнейшие вычисления. Для полученных профилей были построены сглаживающие кубические сплайны. Для вычислений использовались написанные нами программы на языке R с использованием стандартных пакетов этого языка.

Далее, мы построили попарные корреляции кубических сплайнов для разных генов, и с помощью кластеризации tSNE и иерархической кластеризации выделили группы генов (количество кластеров, равное 11, было установлено опытным путём). Были найдены гены, у которых сплайн максимально варьируется в возрастном диапазоне 27-43 года, и при этом максимально скоррелирован с усреднённым графиком зависимости концентрации триглицеридов в крови мужчин разного возраста из работы [7] в диапазоне среднего возраста.

Таким образом были найдены гены (NUPR1, IL12B, UBE2N, TLR5), потенциально связанные с реакцией клеток крови на изменения во внешней среде (рост [ТГ] в крови с возрастом), и/или с изменением соотношения между типами клеток при старении. Разработанный нами подход, на наш взгляд, может быть полезен для получения исходных данных, необходимых для построения системно-биологических моделей отдельных аспектов старения человека.

1. Фоменко, А.Н., Баранова, А., Митницкий, А., Жикривецкая, С., Москалев, А.А., 2016. Биомаркеры старения человека.
2. Peters, M.J., Joehanes, R., Pilling, L.C., Schurmann, C., Conneely, K.N., Powell, J., Reinmaa, E., Sutphin, G.L., Zhernakova, A., Schramm, K. and Wilson, Y.A., 2015. The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. *Nature communications*, 6, p.8570.
3. Кишкун А. А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции: Рук. для врачей. – ГЭОТАР-медиа, 2008.
4. López-Otín C. et al. The hallmarks of aging // *Cell*. – 2013. – Т. 153. – №. 6. – С. 1194-1217.
5. Whitney, A.R., Diehn, M., Popper, S.J., Alizadeh, A.A., Boldrick, J.C., Relman, D.A. and Brown, P.O., 2003. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), pp.1896-1901.
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE53165>
7. Murakata, Y., Fujimaki, T. and Yamada, Y., 2015. Age-related changes in clinical parameters and their associations with common complex diseases. *Biomedical reports*, 3(6), pp.767-777.

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ФОТОТРАНСДУКЦИИ В ТКАНЯХ LYMNAEA STAGNALIS**

**EXPRESSION OF SOME MOLECULAR COMPONENTS OF PHOTOTRANSUATION IN LYMNAEA STAGNALIS TISSUES**

***Жуков В.В., Карнаухова Е.В., Мельдер Н.О., Ноговицына К.В.***

Балтийский федеральный университет им. И.Канта, Калининград, e-mail: valerzhukov@mail.ru

Предлагаемая в настоящее время схема преобразования светового сигнала в рабдомерных (микровиллярных) фоторецепторах была составлена по результатам исследований, выполненных на клетках глаза мухи *Drosophila* [1, 2]. Сведения об этом процессе в светочувствительных клетках глаза и экстраокулярных фоторецепторах головоногих и двустворчатых моллюсков [3, 4] пока еще фрагментарны. У брюхоногих, составляющих самый многочисленный класс моллюсков этот вопрос практически не изучен. Целью данной работы было установление факта и сравнительная оценка экспрессии генов трех белков зрительного цикла в тканях глаза, кожи и ганглиях центральной нервной системы пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis*. Оценивали экспрессию генов: 1) G<sub>q</sub>-связанного родопсина, 2) белка G<sub>qa</sub> и 3) β-аррестина - участника фоторецепторного процесса в сетчатке слизня [5].

Кодирующие последовательности белков были определены методами биоинформатического анализа (GeneMark-ES, HMMER, NCBI BLAST) на основе неаннотированной геномной сборке *L. stagnalis* (GCA\_900036025.1). Экспрессию генов в тканях устанавливали при помощи методов обратной транскрипции и ПЦР “в реальном времени”. Были найдены значения C<sub>q</sub> и эффективностей ПЦР для транскриптов исследуемых белков и контрольных транскриптов. Эти данные использовались в подсчёте соотношений в уровнях экспрессии генов в исследуемых тканях [6].

Во всех исследованных образцах были обнаружены транскрипты интересующих генов. Уровни их экспрессии зависели от типа ткани. Например, экспрессия родопсина в глазах была выше, чем в коже и нервной системе в 8,73 и 1,85 раза, соответственно. Таким образом, можно уверенно говорить о том, что родопсин, связанный с G<sub>q</sub>-белком, есть не только в фоторецепторах глаз, но также в коже и центральных нервных ганглиях *L. stagnalis*. Предсказанная последовательность экзонов родопсина *L. stagnalis* была на 75% идентична последовательности родопсина, связанного с G<sub>q</sub>-белком, пресноводной лёгочной улитки *Biomphalaria glabrata* (rhodopsin G<sub>q</sub>-coupled-like, LOC106067387).

Присутствие опсина наряду с глазом в коже *L.stagnalis* согласуется с данными о ее световой чувствительности [7] и иммуногистохимической идентификацией в ней этого белка [8]. Этим же можно объяснить присутствие в коже белков G<sub>qa</sub> и аррестина. Некоторые центральные нейроны брюхоногих моллюсков также обладают световой чувствительностью [9, 10], что позволяет предполагать наличие специализированного молекулярного механизма. Однако не менее правдоподобным выглядит предположение о том, что упомянутые в работе белки могут также выполнять и не связанные со световой чувствительностью функции. Например, как это известно в отношении β-аррестина, из которого в процессе филогенеза путем молекулярного преобразования возник специализированный зрительный аррестин [5].

Работа была выполнена в рамках гранта для молодых исследователей БФУ им. И. Канта и частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 16-04-01090).

1. Fain G.L., Hardie R., Laughlin S.B. Phototransduction and the evolution of photoreceptors // *Curr Biol*. 2010. Vol. 20(3). P.114-124.
2. Yau K.W., Hardie R.C. Phototransduction motifs and variations // *Cell*. 2009. Vol. 139. P. 246-264.
3. Kingston A.C.N., Kuzirian A.M., Hanlon R.T., Cronin T.W. Visual phototransduction components in cephalopod chromatophores suggest dermal photoreception // *J. Exp. Biol*. 2015. Vol. 218. P. 1596-1602.
4. Kingston A.C.N., Chappell D.R., Miller H.V., Lee S.J., Speiser D.I. Expression of G proteins in the eyes and parietovisceral ganglion of the bay scallop *Argopecten irradians* // *Biol Bull*. 2017. Vol. 233(1). P. 83-95.
5. Matsuo R, Takatori Y., Hamada S., Koyanagi M., Matsuo Y. Expression and light-dependent translocation of β-arrestin in the visual system of the terrestrial slug *Limax valentianus* // *J.Exp.Biol*. 2017. Vol. 220(Pt 18). P. 3301-3314.
6. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by comparative CT method // *Nature Protocols*. 2008. Vol. 3(6). P. 1001-1108.
7. Chono K., Fujito Y., Ito E. Non-ocular dermal photoreception in the pond snail *Lymnaea stagnalis* // *Brain Research*. 2002. Vol. 951. P. 107–112.
8. Takigami S., Sunada H., Horikoshi T., Sakakibara M. Morphological and physiological characteristics of dermal photoreceptors in *Lymnaea stagnalis* // *Biophysics*. 2014. Vol. 10. P. 77–88.
9. Kartelija G, Nedeljkovic M., Radenovic L. Photosensitive neurons in mollusks // *Comp.Biochem.Physiol. A. Mol Integr Physiol*. Vol. 134(3). P. 483-495.
10. Gotow T., Nishi T. A new photosensory function for simple photoreceptors, the intrinsically photoresponsive neurons of the sea slug *Onchidium* // *Front. Cell Neurosci*. 2009. Vol.3. Art.18. P.1-6. doi: 10.3389/neuro.03.018.2009.



## РОЛЬ ХИРАЛЬНОСТИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ САМООРГАНИЗАЦИИ В СТАНОВЛЕНИИ ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ

### CHIRALITY AND MOLECULAR SELF-ASSEMBLY IN LIFE DEVELOPMENT ON YOUNG EARTH

*Зленко Д. В.<sup>1,2</sup> Стовбун С. В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Каф. биофизики биол. ф-та МГУ. Москва. Ленинские горы. 1/24. dvzlenko@gmail.com

<sup>2</sup>Институт Химической Физики РАН. Москва, Косыгина, 4. s.stovbun@yandex.ru

Исторически описание возникновения жизни на Земле сталкивалось с проблемой абиогенного синтеза мономеров, которые могли бы стать основой для макромолекул. В настоящее время этот вопрос можно считать решенным, так как описаны реакции, которые могли протекать на молодой Земле и приводят к углеводам и аминокислотам. Однако, описанные процессы крайне неселективны: продуктами оказываются сложные смеси большого количества различных веществ. При этом среди всего разнообразия продуктов лишь малая часть встречается ныне в составе живой материи. Более того, все хиральные биомолекулы представлены только одним энантиомером, в то время как изначально оптической асимметрии в продуктах реакций синтеза мономеров не наблюдается. Таким образом, остаются нерешенными проблема химической очистки мономеров, и проблема их хиральной очистки. Обе проблемы становятся принципиальными в свете результатов, полученных Джойсом в 1984 году [1], который показал, что скорость амплификации олигонуклеотидов драматически падает в присутствии нуклеотидов обратной хиральности. Это означает, что естественный отбор не мог бы запуститься до того, как произошла сегрегация небольшого числа «избранных», хирально чистых мономеров.

Существует механизм, который позволяет решить проблему пространственной сегрегации хирально чистых веществ из сложных смесей. При охлаждении хиральных растворов N-трифторацетилрованных  $\alpha$ -аминоспиртов (ТФААС) наблюдается образование анизометрических осадков: вещество конденсируется в виде тонких спиральных кристаллических струн, в то время как из рацемических растворов при охлаждении выпадают изометрические хлопья [2]. При этом для одного из ТФААС, при охлаждении растворов близким к рацемическим, наблюдалось выпадение большого объема изометрического осадка, что приводило к хиральной очистке небольшого избытка одного из энантиомеров, который оставался в растворе [3]. При дальнейшем охлаждении, при достаточно большой начальной концентрации, из раствора выпадают анизометрические, хирально-чистые струны [3].

Сделанные наблюдения позволили предположить, что подобные процессы могли иметь место на молодой Земле. В изначальной смеси мономеров из-за некоторых особенностей реакций синтеза может наблюдаться небольшая хиральная асимметрия. Если в ходе повторяющихся годовых циклов нагревания-остывания происходило выпадение сначала изометрических, рацемических осадков, а затем – хиральных анизометрических, то образовавшиеся частицы могли быть затем разделены за счет механического воздействия, например, волн или течений. Таким образом, этот эффект приводит к выделению из общей массы мономеров некоторого количества хирально чистых веществ, способных к самоорганизации и образованию протяженных, спиральных агрегатов. Отметим, что предложенная гипотеза предполагает, что образование спиральных структур есть первичное свойство «избранных» мономеров, а полимеризация и образование макромолекул произошло позже. Предложенная гипотеза подкрепляется тем, что образование хиральных струн было обнаружено при в растворах углеводов, полученных в классической реакции Бутлерова.

1. Joyce C.F. et al. Chiral Selection in Poly(C)-directed Synthesis of Olygo(G) // Nature. 1984. 310(16): 602–604.
2. Stovbun S.V. et al. Self Assembly and Gelation in Solutions of Chiral N-trifluoroacetylated  $\alpha$ -aminoalcohols // Chem. Phys. 2018. 508: 34–44.
3. Zenko D.V. et al. Spontaneous Resolution in Racemic Solutions of N-trifluoroacetylated  $\alpha$ -aminoalcohols // J. Mol. Struct. 2019. 1183:8–13.

---

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ НАДЕЖНОСТИ В ТЕХНИКЕ И НАДЕЖНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ: ИСТОРИЯ ВОПРОСА И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

### MATHEMATICAL THEORY OF RELIABILITY IN ENGINEERING AND BIOLOGICAL ROBUSTNESS: A LITTLE BIT OF HISTORY AND THE STATE OF ART

*Кольтовер В.К.*

Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Московская область, Россия

Основы математической теории надежности были заложены в 1950-х годах в связи с развитием авиации, радиотехники и др. Надежность определяется, как свойство выполнять заданную функцию в течение заданного времени в заданных условиях [1]. Подобно техническим устройствам, любая биосистема «сконструирована» для выполнения заданной функции в соответствии с предназначением – информационным планом или генетической программой. Как и технические конструкции, биологические конструкции не вполне надежны, т.е., в работе каждого

устройства акты нормальной работы чередуются со случайными (стохастическими) отказами (сбоями). При этом высокая системная надежность обеспечивается профилактическими мерами, а именно: своевременным обновлением функциональных элементов. «Профилактика отказов» находится под контролем управляющих функциональных элементов высшего иерархического уровня («вертикаль управления»).

Проблема надежности биологических систем была впервые поставлена в работах Д.М. Гродзинского и его сотрудников [2]. Проводились регулярно конференции по бионадежности, начиная с первой, 1975 г., Киев, тогда – СССР. В 1978 г. при Научном совете по биологической физике АН СССР была создана специальная комиссия по проблемам надежности биологических систем, в которую входили многие выдающиеся биофизики. Спустя четверть века начались аналогичные исследования за бывшим «железным занавесом» – под названием “robustness” [3]. Между тем, существует математическая теория надежности, в англоязычной литературе – reliability, а не «robustness». Термин reliability общепринят в технике. Соответственно, именно этот термин был использован в пионерских работах по бионадежности.

Концепция детерминированной надежности биосистем позволяет количественно описать основные феноменологические закономерности старения. Старение – это неизбежное следствие генетически запрограммированного дефицита надежности биомолекулярных конструкций, тогда как свободно-радикальный редокс-таймер, локализованный в специализированных клетках центральной нервной системы, служит эффективным стохастическим механизмом реализации программы старения. Продолжительность жизни человека могла бы достичь 250 лет при 100-процентной надежности защиты клеток и тканей от анион-радикалов кислорода ( $O_2^{\bullet-}$ ) [4-5].

Системный теоретико-надежностный подход оказался эффективен в исследованиях механизмов антиоксидантной терапии. По сравнению со специализированными антиоксидантными ферментами, способность так называемых антиоксидантов устранять «активные формы кислорода» ничтожно мала. *In vivo*, антиоксиданты действуют превентивным образом – предотвращают образование радикалов и продуктов свободно-радикального окисления. Например, витамин Е модулирует экспрессию генов, кодирующих синтез важных защитных белков. Так называемые антиоксиданты митохондриального действия предотвращают образование  $O_2^{\bullet-}$ , действуя как разобшители окислительного фосфорилирования. Существенную роль в профилактической антиоксидантной терапии играет гипоталамо-гипофизарная система. В то же время, все больше данных о том, что антиоксидантная терапия обусловлена благоприятным воздействием фенольных соединений на микрофлору желудка и кишечника организма-хозяина [6, 7]. В связи с этим, обнаруженный недавно в экспериментах с клетками дрожжей радиопротекторный эффект магнитного изотопа магния ( $^{25}Mg$ ) открывает перспективы создания нового класса геропротекторов на основе стабильных магнитных изотопов [8]. Таким образом, теоретико-надежностный подход служит эвристической методологией для поиска новых средств превентивной медицины.

1. Lloyd D.K., Lipov M. Reliability: Management, Methods and Mathematics. - New Jersey: Prentice Hall, 1962.
2. Гродзинский Д.М., Войтенко В.П., Кутлахмедов Ю.А., Кольтовер В.К. Надежность и старение биологических систем. - Киев: Наукова думка, 1987. 172 стр.
3. Kitano H. Biological robustness. // Nat. Rev. Genet., 2004, 5, 826-837.
4. Koltover V.K. Free radical timer of aging: from chemistry of free radicals to systems theory of reliability. // Current Aging Sci., 2017, 10, 12-17.
5. Koltover V.K. Mathematical theory of reliability and biological robustness: reliable systems from unreliable elements. In: Focus on Systems Theory Research. - New York: Nova Science Publ., 2018. Pp.49-80.
6. Koltover V.K. Antioxidant therapy of aging: from free radical chemistry to systems theory of reliability. In: Anti-Aging Drugs: from Basic Research to Clinical Practice. - Cambridge (UK): Royal Soc. Chem., 2017. Pp. 183-204.
7. Koltover V.K. Antioxidant biomedicine: from chemistry of free-radicals to reliability of biological systems. // Res. Med. Eng. Sci., 2018, 3, 1-6.
8. Koltover V. Nuclear spin catalysis: from physics of liquid matter to medical physics/J. Mol. Liquids, 2017, 235, 44.

## **РАЗРАБОТКА КРИТЕРИЕВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ**

## **DEVELOPMENT OF CRITERIA FOR DETERMINATION OF HUMAN BIOLOGICAL AGE BASED ON BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD**

***Кондакова Е.В., Грачева Е.А., Кривонос М.И.***

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород

Одной из актуальнейших задач современной медицины является поиск маркеров биологического возраста человека. Большая часть хронических и генетически детерминированных патологий связана с возрастом и развитием комплекса возраст - обусловленных нарушений метаболизма. Кроме того, все чаще встает вопрос о разработке специализированных возраст-ассоциированных методов терапии, так как

особенности гомеостатической регуляции также во многом обусловлены возрастными изменениями. В связи с этим особую значимость приобретает поиск возможных маркеров биологического возраста, так как биологический возраст может значимо отличаться от хронологического. Ускорение процессов старения можно рассматривать как неблагоприятный фактор развития патологических изменений в организме и, вероятнее всего, может применяться для превентивной персонализированной коррекции негативных последствий. Одним из наиболее простых способов оценки биологического возраста является определение биохимических маркеров в биологических жидкостях, в частности периферической крови. В настоящее время существует несколько подходов для построения биологических часов на основе показателей крови [1,2,3]. Однако на точность подобных моделей могут существенно влиять популяционные и экологические особенности региона проживания. Целью наших исследований является выбор оптимального комплекса показателей крови для верификации и модификации различных моделей построения биологических часов. Особенностью данного исследования явилось изучение показателей крови среди долгожителей (более 85 лет), а также их прямых потомков (от 1 до 3 поколений). Данный подход должен позволить сократить общепопуляционные колебания различных показателей и позволить более точно выявить значимые маркеры.

Материалом для исследования явилась цельная гепаринизированная и ЭДТА-кровь, полученная от долгожителей (мужчины и женщины в возрасте старше 85 лет) и их потомков (мужчины и женщины в возрасте от 14 до 66 лет). Клинические показатели крови исследовались на автоматическом анализаторе Abacus Junior 30 (18 параметров). Основные биохимические маркеры (общий белок, альбумин, билирубин (общий прямой), АСАТ, АЛАТ, глюкоза, креатинин, холестерин, щелочная фосфатаза, мочевины, С-реактивный белок) исследовались на полуавтоматическом анализаторе StatFax 3300 с использованием наборов реагентов ДИАКОН-ДС (Россия). Для оценки адаптивного потенциала и уровня эндогенной интоксикации определялась электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ). Определение ЭФПЭ проводилось методом микроэлектрофореза с использованием цитоферометра в модификации [4]. Регистрировали время прохождения эритроцитами расстояния 100 мкм в трис-НСI буфере с рН 7.4 при силе тока 8 мА. Величину ЭФПЭ определяли по формуле:  $U = S/ТН$ , где S – расстояние, на которое перемещались клетки, Т – время перемещения клеток на расстояние S, Н – градиент потенциала. Величину градиента потенциала определяли по формуле:  $Н = I/g\chi$ , где I – сила тока, g – поперечное сечение камеры,  $\chi$  – удельная электропроводимость среды.

Результаты исследований показали, что с возрастом наблюдается тенденция к увеличению показателей ЭФПЭ. Показатели в группе долгожителей на 16.56% выше, чем показатели других возрастных групп. При этом группа долгожителей является неоднородной: в ней можно выделить подгруппу с увеличением ЭФПЭ (46% обследованных) и группу без данного увеличения (54% обследованных). Также выявлено, что внутрисемейные колебания данного показателя менее выражены, чем при межсемейном сравнении. Не было выявлено возраст-зависимых изменений ЭФПЭ в группах потомков долгожителей. Анализ биохимических показателей позволил провести верификацию биохимической модели определения биологического возраста [3] и выявить особенности возраст-обусловленных изменений, характерных для Нижегородской области, что может стать основой для разработки модели определения биологического возраста для данного региона с большей точностью прогнозирования.

Работа проведена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 074-02-2018-330 «Цифровая персонализированная медицина здорового старения (ЦПМ-старения): сетевой анализ больших мультиомных данных для поиска новых диагностических, предсказательных и терапевтических целей».

1. Garagnani P. et al. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age // *Aging Cell*. 2012. V.11. P. 1132.
2. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol*. 2013. Vol. 14. P. 115.
3. Levin M.E. et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan // *Aging*. 2018. V.10. № 4. P. 573
4. Дерюгина А.В. и др. Изменение электрокинетических и биохимических характеристик эритроцитов при действии электромагнитных волн терагерцового диапазона // *Биофизика*. 2017. Т. 62. № 6. С. 1108-1113.

## ПРИМЕНЕНИЕ ФРАКТАЛЬНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ОПТИМАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ АРТЕРИАЛЬНОГО ДЕРЕВА МОЗГА КРЫСЫ

## FRactal analysis application for the estimation of the optimal structure of the rat brain arterial tree

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

НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва. [kopilova.veronika@yandex.ru](mailto:kopilova.veronika@yandex.ru)

Основная функция сосудистой системы состоит в обеспечении всех клеток организма кислородом и другими жизненно важными метаболитами. Для наиболее эффективного выполнения данной задачи артериальное дерево должно представлять собой разветвленную систему, основной формой поэтапного ветвления в которой является бифуркация. Сосудистые сети обладают свойствами самоподобия, так как

качественно процесс ветвления на каждом этапе одинаков, а различия носят случайный характер. Исходя из этого они могут рассматриваться как стохастические фракталы, и их анализ дает возможность для оценки как структурных свойств, так и эффективности функционирования артериальной системы в целом.

В данной работе представлен алгоритм построения артериального дерева мозга крысы, описывающий как основные артерии, так и более мелкие сосуды, представляющие собой древовидную структуру, подчиняющуюся физиологическим законам. В предложенном подходе сосудистая система разделяется на две части, отличающиеся применяемыми к ним методами моделирования. К первой относятся основные артерии, формирующие Виллизиев круг, которые представлены в виде упорядоченной совокупности цилиндров, для каждого из которых задавались радиусы и координаты центров их оснований. Вторая часть представляет собой стохастическую структуру, описывающую более мелкие сосуды, являющиеся ответвлениями от основных артерий, которая реализуется в виде бинарного дерева.

В качестве критерия валидации оптимальности структуры построенного сосудистого дерева была использована методика расчета фрактальной размерности, которая позволяет количественно оценивать эффективность заполнения пространства. Данный подход получил широкое распространение для выявления патологических отклонений сосудистых сетей при различных заболеваниях. Ранее было показано, что даже незначительное (в пределах 10%) снижение фрактальной размерности является негативным фактором при прогнозе течения целого ряда заболеваний [1]. Так, например, уменьшение фрактальной размерности связывают с повышенным риском развития инсульта [2], а также с ухудшением прогноза выживаемости при исследовании легочного артериального дерева пациентов с легочной гипертензией [3].

В работе были рассчитаны фрактальные размерности как проекции артериального дерева, так и трехмерной артериальной сети при различных значениях показателя бифуркации. Вычисления проводились с использованием метода «box-counting», при этом сосудистая система рассматривалась как совокупность объектов, каждый из которых представлял собой центральную линию сосуда. В качестве исследуемого объекта использовалась артериальная система мозга крысы. Показано, что уменьшение показателя бифуркации ниже оптимального значения приводит к существенному снижению фрактальной размерности (от 2,23 до 2,06). Таким образом, результаты работы указывают на то, что построение модели артериальной сети в ткани на основе значения показателя бифуркации близкого к трём является обоснованным не только физико-химическими, но и физиологическими особенностями полученных разветвленных структур.

1. Hughes A.D. Optimality, cost minimization and the design of arterial networks//Artery Research, 2015, V. 10, p. 1.
2. Kawasaki R. et al. Fractal dimension of the retinal vasculature and risk of stroke: a nested case-control study // Neurology, Vol. 76, Issue 20, pp. 1766-1767.
3. Moledina S. et al. Fractal branching quantifies vascular changes and predicts survival in pulmonary hypertension: a proof of principle study // Heart, 2011, Vol. 97, Issue 15, pp. 1245-1249.

## МНОЖЕСТВЕННОЕ ВЫРАВНИВАНИЕ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ MULTIPLE ALIGNMENT OF PROMOTER SEQUENCES

**Коротков Е.В.<sup>1</sup>, Суворова Ю.М., Короткова М.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт Биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, email: [genekorotkov@gmail.com](mailto:genekorotkov@gmail.com)

<sup>2</sup>НИЯУ (МИФИ), [bioinf@rambler.ru](mailto:bioinf@rambler.ru)

В данной работе мы разработали новый математический метод для создания множественного выравнивания для сильно различающихся нуклеотидных последовательностей (MAVDS) [1,2]. MAVDS позволяет построить множественные выравнивания для таких нуклеотидных последовательностей, где любое парное выравнивание не обладает достаточной статистической значимостью. Мы изучили возможности программ ClustalW (Larkin *et al.*, 2007), Clustal-omega (Sievers *et al.*, 2014), T-coffee (Notredame *et al.*, 2000), Kalign (Lassmann and Sonnhammer, 2005), Mafft (Katoh and Frith, 2012), Muscle ar, 2004) and AllAlign и некоторых других по созданию множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей в зависимости от степени их эволюционной дивергенции ( $x$ ). Удалось показать, что эти программы хорошо работают до значений  $x < 2.4$ . Однако MAVDS позволяет строить статистически значимые выравнивания при степени эволюционной дивергенции  $x$  в интервале от 2.5 до 3.7 при числе последовательностей в выравнивании равно 100. При числе последовательностей в выравнивании равно 500 граница статистически значимых  $x$  равна 4.4. Разработанный нами математический метод был применен для выравнивания промоторных последовательностей из генома *A.thaliana*. Промоторные последовательности были взяты из банка данных EPD (<https://epd.epfl.ch/index.php>). В данной работе показано, что многие районы промоторных последовательностей от -499 до +1 являются сильно консервативными. Также участки от +1 до +70 вносят большой вклад в создание множественного выравнивания промоторов. Всего удалось получить 25 классов множественных выравниваний промоторов из генома *A.thaliana*. Обсуждается возможность использования разработанного математического метода и рассчитанного множественного выравнивания для идентификации промоторных последовательностей.

**ПОЛНОГЕНОМНОЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МНОЖЕСТВА "ИСТИННЫХ" ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ЭКЗОГЕННОЙ ДНКазе I САЙТОВ. БАЗА ДАННЫХ "ИСТИННЫХ" ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ЭКЗОГЕННОЙ ДНКазе I САЙТОВ В КЛЕТКАХ HEK293T ЧЕЛОВЕКА**

**GENOME-WIDE BIOINFORMATIC STUDY OF THE SET OF "TRUE" HYPERSENSITIVE TO EXOGENOUS DNASE I SITES. THE DATABASE OF THE "TRUE" HYPERSENSITIVE TO EXOGENOUS DNASE I SITES IN HEK293T HUMAN CELLS**

***Кравацкий Ю.В., Кравацкая Г.И., Четкин В.Р., Федосеева Д.М., Чуриков Н.А.***  
Институт Молекулярной Биологии РАН, Москва, jiri@eimb.ru

Ранее [1], при изучении генов рДНК человека, мы обнаружили, что около половины самых мажорных гиперчувствительных к экзогенной ДНКазе I сайтов (DNase I Hypersensitive Sites, DHSS) в этих генах возникают *in vivo*, происходят до добавления экзогенной ДНКазы I и поэтому не являются истинными DHSS. Поскольку полногеномные данные о распределении DHSS крайне важны для понимания структуры хроматина, интересно было провести такое же исследование для полных геномов человека и дрозофилы, т.е. отфильтровать из имеющихся баз данных DHSS в геномах человека и дрозофилы те сайты, которые возникают *in vivo* и имеют другую природу.

Используя полученные нами ранее данные о положении сайтов двухцепочечных разрывов ДНК [2] и сайтов связывания гистона  $\gamma$ -H2AX, мы разработали процедуру фильтрации базы данных ДНКазы I-гиперчувствительных сайтов генома человека. Мы проанализировали совпадения и корреляции между DHSS и сайтами эндогенных двухцепочечных разрывов ДНК [2, 3] и провели фильтрацию DHSS от сайтов, потенциально связанных с двухцепочечными разрывами ДНК, которые могли бы содержаться в хроматине до добавления ДНКазы I. В результате такой фильтрации получены несколько вариантов геномных треков «истинных» гиперчувствительных к ДНКазе I сайтов, которые составили базу данных «истинных» гиперчувствительных к экзогенной ДНКазе I сайтов в клетках HEK293T человека.

Обнаружено, что в хромосомах человека до 20% сайтов, которые ранее рассматривались как ДНКазы I-гиперчувствительные сайты, не вносятся этим экзогенным ферментом, а происходят *in vivo*. Впервые показано, что наличие сайтов связывания гистона  $\gamma$ -H2AX и их колокализация с двухцепочечными разрывами ДНК, наблюдаются во всех хромосомах генома человека. Это подтверждает наше предположение об эндогенности полногеномного процесса возникновения "горячих" областей двухцепочечных разрывов ДНК [4].

С помощью разработанного нами программного обеспечения GenomeTrackAnalyzer (<http://ancor.eimb.ru>) [2] проведён полногеномный расчёт корреляций между геномными треками «истинных» ДНКазы I-гиперчувствительных сайтов и треками различных генетических и эпигенетических признаков, доступными из публичных баз данных (Encode, GEO, NCBI и т.д.) для клеток HEK293 *H.sapiens*.

Таким образом, впервые выявлено и полногеномно исследовано множество "истинных" гиперчувствительных к экзогенной ДНКазе I сайтов, то есть сайтов, не пересекающихся с множеством сайтов эндогенных двухцепочечных разрывов ДНК (DSBs).

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-02152.

1. Tchurikov N.A. et al. Hot spots of DNA double-strand breaks and genomic contacts of human rDNA units are involved in epigenetic regulation // J Mol Cell Biol. 2015, vol.7(4), pp. 366-382.
2. Kravatsky Y.V. et al. Genome-wide study of correlations between genomic features and their relationship with the regulation of gene expression. // DNA Res. 2015 vol. 22(1), pp. 109-119.
3. Tchurikov N.A. et al. Genome-wide mapping of hot spots of DNA double-strand breaks in human cells as a tool for epigenetic studies and cancer genomics. // Genom Data 2015. vol. 5. pp. 89-93
4. Tchurikov N.A. et al. Hot spots of DNA double-strand breaks in human rDNA units are produced *in vivo*. // Sci Rep. 2016. vol. 6. p. 25866

## МАШИННОЕ ОБУЧЕНИЕ ДЛЯ ПРОГНОЗА ИСХОДА ИНСУЛЬТА ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ

## MACHINE LEARNING FOR PROGNOSIS OF STROKE OUTCOME IN TERMS OF BLOOD COAGULATION SYSTEM

*Брусов О.С.<sup>1</sup>, Кузнецова А.В.<sup>2</sup>, Сенько О. В.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Научный центр психического здоровья РАН, г.Москва, oleg.brusow@yandex.ru

<sup>2</sup> ИБХФ им.Н.М.Эмануэля РАН, г.Москва, ул.Косыгина, 4. azfor@yandex.ru

<sup>3</sup> ФИЦ «Информатика и управления» РАН, г. Москва, ул. Вавилова 44, к. 2. [senkoov@mail.ru](mailto:senkoov@mail.ru)

Исследование проводили в рамках наблюдательного (не интервенционного) клинического испытания с целью выявления клинически значимых предикторов клинического исхода лечения больных с ишемическим инсультом. Больных обследовали в остром состоянии при поступлении в отделение и при выписки из больницы (через 2 – 3 недели лечения). На входе определяли показатели общего и биохимического анализа крови, а также показатели тромбодинамики в режимах коагуляции и фибринолиза. Клинический исход определяли по модифицированной шкале Ренкина. Для анализа больных разбивали на две группы – с хорошим исходом (число баллов по шкале Ренкина  $\leq 3$ ) и с плохим исходом (число баллов по шкале Ренкина  $\Rightarrow 4$ ).

Критерии невключения в исследование:

Поступление в стационар в срок позднее 24 часов от начала заболевания; регресс неврологической симптоматики в течение первых 24 часов заболевания с установлением диагноза «Транзиторная ишемическая атака»; ишемический инсульт иной уточненной этиологии (мигренозный, гемодинамический и т.п.);

В работе исследовали связь исхода ишемического инсульта с состоянием свертывающей и фибринолитической системы крови при поступлении в отделение. С этой целью оценивали эффективность различных методов машинного обучения для прогнозирования исхода инсульта уже в момент поступления больного в клинику. В настоящее время существует большое число технологий обучения, а также методов статистически корректной оценки эффективности полученных решений [2 - 3]. Разнообразные технологии позволяют достичь высокого уровня прогноза с помощью построения коллективных решений.

Данную задачу прогнозирования решали в виде задачи распознавания с двумя классами (классификация с учителем). При этом задача усложняется малым размером обоих целевых классов: 18 и 12 человек соответственно. Существенным требованием является необходимость анализа информативности различных показателей, вошедших в многопараметрическую базу данных – 94 показателя.

При одномерном анализе с помощью перестановочных тестов выявлено только 9 значимых показателей общего и биохимического анализа крови а также тромбодинамических показателей коагуляции и фибринолиза: возраст ( $p < 0.003$ ), лейкоциты\_1 ( $p < 0.031$ ), нейтрофилы\_p\_1 ( $p < 0.0000$ ), креатинин\_1 ( $p < 0.013$ ), гранулоциты ( $p < 0.082$ ), плотность сгустка (B) -D\_1 ( $p < 0.004$ ), D\_1' ( $p < 0.013$ ), время максимума сгустка (MCT) ( $p < 0.059$ ), время полного лизиса сгустка (FLT\_S) ( $p < 0.033$ ). У пяти показателей значимость была на уровне тенденции: фибринолитический индекс (FI) ( $p < 0.096$ ), потенциал коагуляции (CP\_S) ( $p < 0.071$ ), потенциал фибринолиза (FP\_S) ( $p < 0.059$ ), потенциал фибринолиза в % (FP\_S%) ( $p < 0.056$ ), потенциал гемостаза в % (HP\_S%) ( $p < 0.064$ ).

Повысить эффективность прогноза в данном случае возможно, используя информативность показателей в рамках их взаимодействия. На двумерных разбиениях существенно увеличилось число значимых пар показателей, вносящих свой вклад в прогностическую функцию. Выявлено 112 значимых закономерностей.

Для вычисления оптимальных прогнозных решений был протестирован ряд разнообразных технологий распознавания, в том числе решающие деревья, линейный дискриминантный анализ (LDA), нейронная сеть. Однако возможность получения эффективного алгоритма прогнозирования удалось показать только для следующих методов: метод опорных векторов (SVM), метод к-ближайших соседей (KNN), метод статистически взвешенных синдромов (CBC). Для оценивания результатов была использована известная метрика ROC AUC.

Исследование показало, что более высокой эффективностью обладают следующие методы: метод опорных векторов, метод к-ближайших соседей, метод статистически взвешенных синдромов. Доказана достоверная связь состояния свертывающей и фибринолитической системы крови с исходом инсульта.

Разработанная коллективная модель по группе методов распознавания позволяет достаточно точно прогнозировать исход инсульта уже в первые сутки при поступлении в клинику. Методика может быть полезна при выборе схемы лечения и оптимизации воздействия на состояние системы свертывания крови.

1. Морозова М.А., Бениашвили А.Г., Рупчев Г.Е., Лепилкина Т.А., Старостин Д.С., Брусов О.С. Эффекты антихолинэстеразного препарата – нейромидина у больных шизофренией с выраженными признаками шизофренического дефекта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова, 2006, том 108, № 11, с. 28.

2. Кузнецов В.А., Сенько О.В., Кузнецова А.В. и др. // Химическая физика, 1996, т.15 . №1. С. 81-100.

3. Kuznetsova A.V., Kostomarova I.V., Senko O.V. Modification of the method of optimal valid partitioning for comparison of patterns related to the occurrence of ischemic stroke in two groups of patients // Pattern Recognition and Image Analysis. 2014. V.24. №1. P.114–123.



**МЕТОД ПРЕДСКАЗАНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ОСНОВАННЫЙ НА ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ АМИНОКИСЛОТ**

**METHOD FOR PREDICTION OF PROTEIN LOCAL STRUCTURE BASED ON THE PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF THE SEQUENCE**

***Мильчевский Ю.В., Никитин А. М., Туманян В.Г.***

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991, Москва, Вавилова 32, [yury.milchevskiy@gmail.com](mailto:yury.milchevskiy@gmail.com)

Методы предсказания вторичной структуры белка (Nature 2016) [1] достигли точности предсказания в 84% для трех структурных классов и 72% для восьми структурных классов в соответствии с разметкой DSSP[2]. Однако, даже по правильно предсказанной вторичной структуре фрагмента получить его декартовы координаты не представляется возможным.

Мы предлагаем новый подход предсказания локальной структуры белка, который позволяет однозначно восстанавливать декартовы координаты предсказываемого фрагмента. Для этого мы определили аналог базиса в пространстве локальных структур (далее наз. “обобщённые функции координат”), и обосновали минимальное число элементов, необходимое для представления фрагментов белковой цепи различной длины при различных предположениях о фиксированных/нефиксированных двугранных и/или валентных углах, а также длинах связей. Далее описан метод предсказания локальной структуры фрагментов из пяти остатков. Путем кластеризации выборки белковых структур из PDB банка мы получили набор локальных структур пентапептидов, включающий 30 кластеров, т.е. 30 базисных структур. Полученные обобщенные координаты позволяют свести многомерную задачу предсказания пространственной структуры по последовательности к ряду одномерных задач. Так же, как в декартовых координатах, когда положение точки можно задать через расстояния до базисных векторов, в представленных обобщенных координатах структура фрагмента определяется расстояниями до базисных структур. Данные расстояния предсказываются на основе физико-химических свойств последовательности белкового фрагмента [3].

Создан сервер для предсказания локальной структуры белка по последовательности белка: [milch.eimb.ru](http://milch.eimb.ru), не имеющий аналогов. Качество предсказания (попадания в свой кластер) для набора из 30 кластеров составляет в среднем 72%.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 17-04-02105 и № 18-54-00037\_Бел\_а).

1. Wang, S. et al. Protein Secondary Structure Prediction Using Deep Convolutional Neural Fields. Sci. Rep. 6, 18962; doi: 10.1038/srep18962 (2016).
2. Kabsch W, Sander C (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features". *Biopolymers*. **22** (12): 2577–637.
3. [www.genome.jp/aaindex/](http://www.genome.jp/aaindex/)

**СЕКРЕТИРУЕМЫЕ РНК БАКТЕРИЙ**

**SECRETED RNAs OF BACTERIA**

***Озолин О.Н.<sup>1</sup>, Шавкунов К.С., Глазунова О.А., Аликина О.В., Сырочева А.О.<sup>1</sup>, Фролова М.С.***

Институт биофизики клетки, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, [ozoline@rambler.ru](mailto:ozoline@rambler.ru)

<sup>1</sup>Пушинский государственный научно-исследовательский институт, Пушкино

Первоначально обнаруженные как кодирующие, декодирующие и транспортные молекулы, РНК оказались также регуляторами, способными изменять транскриптомы в клетках высших организмов и активно участвовать в межклеточной сигнализации. Было установлено, что микроРНК эукариот могут влиять не только на клетки продуцирующего их организма, но и на бактерии симбиотической микрофлоры [1], а бактериальные РНК были обнаружены в кровяном русле млекопитающих [2]. Некоторые из них могут проникать в эпителиальные клетки, вызывая рецептор-опосредованный иммунный ответ [3]. О способности бактериальных РНК влиять на уровень генной экспрессии других бактерий косвенно свидетельствуют данные сравнительного анализа транскриптомов, полученные в условиях индивидуального и смешанного роста для патогенного и непатогенного видов стафилококков [4] и для пары *Mycobacterium xanthus* и *Escherichia coli*, находящихся в отношениях хищник-жертва [5]. Изменения в профиле именно секретиремых РНК были зарегистрированы только в нашей работе [6] для пары *E. coli* - *Paenibacillus bisonicum*, не находящихся ни в симбиотических, ни в антагонистических отношениях друг с другом. В данной работе мы исследовали изменения РНК-секретома *E. coli* в ответ на присутствие конкурирующих с ней бактерий *Prevotella copri* и *Rhodospirillum rubrum*.

Как и ранее, клетки *E. coli* преимущественно секретируют короткие фрагменты матричных и антисмысловых РНК (12-27 н), являющиеся продуктами эндонуклеазного процессинга предшественников по вторичным структурам, а также олигонуклеотиды, синтез которых возможен в ходе abortивной транскрипции с собственных промоторов. Изучение таких коротких РНК сопряжено с целым рядом проблем, одной из которых является потеря большого числа прочтений из-за необходимости использовать идеальное соответствие геномам при их картировании. Для секретируемых РНК эта потеря в среднем оказалась на  $27,5 \pm 2,5\%$  больше, чем для аналогичных по размеру внутриклеточных олигонуклеотидов. Это предполагает сопряжённую с секрецией модификацию РНК, или их специфическую селекцию. Другой проблемой является перекрёстное картирование внеклеточных РНК на оба генома в смешанных популяциях. Поэтому в данной работе был исследован контекст некартируемых на геном олигонуклеотидов, а РНК-секретомы чистых и смешанных культур анализировали дифференциально, учитывая только видо-специфичные последовательности нуклеотидов.

В результате, в секретоме были обнаружены химерные РНК, содержащие картируемые олигонуклеотиды с единственным вхождением в геном, фланкированные на 3'- или 5'-концах «навесками» разной длины. Последовательности фланков, пошагово удлиненные до 6-13 н. были найдены в геномах, но в участках, удалённых от места синтеза основного продукта. 5'-концевые фланки встречались в 1,6 раз чаще, чем 3'-концевые и в среднем были длиннее (до 13 и 11 нуклеотидов, соответственно). Так как 16% 5'-концевых фланков были обнаружены и на 3'-концах, можно думать, что такие химеры получаются в результате опосредованного секрецией лигирования. Так как все 5'-концевые фланки могут быть продуктами abortивной реакции с удалённых промоторов, не исключено также, что их «присоединение» является результатом праймирования транскрипции. Самым удивительным является очень высокая специфичность формирования химер. Одинаковые навески на 5'-концах были обнаружены только для 4х пар из 101, а на 3'-концах только для 2х пар из 63 исследованных РНК. Молекулярные механизмы, определяющие эту селективность пока совершенно не понятны.

В результате дифференциального анализа секретомов чистых и смешанных культур были выявлены потенциально сигнальные РНК, а также установлено, что для чистой популяции *E. coli* не характерна секреция фрагментов с мотивами, имеющимися в других геномах, но в ответ на присутствие *P. copri* и *R. rubrum*, адаптированных к совместному росту с *E. coli*, кишечная палочка индуцирует секрецию таких РНК. Реакция на представителя рода превотелл, который доминирует в микрофлоре второго энтеротипа, оказалась более выраженной, чем реакция на представителя родоспирилл, менее представленных в человеческой микробиоте, а реакция на «чужую» для *E. coli* бактерию, *P. bisonicum*, по этому критерию вообще отсутствовала. Эта зависимость является самым весомым доказательством участия секретируемых РНК в межвидовой сигнализации у бактерий и ориентирует дальнейшие их исследования на учёт возможности комплементарных взаимодействий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00348).

1. Liu S. et al. The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA // Cell Host Microbe. 2016. Vol. 19. P. 32.
2. Wang K et al. The complex exogenous RNA spectra in human plasma: an interface with human gut biota? // PLoS One. 2012. Vol. 7. P. e51009.
3. Neil et al. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8 // Science. 2004, Vol. 303. P. 1526.
4. Hermansen G. et al. Transcriptomic profiling of interacting nasal staphylococci species reveals global changes in gene and non-coding RNA expression // FEMS Microbiol Lett. 2018. Vol. 365. P. fny004.
5. Whitworth D. Interspecies conflict affects RNA expression. // FEMS Microbiol Lett. 2018. Vol. 365. P. fny096.
6. Alikina O. et al. A cohabiting bacterium alters the spectrum of short RNAs secreted by *Escherichia coli* // FEMS Microbiol Lett. 2018. Vol. 365. P. fny262.

## КОМПЬЮТЕРНЫЕ СРЕДСТВА АНАЛИЗА КЛАСТЕРОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ РАЙОНОВ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

## COMPUTER TOOLS FOR ANALYSIS OF CLUSTERS OF REGULATORY REGIONS OF GENE EXPRESSION

Орлов Ю.Л.<sup>1</sup>, Дергилев А.И.<sup>2</sup>, Цуканов А.В.<sup>3</sup>, Лузин А.Н.<sup>2</sup>, Орлова Н.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Первый МГМУ им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, orlov@d-health.institute

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет (НГУ), Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Регуляция транскрипции генов играет ключевую роль в функционировании клетки [1]. Изучение регуляции транскрипции на основе наиболее полных геномных данных является одним из важнейших направлений в биофизике и биоинформатике. Продолжается рост объемов данных, полученных с помощью технологий секвенирования, таких как Hi-C, ChIP-seq, BS-seq, DNaseI-seq, ATAC-seq, NOMe-seq и конечно RNA-seq. Регуляция осуществляется за счет связывания транскрипционных факторов (ТФ) с сайтами на ДНК,



при этом положение сайтов может быть удалено от старта транскрипции. Имеют место кооперативные эффекты регуляции при одновременном связывании с ДНК различных транскрипционных факторов в белковых комплексах. Важный уровень регуляции осуществляется за счет трехмерной структуры хромосом. Трехмерная упаковка в ядре клетки может оказывать значительное влияние на регуляцию экспрессии генов за счет сближения удаленных регуляторных участков (энхансеров, сайленсеров) и промоторов генов, тем самым регулируя уровень экспрессии генов

В настоящей работе представлены компьютерные скрипты для анализа данных ChIP-seq, расчета кластеров и их визуализации в форме тепловых карт. В работе использовались пики ChIP-seq для клеточной линии эмбриональных стволовых клеток человека H1. Данные в виде BED файлов загрузили из базы данных Cistrome (<http://cistrome.org/db/#/>) [2], были загружены координаты пиков 38 транскрипционных факторов. Отметим, что существующие базы данных по сайтам связывания транскрипционных факторов, которые содержат в себе как данные по ChIP-seq (Expression Atlas, Roadmap epigenomics project, ENCODE), так и данные по непосредственным координатам ССТФ и мотивам связывания ТФ (TRANSFAC, JASPAR) [12, 13], также существуют базы данных в данном направлении разработанные в том числе и в России – TRRD, GTRD, НОСОМОСО.

Для анализа данных был разработан набор скриптов на языке R, в последующем они были собраны в пакет, названный ClanChIPeaks, который можно свободно скачать из репозитория GitHub (<https://github.com/anton-tsukanov/ClanChIPeaks>) [2]. При разработке ClanChIPeaks и анализе данных также использовались сторонние пакеты из репозитория Bioconductor (GenomicRanges, AnnotationHub, ChIPeeker и т.д.) и CRAN (ggplot2, fastclust и т.д.). ClanChIPeaks позволяет проводить небольшой анализ пиков ChIP-seq, так например расчет плотности распределения пиков около начала сайтов транскрипции с использованием функции peaks.near.TSS(), а также аннотация пиков, то есть, в каком регионе находится пик (экзон, интрон, 5'-нетранслируемая область, 3'-нетранслируемая область, межгенное пространство), для этого используется функция peaks.annotation(). На последнем этапе можно проводить анализ посчитанных данных при помощи стандартных методов, встроенных в R, а также визуализировать данные при помощи пакетов ggplot2, corrplot и других.

Проведен вычислительный эксперимент по анализу кластеров сайтов связывания в геноме человека по базам данных ENCODE, Cistrome. На основании координат (начало и конец пика) каждого пика ChIP-seq для 38 транскрипционных факторов клеточной линии H1 была рассчитана ширина каждого пика и для 9 ТФ (E2F6, CREB1, MYC, ZNF143, MXI1, SP4, YY1, NRF1, NANOG) построены графики распределения ширины пиков. Показано, что плотность распределения пиков ChIP-seq около сайта начала транскрипции растет и имеет куполообразную форму, что свидетельствует об увеличении количества пиков на старте транскрипции, при этом некоторые пики немного смещены в 5'-область [3].

Из нашего анализа можно сделать вывод, что некоторые ТФ находятся в одном кластере, так например группа ТФ как SOX2, NANOG, BCL11A и POU5F1 образуют одну группу, стоит отметить ТФ PRDM14 и ZNF274, которые также образуют отдельный кластер. Разработанные программы позволяют оценивать статистические параметры профилей ChIP-seq в геноме человека и модельных геномах, строить распределения пиков, определять параметры отдельных групп сайтов [2,3].

Работа частично поддержана грантом РФФИ 18-04-00483.

1. Игнатъева Е.В., Подколотная О.А., Орлов Ю.Л., Васильев Г.В., Колчанов Н.А. Регуляторная геномика - экспериментально-компьютерные подходы // Генетика. 2015. Т. 51 (4), С. 409-429.
2. Цуканов А.В., Орлова Н.Г., Дергилев А.И., Орлов Ю.Л. Программы статистической обработки, кластеризации и визуализации распределения сайтов связывания транскрипционных факторов в геноме // Вестник НГУ Серия: Информационные технологии. 2018. Т. 16 (3). С. 51-63.
3. Кулакова Е.В., Спицина А.М., Орлова Н.Г., Дергилев А.И., Свичкарев А.В., Сафронова Н.С., Черных И.Г., Орлов Ю.Л. Программы анализа геномных данных секвенирования, полученных на основе технологий ChIP-seq, ChIA-PET и Hi-C // Программные системы: теория и приложения. 2015. Т. 6:2(25), С. 129-148.



## КАК КОДОНЫ ОТБИРАЮТСЯ НЕ ДЛЯ БЕЛКОВ, А ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ РЕГУЛЯТОРОВ С ДНК

### HOW CODONS ARE SELECTED NOT FOR PROTEINS BUT FOR DNA-REGULATORS BINDING

**Осинов А.А.<sup>1,2</sup>, Попова И.Ю.<sup>2</sup>, Крутинин Г.Г.<sup>3</sup>, Крутинина Е.А.<sup>3</sup>, Камзолова С.Г.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, aosupov@gmail.com

<sup>2</sup>Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, Пущино

<sup>3</sup>Институт Биофизики Клетки РАН, Пущино

ДНК сильно заряжена, и электростатические взаимодействия с белками важны для регуляции транскрипции. Электростатический потенциал распределен неравномерно вдоль ДНК, коррелирует с GC%, видом последовательности и ее контекстом. Сайты связывания транскрипционных факторов расположены в областях с высоким электростатическим потенциалом, многократно превышающих размер белка.

Распределение электростатического потенциала на поверхностях молекул транскрипционных факторов отражает структуру сайтов связывания. Промоторы в среднем имеют высокое значение профиля электростатического потенциала. Таким образом, распределение электростатического потенциала является важным фактором естественного отбора, влияющим на эволюцию регуляторных участков ДНК [1,2].

Сотни сайтов связывания транскрипционных факторов лежат в областях кодирования белков, процент их не очень высок, но значителен для функционирования клетки. Некоторые области кодирования белка также содержат промоторы для генов, в основном расположенных на противоположной цепи.

Мы обнаружили, что у бактерий, относящихся к таким разным эволюционным ветвям, как таксоны *Proteobacteria* (*E.coli*, представители родов *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Shewanella*), *Firmicutes* (*B.subtilis*) и *Actinobacteria* (*Corynebacterium glutamicum*), существует сдвиг предпочтений кодонов и даже аминокислот вокруг промоторов и сайтов связывания транскрипционных факторов, охватывающий несколько сотен кодонов, и что этот сдвиг обусловлен физическими свойствами рассматриваемых кодонов, обеспечивающих правильные электростатические аттракторы для белков, регулирующих транскрипцию (транскрипционных факторов и РНК-полимеразы). Величина отклонения встречаемости от среднего уровня достигает 300% для кодонов и 200% для аминокислот. Особенно ярко выражена картина у таких аминокислот, как глицин, серин, лизин и аспарагиновая кислота.

Синонимические кодоны имеют, как правило, противоположную тенденцию к изменению частотности в зависимости от расчетного значения формируемого ими электростатического потенциала, тем более выраженную, чем выше отклонение потенциала и частота встречаемости кодона и самой аминокислоты (ярким примером служит лейцин).

Полученные данные требуют серьезного пересмотра концепции молекулярной эволюции. Выявленная несинонимичность синонимичных замен может привести к неправильной оценке судьбы последовательностей, включая неправильное использование молекулярных часов и ошибочные оценки специфических мутаций. Смещение предпочтений аминокислот приводит к еще более важному сдвигу в концепции естественного отбора белков. Он обосновывает представление о ДНК не только как о тексте для реализации первого шага Центральной догмы молекулярной биологии, но и сложном органе наследственности, который выполняет разные, порой противоречивые, требования. Эти представления соответствуют идеям великого эволюциониста И. И. Шмальгаузена о неизбыточном дублировании, которые он развивал в отношении структур и функций организма.

Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-01865

1. Osypov A.A., et al. DEPPDB – DNA Electrostatic Potential Properties Database. Electrostatic Properties of Genome DNA // JBCB. 2010. 8(3): 413-25.
2. Osypov A.A., et al. DEPPDB – DNA Electrostatic Potential Properties Database. Electrostatic Properties of Genome DNA elements // JBCB. 2012. 10(2) 1241004.
3. Шмальгаузен И. И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. М.-Л. Изд-во академии наук СССР, 1938. 144 с.

## ПРИМЕНЕНИЕ БИНАРНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТИПОВ РАСТИТЕЛЬНОСТИ

## VEGETATION IDENTIFICATION WITH BINARY ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS

*Салтыков М.Ю., Иванова Ю.Д., Барцев С.И.*  
Институт Биофизики СО РАН

Дистанционное зондирование Земли (ДЗЗ) является важным в науках о Земле. Одним из наиболее распространенных методов ДЗЗ является анализ мультиспектральных спутниковых снимков. Они позволяют отслеживать изменения вегетационных индексов, таких как NDVI, и других важных экологических показателей. В силу большого количества предоставляемых современными спутниками данных, требуется их автоматическая обработка. Методы машинного обучения, включая нейронные сети, показали хорошие перспективы в анализе спутниковых снимков [1].

В традиционных нейронных сетях компоненты вектора входных данных умножаются на весовые коэффициенты (синапсы). Умножение является вычислительно-затратным процессом, что делает актуальным вопрос о возможности использования бинарных нейронных сетей [2] – сетей, в которых коэффициенты синапсов принимают значения «0» (связь отсутствует), «1» (возбуждающий синапс) и «-1» (тормозной синапс). В такой нейронной сети фактически отсутствует операция умножения, что позволяет расходовать меньше вычислительных ресурсов на ее функционирование. Другим интересным свойством таких нейронных сетей является большая прозрачность по сравнению с традиционными нейросетями. Построив карту связей или коннектом обученной нейросети можно судить о том, какие параметры спутникового снимка были

использованы в решении задачи распознавания. В данной работе был разработан метод обучения таких сетей посредством обучения традиционной нейросети прямого распространения и приведения ее к бинарному виду.

Нейросеть обучалась распознавать один из трех типов растительности характерный для Красноярского края (смешанный и лиственные леса, луг) по данным мультиспектральных снимков спутника Sentinel-2. На вход нейросети подавалось 12 спектральных каналов спутникового снимка. Обучалась сеть прямого распространения «многослойный перцептрон» с тремя скрытыми слоями, входным и выходным слоем. На входном слое было 12 нейронов – по одному на канал, на выходном – 3 нейрона, соответствовавших типам растительности. Было показано, что бинарная нейросеть способна решать задачу распознавания типов растительности по данным спутникового снимка. При этом анализ конектома обученных бинарных нейросетей показал что нейросеть делает прогноз основываясь на каналах не входящих в индекс NDVI.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и РГО в рамках научного проекта № 17-05-41012.

1. Chen L. et al. Estimation of forest above-ground biomass by geographically weighted regression and machine learning with Sentinel imagery //Forests, 2018, том. 9. – №. 10. – стр. 582.

2. Rastegari M. et al. Xnor-net: Imagenet classification using binary convolutional neural networks //European Conference on Computer Vision. – Springer, Cham, 2016., стр. 525-542.

### **ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕТРИВИАЛЬНОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ДАННЫХ (ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ДОКТОРА) ПРИ АНАЛИЗЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **THE ADVANTAGES OF USING NON-TRIVIAL DATA CONVERSIONS (DOCTOR'S DATA CONVERSION) IN ANALYSING THE RESULTS OF BIOMEDICAL RESEARCH**

*Феофанова Т.В.<sup>1</sup>, Серова Т. А.<sup>2</sup>.*

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «ГНИЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва. [tatianafeofanova@yandex.ru](mailto:tatianafeofanova@yandex.ru)

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, [tas1071953@gmail.com](mailto:tas1071953@gmail.com)

Значительная часть медико-биологических исследований включает в себя парные сравнения показателей объекта в зависимых и независимых выборках. При этом изменения этих показателей рассматриваются только с точки зрения роста или снижения их начальных значений.

Отличительной чертой живого объекта является наличие референтных интервалов (диапазонов нормы) для большинства признаков, характеризующих его жизнедеятельность. Область значений признака делится на три части: сниженные, находящиеся в границах нормы (ГН) и повышенные значения. Диапазон нормы каждого признака является количественной характеристикой состояния равновесия объекта. Внешнее воздействие (ВВ) может изменять положение значения признака относительно его ГН – быть либо положительным (приближать его к ГН), либо отрицательным (выводить его за ГН).

Мы предлагаем непараметрический критерий Доктора (НКД), при использовании которого результат ВВ оценивают с учетом изменения расположения значения признака относительно его ГН и интерпретируют как стабилизацию или дестабилизацию последнего. НКД является комбинацией нетривиального преобразования Доктора для количественных данных и соответствующего классического статистического критерия для парных сравнений. Для независимых выборок в качестве такого критерия выбран точный критерий Фишера (ТКФ), предназначенный для сравнения эффекта в двух группах. Для зависимых выборок – критерий знаков (КЗ), с помощью которого определяют преимущественное направление изменения значения показателя в данной группе (анализ динамики «до - после»).

Преобразование Доктора состоит в замене пары количественных значений признака «до - после» показателем «тип динамики», принимающим значения «положительная динамика» (ПД), «отрицательная динамика» (ОД). Показатель ПД отражает процессы восстановления равновесия (рост сниженных, снижение повышенных и др.) значений анализируемого признака, показатель ОД – противоположные процессы (снижение сниженных, рост повышенных значений и др.).

НКД для независимых выборок. После преобразования данных задача оценки эффекта ВВ сводится к сравнению между собой частот однопипной динамики изучаемого признака в двух группах. Для этого используют таблицу сопряженности 2x2 с факторами «ВВ» и «исход», где исход представлен показателем «тип динамики». Фактор «ВВ» принимает значения «есть-нет», фактор «исход» принимает значения «ПД-ОД» [1].

НКД для зависимых выборок. В этом случае после преобразования данных сравнивают частоты случаев ПД и ОД в одной группе.

При апробации НКД для зависимых выборок использовали данные лазеротерапии (ЛТ) 22 гастроэнтерологических больных (инфракрасный лазер ГЕЛИОС 01М, длина волны 0,8-0,95 мкм, воздействие

накожное). Показатели лейкоцитарной формулы крови, иммунного статуса и их индексы (всего 19) оценивали до и после курса ЛТ. Результаты расчетов сравнивали с таковыми, полученными при применении классического критерия знаков [2]. Уровень статистической значимости  $p < 0,05$ .

С помощью КЗ установлена статистически значимая динамика 1 показателя из 19 (фагоцитоз, рост у 20 больных, снижение – у 2, значения медиан показателя до (36,0) и после (45,5) ЛТ находятся в ГН,  $p=0,0003$ ).

Расчеты по НКД для зависимых выборок выявили 12 показателей из 19, для которых установлено статистически значимое преобладание числа лиц с ПД над числом лиц с ОД в группе ( $0,00001 < p < 0,04$ ) в ходе ЛТ. При этом в 10 случаях из 12 значения медиан соответствующих показателей находились в своих ГН как до, так и после ЛТ. В 2 случаях из 12 имела место нормализация показателей. Изначально сниженное значение медианы индекса нагрузки выросло с 1,96 до 2,15 (ГН 2,0-4,2, ПД у 19 человек, ОД – у 3,  $p=0,001$ ). Изначально повышенное значение медианы показателя НСТ-теста понизилось с 0,36 до 0,24 (ГН 0,10-0,30, ПД у 19 человек, ОД – у 3,  $p=0,001$ ).

Т.о., показано, что преимущество НКД для зависимых выборок по сравнению с КЗ состоит в получении дополнительной информации о гомеостазе системы (нормализации или денормализации ее параметров), которая необходима для оценки безопасности изучаемого воздействия.

1. Феофанова Т.В., Серова Т.А. Использование таблицы сопряженности 2x2 при оценке внешнего воздействия на объект в динамическом медико-биологическом исследовании (непараметрический критерий Доктора) //Нейрокомпьютеры: разработка, применение. 2015. №1. С. 55-60.
2. Урбах В.Ю. Биометрические методы. Издательство «Наука», 1964.

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ГОМОЛОГИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ ПИЛЕОБРАЗУЮЩИХ БЕЛКОВ БАКТЕРИЙ РОДА AZOSPIRILLUM

## MOLECULAR MODELING AND HOMOLOGOUS STRUCTURES OF PILUS-FORMING PROTEINS OF BACTERIA OF THE GENUS AZOSPIRILLUM

Щеголев С.Ю., Буданова А.А., Матора Л.Ю.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, г. Саратов, shegolev\_s@ibppm.ru

Бактерии рода *Azospirillum* идентифицированы как ассоциативные симбионты разнообразных растений и активно используются в фундаментальных и прикладных исследованиях механизмов растительно-микробных взаимоотношений. Важнейшими компонентами их клеточной поверхности являются пили, опосредующие взаимодействия бактерий с корнями растений и с большой вероятностью причастные к такому типу коллективного поведения азоспирилл, как их микроколониальное распространение [1].

С помощью методов биоинформатики впервые для штамма *A. brasilense* Sp245 нами проведено моделирование в 3D пилеобразующих белков и идентифицированы их гомологичные структуры. Использованы аминокислотные последовательности, сосредоточенные в протеоме данного штамма (GenBank GCA\_000237365.1) по результатам полногеномного секвенирования его ДНК [2], чьи кодирующие нуклеотидные последовательности оказались локализованными на плазмиде p4.

Для азоспирилл характерно наличие пилей плотной адгезии типа TAD [3], структурной основой которых является пилин Flp – низкомолекулярный белок фимбрий. Известно, что пили данного типа участвуют в процессах, определяющих взаимоотношения бактерий с растениями, и что их присутствие у азоспирилл является исключительной особенностью вида *A. brasilense* [4]. Кроме препилина Flp IVb нами приняты в рассмотрение аналоги белков секреторной системы TAD [3], найденные в протеоме *A. brasilense* Sp245: компонентов комплекса секретина внешней мембраны (CraB, CraC и CraD); АТФ-азы, снабжающей энергией сборку филамента из Flp (CraF); структурной субъединицы, служащей якорем для пилей во внутренней мембране клеток (TadG); пептидазы препилина, осуществляющей процессинг предшественников структурных составляющих пилей.

2D- и 3D-структуры белков определяли методом молекулярного моделирования по шаблонам с использованием программного обеспечения I-TASSER [5]. Ключевым его этапом является использование структурных аналогов моделируемого белка, выявленных среди белков с экспериментально определенной 3D-структурой и функцией в базе данных белковых структур PDB. Благодаря структурному сходству о функции модели, как правило, можно судить по соответствующим характеристикам структурного аналога. Однако в технологии I-TASSER предусмотрены дополнительные эффективные инструменты для предсказания функциональных свойств моделируемого белка, таких как его связь с лигандами, ферментативный потенциал, генно-онтологические характеристики.

В круг объектов, также обладающих сходством в 3D с тем или иным моделируемым белком, могут входить гомологичные ему структуры, происходящие от общего предка. При достаточно достоверной

гомологии, чему соответствуют значения математического ожидания  $E$ -value  $< 0.01$  (при выравнивании 2-х последовательностей) или  $0.0001$  (при попарных выравниваниях BLAST с соответствиями из баз данных), структура белков в 3D сохраняется в своей основе даже при относительно низких значениях идентичности их аминокислотных последовательностей порядка 15-20% [6]. Для обнаружения гомологичных структур исследуемых белков применяли технологию SmartBlast, оптимизирующую решение этой задачи в протяженных эволюционных масштабах среди бактерий, архей и эукариотов.

В качестве примеров ниже приведены результаты, полученные нами для препилина Flp IVb, белка CraB, возможно вовлеченного в формирование биопленок [4], и TadG, который, будучи структурным элементом пилей типа TAD, также может быть компонентом аппарата биогенеза, прикрепляющим пили к клеткам [3]. Использование метода [5] для белка Flp IVb показало практически одинаковую близость его фолдинга фрагментам 3D-структур инсектицидного дельта-эндотоксина Cry8Ea1 из *Bacillus thuringiensis* (PDB 3EB7) и белка DHR81 (PDB 5CWQ) – одного из 15 модельных белков, искусственно собранных из tandemного повтора простого структурного мотива типа спираль-петля-спираль-петля [7]. Этот сконструированный и закристаллизованный белок с мотивом, на основе которого может возникать множество 3D-структур белковых молекул с разнообразными функциями, интересен тем, что его последовательность по замыслу авторов должна существенно отличаться от известных белков с повторами без какой-либо значительной гомологии с ними. Действительно, парное локальное выравнивание аминокислотных последовательностей Flp IVb с 5CWQ и 3EB7 программой LALIGN продемонстрировало отсутствие такой гомологии. Существующие в природе белки с tandemными повторами составляют, по мнению авторов работы [7], лишь малую долю возможных вариантов последовательностей и структур таких белков. Тем не менее, даже при отсутствии гомологии аминокислотных последовательностей фолдинг препилина Flp IVb из протеома *A. brasilense* Sp245, спрогнозированный по методу [5], обнаружил высокую степень его структурного сходства в 3D (TM-score 0.766) с искусственно созданным белком DHR81 (PDB 5CWQ).

Применение SmartBlast показало, что в набор из пяти гомологов с наилучшими соответствиями для Flp IVb *A. brasilense* Sp245 ( $E$ -value  $4 \cdot 10^{-45}$  -  $10^{-30}$ , идентичность 66-99%) входят только представители рода *Azospirillum* неизбыточной базы данных белков nr, и что белки базы данных Landmark хорошо изученных эталонных видов про- и эукариотов в нем не представлены. Выявлено наличие в них консервативного домена семейства Flp – белков сборки фимбрий. В дополнительном списке гомологов из 20 соответствий 7 позиций с наивысшей общей оценкой ( $E$ -value  $3 \cdot 10^{-44}$  -  $10^{-28}$ , идентичность 80-97%) также заняты азоспириллами. В остальную часть этого списка с  $E$ -value в интервале  $10^{-14}$  -  $3 \cdot 10^{-6}$  с идентичностью 29-52% входят 13 представителей семейств *Acetobacteraceae*, *Burkholderiaceae* и *Hyphomicrobiaceae*.

Использование метода [5] для белка CraB продемонстрировало соответствие его фолдинга 3D-структуре шаперона FlgA из *Salmonella typhimurium* LT2 (PDB 3TEE), участвующего в сборке Р-кольца базального тела бактериального жгутика. При этом уровень гомологии их аминокислотных последовательностей, по данным программы LALIGN, соответствует  $E$ -value  $< 0.025$  при идентичности 28% и сходстве 54%. Функция CraB как шаперона подтверждается также литературными данными для ряда штаммов рода ацинетобактеров [8].

Применение SmartBlast показало, что среди пяти гомологов с наилучшими соответствиями для CraB *A. brasilense* Sp245 ( $E$ -value  $6 \cdot 10^{-167}$  -  $4 \cdot 10^{-98}$ , идентичность 34-99%) присутствует гипотетический белок PA4306 из *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, чей протеом входит в эталонную базу данных Landmark. Остальные четыре соответствуют базе данных белков nr и являются представителями рода *Azospirillum*. Анализ доменного состава CraB методом BLASTP выявил среди специфичных соответствий консервативный домен SAF, входящий в состав шаперонов FlgA, один из которых (см. выше) был выбран программами I-TASSER [5] в качестве шаблона при моделировании в 3D белка CraB. В дополнительном списке гомологов из 13 соответствий более половины позиций с наивысшей общей оценкой ( $E$ -value  $0$  -  $3 \cdot 10^{-115}$ , идентичность 67-97%) также занято азоспириллами. В остальную часть этого списка с  $E$ -value в интервале от  $4 \cdot 10^{-78}$  до  $3 \cdot 10^{-42}$  с идентичностью 42-51% входят 6 представителей семейств *Acetobacteraceae* и *Rhodospirillaceae*.

Использование метода [5] для TadG обнаружило соответствие его фолдинга 3D-структуре белка FlgK из *Burkholderia pseudomallei* K96243 (PDB 4UT1), соединяющего крюк и филамент бактериального жгутика. Уровень гомологии их аминокислотных последовательностей, по данным программы LALIGN, соответствует  $E$ -value  $< 0.021$  при идентичности 28% и сходстве 60%.

Применение SmartBlast показало, что в набор из пяти гомологов с наилучшими соответствиями для TadG *A. brasilense* Sp245 ( $E$ -value  $0$  -  $2 \cdot 10^{-158}$ , идентичность 54-99%) входят только представители базы данных белков nr, и что белки базы данных Landmark в нем не представлены. Четыре позиции занимают белки из штаммов *Azospirillum* и одну – белок сборки пилей TadG из *Skermanella aerolata* KACC 11604. Доменный состав TadG демонстрирует специфичные соответствия консервативным доменам TadG (белок сборки Flp пилей) и VWA (домен vWF type A, определяющий адгезивные свойства белков). В дополнительном списке 56 гомологов 8 позиций с наивысшей общей оценкой ( $E$ -value  $0$  -  $2 \cdot 10^{-162}$ , идентичность 51-98%) представлено азоспириллами. Остальную часть этого списка с  $E$ -value в интервале от  $2 \cdot 10^{-158}$  до  $2 \cdot 10^{-11}$  с идентичностью 24-52% представляют 48 белков бактерий семейств *Rhodobacteraceae* (10 родов), *Rhodospirillaceae* (4 рода), *Sphingomonadaceae* (2 рода), *Caedimonadaceae* и *Aurantimonadaceae* (по одному роду каждый).

В эту часть входят также два представителя рода *Caedibacter* (эндосимбионта инфузории туфельки *Paramecium*), первоначально отнесенного к классу гамма-протеобактерий (порядок *Thiotrichales*, семейство не

идентифицировано), за пределами класса альфа-протеобактерий, объединяющего все остальные семейства, перечисленные в предыдущем абзаце. Однако позднее появились сообщения о том, что род *Caedibacter* следует считать полифилетической группой, и его представителей можно встретить также среди альфа- и бета-протеобактерий. Этим, по-видимому, объясняется обнаруженная нами выраженная гомология белков TadG из *A. brasilense* Sp245 и *Caedibacter* sp. 38-128, sp. 37-49 ( $E$ -value  $10^{-93}$  -  $3 \cdot 10^{-84}$ , идентичность 37-39%).

В заключение заметим, что очевидное доминирование *Azospirillum* в списках SmartBlast рассмотренных нами белков может, вероятно, быть следствием структурной обособленности молекулярного аппарата пилей плотной адгезии TAD азоспирилл, отмеченной в работе [4]. Полученные результаты указывают также на его структурную аналогию и возможную эволюционную связь с белками полярного жгутика бактерий.

1. Шелудько А.В. с соавт. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. 2010. Т. 79, № 5. С. 696-704.
2. Wisniewski-Dye F. *et al.* *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments // PLoS Genetics. 2011. Vol. 7, No 12 (e1002430). P. 1-13.
3. Tomich M. *et al.* The *tad* locus: postcards from the widespread colonization island // Nat. Rev. Microbiol. 2007. Vol. 5. P. 363-375.
4. Wisniewski-Dye F. *et al.* Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation // Genes. 2012. Vol. 3. P. 576-602.
5. Yang J. *et al.* The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction // Nat. Meth. 2015. Vol. 12. P. 7-8.
6. Agostino M. Practical Bioinformatics. New York-London: Garland Science, 2013. 384 p.
7. Brunette T.J. *et al.* Exploring the repeat protein universe through computational protein design // Nature. 2015. Vol. 528. P. 580-584.
8. Kinsella R.L. *et al.* Defining the interaction of the protease CpaA with its type II secretion chaperone CpaB and its contribution to virulence in *Acinetobacter* species // J. Biol. Chem. 2017. Vol. 292. P. 19628-19638.

**Секция 10. Новые методы в  
биофизических исследованиях.**

**ЦИФРОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО КАРТИРОВАНИЯ СТРЕССОВ И СТРЕСС-ФАКТОРОВ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

**DIGITAL TECHNOLOGIES FOR PERSONALIZED MAPPING OF ACUTE STRESSES AND STRESS FACTORS OF THE EDUCATIONAL PROCESS (PILOT RESEARCH)**

*Полевая С.А.<sup>1,2</sup>, Бовыкина Д.В.<sup>1</sup>, Антонец В.А.<sup>1</sup>, Парин С.Б.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>НИУ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (ННГУ)

<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет (ПИМУ), Нижний Новгород

Образование (в первую очередь – высшее) в последние годы все чаще переносится в виртуальную, Интернет-ориентированную среду. Очевидно, что этот тренд будет только усиливаться, прежде всего, из коммерческих соображений. Однако особенности и последствия этой оптимизации изучены чрезвычайно поверхностно. В частности, упор в подобных исследованиях делается исключительно на субъективные «психологические» методы, основанные на батареях разнообразных опросников и тестов [1]. Между тем, дистанционные формы обучения приносят в образовательный процесс целый ряд новых, ранее не встречавшихся факторов, в том числе, стрессогенного характера. Это серьезная, в том числе, клиническая проблема, требующая привлечения современных объективных методов решения.

В настоящей работе использована разработанная в ПИМУ совместно с ННГУ мобильная технология событийно-связанной телеметрии ритма сердца (ССТ РС), позволяющая по динамике спектральных показателей кардиоритма в реальном режиме времени выявлять эпизоды стресса различных видов естественной деятельности [2]. В основе детектирования стресс-эпизодов лежат положения трехкомпонентной теории нейробиологических механизмов стресса [3]. В экспериментах приняли участие 19 студентов. На аудиторных лекциях выполнено 14 записей ритмокардиограммы, на дистанционных – 5 записей, в обоих контекстах по 90 минут. Синхронно проводилась видеофиксация контента занятий для дальнейшего выявления стрессогенных событий и факторов. До и после лекции студенты заполняли опросник самооценки ситуативной и личностной тревожности Спилбергера-Ханина. Кроме того, на основании анализа литературных данных была сформирована классификация возможных стресс-факторов, характеризующих аудиторную (традиционную) форму занятий. Статистическая обработка полученных данных включала методы описательной статистики, дисперсионный и корреляционный анализ.

По результатам анализа динамики спектральных показателей кардиоритма установлено, что во время аудиторных занятий среднее количество стресс-эпизодов на одну лекцию составило 20,0, что статистически значимо ( $p < 0,05$ ) меньше, чем во время дистанционных – 34,8. Обнаружено, что наряду с традиционными для аудиторной формы обучения группами стресс-факторов (2 фактора инфраструктуры, 10 факторов непосредственно процесса лекции, 3 фактора отношения, 5 факторов случайного характера), при дистанционной форме лекций дополнительно проявляется ряд техногенных стресс-факторов: например, проблемы с подключением к Web-лекции, «вылет» программы, проблемы с видеорядом, медленный Интернет, проблемы с интерфейсом, проблемы со звуком и микрофоном, неполадки с ПК, и т.д. В общей структуре карты стрессогенности 74% стрессующих факторов обнаруживались при обеих формах занятий, тогда как 26% оказались специфичными исключительно для дистанционной формы. Кроме того, по окончании дистанционных лекций показатели личностной тревожности оказались значимо ( $p < 0,05$ ) выше, чем после аудиторных и до начала занятий по обеим формам обучения. Характерно, что при корреляционном анализе между уровнем личностной тревожности и такими показателями вегетативной регуляции, как уровень симпатической (LF) и парасимпатической (HF) активности и общая мощность спектра вариабельности ритма сердца (TP), была выявлена достоверная умеренная положительная связь.

Таким образом, по результатам нашего пилотного исследования можно констатировать, что стрессогенная нагрузка различных форм занятий существенно различается: дистанционные лекции имеют значительно большую стрессовую нагрузку в связи наличием уникальной группы стресс-факторов, связанных с техническим обеспечением занятий. Использование мобильной технологии событийно-связанной телеметрии ритма сердца позволяет объективизировать оценку стрессогенности различных форм и типов образовательной деятельности, что позволяет надеяться на успешный поиск эффективных средств снижения этой разрушительной нагрузки.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ: 19-013-00095\_a, 18-013-01225\_a, 18-413-520006\_p\_a.

1. Щербатых Ю.В., Щекина И.А. Психические состояния в учебном процессе: проблемы и способы оптимизации. // Проблемы современного педагогического образования. 2017. № 54-4. С. 241-246.
2. Polevaaya S.A., Eremin E.V., Bulanov N.A., Bakhchina A.V., Kovalchuk A.V., Parin S.B. Event-related telemetry of heart rhythm for personalized remote monitoring of cognitive functions and stress under conditions of everyday activity. // *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2019. Vol. 11. Iss. 1. P. 109–115.
3. Parin S.B., Vetyugov V.V., Bakhchina A.V., Polevaaya S.A. The Role of the endogenous opioid system in the control of heart rate variability under cognitive loads of various levels. // *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2014. Vol. 6. Iss. 4. P. 116-126.



## ОТКРЫТАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ OPEN-SOURCE PLATFORM FOR CELLULAR RESEARCH

*Асташев М.Е., Серов Д.А.*

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение  
Федерального государственного учреждения науки  
«Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”», Пушкино, Россия, [astashev@yandex.ru](mailto:astashev@yandex.ru)

В последние годы развивается направление разработки лабораторного оборудования с открытой технической документацией, допускающей его повторение, для которого принято обозначение Open-Source Lab [1]. Это касается научного программного обеспечения [2], и такого лабораторного оборудования, как усилитель токов для БЛМ [3], электрофизиологический стимулятор [5], робот для молекулярно-биологических исследований [4] и многого другого. Рывок в области самостоятельной разработки научного оборудования связан со следующими обстоятельствами: доступной технологией 3D-печати, распространением управляющих контроллеров типа Arduino, появлением библиотек программного обеспечения и моделей для 3D печати [6] в сети Интернет, формированием многочисленной аудитории авторов-пользователей.

Задача работы: разработать схему модификации флуоресцентного микроскопа для проведения экспериментов по измерению внутриклеточного кальция с использованием зонда FURA-2AM в ратиометрическом режиме измерения, а также синхронного с измерением концентрации кальция, измерением концентрации NO с использованием зонда DAF-FM, т.е. в трехволновом режиме. В соответствии с концепцией Open-Source Lab были поставлены дополнительные требования: максимальное использование доступных электронных, механических и оптических компонентов, не требующих модификации, использование Arduino в качестве микроконтроллерного блока управления, использование готовой программы для ПК с открытым исходным кодом;

Для модификации был выбран инвертированный флуоресцентный микроскоп Motic AE31E. В качестве управляющей программы ПК была выбрана программа WinFluorXE V.3.8.7. [7], которая позволяет проводить микрофлуорометрические исследования в автоматическом режиме. Программа совместима с наиболее распространенными научными цифровыми камерами и осветителями микроскопов. Управление дополнительным оборудованием (источники освещения, электростимуляторы, аппликационные системы, электрофизиологическое оборудование) программа осуществляет через универсальные блоки ввода/вывода аналоговых и цифровых сигналов фирмы National Instruments. Управляющий контроллер моторизованного микроскопа построен на базе платы управления 3D-принтерами RepRap, состоящей из микроконтроллерной платы Arduino Mega2560, коммутационной платы RAMPS 1.4 [8]. Контроллеры Arduino реализуют концепцию "электронных конструкторов". В разработанной нами программе микроконтроллера реализованы функции управления моторами препаратоводителя и фокусировки, управления яркостью осветителя проходящего света и током светодиодов эпифлуоресцентного осветителя, термостатирования препарата и растворов системы перфузии. Управление всеми функциями микроскопа осуществляется из модифицированной программы WinFluorXE. Эпифлуоресцентный осветитель построен на основе механических, оптических компонентов Thorlabs и светодиодных модулей (340нм, 385нм и 490 нм) того же производителя. В настоящий момент проект существует в стадии работающего полнофункционального образца в составе установки для комплексных мембранных и внутриклеточных исследований электрофизиологическими и микроскопическими методами. Исходные файлы программ и модели для 3D-принтера опубликованы на странице лаборатории [9].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 16-15-00248 "Регуляция кровоснабжения кожных покровов человека" и грант № 18-15-00198 "Миокардиальные  $\alpha$ 2-адренорецепторы – новые эффекторы в защите от гипертрофии и сердечной недостаточности".

1. Pearce J. Open-Source Lab: How to Build Your Own Hardware and Reduce Scientific Research Costs. Elsevier. 2013. ISBN: 9780124104860. P. 240.
2. Dempster J. Strathclyde Electrophysiology Software // [http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software\\_ses.htm](http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software_ses.htm)
3. Shlyonsky V., Dupuis F., Gall D. The OpenPicoAmp: An Open-Source Planar Lipid Bilayer Amplifier for Hands-On Learning of Neuroscience. // PLoS ONE. 2014. № 9 V. 9. e108097. doi:10.1371/journal.pone.0108097
4. <https://opentrons.com/>
5. Sheinin A, Lavi A, Michaelevski I. StimDuino: an Arduino-based electrophysiological stimulus isolator // J Neurosci Methods. 2015 Mar 30;243:8-17
6. <http://www.thingiverse.com/jpearce/collections/open-source-scientific-tools/page:2>
7. Dempster J. WinFluor V3.8.7 // [http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/media/40/imaging/WinFluor\\_User\\_Guide.pdf](http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/media/40/imaging/WinFluor_User_Guide.pdf)
8. [http://reprap.org/wiki/RAMPS\\_1.4/ru](http://reprap.org/wiki/RAMPS_1.4/ru)
9. [http://www.icb.psn.ru/index.php?option=com\\_content&view=category&id=14&Itemid=127](http://www.icb.psn.ru/index.php?option=com_content&view=category&id=14&Itemid=127)

**РАЗРАБОТКА УСТАНОВКИ ПО ОЦЕНКЕ ДЕФОРМАБИЛЬНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЯВЛЕНИЯ ВРАЩЕНИЯ ПЛОСКОСТИ ПОЛЯРИЗАЦИИ ПЛОСКОПОЛЯРИЗОВАННОГО СВЕТА ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ.**

**DEVELOPMENT OF THE APPARATUS USING THE EFFECT OF COMPLETELY LINEARLY POLARIZED LIGHT POLARIZATION PLANE ROTATION BY OPTICALLY ACTIVE SUBSTANCES FOR MEASUREMENT ERYTHROCYTES' DEFORMABILITY**

*Белкин А.В., Войтенко П.А., Дубровский В.Н., Елифанов А.В., Маслакова К.Ю., Округина А.В., Шалабодов А.Д.*

Институт Биологии, г. Тюмень, a.v.belkin@utmn.ru  
k.y.maslakova@utmn.ru

Эритроциты, или красные кровяные тельца, это форменные элементы крови, главной функцией которых является транспорт кислорода от легких к тканям. Они представляют собой двояковогнутые клетки, не имеющие ядра и переносящие пигмент гемоглобин. Как известно, эритроциты обладают свойством деформабильности, т.е. способностью менять свою форму в ответ на различные внешние силы. Данное свойство позволяет эритроцитам проходить через узкие сосуды при кровообращении и претерпевать достаточно большие деформации в ответ на воздействие внешних стрессов [1]. Поддержание формы и деформируемость эритроцитов обеспечивают структурная и функциональная интеграции мембранных белков. Эти белки обычно оформлены в комплексы двух типов: интегральные белки мембраны, встроенные в липидный бислой, и белки, образующие предметранный цитоскелет [2]. Многие из этих молекулярных структур мембран обладают оптической активностью и способны вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света.

Деформабильность эритроцитов играет важную роль в их основной функции - транспортировке газов ( $O_2$  и  $CO_2$ ) через систему кровообращения. Незначительное снижение деформируемости клеток крови приводит к значительному повышению микроциркуляторного сопротивления и вязкости крови. Таким образом, пониженная деформируемость эритроцитов часто сообщает о наличии различных микрососудистых заболеваниях, к примеру, осложнения диабета [3]. В настоящее время не разработано методов для оценки деформабильности эритроцитов, которые бы одновременно обладали достаточной информативностью, быстротой проведения и низкой стоимостью. Поэтому актуальным является разработка такого метода, модели установки, а также аппаратного и программного обеспечения к ней. В результате мы разработали и сконструировали рабочий прототип установки по оценке деформабильности эритроцитов. В основе метода, реализованного в нашей установке используется оценка степени вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света оптически активными веществами, которые, как известно, присутствуют в структуре эритроцитов (закон Малюса). Установка состоит из двух блоков, расположенных вертикально на стальных шпильках. Внутри блоков находятся составные элементы – лазер, фоторезистор, мотор и плата Arduino Uno, с помощью которой обеспечивается управление работой установки. Ячейку Куэтта моделируют чашки Петри, в зазор между которыми помещается суспензия эритроцитов ( $t=37^\circ C$ ). Радиус вращающегося сектора, через который проходит луч лазера, составляем 30 мм. Ширина зазора между пластинами равна 0,3 мм. Изменяя скорость вращения нижней пластины (чашки Петри), на основании закона вязкого трения Ньютона, моделируются различные деформирующие условия, возникающие в зазоре между пластинами. Эритроциты под действием деформирующего воздействия вытягиваются, что приводит к повороту плоскости поляризации плоскополяризованного луча лазера, проходящего через тонкий слой суспензии эритроцитов. При этом происходит изменение интенсивности плоскополяризованного света, которое регистрируется при помощи фоторезистора. Также было разработано программное обеспечение в виде интуитивного интерфейса пользователя, для дистанционного управления установкой.

1. Муравьев, А.В. Деформация эритроцитов: роль в микроциркуляции/ А. В. Муравьев, В.Л. Комлев // ЯПВ естественные науки. – 2013. - Т.3, №2. - С. 93-103.
2. Ito, H. Mechanical diagnosis of human erythrocytes by ultra-high speed manipulation unraveled critical time window for global cytoskeletal remodeling / H. Ito et al. // Sci. Rep. - 2017. - №7. – p. 12-16.
3. Agrawal, R. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique / R. Agrawal et al. // Sci. Rep. – 2016. - №6. – p. 18-25.

**ОСЦИЛЛЯЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ NADH ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНОМ В ВОДНЫХ СРЕДАХ И ОБРАЩЕННЫХ МИКРОЭМУЛЬСИЯХ**  
**NADH FLUORESCENCE OSCILLATIONS IN THE INTERACTION WITH S-NITROSOGLUTATHIONE IN AQUEOUS MEDIA AND REVERSED MICROEMULSIONS**

*Беловолова Л.В., Глушков М.В.*

Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва (lvbel@smp.gpi.ru)

Особенности взаимодействия никотинамидадениндинуклеотида (NADH, NAD<sup>+</sup>) и S-нитрозоглутатиона (GSNO) изучены в гомогенном буферном растворе и модельной микроэмульсионной системе типа «вода в масле» («water-in-oil») анионного поверхностно-активного вещества – Аэрозоле ОТ (АОТ) в октане. Водорастворимые реагенты включаются в водные капли микроэмульсии, которые сталкиваются между собой, обмениваясь содержимым за времена порядка 10<sup>-7</sup> с. В таких оптически прозрачных и стабильных системах параметры (степень гидратации комплексов, влияние заряда и природы поверхности мембраны, различные включения) можно варьировать в широком диапазоне условий. Окисление NADH и восстановление NAD<sup>+</sup> протекает по двухэлектронному механизму с образованием промежуточного радикала NAD<sup>•</sup>, способного быстро вступать в реакции с кислородом и другими свободными радикалами. Соотношение (NAD<sup>+</sup>)/(NADH) является важнейшим фактором, определяющим редокс-потенциал клетки. В составе ферментов NADH катализирует многие ферментативные реакции и вовлекается в свободнорадикальные процессы, связанные с образованием активных форм кислорода (АФК) (reactive oxygen species – ROS). В настоящее время доказано, что АФК являются не просто повреждающими многие клеточные структуры побочными продуктами ферментативных реакций, но и осуществляют регуляцию клеточных функций. АФК участвуют в электронном и протонном переносе во многих окислительно-восстановительных процессах, в которых при определенных условиях могут возникать колебательные режимы смены состояния системы. Примером могут служить реакции типа Белоусова–Жаботинского, а также реакции Мейяра, постоянно протекающие в клетках и межклеточном пространстве.

GSNO играет важнейшую роль в системе антиоксидантной защиты, поскольку является основным источником окиси азота – универсального фактора клеточной и межклеточной сигнализации и управления на всех этапах жизненного цикла растений и животных. GSNO может вступать во взаимодействие с NADH-содержащими ферментами, что имеет большое значение для клеточного метаболизма, как в норме, так и при патологиях. В частности, открытым остается вопрос о механизмах взаимодействия GSNO и NADH в составе фермента и роли GSNO в поддержании физиологических значений соотношения [NAD<sup>+</sup>]/[NADH]. Связывание с ферментами оказывает существенное влияние на конформацию и активность молекулы NADH. Изучение взаимодействия GSNO и NADH в клеточных суспензиях, представленные в литературе, имеет большие сложности из-за многофакторности различных влияний, поэтому перспективны исследования с помощью простых микроэмульсионных систем.

Кинетика уменьшения интенсивности флуоресценции восстановленной формы NADH при реакции с GSNO протекает через две основные стадии: скачкообразное падение интенсивности и относительно медленную экспоненциальную стадию, на фоне которой наблюдаются высокоамплитудные колебания интенсивности сигнала. В микроэмульсиях АОТ деградация флуоресценции NADH протекает существенно быстрее, чем в гомогенном буферном растворе. Относительный вклад скачкообразной стадии растет при освещении образца азотным лазером (337 нм), а также при увеличении содержания GSNO и воды в микроэмульсии. Сопоставление результатов экспериментов в водном растворе и в микроэмульсиях позволяет заключить, что, несмотря на большую разницу в скорости медленной стадии реакции, частоты обнаруживающихся на ее фоне колебаний в обеих системах близки по порядку величины, но амплитуда наблюдаемых колебаний сигнала в микроэмульсиях существенно выше, чем в буфере. В условиях, когда на один пузырек микроэмульсии в среднем приходится по одной молекуле NADH и GSNO вклад скачкообразной стадии существенно уменьшается по сравнению с образцами при меньшем содержании NADH. При этом уменьшается и константа скорости медленной стадии деградации флуоресценции NADH, в то время как частота колебаний ее интенсивности увеличивается. Колебания интенсивности флуоресценции NADH заметно выражены в микроэмульсиях с невысокой степенью обводненности пузырьков (молярное отношение  $n = [H_2O]/[АОТ] = 19$ ) и заметно уменьшаются с ростом  $n$ , что свидетельствует о существенном влиянии локальных параметров микроокружения реагентов. В зависимости от соотношения концентраций GSNO и ионов меди может проявляться как катализ распада GSNO, так и его замедление из-за образования неактивного комплекса. В микроэмульсиях высокоамплитудные колебания интенсивности флуоресценции NADH сильнее выражены в присутствии буфера (1 мМ HEPES, pH 7.4), чем в чистой воде. Предполагается, что наблюдаемые эффекты обусловлены сдвигами локальных значений pH водного микроокружения реагентов в микроэмульсионных пузырьках, образованием АФК и участием катион-радикалов буфера HEPES в реакции восстановления промежуточного радикала NAD<sup>•</sup> до NADH.

## **ОТКЛИК СУСПЕНЗИИ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ НА ЗВУКОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ, ИЗМЕРЕННЫЙ ВОЛОКОННЫМ ИНТЕРФЕРОМЕТРОМ ФАБРИ-ПЕРО**

### **THE BAKER'S YEAST SUSPENSION RESPONSE ON THE SOUND ACTION MEASURED BY MEANS OF A FIBER FABRY-PEROT INTERFEROMETER**

*Беловолова Л.В., Беловолов М.И.<sup>1</sup>, Беловолов М.М.<sup>1</sup>*

*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва (est123321@mail.ru)*

*<sup>1</sup>Научный центр волоконной оптики РАН, Москва.*

В настоящее время имеется большая потребность в устройствах для изучения динамики живых клеток и водных суспензий в различных неравновесных состояниях. Например, для понимания роли примембранной воды в механизмах создания анестезии актуальны исследования микроэмульсионных систем вблизи критических точек расслаивания, при приближении к которым происходят резкие изменения параметров корреляции между молекулярными компонентами (вплоть до выделения какого-то компонента в виде пузырьковых структур). В таких условиях могут быть сильно выражены эффекты оптической нелинейности, вследствие чего системы приобретают высокую чувствительность к слабым внешним воздействиям, малым добавкам и внутренним флуктуациям. В них могут возникать долгоживущие метастабильные состояния и колебания различных физических параметров. Можно полагать, что подобные явления наблюдаются в воде, насыщенной атмосферными газами, при увеличении содержания активных форм кислорода (АФК) в определенных пределах относительно равновесных значений. Изучение таких систем в условиях низкого оптического контраста требует высокочувствительных методов детектирования изменения коэффициента преломления раствора, чему в принципе удовлетворяют методы оптической интерферометрии. Для исследования <https://chem21.info/info/1711750> оптических и акустических особенностей систем в окрестности критических точек расслаивания была создана и испытана установка на основе волоконного интерферометра Фабри-Перо. Опыт показал, что оптимальной по стабильности и уровню шумов является схема, в которой вся разность хода интерферирующих световых потоков сосредоточена в чувствительном элементе - коллимирующем устройстве (волоконном порте FB221FC), в который помещается исследуемый биологический объект на стеклянной подложке или кювета с раствором. Схема установки включает в себя одночастотный полупроводниковый лазерный диод ЛД-ВБР (1.55 мкм), оптический изолятор, направленный разветвитель Y-типа на одномодовом волокне, интерферометр Фабри - Перо на коллимирующем оптическом устройстве с исследуемым образцом и фотоприемник с усилителем. Установка позволяет регистрировать динамические процессы в исследуемых системах в реальном времени, а также проводить частотный (до 100 кГц) и фазовый анализ. В установке на основе низкодобротного волоконного интерферометра Фабри - Перо одним зеркалом является торец-скол волокна с 4% френелевским отражением, а вторым - зеркало в коллимирующем устройстве с высоким (~98%) коэффициентом отражения. Оптическая плотность исследуемого раствора подбирается таким образом, чтобы интенсивность двух интерферирующих световых потоков (отраженного от скола и дважды прошедшего через образец) были примерно одинаковыми. Сигнал с фотоприемника подается либо на вход милливольтметра, либо на линейный или звуковой вход персонального компьютера. Переменная компонента сигнала анализируется с помощью программ стандартных звуковых редакторов (Spectra-Plus или CoolEditPro2). Данная установка была испытана с использованием обращенных микроэмульсионных и биологических систем, что подтвердило ее перспективность для поставленных целей. В частности, в суспензиях живых клеточных культур после определенных воздействий в реальном времени наблюдались вариации оптической плотности, отражающие динамику процессов структурной перестройки. Например, после одной минуты звукового воздействия (с частотой 3 кГц и звуковым давлением ~ 50-60 ДБ) на суспензию пекарских дрожжей примерно через 5 минут после его прекращения возникают скачкообразные изменения сигнала, которые могут то проявляться, то исчезать в течение десятков минут после прекращения воздействия. При этом в частотном спектре особенно заметны звуковые сигналы в диапазоне 400÷600 Гц, которые возникают и исчезают с временными интервалами в десятки секунд. На время ~ 800÷1000 с через несколько минут после воздействия появляются квазипериодические изменения интенсивности регистрируемого сигнала с максимальным периодом  $\tau \sim 100$  с. Эти особенности наблюдали в различное время на различных образцах свежеприготовленных суспензий дрожжей. В подобных условиях в отсутствие внешнего звукового воздействия на суспензию дрожжей аналогичных особенностей не наблюдалось. Можно полагать, что звуковое воздействие на суспензию дрожжей приводит к повышению активности их клеток, вследствие чего происходит усиление процессов образования и разрушения пузырьков газа, что и ведет к долговременным изменениям в оптической плотности суспензии.

## **ФЛУКТУАЦИИ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В ЛАБОРАТОРИЯХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ БИОФИЗИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ**

### **FLUCTUATIONS OF PERMANENT THE MAGNETIC FIELD IN LABORATORIES AT CARRYING OUT BIOPHISICAL EXPERIMENTS**

***Бондаренко В.Г., Бондаренко В.А., Маркина И.С.<sup>1</sup>***

Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН,  
123007, Россия, Москва, Хорошевское шоссе, 76А, **E-mail:** vbmephi@inbox.ru

<sup>1</sup>Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, Москва, Каширское шоссе, 31

Описанные в литературе эффекты воздействия на человека и живые системы [1] даже незначительных флуктуаций магнитного поля (МП) приводят к заметным изменениям в организме. Уровни магнитных полей естественного и городского магнитного шума имеют диапазон от  $10^{-9}$  Тл (флуктуации геомагнитного поля) до  $10^{-6}$  Тл (МП в местах проживания). При оценке результатов биофизических экспериментов необходим учет флуктуаций МП по амплитудным, ориентационным и спектральным параметрам.

С этой целью создан прибор на базе магниторезистивного датчика НМС1001 для измерений флуктуаций магнитного поля в различных экспериментальных условиях в лабораториях, проводящих биофизические эксперименты [2]. Принцип работы датчика основан на эффекте изменения ориентации внутренних доменов пермаллоевой (NiFe) пленки под воздействием внешнего магнитного поля, в результате чего изменяется сопротивление пермаллоя. Датчик НМС1001 состоит из четырех пермаллоевых слоев, включенных в мостовую схему. Степень разбаланса моста линейно зависит от величины флуктуации внешнего магнитного поля.

Блок детектирования прибора содержит датчик НМС1001, стабилизатор напряжения питания моста (+5В) и прецизионный инструментальный усилитель с коэффициентом усиления  $K_{ус}=100$ . Инструментальный усилитель усиливает разность сигналов с мостовой схемы, преобразуя их в выходной однополярный сигнал. Выбор типа датчика и схемное решение блока детектирования обеспечивают высокую чувствительность прибора, низкий уровень шумов и большой динамический диапазон измеряемых полей ( $5\text{нТл} \div 50\text{мкТл}$ ).

Прибор включает 3 взаимно ортогонально расположенных блока детектирования магнитного поля для измерения трех его проекций, блок приема-передатчика сигналов с выходов блоков детектирования на входы амплитудно-цифрового преобразователя (АЦП), прецизионное устройство АЦП LA-i24USB, блок измерения температуры, а также компьютер или ноутбук, в память которого поступают результаты оцифровки аналоговых сигналов.

Проведены измерения амплитуд магнитной индукции (фоновое магнитное поле) в научных лабораториях Института медико-биологических проблем во время многосуточных экспериментов. Диапазон флуктуаций амплитуд магнитной индукции составил от  $\pm 20$  до  $\pm 150$  нТл и зависел от времени суток. Минимальные флуктуации магнитного поля наблюдались в ночное время от 23 ч. вечера до 5ч. утра, что, вероятно, можно связать с уменьшением вклада городского магнитного шума.

1. Бинги В.Н. Принципы электромагнитной биофизики. - М.: ФИЗМАТЛИТ, 2011, 592с.

2. Бондаренко В.Г., Маркина И.С. Анизотропный магниторезистивный датчик – детектор постоянного магнитного поля. // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки», 2018, № 12, С. 59-62.



## **ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОВОЛНОВЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА**

### **RESEARCHES OF MICROWAVE RADIATIONS OF THE HUMAN BRAIN**

***Брусиловский Л.И., Брюховецкий А.С.<sup>1</sup>***

ООО «ЭЛЬБРУС Корпорация», Москва, netsrv@aha.ru

<sup>1</sup>ЗАО «Клиника интервенционной неврологии и восстановительной терапии «Нейровита», Москва, neurovita-as@mail.ru

Новая информационно-коммутиационная теория устройства головного мозга человека (ГМЧ), разработанная профессором А.С.Брюховецким (2014), утверждает что когнитивные и мыслительные процессы в ГМЧ связаны не с электромагнитными процессами в коре головного мозга, а с электромагнитной активностью электромагнитных волн в области межоболочечного ликворного пространства между корой и внутренней поверхностью черепной коробки головы человека [1,2]. Для проверки теории под руководством Л.И.Брусиловского были проведены исследования и представлены экспериментальные доказательства факта существования электромагнитной активности ГМЧ в диапазоне электромагнитных волн УВЧ и СВЧ частот от 1,5 до 5,0 ГГц с мощностью сигналов на уровне -100 дБм .. 80 дБм ( $1\text{e}^{-13}$ .. $1\text{e}^{-11}$  Вт). Фактически обнаружен новый канал собственной электромагнитной активности ГМЧ, которая может стать объективным инструментом

для оценки психического состояния человека в норме и при патологии. Способ регистрации амплитудно-частотных характеристик собственных микроволновых излучений ГМЧ запатентован авторами (заявка №2017126117 от 20.07.2017). Запатентованный способ станет основой для разработки принципиально новой технологии микроволновой энцефалографии (оборудование микроволнового сканирования реального времени + программное обеспечение + медицинские методики).

В докладе представляются программы-методики и экспериментальные доказательства независимых исследований в безэховых экранированных камерах ФБУ Ростест-Москва и Центра эксплуатации объектов наземной космической инфраструктуры (ЦЭНКИ).

The report presents researches and experimental evidence of the existence of the own electromagnetic activity of the human brain in the UHF and SHF ranges from 1.5 to 5.0 GHz with signal power at the level of -100 dBm .. 80 dBm ( $1e^{-13}..1e^{-11}$  W). The method of registration will be the basis for the development of a fundamentally new technology of microwave encephalography.

1. Брюховецкий А.С. Проблемы теоретической неврологии. Информационно-коммутативное устройство и принципы работы мозга человека.-М.:Изд. Полиграф-Плюс, 2014 .- 330 с: 44 ил
2. Andrey S. Bryukhovetskiy Human Brain Theory. Information-Commutation Device of Brain and Principles of its Work and Modeling .-New York .-2016,Nova Science Publishers.-220p



## ИНТЕРФЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ПРИЖИЗНЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

## INTERFEROMETRIC METHOD OF LIFE RESEARCH STRUCTURAL TRANSFORMATIONS OF PLANT TISSUES

*Будаговская О.Н.<sup>1</sup>, Будаговский А.В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В.Мичурина», г.Мичуринск, [info@fnc-mich.ru](mailto:info@fnc-mich.ru)

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Мичуринский государственный аграрный университет», г.Мичуринск [budagovsky@mail.ru](mailto:budagovsky@mail.ru)

В процессе жизнедеятельности и под действием различных факторов в растительных тканях происходят структурные перестройки, динамика и интенсивность которых является критерием жизнеспособности, устойчивости, развития патологий и репарационных процессов. Для их регистрации, как правило, используют препаративные анатомические методы, различные микроскопы, современные технологии ядерно-магнитного резонанса и когерентной фазовой микроскопии. С целью количественной оценки микроструктурных изменений растительных тканей разработан новый метод, компьютеризированное оборудование и пакет программ, позволяющие проводить измерения в процессе жизнедеятельности.

Теоретически и экспериментально обоснована *количественная оценка микроструктуры* растительной ткани по степени пространственной когерентности (*СПК*) и радиусу корреляции (*Rcor*) рассеянного объектом лазерного пучка методом поляризационной и спекл-интерферометрии. На базе физико-математической модели стационарного случайного фазового экрана с Гауссовым типом распределения фазовых неоднородностей определены теоретические зависимости *СПК* и *Rcor* от среднего размера фазовых неоднородностей среды  $a_i$  и разности хода  $s$  поляризационного интерферометра. В соответствии с теоремой Винера-Хинчина корреляционная функция стационарного случайного процесса и его спектральная плотность связаны Фурье-преобразованием, что для одномерного случая можно представить как:

$$\gamma(s) = \int_{-\infty}^{+\infty} g(\psi) e^{i\psi s} d\psi, \text{ где } g(\psi) - \text{спектр распределения разности фаз } \psi = \varphi(r+s, z) - \varphi(r, z) \text{ в поперечной плоскости}$$

рассеянного пучка. Функция распределения разности фаз  $g(\psi)$  зависит от характера светорассеяния лазерного излучения, определяемого типом неоднородностей объекта и схемой наблюдения рассеянного излучения (отраженный или проходящий пучок).

Основными фазовыми неоднородностями растительной ткани являются клеточные стенки, межклеточные и внутриклеточные воздушные пространства, клеточные органеллы, зерна крахмала. Установлено, что существенное снижение степени когерентности лазерного пучка происходит при взаимодействии с более чем десятью клеточными слоями, что позволяет проводить оценку структурного статуса любых растительных тканей и органов в режиме отражения и листьев - в режиме как отражения, так и пропуска. Использование параметра «пространственная когерентность» при оптической диагностике плодов и овощей значительно увеличивает точность распознавания механических дефектов по сравнению со стандартными спектрофотометрическими методами. При этом величина информационного сигнала практически не зависит от помологического сорта, биохимического состояния покровных и сочных тканей плода, времени нанесения повреждений, а определяется только их микроструктурным состоянием. Когерентность отраженного излучения от

неповрежденной поверхности большинства фруктов, овощей и корнеплодов свыше 30 %, а в зоне механических повреждений типа сдира, прокола, сетки и т.п. - менее 12 %.

Разработанный метод диагностики целесообразно использовать также для экспресс-оценки реакции растений на *токсичные соединения* (соли тяжелых металлов, хлоридное засоление и т.п.); динамики развития грибной и вирусной инфекции и выявления ее наличия уже в латентной фазе; регистрации дефицита микро- или макроэлементного питания. Выявлены корреляционные связи между изменением *СПК* или *Rcor* и такими важными физиологическими характеристиками тканей растительных объектов, как устойчивость, репарация, созревание и старение.

## ТКАНЕИМИТИРУЮЩИЕ ФАНТОМЫ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

### TISSUE-EQUIVALENT PHANTOMS OF HUMAN SKIN FOR TOXICOLOGICAL RESEARCH

*Венцорова Н.В., Тымчук Т.М., Потлов А. Ю., Фролов С.В.*

Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, bmt@nnn.tstu.ru

Косметические средства и бытовая химия являются неотъемлемой частью современного образа жизни. В связи с этим, неточное или неполное соблюдение требований о концентрациях вредных веществ и примесей в этих продуктах может привести к тяжелым последствиям для множества людей. Из литературы [1] известны случаи серьезных заболеваний, вызванных содержанием значительного количества ртути в отдельных средствах по уходу за кожей лица, избыточной концентрации парабенов (соединения для продления сроков хранения косметики) в кремах и т.п.

В связи с вышесказанным актуальным является многоуровневое тестирование различных косметических средств и предметов бытовой химии. В работе предлагаются оригинальные фантомы кожных покровов человека, которые позволяют адекватно смоделировать влияние исследуемого продукта (косметическое средство или предмет бытовой химии) на кожные покровы без использования не всегда этических экспериментов на животных [2].

Фантомы разработаны таким образом, чтобы имитировать оптические и химические свойства покровных тканей, однако в дополнение к ним предпринята попытка имитировать и механические свойства биологической ткани. К моделируемым оптическим свойствам относятся величины коэффициентов поглощения, преломления, рассеяния (с учетом фактора анизотропии) и отражения. Из механических свойств имитируется величина модуля Юнга, а схожесть фантома с реальной биологической тканью по химическим свойствам заключается в подобных окислительно-восстановительных реакциях. Каждый разработанный фантом представляет собой многокомпонентную оптически мутную (сильно рассеивающую) среду с ярко выраженными анизотропными свойствами отдельных слоев [3]. Матрикс фантома изготавливается из желатина, чтобы имитировать упругие свойства кожи человека. При изготовлении фантомов также используются дистиллированная вода, пропиленгликоль, подсолнечное масло, мастика и раствор формалина. Дистиллированная вода в специальной емкости была нагрета до температуры 50 °С, затем в нее внесены точно вычисленные количества пропиленгликоля и желатина. В отдельной емкости в определенной пропорции были смешаны мастика и подсолнечное масло. Содержимое емкостей было перемешано до однородного состояния, внесен 37% раствор формальдегида. Полученная субстанция была перенесена в форму для литья. Получившийся фантом помещен в холодильник на 10 часов, чтобы обеспечить полное затвердевание.

В качестве критериев оценки косметических средств на токсичность [4] известны снижение общей массы фантома, наличие пузырьков воздуха, изменение цвета и текстуры, а также изменение электрического сопротивления. Снижение массы фантома может быть вызвано испарением воды, а также химическими реакциями между исследуемыми материалами и составляющими фантома. Наличие пузырьков воздуха, как и изменение цвета и текстуры также свидетельства химических реакций. Электрическое сопротивление может увеличиваться при некрозе ткани из-за потери клеточной мембраной своих изоляционных свойств.

В результате серии физических экспериментов с вышеуказанными фантомами выявлено, что различия в величине электрического сопротивления поверхностных слоев контрольного фантома и отдельных участков поверхности фантома под действием токсичного агента являются наиболее четко прослеживаемым и количественно оцениваемым показателем агрессивности исследуемого вещества для кожных покровов человека. Возможной причиной увеличения электрического сопротивления исследуемых фантомов может служить разрушение химических связей в полимерных структурах.

Таким образом, предложены оригинальный способ изготовления тканеимитирующих фантомов кожных покровов человека, изучены известные критерии оценки токсичности исследуемых косметических средств и предметов бытовой химии, установлено, что изменения в величине электрического сопротивления поверхностных слоев фантома наиболее информативный и в тоже время удобный к количественной оценке и из рассмотренных критериев [5].

1. United States Department of Agriculture // Annual Report of Animal and plant health inspection service «Animal Usage by 2016 year». – 2017. – p. 10.
2. Симоненко Г.В., Тучин В.В. Оптические свойства биологических тканей // Учебно-методическое пособие. Издательство СГУ. – 2007. – с. 4-10.
3. Hahn C., Noghianian S. Heterogeneous Breast Phantom Development for Microwave Imaging Using Regression Models // International Journal of Biomedical Imaging. – 2012. – No. 803607. – p 12.
4. Dolbashid A.S., Hamzah N., Zaman W.S., Mokhtar M.S. Toxicology analysis of tissue-mimicking phantom made from gelatin // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2017. – Vol. 210. – No. 012004.
5. Фролов С.В., Потлов А.Ю., Проскурин С.Г., Синдеев С.В. Эластография мягких биологических тканей и эндоскопические исследования с помощью оптической когерентной томографии: монография. // Тамбов : Изд-во ФГБОУ ВО «ПГТУ». – 2017.

## РЕАЛИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ КАРБОНОВЫХ ВОЛОКОН ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗАВИСИМОСТИ «ДЛИНА-СИЛА» ОДИНОЧНОГО КАРДИОМИОЦИТА

## REALIZATION OF THE CARBON FIBERS TECHNIQUE FOR THE STUDY OF SINGLE CARDIOMYOCYTE "FORCE-LENGTH" RELATION

*Волжанинов Д.А.<sup>1,2</sup>, Мячина Т.А.<sup>1,2</sup>, Бутова К.А.<sup>1,2</sup>, Хохлова А.Д.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, volzhaninovenis@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург

Сердечная недостаточность является одной из причин высокой смертности во всем мире. Фундаментальное изучение сократительной функций сердца в норме и при патологии является актуальной задачей трансляционной медицины.

В настоящее время наиболее применяемым и наглядным инструментом для изучения сократительной функции сердца являются кривые зависимости давления в полости желудочка от объема желудочка (петли «давление-объем») [1]. Однако в таких исследованиях на целом сердце возникают проблемы анализа непосредственно механических свойств сократительного компонента сердечной мышцы. Одной из таких проблем является наличие соединительной ткани и эндотелия, которые вызывают существенное изменение вязкоупругих и сократительных свойств сердечной мышцы. Другой значительной проблемой является внутренняя неоднородность механической активности кардиомиоцитов (КМ), которая приводит к неравномерному сокращению различных регионов миокарда. Для изучения внутренних свойств сократительного аппарата представляет интерес зависимость «длина-сила» КМ, свободных от соединительной ткани и эндотелия.

Для изучения данной зависимости было разработано множество методов, таких как метод стеклянных стержней, микропипеток и клеящих веществ, однако, наилучшие результаты показал метод карбоновых волокон (КВ), разработанный Le Guennec и соавторами в конце 1980-х годов [2,3]. Карбоновые волокна способны при помощи электростатических сил образовать прочный контакт с мембраной КМ. Позднее были разработаны экспериментальные установки, способные изучать соотношение длина-сила одиночного КМ с помощью различных модификаций методики КВ, таких как использование жестких фиксирующих край КМ GRC волокон, использование двух гибких КВ, использование методики четырех КВ с жесткой фиксацией края КМ. Для перемещения и контроля положения КВ во всех выше упомянутых экспериментальных установках использовались системы микроманипулирования.

Целью данного исследования является разработка экспериментальной установки для исследования зависимости «длина-сила» КМ на основе цифровой системы микроманипулирования, способной поддерживать любые варианты методики КВ.

Для разрабатываемой экспериментальной установки была выбрана цифровая система микроманипулирования Sensapex (uMr micromanipulation system, Финляндия), имеющая широкий диапазон позиционирования (20 мм), покрывающий экспериментальную ванночку, и нанометровую точность перемещения (5 нм), для прецизионного контроля положения КВ.

Разработанная экспериментальная установка способна работать с тремя уже известными вариантами методики КВ: два КВ, одно подвижно, одно статично; два КВ, оба подвижны; четыре КВ, два подвижны, два статичны, а также с новым режимом, ещё не исследованном: четыре КВ, четыре подвижны. Программное обеспечение управления экспериментальной установкой было написано в среде разработки LabVIEW для каждого из осуществляемых режимов методики КВ.

Были проведены пробные физиологические эксперименты на одиночных КМ крысы линии Вистар в конфигурации двух подвижных КВ. Были получены соотношения «длина-сила» одиночного КМ, сокращавшегося в ауксотоническом режиме при контролируемой преднагрузке. По полученным данным была



построена зависимость «конечно-диастолическая длина - пассивное напряжение», позволяющая оценить жесткость клетки и зависимость «конечно-систолическая длина - общее напряжение», позволяющая оценить сократимость клетки.

Дальнейшая работа над разработанной установкой будет заключаться в создании обратной связи между микроманипуляторами и системой оптического контроля, для реализации сложных режимов сокращения, таких как изометрический, изотонический, рабочий цикл, которые требуют контроля силы и длины, развиваемой КМ. Также при помощи разработанной установки планируется исследование влияний патологических факторов на соотношение «длина-сила» одиночных КМ из различных камер сердца.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МК-949.2019.4.

1. Burkhoff D. Pressure-volume loops in clinical research // Journal of the American College of Cardiology, 2013, 62, P. 1173–1176.
2. Le Guennec J. Y., Peineau N., Argibay J. A., Mongo K. G., Garnier D. A new method of attachment of isolated mammalian ventricular myocytes for tension recording: length dependence of passive and active tension // Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1990, 22, P. 1083–1093.
3. Iribe G. Development in Cell Manipulation Techniques for the Study of Single Cardiomyocyte Mechanics // Biological, Physical and Technical Basics of Cell Engineering, 2018, P.193-207.

## **ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА РАСТЕНИЯ МЕТОДОМ РЕГИСТРАЦИИ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА**

### **ASSESSMENT OF THE IMPACT OF ENVIRONMENTAL POLLUTION ON PLANTS BY THE RELATIVE INDEX OF DELAYED CHLOROPHYLL FLUORESCENCE**

*Григорьев Ю.С., Стравинскене Е.С., Крючкова О.Е., Пахарькова Н.В.*

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, e-mail: gr2897@gmail.com

В биомониторинге загрязнения окружающей среды важная роль принадлежит растениям, поскольку они весьма чувствительны ко многим поллютантам. Воздействие загрязнителей окружающей среды на растения часто сопровождается нарушениями в процессе фотосинтеза. Поэтому фотосинтетическая функция растений является хорошим индикатором проявления действия загрязнения.

Для оперативной оценки состояния фотосинтеза широко используется флуоресценция хлорофилла. В настоящее время для этих целей применяют так называемую быструю флуоресценцию, регистрируемую с помощью РАМ флуориметров. В последние годы нами разработан более чувствительный и быстрый показатель состояния фотосинтетического аппарата растений, основанный на измерении замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла, которая регистрируется в виде затухающего во времени излучения в красной области спектра после вспышек возбуждающего света [1].

Предлагаемый метод заключается в том, что измерение свечения, выполняемое в режиме фосфороскопа, проводится для двух заранее установленных световых условий, условно названных нами «высокий свет» и «низкий свет». На «высоком свету», интенсивность которого достаточна для обеспечения активного фотосинтетического транспорта электронов, в ЗФ доминируют быстрые компоненты затухания, обусловленные образованием электрохимического градиента протонов на мембране тилакоидов. При подавлении электронного транспорта или нарушении целостности мембран хлоропластов в силу невозможности создания протонного градиента интенсивность быстрых компонент, регистрируемых в микро- и миллисекундном диапазоне затухания, многократно снижается. На «низком возбуждающем свету» свечение в основном представлено медленными компонентами затухания ЗФ, величина которых зависит от окислительно-восстановительного состояния первичного акцептора фотосистемы 2 хлоропластов. Поэтому при подавлении транспорта электронов данный акцептор переходит в более восстановленное состояние, в результате чего интенсивность медленных (секундных) компонент затухания ЗФ возрастает в несколько раз. В результате отношение этих двух параметров ЗФ, измеренных в своих индукционных максимумах, снижается в десятки раз при нарушении работы фотосинтетического аппарата растений. Благодаря относительности данного показателя его величина не зависит от формы и размера исследуемого растительного образца.

Для реализации данного метода нами разработан флуориметр Фотон 10 (производитель ООО «СФУ-Система»), который позволяет в автоматическом режиме измерять относительный показатель замедленной флуоресценции хлорофилла (ОП ЗФ) у 24 образцов растений. При этом длительность измерения данного показателя каждой кюветы с суспензией водоросли или высечкой из листа составляет несколько секунд. Одновременно с ОП ЗФ прибор регистрирует переменную часть быстрой флуоресценции этих образцов с помощью дополнительного источника возбуждающего света. Управление флуориметром и обработка данных осуществляется внешним компьютером.

С помощью данного прибора нами была проведена трансплантационная лишеноиндикация загрязнения атмосферы г. Красноярска. Было выявлено, что после трех недель экспозиции талломов нескольких видов лишайников в экологически чистых и промышленных районах города значения ЗФ различалось до 20 раз [2]. Исследование состояния хвои сосны в этих районах показало разницу в значении ОП ЗФ до 5 раз [3].

Разработанный метод показал высокую чувствительность при биотестировании на токсичность природных и сточных вод. В качестве тест-организма была использована культура водоросли *Chlorella vulgaris*. Двукратное снижение значения ОП ЗФ ( $EC_{50}$ ) суспензии клеток водоросли в водных растворах ионов меди, цинка и никеля имело место при концентрации этих тяжелых металлов 0,005; 0,5 и 0,05 мг/л, соответственно.

На основе данного метода нами разработана и аттестована методика биотестирования токсичности природных, сточных вод и отходов по изменению ОП ЗФ водоросли хлорелла, которая допущена для целей государственного экологического контроля в Российской Федерации [4].

1. Григорьев Ю.С., Андреев А.А., Кравчук И.С., Гекк П.И. Способ биотестирования токсичности вод и водных растворов. Патент на изобретение № 2482474. Оpubл. Бюл. изобр. № 14 от 20.05.2013.
2. Григорьев Ю.С., Бучельников М.А. Трансплантационная лишеноиндикация загрязнения воздушной среды на основе замедленной флуоресценции хлорофилла // Экология. 1997. № 6. С. 465-467.
3. Григорьев Ю.С., Бучельников М.А. Биоиндикация загрязнений воздушной среды на основе замедленной флуоресценции хлорофилла листьев деревьев // Экология. 1999. № 4. С.303-305.
4. Григорьев Ю.С., Стравинскене Е.С. Методика измерений относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. ПНД Ф Т 14.1:2:4.16-09 Т 16.1:2.3:3.14-09. Москва. 2009. 43 с.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ РОГОВОГО СЛОЯ КОЖИ МЕТОДОМ МИКРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ В IN VIVO ЭКСПЕРИМЕНТЕ

## DETERMINATION OF THE BARRIER FUNCTION RELATED PARAMETERS OF THE STRATUM CORNEUM USING IN VIVO RAMAN MICROSCOPY

Дарвин М.Е., Шлойзенер И., Ладеманн Ю.

Charité-Universitätsmedizin Berlin, Department of Dermatology, Venerology and Allergology,  
Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany  
E-mail (maxim.darvin@charite.de)

Роговой слой кожи состоит из ороговевших клеток – корнеоцитов, погруженных в внеклеточный липидный матрикс, состоящий из плотно упакованных бислоев липидов (ламелл), является мультифункциональной системой. Структурные элементы рогового слоя – липиды, кератин, вода и молекулы естественного фактора увлажнения (ЕФУ), находятся в морфо-функциональном единстве и участвуют в формировании и поддержании барьерной функции кожи. Несмотря на важность этих компонентов, барьерная функция рогового слоя кожи обеспечивается орторомбической фазой латеральной организации липидов внутри ламелл [1]. Существующие методы измерения состояния барьерной функции кожи *in vivo* ограничиваются косвенными методами, наиболее популярный из которых – измерение трансэпидермальной потери воды – не дает информации о биофизических параметрах, отвечающих за барьерную функцию рогового слоя кожи.

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) широко используется в *in vivo* исследовании кожи человека и спектры КР описывают колебания всех ее компонентов [2]. Основными недостатками использования метода микроскопии/спектроскопии КР на практике являются невысокая чувствительность, ограничение глубины зондирования кожи до  $\approx 50$  мкм [3], перекрытие линий КР и дороговизна приборов. Однако, роговой слой кожи, типичная толщина которого находится в интервале 15–30 мкм, идеально подходит для *in vivo* измерений методом микроскопии КР. Перекрытие линий КР липидов и кератина в широком диапазоне волновых чисел может быть учтено при использовании методик моделирования спектра КР [4] или его декомпозиции [5].

Применение метода микроскопии КР позволило определить профили изменения концентрации компонентов [6], а также впервые получить профили распределения параметров барьерной функции по глубине рогового слоя кожи человека в *in vivo* эксперименте [7]. Отношение интенсивностей линий КР  $I_{1080}/(I_{1130}+I_{1060})$  характеризует *gauche-trans* конформационный порядок в липидах, т.е. степень ламеллярной организации липидов в мембране. Отношение интенсивностей линий КР  $I_{2880}/I_{2850}$  характеризуют отношение орторомбической и гексагональной степени латеральной организации липидов в роговом слое, т.е. является параметром, определяющим барьерную функцию кожи. Показано, что значение степени ламеллярной и латеральной организации липидов неравномерно по глубине рогового слоя. Максимальное значение барьерной функции (преимущество орторомбической организации липидов и *trans* конформеров липидов) достигается на

глубине 20–40% толщины рогового слоя [4]. Процедура декомпозиции линии КР воды в диапазоне волновых чисел  $\approx 3000\text{--}3700\text{ см}^{-1}$  позволила различить состояния подвижности воды в зависимости от силы водородных связей («жестко связанная», «сильно связанная», «слабо связанная» и «несвязанная») и определить профиль распределения силы водородных связей молекул воды по глубине рогового слоя. Показано, что молекулы воды обладают максимальной силой водородных связей на глубине 20–40% толщины рогового слоя [5]. Проведен анализ вторичной и третичной структур кератина, что позволило определить эффективность молекул кератина связывать молекулы воды на разных глубинах рогового слоя. На основании полученных результатов предложена трехслойная модель взаимодействия ЕФУ–вода–кератин в корнеоцитах рогового слоя кожи человека в *in vivo* эксперименте [2].

Разработанная методика, в основе которой лежит анализ спектров КР рогового слоя кожи, измеренного неинвазивно и *in vivo*, является важной в исследовании влияния ксенобиотиков (медицинские или косметические средства наружного применения) на параметры барьерной функции кожи, в частности механизмов увлажнения кожи; а также для мониторинга физиологических процессов, происходящих в роговом слое кожи в норме и при патологии.

1. van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1841: 295-313, 2014.
2. Choe CS, Schleusener J, Lademann J, Darvin ME. *Scientific Reports* 7: 15900, 2017.
3. Darvin ME, Schleusener J, Parenz F, Seidel O, Krafft C, Popp J, Lademann J. *Analyst* 143: 4990-4999, 2018.
4. Choe CS, Lademann J, Darvin ME. *Analyst* 141: 1981-1987, 2016.
5. Choe CS, Lademann J, Darvin ME. *Analyst* 141: 6329-6337, 2016.
6. Darvin ME, Choe CS, Schleusener J, Lademann J. *Biomedical Optics Express* 10: 3092-3103, 2019.
7. Choe CS, Schleusener J, Lademann J, Darvin ME. *Journal of Biophotonics* 11: e201700355, 2018.

## ПОЛНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА НА ОСНОВЕ МАГНЕТИТА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

## COMPREHENSIVE CHARACTERIZATION OF MAGNETITE-BASED COLLOID FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

*Дериглазов В.В., Рыжов В.А., Киселёв И.А., Смирнов О.П., Черненко Ю.П.,  
Марченко Я.Ю.<sup>1</sup>, Яковлева Л.Ю.<sup>1</sup>, Николаев Б.П.<sup>1</sup>, Богачёв Ю.В.<sup>2</sup>*

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина

<sup>1</sup>НИИ Особочистых биопрепаратов, С-Петербург

<sup>2</sup>С-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», С-Петербург

Магнитные наночастицы (МНЧ) магнетита востребованы в биомедицине для диагностики заболеваний в качестве контрастного вещества в магниторезонансной томографии и перспективны для исследования адресной доставки лекарственных препаратов в больные органы, в том числе при онкологических заболеваниях. В ряде случаев применяют водные коллоидные растворы МНЧ. Для стабилизации МНЧ в растворе и для предотвращения их окисления и токсичности их покрывают специальной органической оболочкой. Для производства и использования МНЧ препаратов с требуемыми свойствами необходимо не только контролировать состояние МНЧ в растворе, но и иметь как можно более полные сведения об их магнитных статических и динамических параметрах.

В представленной работе водные коллоидные растворы МНЧ магнетита диаметром 10 нм в оболочке декстрана с концентрациями 2 и 0.02 мМ(Fe)/л исследованы при комнатной температуре с помощью методов нелинейного магнитного отклика на второй гармонике (М2), электронного магнитного резонанса (ЭМР), рентгеновской дифракции (РД), трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и динамического рассеяния света (ДРС) [1]. По данным РД магнетит в МНЧ находится в кристаллическом состоянии, а из данных по ТЭМ и ДРС установлено, что раствор практически целиком состоит из агрегатов, содержащих ~10–100 МНЧ с логнормальным распределением по размерам. Результаты ТЭМ и ДРС оказались в хорошем согласии друг с другом, после того как при обработке данных ДРС была учтена вода, увлекаемая агрегатами при их броуновском движении в растворе. Из данных по М2, обработанных с помощью формализма, основанного на уравнении Фоккера-Планка для кинетики суперпарамагнитных частиц [2,3], определены магнитные статические и динамические параметры, такие как среднее значение и ширина распределения магнитных моментов агрегатов, коэффициент затухания и Неелевское время продольной релаксации намагниченности, средние значения энергии и поля магнитной анизотропии и направление её оси относительно магнитного поля, намагниченность насыщения агрегатов, средний магнитный момент на ион железа и др. В измерительных постоянных полях ~100 Э агрегаты проявляют тенденцию к ориентации вдоль поля вследствие значительной одноосной магнитной анизотропии с энергией порядка комнатной температуры. Небольшой коэффициент затухания ~0.2 указывает на значительное влияние прецессии на релаксацию намагниченности. Обнаружено,

что магнитные моменты МНЧ в агрегатах частично скоррелированы по направлениям вследствие диполь-дипольного взаимодействия. Магнитные корреляции были учтены при обработке М2 данных введением обрезывающей функции для намагниченности. В результате были скорректированы значения магнитных параметров, определён корреляционный радиус, среднее число МНЧ в агрегатах, разделены магнитная (магнетит) и немагнитная (декстран) компоненты коллоидных частиц, а также получены среднее значение и ширина распределения агрегатов по объёмам, которые совпали с данными ТЭМ. Полученная оценка характерной энергии диполь-дипольного взаимодействия МНЧ в агрегатах на порядок превосходит комнатную температуру, что указывает на дипольно-кластерную магнитную структуру агрегатов. В зависимости сигнала ЭМР от магнитного поля обнаружен кроссовер в поле  $\sim 1400$  Э, связанный с разрывом магнитным полем диполь-дипольного взаимодействия между МНЧ в агрегатах и резким изменением динамики намагниченности. Значение поля кроссовера совпало с оценкой из других экспериментальных данных. Отслежена скейлинговая зависимость магнитного момента и намагниченности агрегатов от количества составляющих их МНЧ [4,5] и её нарушение из-за диполь-дипольного взаимодействия.

Результаты работы были получены с использованием суперкомпьютера Санкт-Петербургского политехнического университета. Авторы благодарны его персоналу, а также А.В. Арутюняну и А.М. Ищенко за постоянный интерес и поддержку работы, и И.И. Ларионову за помощь в М2 измерениях.

1. Ryzhov V.A. et al. Comprehensive characterization of magnetite-based colloid for biomedical applications // Appl Phys A. 2019. Vol. 125. P. 322.
2. Titov S.V. et al. Nonlinear magnetization relaxation of superparamagnetic nanoparticles in superimposed ac and dc magnetic bias fields // Phys Rev B. 2010. Vol. 82. P. 100413(R).
3. El Mrabti H. et al. Nonlinear stationary ac response of the magnetization of uniaxial superparamagnetic nanoparticles // J Appl Phys. 2011. Vol. 110. P. 023901.
4. Schaller V. et al. Effective magnetic moment of magnetic multicore nanoparticles // Phys Rev B. 2009. Vol. 80. P. 092406.
5. Ahrentorp F. et al. Effective particle magnetic moment of multi-core particles // J Magn Magn Mater. 2015. Vol. 380. P. 221.

## КОМБИНАЦИЯ АТОМНО-СИЛОВОЙ, ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ И МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОК

### COMBINING ATOMIC FORCE-FLUORESCENCE MICROSCOPY WITH MODELING FOR ANALYZING MECHANICAL PROPERTIES OF LIVING CELLS

*Ефремов Ю.М.<sup>1</sup>, Фролова А.А.<sup>1</sup>, Акованцева А.А.<sup>3</sup>, Котова С.Л.<sup>1,2</sup>, Тимашев П.С.<sup>1,2,3</sup>*

<sup>1</sup>Институт Регенеративной Медицины, Сеченовский Университет, Москва, yu.efremov@gmail.com

<sup>2</sup>Институт химической физики имени Н. Н. Семёнова РАН, Москва

<sup>3</sup>ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

Исследование механических свойств на уровне отдельных клеток, клеточных агрегаций и биологических тканей является активно развивающейся областью благодаря разработке и внедрению новых методов измерений. Полученные данные свидетельствуют о важности механических свойств и взаимодействий при развитии организма, при различных патологиях и в процессах регенерации. Например, низкий модуль Юнга (модуль упругости) – новый недавно обнаруженный маркер многих раковых клеток [1]. Также обнаружена взаимосвязь между механическими свойствами клеток и строением цитоскелета, прежде всего актинового [2]. Актиновый цитоскелет может быть представлен в виде различных структур, например, как подмембранный актиновый кортекс, или как базальные, апикальные и другие виды стресс-фибрилл. Тем не менее, как именно строение актинового цитоскелета и его взаимодействие с другими компонентами клетки определяют ее механические свойства остается неизвестным.

Недавние работы также указывают, что модуль Юнга не может быть эффективно использован как единственный параметр, характеризующий клеточную механику [3–5]. Обнаружено, что более правильное описание должно включать в себя: 1) гетерогенность на уровне клетки – в силу комплексного строения можно различать свойства отдельных областей клетки (тело, ламелла) и органелл (ядро, цитоплазма); 2) вязкоупругость – клетки одновременно ведут себя и как упругие, и как вязкие тела, из-за чего возникает ряд феноменов при описании их поведения во времени, такие как релаксация напряжений и ползучесть; 3) нелинейность – свойства зависят от степени деформации не линейно, а более сложным образом, с упрочнением или размягчением; и 4) анизотропность – свойства зависят от направления деформации, что особенно заметно для клеток, растущих в условиях выделенного направления приложения силы (в анизотропных условиях) – например, клеток кровеносных сосудов. Учет подобных особенностей требует создания соответствующих механических моделей.

Таким образом, в описании механических свойств клетки многое остается неясным. Полное описание требует знания внутренней структуры клетки на нанометровых масштабах, и наличия моделей, способных описать механическое поведение клетки с приемлемой точностью. Оптимальным способом решения этой проблемы является комбинирование таких современных методов как атомно-силовая микроскопия (АСМ), флуоресцентная микроскопия и конечно-элементное моделирование. АСМ позволяет картировать механические свойства поверхности клеток на различных масштабах, от десятков нанометров до десятков микрон и получать данные о вязкоупругих свойствах. Последние достижения флуоресцентной микроскопии – конфокальная микроскопия с вращающимся диском Нипкова, прижизненные флуоресцентные красители для цитоскелета – позволяют проводить исследование различных внутриклеточных компонентов с высоким пространственным и временным разрешением в живых клетках. Конечно-элементное моделирование на основе данных АСМ (вязкоупругие свойства поверхности) и флуоресцентной микроскопии (геометрия клетки, расположение элементов цитоскелета и других органелл) позволяет создать приближенные к реальности модели клетки. На основе таких моделей возможно определить, как именно строение цитоскелета и внутриклеточных органелл ведет к наблюдаемым механическим свойствам и сделать дальнейшие предсказания о поведении клетки в различных условиях.

В данной работе продемонстрированы конкретные примеры использования описанных выше подходов. Для нормальных (фибробласты NIH 3T3) и раковых клеток (MDA-MB-231) показана роль особого вида стресс-фибрилл, перинуклеарного актинового кэпа, в определении вязкоупругих и анизотропных механических свойств. Кроме этого, показано как комбинация трех методов позволяет получить информацию о свойствах внутриклеточных органелл (ядро, ядрышки), не доступную при использовании методов по отдельности.

Исследование поддержано программой поддержки ведущих университетов Российской Федерации "5-100" и грантами РФФИ 18-29-06059 и 18-33-00645.

1. Lekka M. et al. Cancer cell recognition–Mechanical phenotype // *Micron*. 2012. Vol. 43. P. 1259–1266.
2. Efremov Y.M. et al. Distinct impact of targeted actin cytoskeleton reorganization on mechanical properties of normal and malignant cells // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2015. Vol. 1853, № 11. P. 3117–3125.
3. Efremov Y.M. et al. Measuring nanoscale viscoelastic parameters of cells directly from AFM force-displacement curves // *Sci. Rep. Springer US*, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1541.
4. Efremov Y.M. et al. Anisotropy vs isotropy in living cell indentation with AFM // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 5757.
5. Efremov Y.M. et al. Mapping heterogeneity of cellular mechanics by multi-harmonic atomic force microscopy // *Nat. Protoc. Springer US*, 2018. Vol. 13, № 10. P. 2200–2216.

## **НОВЫЙ МЕТОД КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОНКОТЕРАПИИ – ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МИКРОВОЛНОВАЯ ТЕРМОГРАФИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

### **A NEW METHOD FOR MONITORING THE EFFECTIVENESS OF ANTITUMOR DRUG - FUNCTIONAL MICROWAVE THERMOGRAPHY (EXPERIMENTAL STUDY)**

*Зиновьев С.В.*

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, svz321@mail.ru

В настоящее время методы экспресс-контроля эффективности лечения злокачественных новообразований развивается на основе идеологии молекулярной биологии, когда быстрые изменения экспрессии пептидных онкомаркёров регистрируются с помощью молекулярных биочипов, оптических и магнитно-резонансных методов. Фактически отслеживаются изменения происходящие на генетическом и эпигенетическом уровне в опухолевых клетках. Однако опухоль представляет собой сложное динамическое морфо-физиологическое образование, прогноз развития которого можно сделать только учитывая взаимоотношения всех его составляющих.

Информацию для решения данной задачи можно получить из анализа динамики интегральной температуры в зоне опухолевого роста, отражающей соотношение процессов термпродукции и термодиссипации и определяемой путем локальной регистрации электромагнитного микроволнового широкополосного излучения на основе принципов контактной радиотермометрии. Данный физический параметр может служить диагностическим маркёром развития как опухолевого процесса, так и для предсказания эффективности его терапевтической коррекции. Есть основания полагать, что в определённых временных точках развития опухоли происходят кооперативные процессы изменения метаболизма, пролиферации, деструкции клеток (по типу некроза или апоптоза), изменения характера кровоснабжения опухоли и её взаимодействия с иммунной системой организма.

Применение методов пассивного и активного радиозондирования в сочетании с методологией нелинейной динамики при анализе временных рядов регистрируемого параметра, позволяет определить эти

«триггерные» точки, в которых опухолевый процесс становится максимально чувствительным к терапевтическим воздействиям. Ряд технологических и инженерно-технических особенностей регистрации и анализа сигнала (широкополосного микроволнового собственного излучения биообъекта), даёт возможность получить новую информацию о процессах метаболизма, кровоснабжения (микроциркуляции) и клеточной кинетики злокачественных новообразований.

Нами разработаны основы технологии функциональной микроволновой термографии позволяющей уже на этапе доклинических исследований, на моделях *in vivo*, оценить эффективность взаимодействия с сформировавшейся злокачественной опухолью фармакологических агентов и (или) физических факторов с момента их введения в организм лабораторных животных. Критерии такой эффективности порождаются анализом флуктуационных характеристик тепловых процессов, происходящих в нормальных и патологически изменённых тканях организма лабораторных животных и человека.

Анализ первичных данных (получаемых нами в виде нестационарных временных рядов определённой длительности) с применением методологического аппарата нелинейной динамики основан на следующих теоретических предположениях. Воздействие на опухоль (прямое или опосредованное) приводит к изменению микроциркуляции в ткани опухоли и соответственно кинетики транспортных процессов; изменению метаболических и биоэнергетических процессов в опухолевых клетках; к изменению клеточной кинетики-процессов пролиферации, некроза и апоптоза клеток опухоли. Все три типа процессов сопровождаются изменением соотношения термогенерации и термодиссипации на молекулярном, клеточном и тканевом уровне. Все три типа процессов имеют различные собственные характерные времена. Как будет изменяться, при этом, например, профиль спектра мощности внутритканевой температуры? Если в спектре будут доминировать высокочастотные флуктуации с низкой амплитудой- преимущественное действие агента происходит на биоэнергетику клетки. Если среднечастотные высокоамплитудные- действующий агент изменяет динамику кровотока. Если мы наблюдаем превалирование низкочастотных флуктуаций с малой амплитудой- изменяется клеточная кинетика, причём имеют место, скорее всего, кооперативные процессы. Кроме того, существует ряд других математических характеристик временных рядов регистрируемого нами параметра, количественные изменения которых хорошо коррелируют с изменением функционального состояния злокачественного новообразования.

Приводятся конкретные примеры реализации данной технологии в экспериментальных онкологических исследованиях. Обсуждаются возможности и ограничения применения технологии, перспективы её использования в онкологической клинике.

---

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГАЗОЖИДКОСТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ И ФЛАВОНОИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

### THE USE OF GAS-LIQUID TECHNOLOGIES TO EXTRACT CAROTENOIDS AND FLAVONOIDS FROM PLANT MATERIALS

*Касьянов Г.И., Занин Д.Е., Магомедов А.М., Медведев А.М.*

Кубанский государственный технологический университет, г. Краснодар

Одним из главных приоритетов Стратегии здорового питания населения Российской Федерации на период до 2025 года, является разработка новых конкурентоспособных импортозамещающих натуральных пищевых добавок из отечественного растительного сырья. Выполнено исследование по разработке технологических режимов извлечения каротиноидов и флавоноидов из растительного сырья. В ходе выполнения работы выполнен патентный поиск по проблеме «Совершенствование технологии извлечения каротиноидов и флавоноидов из растительного сырья» и «Установки для получения CO<sub>2</sub>-экстрактов»; отправлена заявка на предполагаемое изобретение. Проанализировано содержание каротиноидов и флавоноидов в растительном сырье, исследованы способы подготовки сырья к экстракции, особенности извлечения флавоноидов из растительного сырья на универсальном экстракционном модуле, с использованием в качестве экстрагента диоксида углерода в различных фазовых состояниях. Приведены основные параметры процесса до- и сверхкритической экстракции, качественные и количественные показатели CO<sub>2</sub>-экстрактивных веществ. Разработаны режимы экстракции каротиноидов в докритическом режиме при давлении 6,4-7,0 МПа и температуре 18-25°C и выделения флавоноидов из растительного сырья сверхкритическим диоксидом углерода в присутствии соразтворителя при давлении 15-40,0 МПа и температуре 30-45°C.

За счет развития высоких технологий на универсальном экстракционном модуле КубГТУ, при воздействии на процесс извлечения экстрактов ультразвука (20-22 кГц) и ЭМП низкой частоты (25-100 Гц), достигнута высокая концентрация основного компонента. Выполненное исследование позволило повысить выход суммы каротиноидов из каротинсодержащего сырья, на 22 % превышающий выход компонентов по традиционному способу. Выход суммы флавоноидов из исследуемого сырья выше нормативного на 26-28 %. Установлена продолжительность срока хранения CO<sub>2</sub>-экстрактов до 5 лет, по сравнению с 2 годами по

существующей нормативной документации. Предложен эксклюзивный способ препаративного получения нативных пищевых добавок, с преобладанием каротиноидов и флавоноидов, путем ступенчатого повышения давления и температуры в экстракторе. Выход CO<sub>2</sub>-экстрактов из воздушно-сухого сырья составил от 1,3 до 30 %, плотность полученных экстрактов находилась в пределах от 0,8500 до 1,1200.

За счет использования инновационных технологических приемов на универсальном экстракционном модуле, путем воздействия на процесс извлечения экстрактов электрофизических факторов, достигнут более высокий выход позитивных экстрактивных веществ. Разрабатываемые режимы обеспечивают возможность получения экстрактов с повышенным содержанием флавоноидов из растительного сырья под избыточным давлением до 40 МПа и длительностью экспозиции от 60 до 180 мин.

В универсальном экстракционном модуле использованы отечественные комплектующие, позволяющие обойтись без импортных поставок элементов оборудования, и аннулировать заказы на каротин и флавоноидсодержащие пищевые добавки. Предложена нелокальная по времени регрессионная модель динамики обезвоживания растительного сырья перед экстракцией, позволяющая учесть предысторию процесса и его влияние на текущее состояние сырья. Применение интегралов с «кратковременной памятью» даёт возможность корректировать существующие ограничения традиционно применяемого регрессионного анализа, которым в научно-технической литературе не уделяется достаточного внимания: учитываются только количественные связи наблюдаемых в эксперименте величин, вместо описания и построения моделей биохимической и физической сути экстракционных процессов, а также отсутствие учёта влияния предыстории процесса на его текущее состояние. В ходе выполненных исследований установлены рабочие режимы процесса извлечения флавоноидов из сырья с помощью диоксида углерода в сверхкритическом состоянии в присутствии соразтворителя – этилового спирта. Значимыми параметрами процесса является температура и зависящее от нее давление паров растворителя в экстракционном контуре. Установлены режимы экстракции: содержание соразтворителя (96 % этанола) – 5 %, давление в экстракционном аппарате от 35 до 40 МПа, температура от 45 до 55 °С и длительность процесса от 120 до 180 мин. Регулирование этих параметров позволяет изменять выход и состав экстрагируемых флавоноидов.

Разработка этапа щадящей сушки сырья, позволило сохранить в полной мере исходное состояние каротиноидов и флавоноидов и получить на их основе пищевые добавки высокого качества.

Таким образом, полное освоение этапов проекта позволит перейти на выпуск отечественных натуральных пищевых добавок с повышенным содержанием каротиноидов и флавоноидов. Внедрение результатов данных исследований будет способствовать успешной реализации, одним из главных приоритетов которой является разработка новых конкурентоспособных импортозамещающих натуральных пищевых добавок из отечественного растительного сырья.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» по программе Старт-2.

## МОДИФИКАЦИЯ MALDI-МИШЕНИ МЕТАЛЛ-АФФИННЫМИ СОРБЕНТАМИ В ПРОЦЕССЕ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ В НОРМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

### MODIFICATION OF MALDI TARGET PLATE BY METAL OXIDE BY MEANS OF ELECTROSPRAY

*Кельцьева О.А.<sup>1,2</sup>, Мурадымов М.З.<sup>1</sup>, Подольская Е.П.<sup>2,1</sup>, Краснов Н.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург  
keltcieva@gmail.com

<sup>2</sup>Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

При решении задач определения ксенобиотиков (отравляющие вещества, лекарственные препараты и тд) особое внимание уделяют высокоспецифичным и высокоселективным методам пробоподготовки для выделения органических соединений из биологических сред и объектов окружающей среды. В последнее время создаются альтернативы к трудоемкой и дорогой пробоподготовке биообразцов, направленной на концентрирование аналита перед анализом и удаление примесей. Так, предложены подходы позволяющие проводить пробоподготовку некоторых образцов непосредственно на поверхности стальной мишени для МАЛДИ-масс-спектрометрии. В первую очередь сюда относят аффинное концентрирование аналитов для целей фосфопротеомики и аддуктомики.

Поверхность мишени МАЛДИ модифицируют различными методами, получая активную поверхность. Способы модификации поверхности весьма разнообразны, а в основу активной поверхности могут входить и металл-аффинные сорбенты. Так в работе [0] использовали реактивный метод осаждения, заключающийся в электрораспылении раствора, содержащего 70% zirconium(IV)-n-proroxide на поверхность мишени, обработанную кислородной плазмой, процесс занимал от 1,5 до 4 часов. Зачастую поверхность мишени

модифицировали частицами оксидов, закрепляя их при помощи полимеров [0] или нагрева [0]. Также был предложен метод получения одноразовых мишеней из алюминиевой фольги, на которую наночастицы диоксида титана наносились с помощью трафаретной печати с последующим запеканием [0].

В нашей работе предложен метод модифицирования поверхности МАЛДИ-мишени металл-аффинными сорбентами в ходе электрораспыления в нормальных условиях, не требующий применения высоких температур или полимеров.

В источнике ионов с динамическим делением потока жидкости при нормальных условиях проводили электрораспыление жидкости с введенными наночастицами металл-аффинного сорбента на основе оксида металла. Из вершины мениска потока коллоидного раствора на поверхность мишени происходит полевая десорбция заряженных наночастиц в сильном постоянном электрическом поле. Таким образом на пятне мишени формируется относительно тонкий слой наночастиц, устойчивый к растворителям.

Предложенным способом провели модификацию поверхности мишени металл-аффинными сорбентами на основе оксида железа (III) и оксида меди (II). Пробоподготовка образца включала следующие стадии: капля образца наносится на пятно, выдерживается 15 минут; затем каплю убирают, проводят отмывку поверхности; на пятно наносят каплю МАЛДИ матрицы. После высыхания пятен мишень загружают в масс-спектрометр и с поверхности пятен записывают масс-спектр. На модифицированной частицами оксида железа мишени провели металл-аффинное обогащение образца фосфорилированного пептида с аминокислотной последовательностью SSNGHV(pY)EKLSI из образца триптического гидролизата глобина человека. Водный раствор пептида (100 мкг/мл) смешивали с раствором гидролизата белка (концентрация глобина до триптического гидролиза составляла 1 мг/мл) в соотношении 1:100. Показано, что после металл-аффинного анализа в спектрах надежно детектируется и идентифицируется сигнал, соответствующий протонированной форме пептида SSNGHV(pY)EKLSI (m/z 1500). На модифицированной частицами оксида меди была проведена специфичная экстракция аддуктов глобина человека с метаболитами диклофенака. После металл-аффинного анализа в спектрах детектируются и идентифицируются сигналы, соответствующие аддуктам пептидов глобина человека с метаболитом диклофенака. При этом при удалении супернатанта и на стадии отмывки поверхности модифицированного пятна происходит удаление примесей и нецелевых соединений, достигается эффект концентрирования и повышения чувствительности детекции.

Таким образом данный метод позволяет проводить эффективную пробоподготовку при анализе водорастворимых веществ, обладающих активными функциональными группами.

Работы выполнены при поддержке ООО «Девайс Консалтинг», Санкт-Петербург.

1. Blacken GR, Volný M, Vaisar T, Sadílek M, Tureček F. In situ enrichment of phosphopeptides on MALDI plates functionalized by reactive landing of zirconium(IV)-n-propoxide ions. *Anal Chem.* 2017;79(14):5449–5456
2. Chen CJ, Lai CC, Tseng MC, et al. A novel titanium dioxide-polydimethylsiloxane plate for phosphopeptide enrichment and mass spectrometry analysis. *Anal Chim Acta.* 2014;812:105-113. doi: 10.1016/j.aca.2014.01.010
3. Krásný L, Pompach P, Strohal M. In-situ enrichment of phosphopeptides on MALDI plates modified by ambient ion landing. *J Mass Spectrom.* 2012;47(10):1294-1302. doi:10.1002/jms.3081
4. Bi H, Qiao L, Busnel J-M, Devaud V, Liu B, Girault HH. TiO<sub>2</sub> printed aluminum foil: single-use film for a laser desorption/ionization target plate. *Anal. Chem.* 2009;81(3):1177–1183. doi: 10.1021/ac8024448

## РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКИЕ СТАНЦИИ ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ SAXS/WAXS ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОСИСТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

### X-RAY STATIONS FOR STRUCTURAL SAXS/WAXS STUDIES OF BIOLOGICAL NANOSYSTEMS BY USING SYNCHROTRON RADIATION

**Корнеев В.Н., Аульченко В.М.<sup>1</sup>, Забелин А.В.<sup>2</sup>, Ланина Н.Ф.<sup>3</sup>, Шлектарёв В.А.<sup>3</sup>, Вазина А.А.<sup>3</sup>**

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, kvn\_40@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБУН Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского Отделения РАН, Новосибирск

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

<sup>3</sup>ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Представлены два направления использования синхротронного излучения (СИ) для решения задач структурной биологии тканей: разработки инструментального обеспечения и, во-вторых, развитие методов рентгеновской дифракции под большими (WAXS) и малыми (SAXS) углами. Рентгенографические станции создавались на рабочих каналах накопителей ВЭПП-3, ВЭПП-4 (Новосибирск) и Сибирь-2 (Москва) [1].

На рабочих каналах источников СИ созданы рентгеновские станции на основе методов монокроматической ( $\lambda = \text{const}$ ) и энергетической ( $\Theta = \text{const}$ ) дифрактометрии. В системе формирования пучка СИ для метода  $\lambda = \text{const}$  вначале пучок коллимируется до размера входных апертур рентгенооптических элементов. Далее обеспечивается монокроматизация потока и его коллимация в меридиональной и сагиттальной



плоскостях. Полученная дифракционная картина представляет собой распределение интенсивности как функции угла рассеяния. В устройстве контроля за субклеточными структурами формируется канал видимого диапазона с лазерным дифрактометром. Для метода  $\Theta = \text{const}$  обеспечивается коллимация полихроматического потока с заданной расходимостью, размерами и ориентацией. Дифракционная картина представляет распределение интенсивности как функции длины волны при фиксированном угле рассеяния ( $\Theta$ ).

Сформированный пучок СИ попадает на объект исследования, где дифрагирует на его структуре. Рентгенограмма в плоскости изображения источника СИ регистрируется системой, построенной на основе позиционно-чувствительного ( $\lambda = \text{const}$ ) или полупроводникового ( $\Theta = \text{const}$ ) детекторов. Перед детектором устанавливается или ловушка пучка ( $\lambda = \text{const}$ ), или приемная щель ( $\Theta = \text{const}$ ). Полученная информация хранится и обрабатывается соответствующей системой с дистанционным управлением настройкой комплекса.

С использованием созданных станций проведены рентгендифракционные исследования структурной организации биологических тканей человека и животных в различных физиологических состояниях [2]. При исследовании структуры и структурной динамики поперечнополосатой скелетной мышцы зарегистрировано короткоживущее (около 20 мс) состояние структуры, сформированной взаимодействием миофибрилл и актиновых нитей; выдвинута оригинальная гипотеза механизма генерации силы на основе принципа динамического сопряжения разноразмерных наноструктур с несоизмеримыми периодами. Исследованы трансформированные эпителиальные ткани человека на различных стадиях патологического процесса. Особое внимание уделялось анализу опухолевой ткани молочной железы и продуктам эпителиальной ткани – ткани волоса, как маркеру, отслеживающему эндогенное и экзогенное воздействия. Характерными рефлексами являются: кольцевой рефлекс  $\sim 4,5$  нм; меридиональный рефлекс  $\sim 6,7$  нм и экваториальный рефлекс  $\sim 9$  нм. Анализ рентгенограмм от различных образцов слизи и биологических тканей показал, что период идентичности  $4.65(\pm 0.15)$  нм является наноструктурным инвариантом гигантских протеогликановых молекул как слизи, так и межклеточного матрикса тканей. Проведены исследования образцов природного шелка, полученных из шелкопрядов *Antheraea mylitta* и *Bombix mori*, а также различных шелковых наноконструкций. На рентгенограммах скефолдов из шелкопряда *A. mylitta* зарегистрирована серия острых интенсивных дебаевских колец с периодами 4.1, 2.05 и 1.37 нм, которые локализованы в позиционном отношении 3:2:1, что характерно для линейной периодичности цепных молекул. Рентгенограмма аналогичных скефолдов из *B. mori* демонстрирует гораздо больше дебаевских колец, которые можно сгруппировать в две серии с линейной периодичностью: 3.8, 1.9, 1.3 нм и 3.0, 1.5, 1.0 нм, и атрибутировать к двум компонентам цепных молекул, формирующих 3D конструкцию скефолда. Исследовался структурный механизм модификационной адаптации различных биологических тканей под синергическим воздействием различных параметров высокочастотной электрохирургической сварки (ВЧ-сварки). После ВЧ-воздействия на ткань кишки и кокона шелка зарегистрировано существенное изменение дифракционной картины: рентгенограмма сварного шва в области малых углов буквально «набита» острыми дифракционными кольцами, зарегистрированы четкие одиночные дебаевские рефлексы (3.7, 1.35 нм); можно выделить и серию рефлексов: 4.65, 2.32, 1.55 нм, которые расположены с позиционными отношениями 3:2:1, что характерно для линейной периодичности с основным периодом 4.65 нм.

1. Korneev V.N. et al. The Role of Instrumental-methodical Developments with the Use of Synchrotron Radiation for Researching the Transformation of Nanostructural Parametres in Biological Objects. // *Advances in Biosensors and Bioelectronics (ABB)*. 2013. Vol. 2. Is. 4. P. 65-74.

2. Vazina A.A. et al. Nanostructural Mechanism of Modifying Adaptation of Proteoglycan Systems of Biological Tissues and Mucus. // *Crystallography Reports*. 2018. Vol. 63. No. 7. P. 1063–1070. ISSN 1063-7745.

## РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ПУТЕМ ИХ АДСОРБЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА

### DEVELOPMENT OF HETEROGENEOUS BIOCATALYSTS BASED ON CYSTEINE PROTEASES BY THEIR ADSORPTION IMMOBILIZATION ON THE CHITOSAN MATRIX

Королева В.А., Ольшанникова С.С., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж, koroleva\_victoria@bk.ru

Исследования в области получения высокостабильных гетерогенных препаратов на основе иммобилизованных ферментов приобретают все большую актуальность. С помощью иммобилизации энзимов на нерастворимых носителях можно решить ряд важных задач для медицины: 1) получение препаратов пролонгированного действия; 2) возможность адресной доставки вещества и решение проблемы его диффузии в организме, 3) направленное регулирование оптимумов функционирования препарата (температурный оптимум, оптимум pH). Иммобилизация может приводить к жесткой фиксации пространственной структуры молекулы фермента и ее конформационным изменениям, что обычно вызывает частичную или полную потерю

каталитической активности энзима. Поэтому необходимо продолжать поиск путей регулирования физико-химических, кинетических и структурно-функциональных характеристик ферментов и методов их стабилизации. Цель исследования состояла в разработке методики иммобилизации цистеиновых протеаз (фицина, папаина, бромелина) на матрице кислоторастворимых хитозанов.

В качестве объектов исследования были выбраны фицин (КФ 3.4.22.3), папаин (КФ 3.4.22.2), бромелин (КФ 3.4.22.4) (Sigma), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma), носителями для иммобилизации – матрица кислоторастворимого среднемолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов, синтезированных ЗАО «Биопрогресс». Иммобилизацию протеаз осуществляли адсорбционным методом.

Оптимальное соотношение содержания белка (мг на г носителя), общей активности (в ед на мл раствора) и удельной активности (в ед на мг белка) выявлено:

- 1) при иммобилизации фицина на матрице среднемолекулярного хитозана при использовании глицинового буфера с рН 10.0 и на матрице высокомолекулярного хитозана при применении глицинового буфера с рН 8.6;
- 2) при сорбции папаина на матрице среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов при использовании глицинового буфера с рН 9.0 и рН 8.6-10.5 соответственно;
- 3) при иммобилизации бромелина на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов при использовании трис-глицинового буфера с рН 9.0 и 8.5 соответственно.

Исследованы физико-химические и кинетические характеристики фицина, папаина и бромелина в нативном и иммобилизованном состояниях. Установлено, что растворимый фицин активен в диапазоне температур от 37 до 60 °С, при 70 °С он полностью инактивирован, в то время как фермент, сорбированный на обоих видах хитозана, сохраняет порядка 50 % активности. Нативный фицин при значении рН 9.0 практически полностью теряет свою каталитическую способность; после иммобилизации на высокомолекулярном хитозане энзимный препарат сохраняет 50 % активности от максимальной, а сорбированный на среднемолекулярном хитозане биокатализатор снижает свою активность на 20 %. Сорбция фицина приводит к снижению значений  $V_{max}$  и некоторому уменьшению степени сродства фермента к субстрату.

Диапазон рабочих температур для растворимого и иммобилизованного папаина находится между 50 и 70 °С, при 80 °С нативный энзим теряет свою активность на 32 %, а сорбированный на матрице хитозана биокатализатор сохраняет более 80 % своей каталитической способности. Иммобилизация папаина не приводит к сдвигу области рабочих значений рН среды (нативный и сорбированный ферменты активны в диапазоне рН от 5.8 до 9.0). Адсорбционная иммобилизация папаина на кислоторастворимых хитозанах сопровождается снижением значений  $V_{max}$ .

Нативный и иммобилизованный бромелин проявляет свою активность при 50-70 °С, при 80 °С каталитическая способность растворимого энзима снижается в 3 раза, для сорбированного фермента такого эффекта не наблюдается. Растворимый бромелин полностью инактивирован при рН 9.0, в то время как иммобилизованный на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах энзим активен на 53 и 63 % соответственно. Адсорбция бромелина на нерастворимом носителе приводит к снижению значений  $V_{max}$  и увеличению степени сродства фермента к азоказеину.

Следующим шагом являлось изучение стабильности при хранении препаратов фицина, папаина и бромелина, свободных и иммобилизованных на матрицах кислоторастворимых среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов. Установлено, что нативные фицин, папаин и бромелин менее стабильны по сравнению с их сорбированной формой: активность иммобилизованных ферментов в 5 раз выше после 7 дней хранения при 37 °С.

## РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ ТОПЛИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ НА ОСНОВЕ НЕИНВАЗИВНЫХ ЭЛЕКТРОДНЫХ СИСТЕМ

### PLANT-MICROBIAL FUEL CELLS BASED ON NON-INVASIVE ELECTRODE SYSTEMS

*Кулешова Т.Э., Иванова А.Г.<sup>1</sup>, Кручинина И.Ю.<sup>1</sup>, Шеина И.Ю., Удалова О.Р.<sup>2</sup>, Жестков А.С.<sup>2</sup>, Галушко А.С.<sup>2</sup>, Панова Г.Г.<sup>2</sup>, Галль Н.Р*

ФГБУН Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, e-mail: www.piter.ru@bk.ru

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт химии силикатов РАН», Санкт-Петербург, e-mail: agp-13@inbox.ru

<sup>2</sup>ФГБНУ «Агрофизический научно-исследовательский институт», Санкт-Петербург, e-mail: gaiane@inbox.ru

Растительно-микробный топливный элемент (РМТЭ) – технология производства электроэнергии с помощью комбинации высших растений и микробного топливного элемента. Выработка электричества осуществляется за счет электрических свойств растений и активизации микробиологических окислительных процессов в ризосферной зоне. Образующиеся в процессе растительного метаболизма и фотосинтетических реакций органические вещества – ризодепозиты выводятся через корни в окружающую среду, насыщенную бактериями, которые, в свою очередь, расщепляют субстрат, выделяя углекислый газ и высвобождая протоны и электроны. Теоретически, максимальная

выработка электроэнергии составляет 1,6-3,2 Вт на м<sup>2</sup> площади роста растений в естественных условиях [1]. Максимально полученное значение напряжения 700 мВ [2], максимальный ток ~ 105 мА/м<sup>2</sup> [3].

Цель работы заключалась в разработке и создании оптимальной конструкции ячейки для РМТЭ, позволяющей изучить влияние конфигурации и материала электродных систем на величины генерируемых в системе корнеобитаемая среда-растение биоэлектрических потенциалов (БЭП), на физиологическое состояние растительного организма в зависимости от факторов внешней среды: минерального питания, светового режима, глубины почвенного слоя.

Разработанный нами неинвазивный метод автоматической регистрации биоэлектрических потенциалов [4] пригоден как для отслеживания состояний растительных организмов и записи электрофитограмм, так и для съема генерируемых биотоков.

По результатам мониторинга изменений БЭП в корнеобитаемой почве в зависимости от внешних условий: а) предложена модель, описывающая эффекты, протекающие в системе при водodefицитном режиме и поливе; б) определено изменение БЭП в зависимости от глубины почвы, по которому можно судить о развитии корневой системы; в) выявлена корреляция динамики БЭП со световым режимом и, очевидно, с зависимой от последнего активностью растения в отношении усвоения воды и питательных веществ.

Показана возможность использования разработанной технологии измерения БЭП для создания длительно работающих растительно-микробных топливных элементов, основанных на применении электрической активности растений в качестве электродвижущей силы. При выборе конфигурации РМТЭ – расположения и материалов электродных систем, субстрата для растений за основу нами была взята система выращивания растений на тонкослойном и малообъемном аналоге почв – панопоника [5]. На дно емкости объемом 0,0023 м<sup>2</sup> помещен анод, сверху установлена подставка, покрытая пористой тонкослойной корнеобитаемой средой, поднимающей питательный раствор до растения за счет капиллярного эффекта, на подставке размещен катод, который покрывается малообъемным аналогом почвы и высаживаются семена. Максимально полученное значение тока в прототипах РМТЭ составило 83 нА на исследуемую емкость на 25 день роста или 36 мА на м<sup>2</sup>, среднее значение тока варьировало в пределах 50-65 нА. Наилучшим вариантом для использования и в качестве анода, и в качестве катода для РМТЭ на примере салата при выращивании его на питательном растворе, является графитовый войлок. Внесение микроорганизмов в корнеобитаемую среду не изменило порядок величины генерируемого в системе тока, но при этом его значения не зависели от светового режима.

Таким образом, подобраны оптимальные конфигурации установок по оценке БЭП в почве и почвозаменителе в зависимости от вида растительной культуры, развитости корневой системы и условий выращивания. Выбранные электродные материалы характеризуются высокой электропроводностью, химической стабильностью, биосовместимостью и не влияют на жизнедеятельность растений. Прототип РМТЭ устойчив и обеспечивают постоянство значений в течение 24 часов в сутки. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости продолжения исследований по созданию и совершенствованию РМТЭ для будущего использования в системах круглогодичного культивирования растений с целью частичной компенсации затрат электроэнергии на производство растительной продукции.

1. D.P. Strik et al. Microbial solar cells: applying photosynthetic and electrochemically active organisms // Trends Biotechnol. 2011. Vol. 29. № 1. P. 41-49.
2. Moqsud M. A. et al. Compost in plant microbial fuel cell for bioelectricity generation // Waste management. 2015. Vol. 36. P. 63-69.
3. Lu L., Xing D., Ren Z. J. Microbial community structure accompanied with electricity production in a constructed wetland plant microbial fuel cell // Bioresource technology. 2015. Vol. 195. P. 115-121.
4. Кулешова Т.Э., Бушлякова А.В., Галль Н.Р. Неинвазивное измерение биоэлектрических потенциалов растений // Письма в ЖТФ. 2019. Т. 45. № 5. С. 6-8.
5. Панова Г.Г., Черноусов И.Н., Удалова О.Р., Александров А.В., Карманов И.В., Аникина Л.М., Судаков В.Л., Якушев В.П. Научно-технические основы круглогодичного получения высоких урожаев качественной растительной продукции при искусственном освещении // Доклады РАСХН, 2015. № 4. С. 17-21.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ БЛИЖНЕПОЛЬНОГО РЕЗОНАНСНОГО СВЧ-ЗОНДИРОВАНИЯ

### STUDY OF DIELECTRIC PROPERTIES OF HUMAN AND ANIMALS TISSUES WITH TECHNOLOGY OF NEAR-FIELD RESONANCE MICROWAVE SENSING

***Мартушевич А.К., Галка А.Г., Краснова С.Ю., Гольгина Е.С., Епишкина А.А.***

Университетская клиника ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород

Работы по изучению электропроводности тканей, в том числе кожи, впервые появились около 40 лет назад [5]. С этого времени количество публикаций, несмотря на содержащиеся в них интересные результаты,

сравнительно мало [2, 3]. Кожа, несмотря на поверхностную локализацию, являясь затруднительным объектом для визуализации, длительное время оставалась лишь предметом гистологического исследования [4]. Существующие методы (например, оптическая когерентная томография, ИК-термография и др.) позволяют изучить лишь поверхность и ближайшие поверхностные структуры кожи [1, 2, 4]. Более обширный методический аппарат имеется для мониторинга сосудов кожи, тогда как глубинная структура последней затруднительна для неинвазивного изучения. В этом плане привлекают внимание работы по профилированию кожи по ее диэлектрическим свойствам [2, 3, 5], однако эти сведения единичны и отрывочны. Это, в частности, обусловлено отсутствием доступных инструментов для оценки диэлектрических характеристик биотканей.

*Цель исследования:* изучение возможностей ближнепольного СВЧ-зондирования в оценке структуры кожи человека и крыс.

*Материал и методы исследования.* Исследование, включавшее однократное СВЧ-зондирования, выполнено у 20 практически здоровых людей и 20 здоровых половозрелых крыс-самцов линии Вистар. Ближнепольное СВЧ-зондирование тканей производили с использованием специальной установки, созданной в Институте прикладной физики РАН (Нижний Новгород), а также специализированного программного обеспечения, сопрягающего установку с ПК и позволяющего производить расчет действительной части диэлектрической проницаемости [3]. Диэлектрические характеристики кожи оценивали на глубинах от 2 до 5 мм с помощью серии зондов. Измерение у всех обследуемых людей проводили на предплечье в единой точке, а у животных – в одной точке, локализованной в средней части спины, на предварительно эпилированной поверхности. Полученные данные были обработаны в программном пакете Statistica 6.1.

*Результаты.* Установлено, что действительная часть диэлектрической проницаемости кожи людей монотонно нарастает с увеличением глубины зондирования, демонстрируя тенденцию к нарастанию в 1,74 раза при сопоставлении значений параметра, полученных на глубинах 2 и 5 мм ( $p < 0,05$ ). Это обусловлено тем обстоятельством, что рассматриваемая величина кумулятивна, и каждое последующее значение включает предыдущее, а также вклад, вносимый тканями, находящимися от предшествующего до текущего уровня зондирования. Анализ диэлектрических свойств кожи крыс позволил установить, проводимость последней значительно, практически на порядок ниже, чем у людей, однако характер зависимости рассмотренного параметра сохраняется, демонстрируя монотонное повышение значения с максимумом на глубине 5 мм (рис. 2). При этом уровень изучаемого параметра на минимальной и максимальной глубинах различается в 2,55 раза ( $p < 0,01$ ), что связано с оценкой более глубоких структур у крыс при проведении СВЧ-профилирования одним датчиком, осуществляющим зондирование на глубине 5 мм.

*Заключение.* Установлена картина глубинного распределения диэлектрической проницаемости кожи здоровых людей и животных (крыс линии Вистар), которая может служить физиологическим СВЧ-паттерном для исследования подповерхностных тканей, в том числе различных слоев кожи и ближайших подкожных структур. Показано, что действительная часть диэлектрической проницаемости на всех исследованных глубинах у человека на порядок выше, чем у крыс, и монотонно возрастает при увеличении глубины зондирования в диапазоне от 2 до 5 мм с шагом от 0,5 до 1 мм. Стабильность данного паттерна предопределяет возможность применения метода СВЧ-профилирования кожи в оценке ее структуры в норме и при локальных изменениях (доброкачественные и злокачественные новообразования, ожоги и др.), а полученные уравнения могут служить ориентиром для последующего изучения диэлектрических характеристик покровных тканей человека и половозрелых крыс линии Вистар в разноплановых экспериментах.

Исследование частично поддержано РФФИ (грант 18-42-5200053 p\_a.).

1. Гладкова Н.Д., Сергеев А. Руководство по оптической когерентной томографии. М.: Физматлит, 2007. 295 с.
2. Костров А.В., Смирнов А.И., Янин Д.В. с соавт. Резонансная ближнепольная СВЧ диагностика неоднородных сред // Известия РАН. Серия физическая. 2005. Т. 69, №12. С. 1716-1720.
3. Резник А.Н., Юрасова Н.В. Ближнепольная СВЧ томография биологических сред // Журнал технической физики. 2004. Т. 74, вып. 4. С. 108-116.
4. Турчин И.В. Методы оптической биомедицинской визуализации: от субклеточных структур до тканей и органов // Успехи физических наук. 2016. Т. 186, №5. С. 550–567.
5. Gaikovitch K.P. Subsurface near-field scanning tomography // Physical Review Letters. 2007. Vol. 98, N 18. P.183902.

## **ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ДОБАВОК НА РАЗДЕЛИТЕЛЬНУЮ СПОСОБНОСТЬ ВОДНОЙ ДВУХФАЗНОЙ СИСТЕМЫ ПЭГ-НАТРИЕВАЯ СОЛЬ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ-ВОДА**

### **EFFECT OF VARIOUS LOW-MOLECULAR ADDITIVES ON THE SEPARATION CAPACITY OF THE AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM OF PEG-SODIUM SALT OF LEMONIC ACID-WATER**

*Масимов Э.А., Шахбазова Г.М., Оджазвердиева С.Я.*

Бакинский Государственный Университет, Баку masimovspektr@rambler.ru, shahbazova.gunel@mail.ru

Как известно, при смешивании водных растворов двух полимеров или водных растворов одного полимера и некоторых неорганических и органических солей в определенном интервале концентраций компонентов, они становятся несовместимыми в общем растворителе и смеси расслаиваются на две жидкие фазы.

В результате систематических исследований большего количества водно-двухфазных систем (ВДС) появился новый универсальный, высокоэффективный, экономически выгодный метод разделения и очистки различных веществ, в том числе и биологических материалов основанного на неравномерном распределении этих веществ между равновесными фазами двухфазной системы.

В представленной работе изучена разделительная способность ( $n^*$ ) водной двухфазной системы ПЭГ-6000-натриевая соль лимонной кислоты – вода характеризующая различие в структурах водной среды в фазах водно-двухфазных систем при  $T=298,15^\circ\text{K}$  в отсутствии и присутствии различных добавок (карбамид, глюкоза, сахароза, сульфат натрия, карбонат натрия, нитрат натрия).

Полученные результаты показывают, что добавление карбамида в водно-двухфазных систем уменьшает разделительную способность её ( $n^*\approx 5,20$  в присутствии 1,25 моль/л карбамида, тогда как  $n^*\approx 6,5$  в отсутствии добавок) и тем больше, чем больше концентрация карбамида, в то время как добавление в систему углеводов – глюкозу и сахарозу приводит к увеличению разделительной способности системы. Влияние карбамида на величину и  $n^*$  связано с разрушением карбамидом структуры воды в соответствующих фазах, что приводит к увеличению гидратации ПЭГ и изменению ближнего водного окружения молекулы последнего, что должно способствовать увеличению совместимости компонентов системы. Это способствует сближению свойств фаз и, как следствие, более равномерному распределению веществ между двумя фазами, что приводит к уменьшению разделительной способности.

При добавлении углеводов – глюкозу и сахарозу имеет место структурирование водного окружения, что должно привести к уменьшению гидратации ПЭГ, что естественно, к увеличению различия в гидрофобностях фаз, увеличению коэффициента распределения и повышению разделительной способности системы.

Значительное увеличение разделительной способности исследованной водно-двухфазных систем при введении солей (в присутствии нитрата натрия  $n^*\approx 12,6$ , сульфата натрия  $n^*\approx 14,7$ , карбоната натрия  $n^*\approx 13,5$ ) свидетельствует о том, что эти соли очень сильно стабилизируют структуру водного окружения в фазах водно-двухфазных систем.

---

## **ТРЕХМЕРНЫЙ АНАЛИЗ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

### **THREE-DIMENSIONAL ANALYSIS OF BIOCOMPATIBLE MATRIXES FOR TISSUE ENGINEERING**

*Михуткин А.А.<sup>1</sup>, Камышинский Р.А.<sup>1,2</sup>, Тенчурин Т.Х.<sup>1</sup>, Григорьев Т.Е.<sup>1</sup>, Чвалун С.Н.<sup>1</sup>, Васильев А.Л.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

<sup>2</sup> Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

Для создания природоподобных биоискусственных систем для регенеративной медицины, в частности искусственных тканей, необходима их полная качественная и количественная характеристика. Создание искусственных тканей - многоэтапный процесс, включающий создание биосовместимых матриксов различной природы, на основе природного внеклеточного матрикса, получаемого децеллюляризацией нативных тканей и органов, или искусственных биосовместимых полимеров, с заданным комплексом механических, биохимических и морфологических свойств, с последующим засеиванием клетками. Для формирования тканеинженерных конструкций необходимо изучение процессов взаимодействия клеток и матрикса, адгезии и пролиферации клеток.

Для создания внеклеточного матрикса часто используют метод электроформования (электроспиннинга), позволяющий получать волокнистую сетку (каркас) из нано- и микроволокон на основе биосовместимых полимеров. Матрикс и клетки – трехмерные объекты и взаимодействуют в трех измерениях, поэтому для их

полноценного изучения необходимы методы трехмерной реконструкции.

Для разномасштабного восстановления микроструктуры объектов могут применяться различные экспериментальные методы исследований, один из которых, успешно применяемый в изучениях матриц, - это конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Этот метод дает возможность сканирования по глубине образца, что необходимо для формирования трехмерных массивов данных. Для определения морфологии поверхностей волокон матрикса, оказывающей существенное влияние на процессы адгезии и пролиферации клеток к волокнам, используется растровая электронная микроскопия (РЭМ). Применение и разработка методов трехмерной реконструкции и анализа с использованием оптической и электронной микроскопии позволяет решить задачу полноценной характеристики создаваемых микроструктур на всех этапах: от создания биосовместимых матриц до тканеподобных биоискусственных систем. Представленная работа посвящена разработке и применению методов трехмерной реконструкции и количественного анализа биосовместимых матриц с помощью КЛСМ, а также общей характеристики матриц различной природы и систем матрикс-клетки методами РЭМ и КЛСМ.

Проведено комплексное исследование биосовместимых полимерных матриц на основе полиамида-6 (ПА-6) [1] и поли-L/L-лактида (ПЛЛА) для тканевой инженерии с использованием КЛСМ и растровой электронно-ионной микроскопии. Получены данные о различиях микроструктуры областей полимерных матриц, прилегающих к электроду, и остальной части их объема; изучено влияние увеличения толщины ПЛЛА-матрикса на микроструктуру и, в том числе, на жизнеспособность и процессы пролиферации клеток.

С использованием компьютерной обработки экспериментальных данных восстановлена структура волокон матрикса и пустотного пространства между ними. Были разработаны и использованы различные подходы трехмерной реконструкции и анализа волокон и пустотного пространства матриц. Полученные данные позволили произвести всесторонний количественный микроструктурный анализ, в частности, определить значение пористости и объемную долю волокон. Использованные подходы предполагают разбиение пустотного пространства на серии трехмерных линий и скелетирование пористого пространства и волокон. Кроме оценки распределения пор по размерам, определены: среднее расстояние между волокнами в трех направлениях, средний диаметр пор, текстура и ориентация волокон, средний диаметр волокон, площадь поверхности волокон матрикса, доступная для адгезии клеток.

Двумя разработанными подходами проведено моделирование проникновения клеток в пористое пространство матрикса, в предположении сферической формы клеток. Оценена эффективная пористость, т.е. эффективные объемные доли пор для определенного диаметра клетки относительно объема всего пористого пространства. Моделирование показало, что эффективный объем пористого пространства зависит от размера проникающей сферы, уменьшаясь с почти 90% для сферы диаметром 6 мкм до 0,2% для сферы диаметром 24 мкм для матриц ПА-6 [1]. Данные результаты сравнивались с результатами, полученными с помощью растровой электронной микроскопии.

Полученные трехмерные модели матриц могут быть использованы в решении других задач, например, моделировании процессов, происходящих в биореакторе. Один из ключевых вопросов - протекание жидкости сквозь исследуемый материал, позволяет определить оптимальные условия роста клеток и микроорганизмов. В результате симуляции протекания жидкости сквозь пустотное пространство матриц двумя подходами получены параметры полей скоростей, давлений и проницаемости.

Проведенные исследования позволят приблизиться к созданию искусственных тканей, в частности биосовместимых матриц с заданным комплексом механических, биохимических и морфологических свойств. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №17-13-01376.

1. Mikhutkin A.A. et al. Towards Tissue Engineering: 3D Study of Polyamide-6 Scaffolds // BioNanoScience. 2018. Vol. 8, P. 511.

## СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МАГНИТНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ БИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ДИАГНОСТИКЕ

### ULTRASENSITIVE MAGNETIC METHODS FOR BIOPHYSICAL RESEARCH OF TARGETED DRUG DELIVERY AND DIAGNOSTICS

*Орлов А.В.<sup>1,2</sup>, Брагина В.А.<sup>1</sup>, Никитин М.П.<sup>2</sup>, Горшков Б.Г.<sup>1</sup>, Никитин П.И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, E-mail: nikitin@kapella.gpi.ru

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

Магнитные наночастицы, обладая рядом уникальных свойств, чрезвычайно перспективны для многих биофизических и медицинских применений. Эти агенты уже допущены во многих ведущих странах для внутривенных инъекций человеку. Для метрологического обеспечения разработок различных применений магнитных наночастиц (МЧ) авторами впервые предложены высокочувствительные методы их детекции по нелинейному перемагничиванию. Разработаны регистраторы МЧ, имеющие очень широкий линейный

динамический диапазон 7 порядков и рекордные пределы обнаружения - 0,4 нг наночастиц или 39 пг дисков с вихревой намагниченностью [1]. Для неинвазивного мониторинга МЧ внутри живых организмов *in vivo* (на глубине до 20 мм) разработаны специальные внешние индукционные зонды. Показано, что устройства способны регистрировать МЧ на основе радиоизотопов  $^{59}\text{Fe}$  на уровне чувствительности детекторов  $\gamma$ -излучения, что позволяет заменить радиоактивные метки в ряде направлений биофизических исследований и медицинской диагностики на более удобные и доступные МЧ.

Развиты методы синтеза МЧ с пористой метал-органической оболочкой для заполнения лекарственными препаратами [2] и контрастирования изображений при магниторезонансной томографии. Предложены неинвазивные методики регистрации динамики МЧ в кровотоке крыс и мышей, биодеградации МЧ, а также способы мониторинга выведения частиц из кровотока и комбинированной доставки лекарственных препаратов. В частности, впервые показано, что с помощью транспортировки МЧ на поверхности эритроцитов можно увеличивать доставку частиц в легкие мышей *in vivo* вплоть до рекордных величин – в 120 раз (до 40% от введённой дозы наночастиц) [3]. Впервые продемонстрировано, что такое опосредованное эритроцитами перенаправление МЧ, несущих на своей поверхности лекарственные препараты, в легкие животных может использоваться для подавления метастазов агрессивной меланомы B16-F1, использованных в опытах в качестве примера агрессивного типа рака легких, что представляется перспективным для онкотерапии лёгких.

Разработаны методы спектрально-фазовой и спектрально-корреляционной интерферометрии для мониторинга кинетики взаимодействия биомолекул и гибридных наночастиц. На основе указанных оптических и магнитных методов разработаны оригинальные способы высокочувствительных и мультиплексных иммуно- и ДНК анализов с применением МЧ в качестве нанометок биохимических реакций. Устройства протестированы для быстрого измерения концентраций малых молекул, олигонуклеотидов, маркеров онко- и кардиозаболеваний. В частности, продемонстрирована регистрация маркера инфаркта миокарда - кардиального тропонина I - в плазме крови человека на уровне от 12 пг/мл и динамическом диапазоне 3 порядка. Достигнутый уровень соответствует критерию “99 перцентилья” - обнаружению ультранизких фоновых концентраций тропонина у 99% здорового населения. Разработан быстрый и ультрачувствительный метод измерения низких концентраций малых молекул (гаптенев). На примере измерения концентраций гормона щитовидной железы - тироксина в сыворотке крови человека показано, что порог детекции составляет рекордную величину - 16 фг/мл, динамический диапазон - 3 порядка при времени анализа менее 30 мин [4].

Показано, что разработанные оптические и магнитные методы позволяют контролировать и выбирать МЧ и конъюгаты на их основе для управляемой доставки лекарственных препаратов и комбинированной химиогипертермии опухолей; разрабатывать фокусирующие магнитные системы для концентрирования МЧ в определенных участках живого организма; исследовать результаты связывания наночастиц с химическими покрытиями и комплементарными молекулами тканей, клеток или антигенами на их поверхности.

Созданные прототипы приборов также успешно использованы для разработки нового направления самосборки “умных” программируемых наноструктур, способных автономно выполнять логические операции и предназначенных для биомедицинских применений [5].

1. Nikitin M.P. et al. Ultrasensitive detection enabled by nonlinear magnetization of nanomagnetic labels // *Nanoscale*. 2018. Vol. 10. P. 11642.
2. Tregubov A.A. et al. Magnetic hybrid magnetite/metal organic framework nanoparticles: facile preparation, post-synthetic biofunctionalization and tracking in vivo with magnetic methods // *J. Magn. Magn. Mat.* 2018. V. 449. P. 590.
3. Zelepukin I.V. et al. Nanoparticle-based drug delivery via RBC-hitchhiking for the inhibition of lung metastases growth // *Nanoscale*. 2019. Vol. 11. P. 1636
4. Znoyko S.L. et al. Ultrasensitive quantitative detection of small molecules with rapid lateral-flow assay based on high-affinity bifunctional ligand and magnetic nanolabels // *Anal. Chim. Acta*. 2018. Vol. 1034. P. 161.
5. Tregubov A.A., Nikitin P.I., Nikitin M.P. Advanced Smart Nanomaterials with Integrated Logic-Gating and Biocomputing: Dawn of Theranostic Nanorobots // *Chem. Rev.* 2018. Vol. 118. P. 10294.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ РАЗДЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ОРГАНИЧЕСКИХ ГИДРОПЕРОКСИДОВ

### THE USING OF CHEMILUMINESCENCE FOR THE SEPARATE DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND ORGANIC HYDROPEROXIDES

*Панферова А.А., Созарукова М.М., Тихазе А.К., Ланкин В.З.*

ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва, panfyorowa.aniuta@yandex.ru

Свободнорадикальные процессы играют важную роль в этиологии и патогенезе целого ряда заболеваний, таких как атеросклероз, сахарный диабет и др. В процессе окислительного стресса происходит одновременное накопление первичных продуктов свободнорадикального окисления (преимущественно, липогидропероксидов различного строения) и пероксида водорода. В связи с этим существует необходимость в разработке методов для раздельного определения этих продуктов.

В настоящее время в доступной литературе мы не обнаружили указаний на возможность одновременного определения органических гидропероксидов (липопероксидов) и пероксида водорода в одних и тех же пробах.

Предложенные ранее методы определения содержания липопероксидов, основанные либо на цветных реакциях, либо на определении поглощения конъюгированных диенов, высокой чувствительностью не обладают и являются непригодным для серийных клинических анализов. Метод спектрофотометрического определения уровня конъюгированных диенов вследствие их малого содержания не может использоваться при анализе биологического материала. При этом расчет количества конъюгированных диенов весьма затруднен. Кроме того, при спектрофотометрическом определении в области поглощения 233 нм в природных системах определяются не только гидроперокси-производные липидов, но и продукты их восстановления.

Предлагаемый нами хемилюминесцентный метод позволяет проводить отдельный анализ содержания липогидропероксидов и пероксида водорода в пробах с высокой специфичностью и чувствительностью при простоте и скорости определений, что делает возможным его применение в качестве доступного лабораторного теста. Это достигается тем, что в нашем способе селективность определения липогидропероксидов и пероксида водорода основана на предварительном высокоспецифичном ферментативном восстановлении пероксида водорода с помощью каталазы, причем содержание липогидропероксидов рассчитывается путем вычитания светосуммы пробы после инкубации с каталазой из светосуммы под пиком общей хемилюминесцентной кривой.

Хемилюминесцентный реагент (ХЛ-реагент), который использовали в день приготовления и предварительно выдерживали при комнатной температуре в темноте до угасания собственной хемилюминесценции, содержал микропероксидазу-11 и изолюминол в 20 мМ боратном буфере pH 10,0. 13-гидропероксилинолеат получали путем ферментативного окисления линолевой кислоты при катализе липоксигеназой-1 соевых бобов. Полученный гидропероксид линолевой кислоты диспергировали в воде с помощью детергента дезоксихолата натрия. Измерение хемилюминесценции проводили на хемилюминиметре Lum-100 (ДИСофт, Россия).

В хемилюминесцентную кювету помещали дисперсию 13-гидропероксилинолеата или раствор пероксида водорода либо смесь тех же компонентов необходимой концентрации, после чего впрыскивали в кювету через капиллярную трубку ХЛ-реагент и производили запись в течение 5 мин, после чего определяли площадь под кривой хемилюминесценции (светосумма). На основании полученных данных для 13-гидропероксилинолеата и пероксида водорода строили градуировочные графики зависимости светосуммы от концентрации.

Содержание органических гидропероксидов - ROOH (в данном случае – 13-гидропероксилинолеат) и неорганических гидропероксидов ( $H_2O_2$ ) по предлагаемому способу осуществляется по формулам:

- 1)  $[ROOH] = [ROOH + H_2O_2 + \text{каталаза}]$ , где  $[ROOH]$  – концентрация органического гидропероксида;
- 2)  $[H_2O_2] = [ROOH + H_2O_2] - [ROOH]$

Липиды были диспергированы без применения спиртовых растворов, поскольку в присутствии спиртов каталаза способна восстанавливать органические пероксиды в ходе пероксидазной реакции.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет с достаточно высокой точностью (пределы ошибки составляют не более 10%, что допустимо для такого рода анализов), чувствительностью (определяются наномолярные количества веществ, что почти на 3 порядка превышает чувствительность спектрофотометрических методов) и высокой специфичностью производить отдельное определение органических гидропероксидов и пероксида водорода в средах, содержащих смесь этих компонентов.

## ТЕРАГЕРЦОВАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ВРЕМЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ К ИССЛЕДОВАНИЮ ГИДРАТНЫХ ОБОЛОЧЕК БЕЛКОВ

### TERAHERTZ TIME-DOMAIN SPECTROSCOPY AS APPLIED TO THE STUDY OF PROTEINS HYDRATION SHELLS

*Пеньков Н.В.*

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, nvpnkov@rambler.ru

Терагерцовая спектроскопия временного разрешения как метод исследования уже более 20 лет позволяет получать полезную информацию, как в различных фундаментальных, так и в прикладных областях науки, главным образом физико-химической направленности. Данный вид спектроскопии позволяет измерять не только спектр поглощения, но и спектр коэффициента преломления, что даёт возможность рассчитать комплексную диэлектрическую функцию изучаемого вещества в терагерцовой области частот. Однако в биологии этот метод до сих пор мало применялся из-за того, что значительную часть любого биообъекта составляет вода, а вода в терагерцовой области поглощает на 1-2 порядка сильнее, нежели сам биообъект. К тому же полосы поглощения биологических молекул в растворе сильно размыты и перекрываются друг с другом. Поэтому выделить на фоне воды спектральные особенности биологического объекта путём вычитания почти невозможно.



В ряде работ проводилось исследование слабой спектральной полосы воды с максимумом около  $20 \text{ см}^{-1}$ , которую можно выделить только путём математических преобразований спектров, взятых в интервале от гигагерцовой до ближней ИК-области. Было показано, что эта полоса отражает релаксационную динамику свободных молекул воды [1, 2]. Также был предложен метод расчёта [1] доли свободных молекул воды в различных водных растворах электролитов и неэлектролитов с использованием спектральных параметров из терагерцовой области. В продолжение данного направления было проведено исследование более сложных растворов – растворов белка. В качестве модельного объекта был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА), при различных значениях pH: 2,5; 4,2; 6; 8; 10. При каждом из указанных значений pH молекула БСА стабильна, но существует в отличной от других pH конформации и, как мы ожидали, по-разному влияет на водное окружение. Полученные диэлектрические функции растворов БСА корректировались с использованием модели Бруггемана для того, чтобы рассчитать диэлектрические функции водной фазы растворов БСА без вклада самого БСА. Затем с помощью фитинга определялись параметры трёх спектральных полос из терагерцовой области. В результате сравнения значений рассчитанных спектральных параметров растворов с белком и без него было обнаружено, что по одним параметрам мы должны сделать вывод об усилении структурированности воды, а по другим о противоположном – об ослаблении межмолекулярного связывания. Был сделан вывод, что влияние БСА на окружающую водную фазу сводится, во-первых, к образованию сильно связанных гидратных оболочек в непосредственной близости от молекулы белка, а во-вторых, происходит разрушение структуры более отдалённых слоёв гидратных оболочек с образованием повышенного количества свободных молекул воды. Это согласуется с результатами, полученными в ряде работ по исследованию так называемых динамических гидратных оболочек белка, протяжённость которых по разным данным составляет от 2 до 5 нм [3-5]. По-видимому, основная особенность упомянутых динамических гидратных оболочек, выходящих далеко за пределы сильно связанного гидратационного слоя, заключается именно в снижении структурированности воды и увеличении количества свободных молекул по сравнению с невозмущённой водной фазой.

Также было обнаружено, что имеются особые отличия во влиянии различных конформаций БСА на водную фазу раствора, что регистрируется по отличию рассчитанных спектральных параметров воды. В частности, конформация БСА при pH=10, предполагающая склонность к агрегации, влияет на водное окружение таким образом, что доля свободных молекул воды в гидратных оболочках возрастает примерно на четверть – с 4 до 5%, а время жизни свободных молекул увеличивается на 10% по сравнению с водой, не подверженной влиянию белка. Таким образом, предложенный подход позволяет отличать белки в растворе, анализируя спектральные параметры воды из терагерцового диапазона, ввиду того, что даже небольшие отличия в структуре белка приводят к заметным отличиям в его гидратной оболочке.

1. Penkov N. et al. Terahertz Spectroscopy Applied for Investigation of Water Structure // J. Phys. Chem. B. 2015. Vol. 119. pp. 12664–12670.
2. Yada H. et al. Origin of the fast relaxation component of water and heavy water revealed by terahertz time domain attenuated total reflection spectroscopy // Chem. Phys. Lett. 2008. Vol. 464, pp. 166–170.
3. Ebbinghaus S. et al. An extended dynamical hydration shell around proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. pp. 20749–20752.
4. Bye J.W. et al. Analysis of the Hydration Water around Bovine Serum Albumin Using Terahertz Coherent Synchrotron Radiation // J. Phys. Chem. A. 2014. Vol. 118. pp. 83–88.
5. Heyden M. et al. Terahertz absorption of dilute aqueous solutions // J. Chem. Phys. 2012. Vol. 137. P. 235103.

## ШИРОКОПОЛОСНАЯ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

### BROADBAND DIELECTRIC SPECTROSCOPY OF THE SERUM OF THE BLOOD OF PATIENTS WITH ONCOHEMATOLOGICAL DISEASES

*Плотникова Л.В.<sup>1</sup>, Сальникова Ж.А.<sup>1</sup>, Кононов А.А.<sup>2</sup>, Смирнов А.П.<sup>2</sup>, Гарифуллин А.Д.<sup>3</sup>, Кувшинов А.Ю.<sup>3</sup>, Волошин С.В.<sup>3,4,5</sup>, Поляничко А.М.<sup>1</sup>, Кастро Р.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>СПбГУ, Санкт-Петербург, 199034, Университетская наб., 7–9

<sup>2</sup>РГПУ им. А. И. Герцена, Санкт-Петербург, 191186, набережная реки Мойки, 48.

<sup>3</sup>ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, Санкт-Петербург, 191024, ул. 2-Советская, 16

<sup>4</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6.

<sup>5</sup>ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, 191015, ул. Кирочная, 41.

В настоящее время существует много подходов к измерению электрофизических свойств биологических систем, определяемых рабочими условиями эксперимента. Большим преимуществом среди подобных методов обладает диэлектрическая спектроскопия (ДС), отличающаяся быстрым определением параметров биологического материала в широком диапазоне частот и температур.

Сущность метода ДС состоит в подаче возмущающего синусоидального сигнала малой амплитуды на исследуемую систему и изучении вызванного им сигнала - отклика на выходе. Поскольку отклик системы обусловлен совокупностью многих факторов, то для полного понимания процессов, протекающих под влиянием электрического поля, комплексные импедансные данные должны быть проанализированы на уровне комплексных величин импеданса ( $Z^* = Z' + jZ''$ ), адмиттанса ( $Y^* = Y' + jY''$ ), диэлектрической проницаемости ( $\varepsilon^* = \varepsilon' + j\varepsilon''$ ) и электрического модуля ( $M^* = 1/\varepsilon^* = M' + jM''$ ) [1].

Возможности метода ДС определяются совокупностью следующих преимуществ:

- линейность методики предполагает интерпретацию результатов в терминах теории линейных систем;
- измеренный в достаточно широкой частотной области импеданс (или адмиттанс) содержит всю информацию, которая может быть получена с использованием различных методов на постоянном токе;
- экспериментальная эффективность (объем полученной информации по сравнению с затратами на эксперимент) весьма высока;
- достоверность данных легко проверяется с использованием методов интегрального преобразования (соотношение Крамерса – Кронига), которые не зависят от исследуемых физических процессов.

Исследование свойств крови методом ДС позволяет получать информацию, как о внутримолекулярном движении биологических макромолекул, так и о характере их межмолекулярных взаимодействий [2,3]. Проведение исследований цельной крови и её сыворотки позволяет изучать молекулярные процессы, происходящие при гематологических заболеваниях в условиях, максимально приближенных к физиологическим условиям.

В докладе приводятся результаты исследования диэлектрических спектров сыворотки крови больных, страдающих онкогематологическими заболеваниями. Исследование сыворотки крови прямым методом I-U по разности фаз между током и напряжением (область низких частот,  $f=10^{-4} \dots 10^6$  Гц) и микроволновым методом (область высоких частот,  $f=10^6 \dots 10^9$  Гц) позволит разработать дополнительные методы диагностики и оценки эффективности лечения онкогематологических патологий.

1. Kremer, K. Broadband dielectric spectroscopy // Kremer K., Schonhals A. (Eds.). – Berlin Heidelberg: Springer, 2003. – 729 с.
2. Wolf M., Gulich R., Lunkenheimer P., Loidl A. // Biochimia et Biophysica Acta (BBA). 2011. 1810(8). – P.727.
3. Chelidze T. // Journal of Non-Crystalline Solids, 305 (2002), P.285 – 294.

## ОБНАРУЖЕНИЕ МАГНЕТОСОМО-ПОДОБНЫХ СТРУКТУР В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ С ПОМОЩЬЮ ПРОДОЛЬНОГО НЕЛИНЕЙНОГО ОТКЛИКА НА ПЕРЕМЕННОЕ ПОЛЕ

### DETECTION OF MAGNETOSOME-LIKE STRUCTURES IN EUKARYOTIC CELLS USING NONLINEAR LONGITUDINAL RESPONSE TO AC FIELD

**Рыжов В.А., Мультихофф Г.<sup>1</sup>, Шевцов М.А.<sup>1-3</sup>, Ларионов И.И.**

Петербургский институт ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия, E-mail: ryzhov\_va@npfi.nrcki.ru

<sup>1</sup>Технический Университет Мюнхена, Мюнхен, Германия, E-mail: gabriele.multhoff@tum.de

<sup>2</sup>Институт цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия, E-mail: Shevtsov-max@mail.ru

<sup>3</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Хотя магнетосомы в бактериях были открыты несколько десятилетий назад [1,2], до сегодняшнего дня остаётся открытым вопрос существуют ли подобные биоминерализованные структуры в эукариотических клетках. В данной работе представлены доказательства существования магнетосомоподобных структур на основе Fe различных жизнеспособных эукариотических клетках. Для детектирования сигнала от магнетосом использовалась оригинальная методика регистрация второй гармоники намагниченности продольного нелинейного отклика  $M_2(H)$  на слабое переменное (ac) магнитное поле в присутствии постоянного (dc) поля  $H$  [3]. Особенности зарегистрированных сигналов ((i) экстремумы в слабом поле в зависимостях сигналов обеих фазовых компонент отклика  $\text{Re}M_2(H)$  и  $\text{Im}M_2(H)$  от постоянного поля, (ii) разные знаки этих сигналов, и (iii) полевой гистерезис) являются «отпечатками пальцев» присутствующих в клетках магнитных наночастиц [4], входящих, по-видимому, в магнетосомоподобные структуры. Чтобы понять, влияют ли контакты клеток на параметры  $M_2$  отклика исследовались клеточные культуры в суспензии и в виде гранул. Как правило, полевой гистерезис  $\text{Re}M_2(H)$  сигналов от суспензий исследуемых клеток был больше или равен гистерезису сигналов от образцов с осажденными клетками, что предполагает некоторое потенциальное воздействие клеточных контактов на параметры отклика. Кроме того, поведение полевой гистерезиса  $M_2$  отклика от клеток в суспензии и/или в виде гранул свидетельствует о многодоменном состоянии таких структур в определенных типах клеток, и однодоменном состоянии в других клеточных линиях. Оценки показывают, что количество

магнетосом в клетках составляет  $\leq 5 \div 8$  магнетосом на клетку в двух клеточных линиях, обнаруживающих наибольший сигнал и  $\leq 1 \div 2$  магнетосом/клетку во всех остальных. Присутствие магнетосомоподобных структур анализировалось также в нормальных тканях, полученных от крыс породы Wistar и мышей линии C57Bl/6. Дополнительно исследовались ткани опухоли (ортотопическая С6 глиома крысы и GL261 глиома мыши) и в них также было обнаружено присутствие магнетосом. Полученные сигналы от определенных тканей (мозг, сердце, лёгкие) соответствовали наночастицам магнетита в однодоменном состоянии, тогда как в других органах характеристики  $M_2$  отклика лучше соответствовали Fe(0) составу их магнитного ядра в многодоменном состоянии. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения роли магнетосомоподобных структур на основе Fe в биологии и физиологии эукариотических клеток.

Авторы признательны Ольге Г. Генбач и проф. Олегу В. Галибину за помощь в экспериментах на животных.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ 19-08-00024 и грантом Британского Совета по межинститутским связям в рамках Российско-Британского партнерства (British Council Institutional Links grant, ID 277386067).

1. D.A. Bazylnski, R.B. Frankel. Magnetosome formation in prokaryotes. // Nat. Rev. Microbiol. 2004. Vol 2. P. 217.
2. R. Blakemore. Magnetotactic bacteria. // Science. 1975. Vol. 190. P. 377.
3. В.А. Рыжов, Е.И. Завацкий. Устройство для исследования магнитных свойств магнетиков. // Патент № 2507525, зарегистрированный в России 20.02.2014.
4. V.A. Ryzhov et al. Magnetic Study of Nanostructural Composite Material Based on Cobalt Compounds and Porous Silicon. // Appl. Magn. Reson. 2014. Vol. 45. P. 339.

## ПРИМЕНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССА ДЕНАТУРАЦИИ ЛИЗОЦИМА

### APPLICATION OF OPTICAL METHODS FOR RESEARCHING THE PROCESS OF LYSOCYME DENATURATION

*Саримов Р.М., Матвеева Т.А., Пеньков Н.В.<sup>1</sup>, Гудков С.В., Бинги В.Н.*

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук (rusa@kapella.gpi.ru)

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук

Активно развивается в последние годы направление в исследовании белков, связанное с изменением нативного состояния под действием химических агентов и физических факторов. Часто изменение нативного состояния белка используется в экспериментах по изучению процессов фолдинга *in vitro*. Изменение третичной структуры белка приводит не только к его инактивации, но и к трансформации нормальных белков в прионы и, как следствие, развитию губчатых энцефалопатий. С другой стороны, агрегация белков возникает в связи с потерей нативной конформации, что, на уровне организма, приводит к патологическим изменениям, начиная от нейродегенеративных нарушений и заканчивая системными амилоидозами.

Для такого рода исследований лизоцим, выделенный из яичного белка курицы (HEWL) — удобный объект, поскольку имеет ряд преимуществ, по сравнению с другими белками. Белок доступен и обладает антибактериальными свойствами, что делает удобным изучение сохранности его структуры по его активности; белок легко ренатурирует после денатурации.

В данной работе на примере денатурации HEWL 4 мг/мл в растворах (1) 50 мМ Tris-HCl (pH=8.0) 30 мМ дитиотреитола (DTT) и 6 М гуанидин гидрохлорида (GdnHCl), (2) 50 мМ Tris-HCl и 30 мМ DTT авторы показывают возможность совместного использования нескольких оптических методов: интерферометрии (интерферометр Маха-Цендера подробнее [1, 2]), динамического светорассеивания (DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical Ltd), спектроскопии в видимой и УФ области (ISS-UV-VIS Spectrometer, Ocean Optics Inc) и анализа активности белка (по лизису клеток *M. lysodeikticus*). Каждый из использованных методов по-своему характеризует реакцию: интерферометрия дает информацию об объеме и плотности воды в гидратной оболочке белка; DLS — гидродинамический радиус молекул или их агрегатов; спектроскопия в видимой области показывает наличие агрегатов, а в УФ области — свойства полипептидной цепи; показатель ферментативной активности свидетельствует о целостности активного центра HEWL. Главной особенностью исследования является использование оптических методов изменения нативной конформации белка в *on-line* режиме в денатурирующем растворе.

Денатурирующие растворы подобраны таким образом, чтобы можно было исследовать денатурацию белка без агрегации, раствор (1), и с агрегацией, раствор (2), на временном отрезке 45–60 минут. DTT, как сильный восстановитель, приводит к разрывам в S–S соединениях, образованных двумя цистеиновыми аминокислотами. Молекула HEWL содержит четыре таких соединения. В отсутствие GdnHCl, раствор (2), белок медленно, в течении более 2 минут, теряет свое нативное состояние ( $d \approx 4$  нм) а затем через 10–15 минут агрегирует. С

помощью DLS получена сигмоидальная зависимость размеров молекул HEWL и их агрегатов от времени. Размер конечных агрегатов >200 нм. Похожая динамика — рост в течение 10 минут и выход на плато — наблюдалась для реакции в растворе (2) для оптического поглощения (OD) света на длинах волн 350 и 600 нм. Интересно, что на длине волны 280 нм происходит рост OD на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует о деградации белка в агрегатах.

В присутствии GdnHCl в денатурирующем растворе белок не агрегирует. Сразу же после заливки размер HEWL увеличивается до  $d=4.9$  нм, затем вырастает до  $d=6$  нм за 15–20 минут (экспоненциальный рост и выход на плато на DLS). Характерно, что такая же временная динамика в реакции в растворе (1) наблюдается и для показателя преломления в интерферометрии (рост показателя преломления  $\Delta n \sim 4.5 \cdot 10^{-5}$ ).

Ферментативная активностью лизоцима в растворе (1) за 10 минут резко снижается до 10% от первоначальной активности, а затем медленной снижается в течение часа. В растворе (2) ферментативная активность снижается плавно и через час остаточная активность равна примерно 40%, причем эта цифра сильно варьируется в разных экспериментах.

Одновременное применение современных оптических методов позволяет получать комплексную информацию о характере динамики изменений нативного состояния белка и его гидратной оболочки в ходе реакции денатурации.

Работа выполнена при поддержке НИР "Физические методы в сельском хозяйстве и экологии" (№ 0024-2019-0004).

1. Sarimov R. M., Matveyeva T. A., Binhi V. N., Laser interferometry of the hydrolytic changes in protein solutions: the refractive index and hydration shells. // Journal of Biological Physics. 2018. V.44 (3). P.345-360.
2. Sarimov R. M., Matveyeva T. A., Vasin A. L., Binhi V. N., Changes in the refractive index of a solution during proteolysis of bovine serum albumin with pepsin. // Biophysics (Russian Federation). 2017. V.62 (2). P.177-181.



## МЕТОДЫ ЦИФРОВОЙ ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ РЕАКЦИИ КЛЕТОК НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ И ХИМИОТЕРАПИЮ

### DIGITAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPY IN RESEARCH OF CELLULAR RESPONSE TO PHOTODYNAMIC TREATMENT AND CHEMOTHERAPY

*Семенова И.В.\**, *Белашов А.В.*, *Жихорева А.А.*, *Горбенко Д.А.*, *Васютинский О.С.*

ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, 194021, Политехническая, 26

\*irina.semenova@mail.ioffe.ru

Исследование эффективности терапевтического воздействия на клеточном уровне направлено на идентификацию механизмов гибели клеток при различных дозах воздействия и, таким образом, на определение доз, необходимых для запуска того или иного целевого механизма при проведении терапии. Наиболее часто используемый метод определения механизмов гибели клеток основан на применении различных флуоресцентных красителей с наблюдением их флуоресценции в конфокальном флуоресцентном микроскопе. Также используется анализ морфологических изменений в клетках с помощью проточной цитофлуориметрии, оптической или электронной микроскопии. В работах [1-4] мы показали преимущества методов цифровой голографической микроскопии для оценки морфологических изменений клеток при фотодинамическом воздействии (ФДВ) и химиотерапии, а также для мониторинга этих изменений в динамике. Голографические методы основаны на регистрации изменений фазы просвечивающего клетки излучения, и определении пространственного распределения показателя преломления внутри клетки, которое содержит количественную информацию о клеточных параметрах. В частности, методами цифровой голографической микроскопии и томографии можно определить форму клеток, их толщину, объем, сухую массу, площадь проекции, площадь поверхности мембраны, двумерное (2D) и трехмерное (3D) распределение показателя преломления. Кроме того, голографические методы дают возможность проведения наблюдений в динамике в течение длительного времени, вплоть до нескольких часов, или даже суток. Важным преимуществом этих методов является работа с оригинальными образцами без использования каких-либо дополнительных красителей или химических агентов.

В докладе представлен обзор проведенных нами в последние годы исследований изменений клеточной морфологии вследствие ФДВ или химиотерапии. В частности, исследовалась реакция клеток *in vitro* на ФДВ с использованием фотосенсибилизатора Радахлорин. Исследования проводились на образцах клеточных культур постоянных клеточных линий разных ноологических форм, а также на образцах клеточных культур, полученных хирургическим путем у пациентов НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. Показано, что с увеличением дозы ФДВ последовательно реализуются такие механизмы гибели клеток, как апоптоз, вторичный некроз, некроз. Причем, для клеток разных клеточных линий при сохранении этой последовательности указанные механизмы реализуются при существенно разных дозах. Результаты, полученные с помощью голографических

методов, были подтверждены традиционными тестами на целостность клеточных мембран с применением флуоресцентных красителей.

Исследование изменений клеточной морфологии при химиотерапии препаратами Цисплатин и Диоксадэт проводилось на образцах асцитической жидкости крыс линии Wistar с моделью перевиваемого штамма рака яичника. Было обнаружено уменьшение фазового набега в клеточных структурах образцов, взятых у животных, получавших химиотерапию, по сравнению с контрольными животными, а также показано существенное различие клеточной морфологии в образцах, взятых у крыс, получавших лечение разными препаратами.

Исследования реакции клеток постоянных клеточных линий на ФДВ проводились в сотрудничестве и на образцах клеточных культур, предоставленных сотрудниками Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) Т.Н. Беляевой, Е.С. Корниловой, А.В. Саловой и И.К. Литвиновым. Работы по исследованию фотодинамического воздействия на клетки, взятые у конкретных пациентов, проводились в сотрудничестве и на образцах клеточных культур, предоставленных сотрудниками Института онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) Н.А. Авдонкиной, И.А. Балдуевой, А.Б. Даниловой, М.Л. Гельфондом и Т.Л. Нехаевой. Анализ изменений морфологических параметров клеток рака яичника крыс линии Wistar при химиотерапии Диоксадэтом и Цисплатином проводился в сотрудничестве и на образцах, предоставленных сотрудниками Института онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) В.Г. Беспаловым, Н.Т. Жилинской, В.А. Романовым и А.Л. Семеновым. Авторы благодарят всех вышеперечисленных коллег за плодотворное сотрудничество.

1. A.V. Belashov et al., Digital holographic microscopy in label-free analysis of cultured cells response to photodynamic treatment. *Optics Letters*, 41, 21, 5035-5038, 2016.
2. А.А. Жихорева и др., Исследование морфологических изменений клеток злокачественных новообразований при фотодинамическом воздействии методами цифровой голографической микроскопии. *Химическая Физика*, 38, 6, 1–7, 2019.
3. A.V. Belashov et al., Refractive index distributions in dehydrated cells of human oral cavity epithelium. *Journal of the Optical Society of America B*, 34, 12, 2017.
4. А.А. Жихорева et al., Morphological changes in the ovarian carcinoma cells of Wistar rats induced by chemotherapy with Cisplatin and Dioxadet. *Biomedical Optics Express*, 9, 11, 5817-5827, 2018.

## ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ФОРМИРОВАНИЯ АМИЛОИДОВ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЙНИЯ СВЕТА

### STUDY OF THE KINETICS OF FORMATION OF AMYLOIDS BY THE METHOD OF DYNAMIC SCATTERING OF LIGHT

*Соколов П.А., Ролич В.И., Попова М.А. Белоусов М.В., Касьяненко Н.А.*

Санкт-Петербургский государственный факультет, Санкт-Петербург, p.a.sokolov@spbu.ru

Нарушение третичной и четвертичной структуры у ряда функциональных белков прокариот и эукариот приводит к тому, что они образуют фибриллы, которые называют амилоидами. В результате такие белки выпадают из жизненного цикла клетки. Наличие амилоидных отложений и недостаток соответствующего белка в клетке приводит к нарушению ее жизнедеятельности. У человека это приводит к возникновению различных тяжелых нейродегенеративных заболеваний таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хадингтона и т.д. Изучая кинетику перехода амилоидных белков из функциональной в фибриллярную форму можно выявлять факторы, которые обуславливают данное явление, подбирать условия для направленного изменения характеристик этого процесса, исследовать механизмы и пути изменения конформации амилоидных белков. Это необходимо для понимания причин нарушения функциональной структуры нативных белков и может быть весьма плодотворно при поиске способов блокировки или изменения путей их трансформации. Кинетические данные могут быть использованы для верификации той или иной модели агрегации белка и расчета соответствующих ей скоростей реакций и констант связывания. Однако изучение кинетики перехода амилоидных белков в фибриллярную форму является непростой задачей. В настоящее время набор лабораторных методов *in vitro* для таких исследований ограничивается изучением флуоресценции тιοфлавина-Т, кругового дихроизма и светорассеяния. Первые два метода позволяют оценить скорость трансформации белка в амилоидную форму, но не дают никакой информации относительно размеров формирующихся фибрилл и, соответственно, распределения фибрилл по длинам в процессе агрегации. Метод динамического рассеяния света (ДРС), в сочетании со статическим светорассеянием, потенциально дает такую возможность.

Мы показали, что метод ДРС может плодотворно применяться для количественного изучения агрегации амилоидных белков. В качестве модельной системы использовались прионный дрожжевой белок Sup35NMr и его мутация Sup35NMr-M0. Прделанные нами оценки показателя преломления фибрилл для использованной в экспериментах длины волны света 405 нм показывают, что он находится в типичной для биологических объектов диапазоне 1.4-1.6. Плотность упаковки белка в амилоидных белках (а следовательно и их показатель

преломления) задается укладкой белка в фибриллах, которая представляет собой супер-бета слой, имеющий схожую структуру вне зависимости от аминокислотной последовательности. Это позволяет обобщить полученную нами оценку показателя преломления на большинство амилоидных белков. В данной работе мы оценили диаметр фибрилл в 9.67 нм и использовали модель жестких палочек. Данная модель так же может быть использована при анализе других амилоидных белков, так как литературные данные показывают, что большинство таких белков в фибриллярной форме представляют собой именно жесткие, не разветвленные цилиндры с постоянным диаметром. Пользуясь таким приближением нами были рассчитаны дифференциальные сечения рассеяния и коэффициенты поступательной диффузии фибрилл с различными длинами. Основываясь на таких расчетах мы преобразовали последовательность автокорреляционных функций (АКФ), записанных во время агрегации белка, в последовательность распределений фибрилл по длинам. Результаты обработки АКФ были валидированы путем сравнения с аналогичными данными, полученными при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Сравнение результатов ДСР с анализом СЭМ изображений показало, что метод ДСР дает более полную и реалистичную информацию о распределении фибрилл по длинам в растворе. Разработанный нами подход для получения зависимости распределений фибрилл по длинам от времени с шагом по времени от 1 минуты позволяет получать наиболее полную информацию о процессе агрегации амилоидных белков по сравнению с другими применяемыми на данный момент методами. Мы верим, что полученные таким образом данные могут быть использованы, как для детального сравнения различных вариантов одного белка или разных белков между собой, так и для подбора модели агрегации конкретного белка (и вычисления констант скоростей соответствующих реакций). В дальнейшем мы планируем подобрать модель агрегации Sup35NMr и определить как различные привнесенные мутации влияют на процессе, происходящие на каждом этапе его перехода из нативной в прионную (амилоидную) форму.

Часть работ была выполнена в ресурсных центрах СПбГУ «Нанотехнологии» и «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» при поддержке гранта СПбГУ «Изучение молекулярных основ трансформации прионных белков».

## ПОДХОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

### THE APPROACHES TO VISUALIZATION OF BIOMACROMOLECULAR COMPLEXES BY SINGLE-MOLECULE LOCALIZATION MICROSCOPY (SMLM)

Сорокин И.И.<sup>\*1</sup>, Стрелкова О.С.<sup>2</sup>, Киреев И.И.<sup>2</sup>, Широков В.А.<sup>1</sup>

\*hydrargyrum@vega.protres.ru

<sup>1</sup>Институт белка РАН, г.Пушино

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского

Изучая механизмы работы и устройство биологических макромолекул и их комплексов, взаимодействия их ансамблей, важно получать информацию как о их структуре, так и о функциональном состоянии, кинетических параметрах биомолекулярных систем. Механистическая составляющая может быть изучена физическими методами: электронной микроскопии, рентгеновской кристаллографии, ядерно-магнитного резонанса. Данные методы позволяют получить пространственное разрешение порядка нескольких ангстрем, однако изучаемые молекулы так или иначе будут фиксированы и потеряют свою реакционную способность. Анализ же поведения «живой» молекулы требует использования биохимических методов, позволяющих изучить временные характеристики взаимодействия биомолекул, но исключающие получение структурной информации. Таким образом, есть две стороны медали: структурная и функциональная. Компромиссом могут служить методы флуоресцентной микроскопии и спектроскопии, позволяющие при помощи флуоресцентных меток отслеживать движения и взаимодействия не только каждой биомолекулы в составе сложного комплекса, но даже отдельного участка биополимера (цепи белка, РНК, ДНК). Тем не менее, пространственное разрешение самых продвинутых методов флуоресцентной микроскопии до недавнего времени составляло 200-300 нанометров в оптическом диапазоне, что обусловлено дифракционным пределом, постулированным Эрнстом Аббе в XIX веке.

Решением компромисса стала разработка методов микроскопии сверхвысокого разрешения, позволяющих вести съёмку биомолекул с высоким пространственным разрешением порядка нескольких десятков нанометров (STED, PALM/STORM и др.). На данный момент возможна визуализация биомолекул с пространственным разрешением порядка 1 нанометра и точностью локализации молекул порядка нескольких ангстрем, а также миллисекундным временным разрешением (SPDLM, MINIFLUX). Подобные методики позволяют анализировать сложные комплексы биомолекул *in vivo* и *in vitro* непосредственно в процессе их

функционирования, что позволяет подробно изучать такие процессы как сборку вирусных оболочек, комплексов ядерных пор, компонентов цитоскелета, организацию и транспорт везикул, рибосом, мембранных рецепторов и многие другие процессы.

Объектами нашего же интереса являются полирибосомы – комплексы рибосом, транслирующих генетический код с одной и той же молекулы мРНК. Синтез белка у эукариот происходит именно в полирибосомах, содержащих от трёх-четырёх до нескольких десятков рибосом в своём составе. Полирибосомы, состоящие из 5-8 рибосом являются наиболее трансляционно активными и, как правило, принимают форму колец. Существует гипотеза, что каждая рибосома способна прочитывать одну и ту же молекулу мРНК множество раз, если концы мРНК сближены в пространстве. Данный феномен до сих пор не изучен и является научным вызовом. Полирибосомы, сильно нагруженные рибосомами (порядка 10 и больше) формируют трёхмерные левозакрученные спирали с 4-5 рибосомами на каждый виток. Такие полирибосомы являются «спящими», то есть неспособными синтезировать белок, прочитывая последовательность мРНК. В нашей лаборатории было показано, что различные формы полирибосом могут переходить друг в друга, были описаны различные промежуточные формы полисом. Не смотря на обилие феноменов, описанных для полирибосом, актуальными остаются вопросы о том, какое значение для клетки имеют те или иные формы полирибосом, чем обусловлены трансформации разных типов полисом друг в друга? Случайны ли эти процессы и обусловлены лишь физико-химическими закономерностями? Или же всё это – часть ещё не изученного уровня регуляции экспрессии генов? Ответы на эти вопросы исследователи искали с помощью классических методов биохимии и электронной микроскопии, в том числе криоэлектронной микроскопии и томографии. Чтобы получить структурную и функциональную информацию о функционировании полирибосом мы применили техники микроскопии сверхвысокого разрешения, позволяющие достичь пространственного разрешения 20 нм: STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) и PALM (photoactivated localization microscopy). В качестве тестовых объектов были выбраны виментиновые филаменты и одиночные прокариотические рибосомы из *E.coli*. Нами впервые были визуализированы рибосомы и субчастицы в их составе. В дальнейшем мы применили метод STORM для визуализации полирибосом, сформированных в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы. Рибосомы метили флуоресцентными производными сукцинимидного и малеимидного эфиров. Кроме того, нами была опробована иная стратегия, позволившая получить более интерпретируемый сигнал от каждой рибосомы в составе полисомы – использование фотоактивируемых флуоресцентных белков в качестве генетически-кодированной метки.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАНАЛИРОВАНИЯ КИЛОВОЛЬТНЫХ ЭЛЕКТРОНОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ ЖИДКИХ ОБЪЕКТОВ

## USE OF CHANNELING OF KILOVOLT ELECTRONS TO STUDY THE STRUCTURE OF LIQUID OBJECTS

*Шипко М.Н.<sup>1</sup>, Сибирев А.Л.<sup>2</sup>, Масленникова О.М.<sup>3</sup>, Степович М.А.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина, Иваново, E-mail: michael-1946@mail.ru

<sup>2</sup>Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, E-mail: alsibirev@mail.ru

<sup>3</sup>Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, e-mail: o.m.maslennikova@gmail.com

<sup>4</sup>Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, Калуга, E-mail: m.stepovich@rambler.ru

Интерес к изучению каналирования низкоэнергетических электронов через биологические среды и упорядоченные коллоидные растворы связан с возможностью их использования для выяснения механизмов кооперативных взаимодействий, вызывающих структурную организацию таких сред на микро- и макроуровнях. Зачастую такие среды представляют совокупность ансамблей, формирующих структурные элементы с различным позиционным порядком [1]. Весьма удобными объектами для изучения процессов каналирования являются мицеллярные водные растворы поверхностно-активных веществ, которые являются прекрасными моделями для исследования процессов ассоциации, диссоциации и гидратации молекулярных комплексов в жидкокристаллических и биологических средах. Однако в понимании строения и особенностей ближнего порядка упорядоченных растворов остаётся много вопросов. Ответы на многие из них могут быть получены при использовании методов газоразрядной визуализации (ГРВ) [2], использование которых целесообразно для изучения и объяснения ориентационных эффектов, обусловленных каналированием низкоэнергетических (9 кэВ) электронов в жидких средах. Экспериментальное изучение и анализ имеющихся данных каналирования низкоэнергетических электронов через биологические среды и упорядоченные коллоидные растворы и составляет предмет рассмотрения в настоящей работе.

Картины углового распределения электронов, прошедших через исследованные водные среды, изучались по вызванному ими и регистрируемому в ГРВ камере скользящему газовому разряду, и представляли собой

совокупность максимумов, соответствующих направлениям облегченного движения электронов (каналов). Учитывая, что эти каналы совпадают с направлениями плотно упакованных рядов или плоскостей, формируемых молекулярными комплексами в среде, по количеству максимумов, расстоянию между ними, их ширине, разработана методика оценки особенностей позиционного порядка в расположении таких комплексов – в т.ч. обнаруженных ранее в жидких кристаллах [3, 4] и компонентах крови [5].

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00271), гранта РФФИ и правительства Ивановской области (проект № 18-43-370012) и гранта РФФИ и правительства Калужской области (проект № 18-41-400001).

1. Israelachvili J.M. Thermodynamic and Geometric Aspects of Amphiphile Aggregation into Micelles, Vesicles and Bilayers, and the Interactions Between them. In: Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions / Eds. V. Degiorgio and M. Corti. Amsterdam: Noth Holland, 1985, p. 24-58.

2. Коротков К.Г. Принципы анализа в ГРВ биоэлектрографии. – СПб.: Реноме, 2007. 286 с.

3. Шипко М.Н., Усольцева Н.В., Сибирев А.Л., Масленникова О.М., Смирнова А.И., Степович М.А., Габдулсадыкова Г.Ф. // Жидкие кристаллы и их практическое использование. 2018. Т. 18. № 1. С. 47-52. [http://nano.ivanovo.ac.ru/journal/articles/910065article\\_2018\\_18\\_1\\_47-54.pdf](http://nano.ivanovo.ac.ru/journal/articles/910065article_2018_18_1_47-54.pdf)

4. Шипко М.Н., Степович М.А., Сибирев А.Л., Усольцева Н.В., Масленникова О.М., Смирнова А.И. // Известия РАН. Серия физическая. 2018. Т. 82. № 8. С. 1058-1062. <https://elibrary.ru/item.asp?id=35444134>

5. Stepovich M.A., Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L. and Chrishtop V.V. // Journal of Cardiology and Cardiovascular Therapy. March 2018. Vol. 9. Issue 4. P. 555770. (4 p.). <https://juniperpublishers.com/jocct/JOCCT.MS.ID.555770.php>

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ В БИ- И ТРИФЕРМЕНТНЫХ ЦЕПЯХ СОПРЯЖЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ С ЛЮЦИФЕРАЗОЙ В УСЛОВИЯХ, ПРИБЛИЖЕННЫХ К ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ

### MODEL OF ENZYME COOPERATION IN DOUBLE- AND TRIPLE ENZYME SYSTEMS COUPLED WITH LUCIFERASE UNDER IN VIVO-LIKE CONDITIONS Dihydroquercetin Antioxidant Properties

Сутормин О.С., Суковатая И.Е.<sup>1</sup>, Кратасюк В.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск, OSutormin@sfu-kras.ru

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН, Красноярск, valkrat@mail.ru

В последние годы актуальной задачей современной биохимии является адекватность использования накопленных знаний о механизмах работы ферментативных систем в буферных растворах (*in vitro*) для понимания их функционирования в гиалоплазме клетки (*in vivo*). Сложность адаптации полученных знаний в *in vitro*-моделях заключается в том, что при моделировании условий функционирования ферментов внутри живой клетки большинство положений классической химии не реализуются в полной мере. Такие нестыковки между *in vitro* и *in vivo*-системами связаны с тем, что гиалоплазма клетки представляет собой сложную матрицу густой смеси растворенных в ней молекул и веществ, составляющих 40% от общего клеточного объема, то есть внутриклеточная среда не является гомогенной. В то же время, анализ публикаций, касающихся исследования влияния физико-химических характеристик гиалоплазмы на кинетические характеристики ферментативных реакций [1], говорит о том, что современные исследователи делают основной акцент на определение активности отдельных ферментов в присутствии каких-либо химических веществ, моделирующих внутриклеточные параметры. В публикациях никак не обсуждаются принципы и тонкости перехода от исследований механизмов функционирования моноферментных реакций во внутриклеточных условиях к исследованию полиферментных реакций в *in vivo*-моделях. С этой проблемой современное научное общество должно столкнуться, так как представление о том, что ферменты внутри живой клетки функционируют в виде сопряженных полиферментных систем не является новым. Другой не менее актуальный вопрос состоит в понимании того, какие из ферментов метаболической цепи во внутриклеточных условиях взаимодействуют в комплексе друг с другом. Поэтому исследования полиферментных цепей в условиях, моделирующих внутриклеточные, является актуальным.

Обозначенные выше проблемы в полной мере относятся к метаболическим процессам, происходящим в клетках светящихся бактерий. При этом выбор цепей сопряжения с люциферазой как объекта исследования обусловлен многими их преимуществами перед несветящимися ферментативными системами, что облегчает и ускоряет исследования влияния цитоплазмы на взаимодействие ферментов в метаболических цепочках [2]. Несмотря на имеющиеся возможности и преимущества сопряженных биолюминесцентных ферментативных систем, изучения полиферментных цепей с использованием исследовательского подхода для решения проблемы, касающейся представления о функционировании полиферментных систем внутри живой клетки, не



проводилось. При этом возможно решение еще одной актуальной задачи – доказательства образования комплексов взаимодействующих ферментов как фрагментов метаболической цепи.

В работе представлена экспериментальная модель эффективного взаимодействия ферментов в условиях, приближенных к внутриклеточным, на примере би- и триферментных цепей сопряжения ферментов с бактериальной люциферазой. В качестве биферментной системы была использована ферментативная система - НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза, в качестве триферментной системы - лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза. Условия приближенные к внутриклеточным моделировались с помощью добавления в реакционную среду различных концентраций природных осмолитов - глицерина и сахарозы. Эффективность взаимодействия ферментов в полиферментных цепочках оценивалась по термостабильности сконструированного ферментативного комплекса, определяющей степень термодинамической кооперации ферментов в системе [3]. Эффект кооперативности должен приводить к увеличению устойчивости ферментативных систем к каким-либо неблагоприятным условиям, например, денатурирующим температурам или рН.

Показано, что сконструированная экспериментальная модель эффективного взаимодействия ферментов может быть использована в качестве инструмента позволяющего получить информацию о внутриклеточном функционировании полиферментных систем. Триферментная биолюминесцентная система является искусственно по отношению к живой клетке – внутриклеточные условия не приводят к увеличению эффективности работы ферментов в полиферментной системе. Биферментная биолюминесцентная система характеризуется увеличением эффективности взаимодействия в условиях, приближенных к внутриклеточным.

1. Poggi G. et al. Macromolecular crowding and the steady-state kinetics of malate dehydrogenase // *Biochemistry*. 2015. Vol. 54. P. 260 - 267.
2. Kudryasheva N. et al. Effect of quinones and phenols on the triple-enzyme bioluminescent system with protease // *Luminescence*. 2003. Vol. 18. P. 224 - 228.
3. Lodish H. et al. *Molecular Cell Biology*. - New York: Freeman, 2000, 1247 pp.

## **ОПТИЧЕСКИЙ ПИНЦЕТ КАК ИНСТРУМЕНТ НЕИНВАЗИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕОПЛАЗМЫ ЖИВЫХ ООЦИТОВ МЫШИ**

### **OPTICAL TWEEZERS AS A TOOL FOR NON-INVASIVE PROBING OF NUCLEOPLASM IN LIVING MICE OOCYTES**

*Сырчина М.С., Шахов А.М., Айбуш А.В., Осыченко А.А., Надточенко В. Н.*

ФИЦ ХФ РАН, г.Москва, e-mail: wrongclue@gmail.com

В данной работе представлены данные, касающиеся вязкоупругих свойств нуклеоплазмы GV-ооцитов мышей линии C57Bl/СВА, возрастом 5-9 недель, полученные при помощи оптического пинцета, как неинвазивного инструмента. Среди множества GV-ооцитов, нами были особенно отмечены клетки, обладавшие NSN-конфигурацией ядра. Такой тип распределения хроматина является наиболее «гомогенным», соответствует высокому уровню транскрипционной активности ядра и чрезвычайно низкому потенциалу к развитию (развитие зиготы, полученной из NSN-ооцита, прекращается на стадии двух клеток).

Контролируемое передвижение ядрышка, выступавшего в роли микрозонда, осуществлялось посредством оптического захвата. При включении оптического пинцета, ядрышко попадало в оптическую ловушку, после чего в системе вызвали возмущение – производили как малые, так и значительные смещения ядрышка. После выключения пинцета наблюдали за релаксацией всей системы. Разработанное нами программное обеспечение позволило проследить за динамикой движения ядрышка в нуклеоплазме и извлечь характерные времена, свидетельствующие о неординарных свойствах нуклеоплазмы.

Рассмотрение подобной системы представляет особый интерес в связи с тем, что ядрышко оказывается интегрированным в полимерную матрицу нуклеоплазмы с неоднородным составом и сложной организацией. Выявление уникальных физико-химических свойств «мягких материалов», составляющих основу комплексных биологических систем способствует расширению представлений об их функционировании и реализации ключевых биологических процессов: клеточной дифференцировки, реализации биологической информации. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-33-01080

**ЭМИССИОННАЯ ИК-ФУРЬЕ СПЕКТРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ****FT-IR EMISSION SPECTROSCOPY FOR STUDIES OF BIOLOGICAL MOLECULES***Терпугов Е. Л.*

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, el\_terpugov@rambler.ru

В последнее время развитие новых методов и техники для изучения и диагностики биологических объектов на молекулярном уровне происходит наиболее быстро. При этом отметим все возрастающую роль ИК-спектроскопии (ИКС) в структурных исследованиях сложных биологических молекул [1]. Возможности использования ИКС для изучения биообъектов *in situ* создают пути для понимания молекулярной организации, кинетики протекания биологических реакций, а также механизмов функционирования живых систем, что не может быть достигнуто с помощью спектроскопии электронных и вращательных переходов. Полосы ИК-поглощения появляются в результате переходов между колебательными подуровнями основного электронного состояния и связаны с изменением дипольного момента, правилами отбора, симметрией молекул и степенью ангармоничности колебаний. Спектральные характеристики (положение максимума, полуширина и интенсивность полос) индивидуальных молекул зависят от их строения, массы составляющих атомов, жесткости химических связей и особенностей распределения внутримолекулярных зарядов. Поэтому ИК-спектроскопия отличается высоким уровнем индивидуальности, что и определяет ее особую ценность в этих исследованиях.

В то же время, вода, как вездесущий растворитель для биологических систем, представляет собой серьезную помеху в адсорбционных измерениях, которая легко преодолима в случае эмиссионных измерений. Это делает эмиссионную ИК-Фурье спектроскопию (ИКЭС) идеальной для исследования большого числа молекулярных событий в живых биологических системах. Применение ИКЭС и связанный с ней метод селекции по длине волны возбуждения является мощным инструментом для мониторинга организации и динамики природных зондов внутри белков или мембран.

ИК-эмиссия возбуждается светом, близким по составу к солнечному свету и не является термоэмиссией. Ранее было показано, многочастотный (широкополосный) видимый свет помимо собственной флуоресценции может возбуждать в пигментах стимулированное ИК-излучение по механизму комбинационного типа [2, 3]. В этом случае, как и при ВКР, ИК-эмиссия наблюдается с теми же самыми резонансными условиями, которые имеют место при смешивании оптических волн в нелинейной среде [4-6]. Возможность процесса нелинейного оптического смешивания при использовании только некогерентного источника была показана еще в 1965 году [7]. Хотя вероятность такого процесса не столь велика, особенно при использовании низкоинтенсивных источников света, чувствительность современных ИК-Фурье спектрометров вполне достаточна, чтобы надежно регистрировать спектры ИК-эмиссии в этих условиях. Спектры стимулированной ИК-эмиссии могут быть получены в нерезонансных и резонансных условиях. В последнем случае можно получить значительное усиление сигнала (более чем в 10 раз) [2,3]. Извлекаемая из спектров ИК-эмиссии структурная информация аналогична информации, получаемой на основании спектров ИК-поглощения, поскольку в том и другом случае наблюдаются те же самые колебательные моды.

В данной работе показано, что эмиссионная ИК-Фурье спектроскопия имеет большой потенциал в изучении компонентного состава и структуры светочувствительных молекул, таких как, например, хлорофилл и каротиноиды в интактных листьях растений табака *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun*. Результаты изучения особенностей релаксационной динамики этих молекул в процессе фотовозбуждения показали, что ИКЭС имеет также диагностический потенциал для дискриминации генно модифицированных аналогов *in vivo*.

Автор выражает свою искреннюю благодарность И.А. Митрохину за предоставленные образцы растений табака.

1. Kong J.Yu.S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structure // Acta Biochim Biophys Sin. 2007. Vol. 39. P. 549.
2. Gagarinov A.G. et al., Stimulated infrared emission all-trans retinal and wild-type bacteriorhodopsin under cw optical pumping: studies by FT-IR spectroscopy // Vibrat.Spectros. 2006. Vol. 42. P. 231.
3. Terpugova S.E., et al. Light-induced mid-infrared emission of liquid carbon tetrachloride and benzene // Am. J. Analyt. Chem. 2015. Vol.6. P. 731.
4. Shen Y.R. The Principles of Nonlinear Optics. J. Wiley & Sons. NY. 1984.
5. Akmanov S.A., Khokhlov R.V. Problems of Nonlinear Optics. Nauka Publ, Moscow. 1964.
6. de Martini F. Theory of the infrared generation by coherently driven molecular vibration // Appl. Phys. 1966. V.37. P.4503.
7. McMahon D.F., Franklin A.R. Nonlinear optical sum generation in ADP using only incoherent light // J. Appl. Phys. 1965. Vol. 36. P. 2073.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ДИАГРАММ СОСТОЯНИЙ И ГЛОБАЛЬНОЙ ПОДГОНКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАЛЬЦИЙ СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЛИЗОЦИМА ИЗ МОЛОКА СОБАКИ

### THE USE OF THE FREE METAL – TEMPERATURE ‘PHASE DIAGRAMS’ METHOD AND GLOBAL FITTING FOR STUDIES OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF $Ca^{2+}$ -BINDING CANINE MILK LYSOZYME

Хохлова Т.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ПушГЕНИ, г. Пушкино Московской области, aguttygm@gmail.com

<sup>2</sup>МГОУ, г. Москва

Металл-связывающие белки играют важную роль в биологических процессах. Способность связывать катионы может обеспечивать как выполнение основной функции белка, так и формирование и поддержание его структуры. Связывание катионов металлов может вызывать изменение термодинамических характеристик белка. В то же время изменение внешних условий (температуры, pH, концентрации катионов и др.) может приводить к изменению сродства белков к катионам. В эксперименте белок в зависимости от условий может находиться одновременно в различных состояниях, каждое из которых характеризуется своими термодинамическими параметрами тепловой денатурации и сродства к катионам. Для характеристики каждого отдельного состояния белка требуется использование специального подхода. Пермяковым С.Е. и Пермяковым Е.А. был разработан метод диаграмм состояний белка с одним центром связывания катиона металла в пространстве параметров «свободная концентрация катиона - температура» [1].

Использование данного метода для изучения металл-связывающих белков с одним сильным центром связывания катионов кальция коровьего альфа-лактальбумина и лошадиного лизоцима позволило получить термодинамические характеристики тепловой денатурации апо- и катион-насыщенных форм данных белков, а также истинные константы связывания катионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  [2] и селективность кальциевых центров белков по отношению к  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  [3].

Лизоцим из молока собаки (CML) и лизоцим из молока лошади (EQL) обладают сходной третичной структурой. Сравнение аминокислотных последовательностей этих лизоцимов выявляет большое сходство (83%, всего 22 различающихся остатка). На основании этого можно было бы предположить сходство термодинамических характеристик данных белков. Для исследования этого предположения были определены условия для проведения экспериментов.

Изучение pH-индуцируемых структурных переходов  $Ca^{2+}$ -загруженной формы CML методом собственной белковой флуоресценции показало, что структура белка стабильна в диапазоне величин pH от 7 до 8, выбранных для дальнейших исследований. Для получения апо-формы CML исследования проводились в присутствии 1 мМ ЭДТА.  $Ca^{2+}$ -насыщенная форма изучалась в присутствии 1 мМ кальция.

Исследование кальциевой зависимости термостабильности CML методом сканирующей калориметрии обнаруживает два тепловых перехода, один из которых чувствителен к уровню кальция в растворе. Низкотемпературный тепловой переход апо-формы CML описывается моделью двух состояний, при величине температуры полуперехода, равной 41,0°C. Это существенно выше температуры середины теплового перехода апо-формы EQL (25,3°C). Величина энтальпии Вант-Гоффа  $\Delta H_{VT}$  CML (17,5 Дж/г) существенно выше аналогичной величины EQL (9,3 Дж/г). В то же время изменение удельной теплоёмкости  $\Delta C_p$  лизоцима молока собаки даёт величину ниже, чем у лизоцима молока лошади (0,07 Дж/г·К против 0,29 Дж/г·К).

Исследование сродства CML к катионам кальция проводили методом собственной флуоресценции белка в диапазоне температур от 20°C до 70°C. Описание всего набора экспериментальных данных по эффективным величинам равновесных констант связывания кальция и температурам полуперехода кальций-чувствительного теплового перехода CML проводили методом диаграмм состояний, в рамках простейшей схемы переходов между четырьмя состояниями белка. Величина микроскопической равновесной константы связывания кальция нативной формой CML составила  $(2,5 \pm 1,5) \times 10^7$  М, тогда как у EQL она составляет  $(4,3 \pm 0,5) \times 10^6$  [2].

Таким образом, несмотря на большую гомологию аминокислотных последовательностей обоих лизоцимов и практически идентичную третичную структуру, лизоцим молока собаки демонстрирует большую термостабильность и более высокое сродство к катионам кальция по сравнению с лизоцимом молока лошади.

1. Permyakov, S.E., and Permyakov, E.A. The use of the free metal-temperature 'phase diagrams' for studies of single site metal binding proteins. // *Protein J*, 2007, **26**: 1-12
2. Permyakov, S.E., Khokhlova, T.I., Nazipova, A.A., Zhadan, A.P., Morozova-Roche, L.A., and Permyakov, E.A. Calcium-Binding and Temperature Induced Transitions in Equine Lysozyme: New Insights From the pCa-Temperature ‘Phase Diagrams’ // *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006. **65**: 984–998.
3. Permyakov, S.E., Khokhlova, T.I., Uversky, V.N., and Permyakov, E.A. Analysis of  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  selectivity in alpha-lactalbumin and  $Ca(2+)$ -binding lysozyme reveals a distinct  $Mg(2+)$ -specific site in lysozyme. // *Proteins*, 2010, **78**: 2609-2624.

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОЛУШИРИНЫ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ В ЛИПИДАХ И БЕЛКАХ, ВЫЗВАННЫХ ПОВЫШЕНИЕМ ДАВЛЕНИЯ**

**A THEORETICAL ASSESSMENT OF THE HALF-WIDTH OF CONFORMATIONAL TRANSITIONS IN LIPIDS AND PROTEINS CAUSED BY AN INCREASE IN PRESSURE**

*Хусаинова<sup>1</sup> Р.С., Потехин<sup>2</sup> С.А.*

<sup>1</sup>*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пуццино, Московская обл.*

<sup>2</sup>*Институт белка РАН, Пуццино, Московская обл., E-mail: spot@vega.protres.ru*

Существенное увеличение количества статей по влиянию высокого давления на самые разные биохимические процессы отражает растущий интерес к тем возможностям, которые открывает это направление науки [1].

В 2007-2009 гг. в Институте белка РАН совместно с Институтом физики высоких давлений им. Л.Ф. Верещагина РАН был разработан и изготовлен уникальный сканирующий микрокалориметр, способный работать при давлениях до 6000 атмосфер [2]. Наши первые экспериментальные работы по микрокалориметрии высокого давления на липидах [3-4], белках [5-6] и модельных полимерах [7-8] показали перспективность этого направления исследований [9]. Но, для того чтобы ясно себе представлять, как могут меняться термодинамические параметры того или иного процесса под воздействием давления и какую термодинамическую информацию можно извлечь из полученных зависимостей, необходимо, в частности, проанализировать поведение простейших термодинамических моделей в той или иной степени отражающих реальные конформационные переходы в макромолекулах. В частности, ранее нами был проведен анализ последствий воздействия высокого давления на термотропные конформационные переходы (например, денатурацию биополимеров) с использованием равновесной модели перехода между двумя состояниями [10]. Было показано, как будут меняться основные термодинамические функции перехода с ростом давления и от чего зависят эти изменения. Была выведена формула, определяющая температуру перехода от давления.

Предлагаемая новая работа является продолжением этой серии и посвящена теоретической оценке полуширин переходов под воздействием давления. Анализ выполнен в рамках модели перехода между двумя состояниями. Показано, что полуширина определяется в основном изменением (скачком) объема при переходе. Получена формула, по смыслу подобная формуле Вант Гоффа для полуширины переходов, вызванных ростом температуры. Формула позволяет оценить эффективное изменение объема для одностадийного перехода под воздействием давления по величине его полуширины.

Выполненные оценки показывают, что переходы гель-жидкий кристалл фосфолипидов имеют полуширину порядка нескольких мегапаскаль (десятки атмосфер), в то время как у белков эта величина приблизительно в 100 раз больше и составляет сотни мегапаскаль (несколько тысяч атмосфер). Показано, что при денатурации белков под воздействием давления скачок объема может существенно меняться на интервале от начала до конца перехода.

1. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology // II. Proceedings of the 2nd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology. Dortmund, September 16–19. Roland Winter (Ed.). Springer, 2002.*
2. *Senin A.A. et al. High-pressure differential scanning microcalorimeter // Rev. Sci. Instrum. 2016. V. 87. P. 034901.*
3. *Potekhin S.A. et al. Thermodynamic invariants of gel to the liquid-crystal 1,2-diacylphosphatidylcholines transition // Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes) 2011. V. 1808. P. 1806.*
4. *Potekhin S.A. et al. Thermodynamics of the gel to liquid crystal 1,2-diacylphosphatidylcholines transition High-pressure microcalorimetry // Thermochim. Acta 2013. V. 560. P. 17.*
5. *Potekhin S.A. et al. High pressure stabilization of collagen structure // Biochim. Biophys. Acta (Proteins and Proteomics) 2009. V. 1794. P. 1151.*
6. *Yegorov A.Y., Potekhin S.A. Moderate pressure has no distinct impact on hydrophobic hydration of proteins // Thermochim. Acta 2015. V. 610. P. 10.*
7. *Grinberg V.Y. et al. Energetics of phase separation in aqueous solutions of poly(vinyl methyl ether) // Polymer 2016. V. 87. P. 283.*
8. *Grinberg V.Y. et al. Energetics of poloxamer micellization at normal and high pressures // Polymer. 2018. V. 138. P. 288.*
9. *Potekhin S.A. High Pressure Scanning Microcalorimetry – A New Method for Studying Conformational and Phase Transitions // Biochemistry (Moscow) 2018. V. 83. P. S134.*
10. *Potekhin S.A. et al. A Thermodynamic Analysis of Two State Transitions under High Pressure: Theoretical Considerations // Biophysics 2015. V. 60. P. 687.*

## МЕХАНИЧЕСКИЕ МИКРОВИБРАЦИИ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА

## MECHANICAL MICROVIBRATIONS OF THE HUMAN BODY

**Шабанов Г.А., Припатинская Е.А., Лебедев Ю.А., Рыбченко А.А.**

Научно-исследовательский центр «Арктика» ДВО РАН, г. Владивосток, Магадан,

E-mail: neurokib@mail.ru

Понятие «вибрация» является синонимом понятия «механическое колебание». Любая живая система от клеточных органелл (ядро, хромосомы, клеточная мембрана) до клеток тканей (эритроциты, капилляры, сосуды, мышцы и пр.) являются источниками механических колебаний (от инфра низких до ультра высоких частот). Это позволяет считать колебательные процессы одним из основных проявлений жизни. Вибрационная чувствительность принадлежит к самым древним видам чувствительности. Очевидно, что на ее базе произошло выделение слуховых и тактильных ощущений. Вибрационная чувствительность является одной из наиболее глобальных форм отражения связей человеческого организма с самыми разнообразными воздействиями внешней среды. Нервные клетки, эпителиальные клетки, мышечные волокна, способны непосредственно, без участия органов слуха, воспринимать звуковые раздражения и вибрации.

В 2002 году Фроловым К.В. был разработан «миотремограф» и были зафиксированы и измерены биологические микровибрации тела человека связанные преимущественно с сокращениями миофибрилл скелетной мускулатуры. Мощность микровибраций в зависимости от состояния организма полученных на миотремографе: в условиях максимальной физической нагрузки до 1800 усл. ед., стресса до 1200 ед, покоя – до 370 ед, истощения организма до 180 ед, смерть – 0 ед. Делается вывод что биологические микровибрации – важнейший транспортный ресурс живых организмов и катализатор обмена веществ, важнейший компонент целостности и условие жизнедеятельности организма. Согласно гипотезе А.М. Halliday и J.W.T. Redfearn (1956), мышечный аппарат в условиях целостного организма рассматривается как некий сервомеханизм, имеющий обратную связь с мозжечком. Вибрации мышечных волокон контролируются центральной нервной системой. Известно, что скелетная мускулатура при увеличении нагрузки излучает микровибрации в трех спектральных диапазонах – 100-150, 140-210, 180-300 Гц. При расслаблении мышц частота снижается до 30-100 Гц.

Источниками вибраций в висцеральной сфере организма являются спонтанные авторитмические режимы свойственные большинству внутренних органов. Эти эндогенные авторитмы является основной функциональной характеристикой авторитмически работающих висцеральных систем. Базовые ритмы пейсмекеров внутренних органов занимают полосу инфранизких частот от единиц Гц до единиц колебаний в минуту.

В покое, наиболее мощным излучателем микровибраций является голова и головной мозг человека. Оценку функционального состояния организма посредством регистрации микровибраций головы осуществил В.А. Минкин. Микровибрации лица выделялись при спектральном анализе обычной киносъемки. Автор рассматривает этот феномен как проявление вестибулярного рефлекса [1]. В работе [2] с помощью пьезоэлектрических датчиков были обнаружены виброакустические сигналы с поверхности скальпа головы человека, и по схожести с классической ЭЭГ, эти сигналы названы акустоэнцефалограммой (АЭГ). В наших исследованиях, более детальное изучение этого явления, с корреляцией огибающих спектра ЭЭГ и АЭГ, проведением функциональных проб с закрытыми-открытыми глазами, фотостимуляцией на разных частотах, позволили сделать вывод о тесной связи АЭГ с деятельностью центральной нервной системы. Рассматривались механизмы генерации микровибраций в центральной нервной системе как результат взаимодействия процессов нейроглиального метаболизма с механическими колебаниями мышечных стенок окружающих микрососудов. В отличие от регистрации ЭЭГ, регистрация микровибраций головного мозга надежно осуществима в диапазоне от 0,1 до 27 Гц. Создана технология регистрации спектра акустического поля головного мозга «РС АЭГ-01» [3]. Микровибрации головного мозга мы рассматриваем как древнейший, очень надежный, относительно скоростной канал связи активирующей системы мозга со всеми без исключения клетками и структурами организма. Вибрации в таком диапазоне частот распространяются по всему телу практически без затухания.

1. Минкин В.А. Виброизображение. СПб.: Реноме, 2007. - 108с.
2. Миргородский В.И., Герасимов В.В., Пешин С.В. Обнаружение новых акустических сигналов // Акустический журнал. – 2014. – Т. 60, №4 – С. 437-442.
3. Шабанов Г.А., Лебедев Ю.А., Рыбченко А.А. и др. Исследование спектра акустического поля головного мозга человека// Вестник СВНЦ ДВО РАН. - 2017, №3, - С.115-121.

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КАНАЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ СОСТАВЛЯЮЩИХ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ОКСИДАНТНОГО СТРЕССА**

**APPLICATION OF THE CHANNELING METHOD TO DETERMINE CHANGES IN BLOOD COMPONENTS UNDER OXIDATIVE STRESS**

**Криштон В.В., Сибирев А.Л.<sup>1</sup>, Масленникова О.М.<sup>2</sup>, Степович М.А.<sup>3</sup>, Шипко М.Н.<sup>4</sup>**

Ивановская государственная медицинская академия, Россия, E-mail: chrishtop@mail.ru

<sup>1</sup>Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, E-mail: alsibirev@mail.ru

<sup>2</sup>Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, e-mail: o.m.maslennikova@gmail.com

<sup>3</sup>Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, Калуга, E-mail: m.stepovich@rambler.ru

<sup>4</sup>Ивановский государственный энергетический университет им. Ленина, Иваново, E-mail: michael-1946@mail.ru

Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе заболеваний, обусловленных разрушением биологически значимых молекул (липидов, белков, нуклеиновых кислот). Сложившиеся представления об окислительном стрессе сформированы на данных об изменении проницаемости клеточных мембран, степени регуляции клеточных реакций, окислении митохондриальной ДНК, полученных при помощи косвенных методов. Частично такая ситуация связана со сложностью использования физических методов в медико-биологической практике из-за высокой чувствительности биологических объектов к электромагнитным излучениям, искажающим данные о реальном состоянии биологических систем. Одной из возможностей изучения конформационных изменений белков клеточных мембран, а также межклеточных взаимодействий является изучение процессов каналирования низкоэнергетических электронов через биологические среды. В настоящей работе продолжено изучение [1] возможностей использования каналирования электронов для определения характера изменения позиционного порядка молекулярных комплексов в цельной крови и её компонентах (плазме, эритроцитарной массе, плазме, обогащённой тромбоцитами) в условиях оксидантного стресса. Для моделирования оксидантного стресса в пробирки с цельной кровью подопытных крыс или её компонентами вносили 0,5% раствор перекиси водорода в соотношении 5:1. Для изучения особенностей надмолекулярной организации крови использовали параметры углового и энергетического распределения каналируемых электронов с помощью прибора ГРВ-камера и с использованием программы обработки результатов GDV Scientific Laboratory.

Картины углового распределения каналированных электронов представляли совокупность максимумов, соответствующих направлению облегчённого движения электронов (каналов). Наиболее заметные изменения в параметрах углового распределения электронов были обнаружены после моделирования оксидантного стресса для плазмы крови и плазмы, обогащённой тромбоцитами. Для плазмы, обогащённой тромбоцитами, количество каналов уменьшается после стресса с четырёх до одного, для плазмы – с шести до четырёх. При этом существенно уменьшаются ширина и интенсивность максимумов на картине углового распределения электронов, указывающие на изменение позиционного порядка в расположении молекулярных комплексов и характера взаимодействия каналируемых электронов со стенками каналов. Это согласуется с данными исследований энергетического распределения электронов до и после оксидантного стресса. Для плазмы крови при развитии окислительного стресса наблюдается отчётливый сдвиг максимумов распределения в сторону малых энергий электронов, что свидетельствует об ухудшении их транспорта через указанный компартамент крови. Воздействие оксидантного стресса на обогащённую тромбоцитами плазму сопровождается практически полным разрушением эффекта каналирования и появлением на кривой энергетического распределения одиночного максимума, соответствующего низким значениям их энергий. В то же время, на картине энергетического распределения электронов, каналируемых через эритроцитарную массу, наблюдается сдвиг максимумов в сторону повышенных значений энергии. Выявленные изменения энергетических параметров каналируемых электронов через цельную кровь и её компоненты в условиях оксидантного стресса можно объяснить деструктивными изменениями белковых молекул (ферментов) в их четвертичной структуре. Изменение картины каналирования электронов в суспензии эритроцитов свидетельствует об изменении зарядового состояния мембран эритроцитов, ускоряющих электроны. Полученные результаты указывают на возможность применения метода каналирования для оценки биологических эффектов, наблюдаемых в живых тканях в условиях оксидантного стресса.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований и правительства Ивановской области (проект № 18-43-370012) и гранта РФФИ и правительства Калужской области (проект № 18-41-400001).

1. Stepovich M.A., Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L. and Chrishtop V.V. // Journal of Cardiology and Cardiovascular Therapy. March 2018. Vol. 9. Issue 4. P. 555770. (4 p.).

<https://juniperpublishers.com/jocct/JOCCT.MS.ID.555770.php>

## УСТАНОВКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЗАРЯЖЕННОГО НАНОАЭРОЗОЛЯ НА ЛИПИДНЫЙ МОНОСЛОЙ

### EXPERIMENTAL SETUP FOR THE STUDY OF AN ACTION OF CHARGED NANOAEROSOL ONTO THE LIPID MONOLAYER

*Шляпников Ю.М., Канев И.Л., Шляпникова Е.А., Малахова Е.А., Морозов В.Н.*

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, shlyapnikov@online.stack.net

Фундаментальная задача исследования - смоделировать условия первичного контакта наноаэрозольных лекарств с липидным слоем на поверхности лёгочных альвеол с целью выявления факторов, контролирующую поведение таких частиц на поверхности сурфактанта и проникновение через его слой в условиях, близких к физиологическим. С этой целью разработана установка для электрораспыления заряженного наноаэрозоля на поверхность монослоев лёгочного сурфактанта, нанесённых на микрокапли воды, расположенные на двух цилиндрических пьедесталах с острыми краями. Площадь поверхности капли в  $\sim 1 \text{ см}^2$  позволяет использовать для электрораспыления низкие концентрации веществ и получать частицы с размерами 3-20 нм. Для анализа данных разработан специальный алгоритм, измеряющий по фотографии капли поверхностное натяжение, объём и площадь поверхности капли. Измерение поверхностного натяжения в дифференциальном режиме с использованием двух пьедесталов позволяет исключить ошибки, связанные с непостоянными скоростью и эффективностью электрораспыления. Электрораспыление проводили с высоты 25 см для завершения формирования твёрдых наночастиц в результате высыхания и распада материнских капель. Установлено, что гидрофильные наночастицы быстро проникают в субфазу, по-видимому, за счёт диффузии через липидный монослой. Гидрофобные наночастицы способны длительное время оставаться на поверхности липидного монослоя. Так, при напылении на монослой ДПФХ или лёгочного сурфактанта БЛ наночастиц золота диаметром  $\sim 5 \text{ нм}$  с гидрофобным покрытием обнаружено их встраивание в липидный монослой, приводящее к изменению поверхностного давления. С помощью новой установки исследовано влияние периодического изменения площади поверхности липидного монослоя, имитирующего дыхание, на проникновение гидрофобных наночастиц золота и красителя судан III через монослой лёгочного сурфактанта БЛ. Показано, что периодические двукратные изменения площади поверхности монослоя сурфактанта с частотой 0,5 Гц не приводят к измеримому проникновению гидрофобных наночастиц, находящихся на поверхности липида, через монослой в субфазу. Таким образом, периодическое растяжение слоя сурфактанта в легких с высокой вероятностью не влияет на перенос материала гидрофобных наночастиц в лёгочную жидкость. Работа поддержана грантом РФФИ-офиМ №15-29-01180.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

### RAMAN SPECTROSCOPY AS A METHOD TO ANALYZE ENZYME KINETICS

*Брандт Н.Н., Чикишев А.Ю., Шпаченко И.Г.*

Физический факультет и Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Ленинские горы д.1, Москва, 119991 Россия  
Тел.: +7(495)939-11-06, e-mail: shpachenko@physics.msu.ru

Лазерная спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР) является мощным инструментом изучения молекулярной структуры вещества. Метод применим для соединений находящихся в любых агрегатных состояниях и при любых значениях pH и температуры. Спектры КР имеют хорошо известную область "отпечатков пальцев", которая может быть использована для идентификации конкретного соединения. Осуществляя контроль интенсивности одной или нескольких КР линий вещества с течением времени и используя тот факт, что интенсивность в КР спектре пропорциональна концентрации вещества в смеси, можно определить как изменяется концентрация во времени. Все это позволяет использовать метод КР спектроскопии для получения кинетических кривых (био)химических реакций и определения из их аппроксимации скоростных констант с высокой точностью.

Продемонстрирована возможность применения метода КР спектроскопии для определения скоростных констант ферментативных реакций на примере гидролиза 2,4-динитрофенил ацетата (ДНФА), катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином. В эксперименте по исследованию одной кинетики проводится измерение до 2000 КР спектров с шагом по времени 2–5 с. Предложена методика обработки массива колебательных спектров для расчета кинетических констант ферментативной реакции при заданных концентрациях компонент для любой линии в КР спектре. Применение методики для КР спектров смеси, измеренных в процессе протекания реакции

гидролиза ДНФА в присутствии и отсутствии фермента  $\alpha$ -химотрипсина, позволяет определить скоростные константы ферментативной реакции.

Показано, что метод позволяет определять относительную и абсолютную концентрацию активных молекул  $\alpha$ -химотрипсина, катализирующих гидролиз. Полученные методом КР спектроскопии данные можно использовать для сравнения степени чистоты и активности коммерчески доступных ферментов, которая может естественным образом уменьшаться при длительном хранении.

Обсуждаются преимущества и недостатки КР спектроскопии в сравнении с традиционными методами исследования химических реакций. На основании экспериментальных данных проводится анализ применимости приближенных моделей, традиционно используемых при описании кинетических кривых.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 18-32-00655.



## Оглавление

Пленарные доклады.....	3
ДАЛЬНИЙ ТРАНСПОРТ И МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ПЕРЕНОС ФОТОМЕТАБОЛИТОВ У ХАРОВОЙ ВОДОРОСЛИ .....	4
СИНХРОННОЕ МНОГОКАНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМНОГО ОТКЛИКА ОРГАНИЗМА ЛЮДЕЙ, ПОДВЕРГНУТЫХ ВНЕШНИМ ИНТЕРВЕНТНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ .....	5
НО СЕГОДНЯ В БИОФИЗИКЕ И БИОМЕДИЦИНЕ .....	6
НОВАЯ АФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДЛЯ ОДНОШАГОВОГО ВЫДЕЛЕНИЯ СЛОЖНЫХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В БОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВАХ И С ВЫСОКОЙ ЧИСТОТОЙ.....	7
КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛОФЕРМЕНТОВ С ЛИПИДАМИ МЕМБРАН, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ПРОГРАММИРУЕМУЮ СМЕРТЬ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ.....	8
ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ РАСТЕНИЙ: МЕХАНИЗМЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ.....	9
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. ОТ БИОФИЗИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ДО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ .....	9
ФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ СЛАБЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ С ЖИВОЙ КЛЕТКОЙ. ЭКСПЕРИМЕНТЫ И ТЕОРИЯ.....	10
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ МОРСКИХ ЭКОСИСТЕМ .....	11
КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОЦЕССОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА .....	12
ДНК - БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ АГЕНТОВ .....	12
НОВЫЕ ЭФФЕКТЫ МАЛОРАЗМЕРНЫХ МОДЕЛЕЙ СИСТЕМЫ «БИОСФЕРА-КЛИМАТ».....	13
ДИНАМИКА МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ВОДЕ.....	14
ПУТЕШЕСТВИЯ В «АНОМАЛЬНЫЕ ЗОНЫ» КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ. ....	16
КОДИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ИМПУЛЬСАМИ МЕДЛЕННОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ IN VITRO .....	16
РОБОТ И ЧЕЛОВЕК. ГДЕ НАХОДИТСЯ ПРЕДЕЛ ИХ СХОДСТВА? .....	17
ГЕНЕТИКА, БИОИНФОРМАТИКА, СИСТЕМНАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ БИОЛОГИЯ.....	18
ФОТОНИКА И БИОФОТОНИКА СИНГЛЕТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА.....	18
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОНАНОЭЛЕКТРОНИКИ .....	19
САМООРГАНИЗАЦИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ СИЛЬНО РАЗБАВЛЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ. ....	19
БИОФИЗИКА ДНК-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ ВАРИАНТОВ В ГЕНОМАХ ПОЗВОНОЧНЫХ .....	20
БИОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ .....	21
НЕЛИНЕЙНЫЙ АНАЛИЗ ВРЕМЕННЫХ РЯДОВ И ГИБРИДНЫЕ МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ, НЕПОСРЕДСТВЕННО ВКЛЮЧАЮЩИЕ ДАННЫЕ МОНИТОРИНГА ЭКОСИСТЕМ, КАК ПУТЬ ЗА ПРЕДЕЛЫ РЕДУКЦИОНИЗМА .....	21
ФЕМТОСЕКУНДНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СВЕРХБЫСТРЫХ ПЕРВИЧНЫХ РЕАКЦИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ: ФОТОСИСТЕМА 1 И РЕТИНАЛЬ СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ.....	22
СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ПРИНЦИПИАЛЬНОЕ РАЗЛИЧИЕ МЕЖДУ ИСКУССТВЕННЫМ И ЕСТЕСТВЕННЫМ ИНТЕЛЛЕКТОМ? .....	22

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМА МЕМБРАННОСВЯЗАННЫХ БЕЛКОВ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ НАРУШЕНИЯ СТРУКТУРНОЙ ЦЕЛОСТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ .....	23
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТНОЙ И РЕЦЕПТОРНОЙ ФУНКЦИИ Na,K-АТФазы .....	24
БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ.....	25
ОТ МОЛЕКУЛЫ К ЛЕКАРСТВУ: МЕДИЦИНСКАЯ БИОИНФОРМАТИКА IN SILICO .....	26
НЕЙРОВАСКУЛЯРНЫЕ СВЯЗИ: ФУНКЦИИ, ПРОБЛЕМЫ, МОДЕЛИРОВАНИЕ .....	27
МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ И МИКРОВОДОРОСЛЕЙ. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ, БРОУНОВСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ.....	28
БИФОТОХРОМНЫЕ ЦВЕТНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ: ФЕНОМЕН И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.....	29
МОДУЛЬНАЯ ТРАНСПОРТНАЯ ПЛАТФОРМА – ИНСТРУМЕНТ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ПРОЦЕССЫ В ОРГАНЕЛЛАХ ЖИВОЙ КЛЕТКИ .....	29
ХИРАЛЬНЫЕ ИЕРАРХИИ КАК ФИЗИЧЕСКАЯ ОСНОВА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР .....	30
МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ.....	31
ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫЕ ПОЛЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ.....	32
ПЕРСПЕКТИВЫ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ КОНСЕРВАЦИИ ОРГАНОВ .....	33
СТАБИЛЬНОСТЬ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК .....	34
БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ .....	34
РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ПОЛУЧЕНИЮ ЭНЕРГИИ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ.....	35
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР КОНФОРМАЦИОННО ПОДВИЖНЫХ МОЛЕКУЛ .....	36
ПРИРОДНЫЕ И ТЕХНИЧЕСКИЕ КОГНИТИВНЫЕ СИСТЕМЫ: В ЧЕМ ИХ РАЗЛИЧИЕ? .....	37
SPECTROSCOPY OF PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTERS UNDER HIGH HYDROSTATIC PRESSURE .....	38
Секция 1. Структура и динамика белков и их комплексов. ....	39
МОДЕЛЬ БРОУНОВСКОЙ ДИНАМИКИ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ЦИТОХРОМА С И ВОДОРАСТВОРИМОЙ ЧАСТИ ЦИТОХРОМА С1 В РАСТВОРЕ .....	40
КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТАХИКИНИНОВОГО ДЕКАПЕПТИДА СИАЛОКИНИНА I ..	41
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ NEF С АВСА1 И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ДЛЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ-ИНГИБИТОРОВ.....	42
ВРЕМЕННАЯ КИНЕТИКА РЕКОМБИНАЦИИ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В ПОЛНОСТЬЮ ГИДРАТИРОВАННОМ ФИБРОИНЕ ИНДУЦИРОВАННОМ УФ- ИЗЛУЧЕНИЕМ .....	43
ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОФОБНЫХ КЛАСТЕРОВ СЕРИЦИНА С ПОМОЩЬЮ ANS: СТАЦИОНАРНАЯ И ВРЕМЯ - РАЗРЕШЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ .....	44
КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА АДИПОКИНЕТИЧЕСКИХ НЕЙРОПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ТЕРМИТОВ .....	45
УРОВНИ ОРГАНИЗАЦИИ СТРУКТУРНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ .....	45
МИНИМАЛЬНЫЙ НАБОР СТАБИЛЬНЫХ БЛОКОВ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ .....	46
ФИЗИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ УСЛОВИЯ ФОРМИРОВАНИЯ ПРЕДОПРЕДЕЛЕННЫХ ЛОКАЛЬНЫХ КОНФОРМАЦИЙ БЕЛКА НА ПРИМЕРЕ В-ИЗГИБОВ .....	47

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ФАРМАКОФОРНЫХ МОДЕЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ .....	48
МЕТОД ФУРЬЕ-АНАЛИЗА В ИССЛЕДОВАНИЯХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР .....	49
ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЕННОСТЕЙ КИНЕТИКИ АГРЕГАЦИИ В РАСТВОРЕ ФИБРОИНА.....	50
ОСОБЕННОСТИ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ МИОЗИН СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА-С IN VITRO.....	51
СТЕРЕОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ SH3-ПОДОБНЫХ ДОМЕНОВ.....	52
РОЛЬ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЦИТОХРОМА C1 В ПРОЦЕССЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА МЕЖДУ ЦИТОХРОМАМИ C И C1.....	52
ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА И КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЫ АЛЛАТОСТАТИНА DIPPU AST7 .....	53
ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАИБОЛЕЕ СТАБИЛЬНОЙ УКЛАДКИ ПЕПТИДОВ ИЗ S1 И BGL2P В БИСЛОЯХ .....	54
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ТРИПЕПТИДОВ- ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА (АПФ).....	55
ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ОБРАБОТКИ ТИОЦИАНАТОМ КАЛИЯ И МОЧЕВИНОЙ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G С ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ .....	56
НОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ СБОРКИ ТУБУЛИНОВЫХ МИКРОТРУБОЧЕК .....	57
КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЫ АЛЛАТОСТАТИНА DIPPU AST6.....	58
АНАЛИЗ ВНУТРЕННЕ-НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ ОБЛАСТЕЙ $\alpha$ ЦДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА VirE2 .	59
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТ В ВОДНОЙ СРЕДЕ, ИССЛЕДОВАННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОЙ И КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ.....	60
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА КАЗЕИНКИНАЗЫ-1 ICSN .....	61
ИССЛЕДОВАНИЕ ФАЗОВЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ В БЫЧЬЕМ СЫВОРОТОЧНОМ АЛЬБУМИНЕ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ИОННОЙ СИЛЫ РАСТВОРА. ....	62
КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТРИТИЕВОЙ ПЛАНИГРАФИИ.....	63
МНОГОЧАСТИЧНОЕ БРОУНОВСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ФЕРРЕДОКСИНОМ И ЕГО БЕЛКОВЫМИ ПАРТНЕРАМИ .....	64
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ДЕФЕНЗИНА С МОДЕЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.....	64
ХИРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИФЕНИЛАЛАНИНОВЫХ ПЕПТИДНЫХ НАНОТРУБОК .....	65
АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ ТИОЛОВ КАК ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 .....	66
ДВА НОВЫХ ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРА $K_v$ КАНАЛА ИЗ АКТИНИИ NETERACTIS CRISPA: ВАРИАЦИИ МЕХАНИЗМА БЛОКИРОВАНИЯ .....	67
ДИНАМИКА ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СУПЕР- БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ПОВЕРХНОСТИ РАЗДЕЛА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ НА ПРИМЕРЕ ФАЗОВОГО РОСТА ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ПОПУЛЯЦИОННОЙ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ E.COLI .....	68
ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА DPS ESCHERICHIA COLI С МЕТАЛЛАМИ ПЕРЕХОДНЫХ ВАЛЕНТНОСТЕЙ.....	69
МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ ГТФ- И ГДФ-СВЯЗАННОГО ТУБУЛИНА.....	70
ФАРМАКОФОРНЫЙ ПОИСК СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ВОДОРОСЛЕВОГО РОСТА.....	71

ПРОТОН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЦЕНТРЫ С-КОЛЬЦА АТФ-СИНТАЗЫ: НЕЭМПИРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТАДИИ ПРОТОНИРОВАНИЯ И ФОРМИРОВАНИЯ ЗАКРЫТОЙ КОНФОРМАЦИИ.....	72
МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СВЯЗАННЫХ С КЛАСТЕРОМ ЗОЛОТА ПОЛИАМФОЛИТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ НА ЗАРЯЖЕННОЙ ЗОЛОТОЙ ПОВЕРХНОСТИ.....	73
ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛУТОРОИДАЛЬНЫХ ПОР В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МЕМБРАНАХ.....	74
РАЗРЕШЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ БРОМЕЛИНА С ПОМОЩЬЮ АДДИТИВНЫХ МОДЕЛЕЙ.....	75
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КИНЕТОХОРНОГО КОМПЛЕКСА NDC80 И МИКРОТРУБОЧКИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.....	76
ИССЛЕДОВАНИЯ ФАЗОВЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ В БИОПОЛИМЕРАХ С ПОМОЩЬЮ РЭЛЕЕВСКОГО И МАНДЕЛЬШТАМ-БРИЛЛЮЭНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА.....	76
ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА РЕГУЛИРУЕТ ПЕРЕДАЧУ СИГНАЛА ПО МОЛЕКУЛЕ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ.....	77
ЗНАКОПЕРЕМЕННАЯ ХИРАЛЬНОСТЬ КАК БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЗАКОНОМЕРНОСТЬ ИЕРАРХИЧЕСКОГО СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ В БЕЛКАХ И МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ.....	78
НИЗКОЧАСТОТНАЯ ИК-ФУРЬЕ И КР СПЕКТРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ ЭЛЕМЕНТОВ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛ БЕЛКОВ.....	79
ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ТИПОВ МУТАЦИЙ НА ПУТЬ СВОРАЧИВАНИЯ БЫЧЬЕЙ КАРБОКСИАНИДРАЗЫ Б.....	80
ВЛИЯНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ МОСТИКОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА НА ГИДРАТАЦИЮ ЕГО ПЕРЕХОДНЫХ И ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ.....	80
ЦИТОСКЕЛЕТ КАК СТРУКТУРНЫЙ УРОВЕНЬ ХИРАЛЬНОЙ ИЕРАРХИИ МАКРОМОЛЕКУЛ.....	81
МЕХАНИЗМ СПАСЕНИЯ МИКРОТРУБОЧЕК: СТОХАСТИЧЕСКОЕ СВОЙСТВО ДЕПОЛИМЕРИЗУЮЩЕГО КОНЦА ИЛИ СТРУКТУРНАЯ ПРЕДОПРЕДЕЛЕННОСТЬ.....	82
АНАЛИЗ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА.....	82
ФАРМАКОФОРНАЯ МОДЕЛЬ РАСПОЗНАВАНИЯ НИЗИНОМ ЛИПИДА II В БАКТЕРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ.....	83
ФАЗОВЫЕ ЭФФЕКТЫ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ОБЛАСТИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕМПЕРАТУР ПО ДАННЫМ МЕТОДА ЭПР СПИН-МЕТОК.....	84
ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА СТРУКТУРУ СЫВОРОТОЧНЫХ АЛЬБУМИНОВ В РАСТВОРЕ.....	85
РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО КАРДИОТОКСИНА S-ТИПА ИЗ ЯДА КОБРЫ N. NAJA.....	86
ЛОКАЛИЗАЦИЯ И МОРФОЛОГИЯ RML-ТЕЛЕЦ, ОБРАЗОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ИЗОФОРМАМИ RML, В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ U2OS.....	87
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА HOF1 С АКТИНОВЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ.....	87
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОЛЛАГЕНОВ ЖИВОТНОГО И РЫБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....	88
РОЛЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ЭФФЕКТЕ ВЯЗКИХ СРЕД С ГЛИЦЕРИНОМ И САХАРОЗОЙ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ РЕАКЦИЮ БАКТЕРИЙ.....	89
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С КАТЕХИНАМИ.....	90
ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ И ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ.....	91
ДИНАМИКА БИОКРИСТАЛЛИЗАЦИИ У БАКТЕРИЙ.....	92

ТРИ ДИНАМИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯ МИОЗИНА S1 ПО ДАННЫМ МЕТОДА СПИН-МЕТКИ В X- И W- ДИАПАЗОНАХ.....	93
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРЯМЫХ АНТАГОНИСТОВ С АНДРОГЕНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ ЧЕЛОВЕКА: ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ АНТИАНДРОГЕНОВ IN SILICO МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.....	94
КОМБИНАЦИЯ МЕТОДОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ВИРУСА ГРИППА А ДЛЯ ОЦЕНКИ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ.....	95
ВЛИЯНИЕ НАДФ+ НА СТАБИЛИЗАЦИЮ КОМПЛЕКСА ФД-ФНР. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.....	96
ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА КОМПЛЕКС БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТОЙ.....	97
ЗНАЧЕНИЕ ЛИЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ ЦИТОХРОМА С ДЛЯ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ЭТОГО БЕЛКА С КАРДИОЛИПИНОМ.....	98
ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОСТРОЕНИЮ НЕПРЕРЫВНОЙ МЕРЫ ХИРАЛЬНОСТИ МАКРОМОЛЕКУЛ.....	99
АБСОЛЮТНАЯ СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ И ЭНТРОПИЯ НАТИВНОГО ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА.....	99
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОЛЛАГЕНОВЫХ ПЕПТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ГИАЛИНОВЫХ ХРЯЩЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ.....	100
ОЦЕНКА СОВМЕСТНОГО ВЛИЯНИЯ САХАРОВ И ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ОЛИГОМЕРНУЮ ФОРМУ БЕЛКА DPS ESCHERICHIA COLI.....	101
ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ U2OS НОКАУТНОЙ ПО RML ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФОРМИРОВАНИЯ ARVs DE NOVO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9.....	102
Секция 2. Структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов.....	104
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С ФЕНАНТРОЛИНОМ И НОВЫМИ ФЕНАНТРОЦИАНИНОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ZN(II).....	105
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С ДИАМИНОКАРБЕНОВЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ПЛАТИНЫ И ПАЛЛАДИЯ.....	106
ВЛИЯНИЕ АДСОРБЦИИ ЛИГАНДОВ НА СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫХОДНОГО СИГНАЛА ДНК-БИОСЕНСОРА.....	107
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ UL9 И ICP8 ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО ТИПА СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ОДНОТЯЖЕВЫМИ И ДВУТЯЖЕВЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ.....	107
УГЛОВАЯ МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ ДНК С УЧЕТОМ ПОТЕНЦИАЛА МОРЗЕ.....	108
КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ ОЛИВОМИЦИНА А К НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК.....	109
О ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОМ ПАРАМЕТРЕ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩЕМ ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛЫ ДНК В РЕЗУЛЬТАТЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СО СВОИМ ВОДНЫМ ОКРУЖЕНИЕМ.....	109
УПРАВЛЕНИЕ КОНФОРМАЦИЯМИ МОЛЕКУЛ ДНК С ПОМОЩЬЮ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ.....	110
ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР ДНК.....	111
МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ ДНК-ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ С ВКЛЮЧЕНИЕМ НАНОЧАСТИЦ БЛАГОРОДНЫХ МЕТАЛЛОВ.....	111
СКРЫТЫЙ СТРУКТУРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ УОТСОН-КРИКОВСКИХ ПАР В ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА ЭУКАРИОТ.....	112
ЭКСИТОННЫЕ СОСТОЯНИЯ В ДНК.....	113
СТАТИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНСАМБЛЯ ОТКРЫТЫХ СОСТОЯНИЙ ДНК.....	114

КОНДЕНСАЦИЯ НУКЛЕОИДА БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА .....	115
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. ....	116
КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ СТРУКТУРА В СПЕКТРАХ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ТИМИНА .....	117
ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК И АЗОСОДЕРЖАЩЕГО ПАВ В РАСТВОРЕ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ .....	118
ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИПОХЛОРИТА НАТРИЯ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК .....	119
МЕХАНОХИМИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК И СВОЙСТВА РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОМА .....	120
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ ИЗОХИНОЛИНОВОГО РЯДА С МОЛЕКУЛОЙ ДНК СПЕКТРАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ И КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИМ МОДЕЛИРОВАНИЕМ .....	121
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С КАТЕХИНОМ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ $Mg^{2+}$ И $Cu^{2+}$ .....	121
ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ДНК В ПЛЕНКАХ МЕТОДОМ ИК ФУРЬЕ СПЕКТРОСКОПИИ .....	122
МНОГООБРАЗИЕ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ И КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ .....	123
АНАЛИЗ ДИССОЦИАЦИИ ЦИТОЗИНОВЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК, ОПОСРЕДОВАННЫХ ИОНАМИ СЕРЕБРА .....	124
МАТРИЧНОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ СТЭКИНГ-АГРЕГАТОВ АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ВОДЕ ВЫЗВАННОЕ ЦИКЛИЧЕСКИМ ИЗМЕНЕНИЕМ ТЕМПЕРАТУРЫ .....	125
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И СТАТИСТИЧЕСКОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ РЕЗОНАНСНОЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА В ГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ .....	125
ЧАСТОТНЫЙ АНАЛИЗ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ДИНУКЛЕОТИДОВ В СТРУКТУРЕ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА .....	126
БАЗАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕНОМНОЙ ДНК И КОЛИЧЕСТВО МИТОХОНДРИЙ В ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА .....	127
СОБСТВЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ СТРУКТУР .....	128
ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ПРИ СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ .....	129
ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В СТРУКТУРЕ ДНК ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С КООРДИНАЦИОННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ПЛАТИНЫ МЕТОДОМ ИК -СПЕКТРОСКОПИИ В РАСТВОРАХ И ТВЕРДОЙ ФАЗЕ .....	130
ЛОКАЛИЗАЦИЯ САЙТОВ ОКИСЛЕНИЯ ГУАНИНОВ В ПРОМОТОРЕ ОНКОГЕНА .....	130
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКА HMGV1 И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА СВЯЗЫВАНИЕ С ДНК.....	131
ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ЛИГАНДАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ .....	132
СТРУКТУРА И ДИНАМИКА ДНК В НУКЛЕОСОМЕ: КОМБИНАЦИЯ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОДХОДОВ.....	133
МЕХАНИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОННЫЕ МОДЕЛИ ДНК.....	134
Секция 3. Биофизика клетки. Мембранные процессы. ....	135
ВИТАМИН В12 КАК ГЕНЕРАТОР АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И СУЛЬФОКСИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ИНДУЦИРУЮЩИХ РЕГУЛИРУЕМУЮ КЛЕТОЧНУЮ ГИБЕЛЬ .....	136
ВЛИЯНИЕ ГУАНИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ.....	137

ЭФФЕКТЫ ПОВЫШЕНИЯ ВНУТРЕКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ $Ca^{2+}$ И БЛОКАДЫ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ $Ca^{2+}$ -КАНАЛОВ $Ca^{2+}$ -ЗАВИСИМЫХ $K^{+}$ -КАНАЛОВ НА ВОЗБУДИМОСТЬ ПРЕМОТОРНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ ОБУЧЕННЫХ УЛИТОК .....	138
ПРЕДЕЛЫ ТЕМПЕРАТУРНОЙ АДАПТАЦИИ ЭКТОТЕРМОВ .....	139
СВОЙСТВА КОМБИНИРОВАННЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ, ФОРМИРУЕМЫХ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ В КЛЕТОЧНЫХ И ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ .....	140
ВЛИЯНИЕ ДОКСИЦИКЛИНА И ОКСИДА УГЛЕРОДА (II) НА ЦИТОАРХИТЕКТониКУ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА .....	141
ЭФФЕКТ СКОРОСТИ ТЕПЛОВОЙ АККЛИМАЦИИ НА СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ТЕРМОТРОПНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ГЛАВНЫХ ЛИПИДОВ МЕМБРАН <i>ULVA LACTUCA</i> .....	141
ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОФУНГИЦИДОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ МЕМБРАН ТЮЛЬПАНА В СРЕЗКЕ .....	143
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИЕНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СУБСТРАТНОГО ОКРУЖЕНИЯ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН .....	144
ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЦИТОХРОМА C В ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ МИТОХОНДРИЯХ ПРИ ПОМОЩИ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ .....	145
ОБРАЗОВАНИЕ ПОР В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМ C-ФОСФАТИДНАЯ КИСЛОТА .....	146
THE DANDELION AND BURDOCK PHYTOCOMPOSITION INFLUENCE ON ELECTROPHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF THE PRIMARY ACTIVE TRANSPORT SYSTEM OF PLASMA MEMBRANE OF <i>CHARA FRAGILIS</i> INTACT CELLS .....	146
ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СОСТОЯНИЯ ЦИТОХРОМОВ В КЛЕТКАХ ПРИ ИНДУКЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ .....	147
АКТИВАЦИЯ КАНАЛОВ $NAV 1.5$ ПРИ БЛОКИРОВАНИИ НИФЕДИПИНОМ $Ca^{2+}$ - ТОКА L – ТИПА В ПРЕДСЕРДИЯХ КУРИНОГО ЭМБРИОНА СПОСОБСТВУЕТ СОХРАНЕНИЮ АВТОМАТИЗМА .....	148
СТРУКТУРНЫЙ ПЕРЕХОД В ДВАЖДЫ НЕНАСЫЩЕННОМ ЛИПИДЕ ПО ДАННЫМ ЭПР СПИНОВЫХ МЕТОК .....	149
СЕПТИНЫ И ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЙ ВЕЗИКУЛЯРНЫЙ ЦИКЛ В ДВИГАТЕЛЬНОМ НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ .....	150
ПРОНИЦАЕМОСТЬ ДЛЯ КИСЛОРОДА МОНОСЛОЙНЫХ МЕМБРАН ИЗ ЛИПИДОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА .....	151
ИЗМЕНЕНИЕ МЕМБРАННОГО И ПОРОГОВОГО ПОТЕНЦИАЛОВ КОМАНДНЫХ НЕЙРОНОВ ПОСЛЕ ВЫРАБОТКИ УСЛОВНОГО ОБСТАНОВОЧНОГО РЕФЛЕКСА У ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ .....	152
СБОРКА ИОННЫХ КАНАЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА .....	153
КОМПОНЕНТЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ГРАНИЦАХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА И СВЯЗЬ СО СТРУКТУРОЙ БИОМЕМБРАН .....	154
МЕСТНЫЕ АНЕСТЕТИКИ КАК РЕГУЛЯТОРЫ МЕМБРАННОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ .....	155
ОБРАТНЫЙ ЗАХВАТ ГЛИЦИНА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ: МОДЕЛИРОВАНИЕ РАБОТЫ ПЕРЕНОСЧИКА .....	155
ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> .....	156
ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МЕХАНИКОЙ МЕМБРАН И ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ БЕЛКА .....	157

ПРИМЕНЕНИЕ МНОГОКОМПАРТМЕНТНОЙ КИНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЛОКАЛИЗАЦИИ ИЗОФОРМ ГЛУТАМИНАЗЫ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАМАТА В АСТРОЦИТАХ .....	157
ВЛИЯНИЕ ГИДРОФОБНЫХ И ГИДРОФИЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА МИКРОВЯЗКОСТЬ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ IN VITRO.....	158
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ РЯДА СИНТЕТИЧЕСКИХ СЕРУСОДЕРЖАЩИХ ДВУХОСНОВНЫХ КИСЛОТ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ МИТОХОНДРИЙ .....	159
МЕХАНИЗМ ВСТРАИВАНИЯ МЕМБРАНО-АКТИВНОГО ЦИТОТОКСИНА В ЛИПИДНЫЙ БИСЛОЙ: МОДЕЛИРОВАНИЕ IN SILICO.....	160
МОДЕЛИРОВАНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В СПЕРМАТОЗОИДЕ ЧЕЛОВЕКА.....	161
МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ УФ-В ИЗЛУЧЕНИЯ .....	162
МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНВАЗИВНОЙ ПРОТОВОКОЙ КАРЦИНОМЫ (IDC): СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЕ КОЛЛЕКТИВНЫХ ФОРМ МИГРАЦИИ.....	163
РОЛЬ МЕМБРАННОГО ОКРУЖЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ДИМЕРИЗАЦИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ СЕМЕЙСТВА ERBB .....	165
КОНЦЕНТРАЦИОННАЯ ДИНАМИКА АБСЦИЗОВОЙ И ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТ В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОГО ТЕПЛОВОГО СТРЕССА.....	166
ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНОГО СОСТАВА КЛЕТОК БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ.....	167
ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ РИАНОДИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЯ 10-ДНЕВНОГО КУРИНОГО ЭМБРИОНА .....	167
СТРУКТУРНАЯ ЛАБИЛЬНОСТЬ, ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК NITELLOPSIS OBTUSA ПРИ ПОВЫШЕНИИ ЭКЗОГЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ... ..	168
О МЕХАНИЗМАХ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЙ ПРОГРАММЫ ЭМБРИОГЕНЕЗА НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ .....	169
АНТАГОНИСТЫ СИГМА-1 РЕЦЕПТОРОВ ПОДАВЛЯЮТ ТРАНСПОРТ Na <sup>+</sup> В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ.....	170
ЛИГАНД СИГМА-1 РЕЦЕПТОРОВ ХЛОПРОМАЗИН ПОДАВЛЯЕТ ДЕПО-ЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca <sup>2+</sup> , ВЫЗЫВАЕМЫЙ ТАПСИГАРГИНОМ В МАКРОФАГАХ .....	171
ВКЛАД ФОСФОЛИПИДОВ ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ В ФОРМИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА .....	172
АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА В ПРОРОСТКАХ ГОРОХА ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗДРАЖИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ .....	173
СВЯЗЫВАНИЕ С ГЕПАРИНОВЫМ МАТРИКСОМ КАК ОСНОВНОЙ ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВ В МЕЖКЛЕТОЧНОМ ПРОСТРАНСТВЕ .....	174
ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И КОНФОРМАЦИИ ЛИПИДОВ В МЕМБРАНАХ КЛЕТОК, МИТОХОНДРИЙ И ЛИПОСОМ МЕТОДОМ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ... ..	175
МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ЛИПОДИСКОВ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ АМФИФИЛЬНЫМИ СОПОЛИМЕРАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ЗВЕНЬЯ МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И СТИРОЛА .....	176
РОЛЬ ЛИПИДНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЦИКЛИЧЕСКИХ ЛИПОПЕПТИДОВ.....	176
МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА.....	177
ДЕЙСТВИЕ НИСТАТИНА И АМФОТЕРИЦИНА В НА ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ .....	178



ЭФФЕКТЫ H <sub>2</sub> S И CO НА ИОН-ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ .....	179
ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА НА СОСТАВ И СОСТОЯНИЕ ЛИПИДОВ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ .....	180
ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛЛЕКТИВНЫХ ДВИЖЕНИЙ ЛИПИДОВ В МОДЕЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ.....	181
ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛОБИНОВ С ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ .....	182
О ВЛИЯНИИ НЕКОТОРЫХ НИТРАТНЫХ ВАЗОДИЛАТАТОРОВ НА ЦИТОАРХИТЕКТониКУ ЭРИТРОЦИТОВ.....	183
КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИСЛОЕВ НЕНАСЫЩЕННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ: СВОЙСТВА ЖИРНОКИСЛОТНЫХ ЦЕПЕЙ .....	183
НЕКРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЕ СИММЕТРИЙНЫЕ ИНВАРИАНТЫ В СТРУКТУРЕ УГЛЕВОДОРОДНЫХ ЦЕПЕЙ ФОСФОЛИПИДОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН .....	184
ВЛИЯНИЕ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В ФЕНИЛЬНОМ КОЛЬЦЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ ИОНОВ НА СКОРОСТЬ ИХ ФЛИП-ФЛОПА ЧЕРЕЗ БИСЛОЙНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ.....	186
РОЛЬ НЕЛОКАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ В ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ОТКЛИКЕ ВОДЫ В ТРАНСПОРТЕ ИОНОВ МЕЖДУ МЕМБРАНАМИ ПЛОТНЫХ КОНТАКТОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК.....	187
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ ЛИПОСОМ В ПРОЦЕССЕ ИХ ИНИЦИИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ. ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ И БЕЛКОВ .....	188
ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА TYLORERTIN В НА СТРУКТУРУ МОДЕЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА.....	189
СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СВЕЖЕВЫДЕЛЕННОГО И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО КОСТНОГО МОЗГА ОТ GFP <sup>+</sup> ДОНОРОВ ОБЛУЧЕННЫМ РЕЦИПИЕНТАМ .....	189
ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТЕ.....	190
ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ .....	191
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОДУКТОВ ОМЕГА-ОКИСЛЕНИЯ ПАЛЬМИТИНОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ИСКУССТВЕННЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН.....	192
ВЛИЯНИЕ ЦЕРАМИДА НА ПРОЦЕССЫ, СВЯЗАННЫЕ С ГИБЕЛЬЮ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ.....	193
ВЛИЯНИЕ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ И МАГНИТНОГО ИЗОТОПА <sup>25</sup> Mg НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЁНОК БАКТЕРИЯМИ.....	194
ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН.....	194
О ВОЗМОЖНОСТИ ГЕНЕРАЦИИ ВЫСОКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ В ВОЗБУДИМЫХ БИОМЕМБРАНАХ .....	195
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТИОННЫХ АНТИСЕПТИКОВ С ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНОЙ .....	196
ОСОБЕННОСТИ АДСОРБЦИИ ПОЛИЛИЗИНА НА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ АНИОННОГО ЛИПИДА И ДЛИНЫ ПОЛИМЕРА .....	197
ВЛИЯНИЕ ИФР-1 НА ФОСФОИНОЗИТИДНЫЙ СОСТАВ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ .....	198
МЕХАНИЗМ АГРЕГАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ .....	199
УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ НЕЙРОНОВ ПОСЛЕ МОДЕЛИРУЕМОГО ЭПИЗОДА ОСТРОГО КИСЛОРОДНОГО ГОЛОДАНИЯ IN VITRO .....	200

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИЛЬНОЗАРЯЖЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ С МЕМБРАНОЙ ЭРИТРОЦИТОВ .....	201
ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В МОНОСЛОЯХ ФОСФОЛИПИДОВ РАЗЛИЧНОЙ ХИРАЛЬНОСТИ: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ПРЕДБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ.....	201
Секция 4. Биологическая подвижность. Молекулярные моторы .....	203
ИССЛЕДОВАНИЕ НЕОДНОРОДНОСТИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ОДИНОЧНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ И СОКРАТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПРЕДСЕРДИЙ И ЖЕЛУДОЧКОВ СЕРДЦА КРЫС.....	204
О МЕХАНИЗМЕ СИСТЕМЫ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТА ИОНОВ.....	205
О МЕХАНИЗМЕ ВРАЩЕНИЯ РОТОРА FO F1 Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> АТФ-СИНТАЗЫ .....	206
ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЪЕМ-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ КРЫСЫ .....	206
ИЗОФОРМЫ ТИТИНА ПРИ ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИИ СЕРДЦА .....	207
МАГНИТНО-ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ МАГНИЯ И ЦИНКА В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ ГИДРОЛИЗА АТФ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МОТОРАМИ .....	208
ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ.....	209
ВЛИЯНИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ	210
РОЛЬ РЕАКЦИИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ФОСФАТА ИЗ КАРМАНА ТУБУЛИНА В МЕХАНИЗМЕ РАСПОЗНАВАНИЯ КОНЦА МИКРОТРУБОЧКИ БЕЛКОМ EB1 .....	211
МНОГОМАСШТАБНАЯ МОДЕЛЬ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА: ВЛИЯНИЕ КАРДИОМИОПАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ТРОПОМИОЗИНА НА НАСОСНУЮ ФУНКЦИЮ СЕРДЦА	212
Секция 5. Механизмы трансформации энергии. Биоэнергетика.....	214
РАЗОБЩИТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ: НОВЫЙ ВИТОК В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ И МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ.....	215
МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ Ca <sup>2+</sup> И ИНДУКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ Ca <sup>2+</sup> - ЗАВИСИМЫХ ПОР ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ I ТИПА .....	216
ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ И НЕСЕЛЕКТИВНАЯ ПОРА МИТОХОНДРИЙ: Cd <sup>2+</sup> КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ВЫЯСНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ.....	216
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАЦИИ ВОССТАНОВЛЕННОЙ ФОРМЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЦИТОХРОМА BD С ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИМПУЛЬСНОЙ АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ С РАЗРЕШЕНИЕМ ВО ВРЕМЕНИ.....	218
ВЛИЯНИЕ САХАРОЗЫ НА СТАБИЛЬНОСТЬ СОЛНЕЧНОЙ ЯЧЕЙКИ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЙ ТИЛАКОИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ .....	219
ТРАНСПОРТ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В МИТОХОНДРИЯХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И СЕРДЦА ПРИ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА.....	219
АНАЛИЗ ПРОТОННОГО ТРАНСПОРТА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОРИЕНТАЦИИ ВХОДНОГО ПОЛУКАНАЛА В АТФ-СИНТАЗЕ .....	220
НОВЫЙ МЕХАНИЗМ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ ПРИ СИНТЕЗЕ И ГИДРОЛИЗЕ АТФ. МЕХАНО- ХЕМИОСМОТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ .....	221
ЭНЕРГОТРОПНЫЙ И ПРОТОНОФОРНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ РАДИОЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЗАМЕЩЕННЫХ САЛИЦИЛАНИЛИДОВ НА МЕМБРАННЫХ СИСТЕМАХ ПРИ Г- ОБЛУЧЕНИИ .....	222
РАЗОБЩИТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ КАК SH-РЕАГЕНТЫ.....	223
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЗМЕМБРАННОГО МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА И ЭЛЕКТРОННЫХ УСТРОЙСТВ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ АНАЭРОБНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА .....	224

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОНОВ ТЕРБИЯ С УЧАСТКАМИ СВЯЗЫВАНИЯ МЕТАЛЛОВ В КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩЕМ КОМПЛЕКСЕ ФОТОСИСТЕМЫ 2 .....	225
ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЭРИТРОЦИТАХ И ГЕМОГЛОБИНЕ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА .....	226
РЕЦЕПТОРЫ ГЛУТАМАТА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА И МОЗГА .....	227
ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА В ДИАПАЗОНЕ -170 °С – +20 °С В РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ .....	227
ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА ГОМОЙОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ .....	228
МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ БИОЭНЕРГЕТИКА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ У ПАЦИЕНТОВ С ПРЕМАНИФЕСТНОЙ СТАДИЕЙ БОЛЕЗНИ ГЕНТИНГТОНА .....	229
ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ТОЧКОЙ ВХОДА В ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ БАКТЕРИЙ, НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ВЫХОД МЕМБРАННОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА .....	230
ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОВ ПАЛЬМИТИНОВОЙ, $\omega$ -ГИДРОКСИПАЛЬМИТИНОВОЙ И $\alpha,\omega$ -ГЕКСАДЕКАНДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТ КАК АКТИВАТОРОВ СВОБОДНОГО ДЫХАНИЯ И ИНГИБИТОРОВ ГЕНЕРАЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ .....	231
ИССЛЕДОВАНИЕ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ВА3 ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ ИЗ THERMUS THERMOPHILUS, СОПРЯЖЕННОЙ С ОДНОЭЛЕКТРОННЫМ ВОССТАНОВЛЕНИЕМ АКТИВИРОВАННОГО СОСТОЯНИЯ O(H) .....	232
СТОХАСТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА ПРОТОНОВ В ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗЕ МИТОХОНДРИЙ .....	232
ЦИТОБИОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ И ПРОДУКЦИИ АФК У МЫШЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ОБЛУЧЕНИЯ УСКОРЕННЫМИ ИОНАМИ УГЛЕРОДА С ЭНЕРГИЕЙ 450 МЭВ/Н .....	233
КОЛЛЕКТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ КАРДИОМИОЦИТОВ У МЫШЕЙ С МЕЛАНОМОЙ B16/F10 В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ НЕЙРОГЕННОЙ БОЛИ .....	234
ЧАСТИЧНО ДЕГИДРАТИРОВАННЫЕ ИОНЫ ВОДОРОДА. УЧАСТИЕ В РАБОТЕ АТФ СИНТЕТАЗЫ .....	235
Секция 6. Биофизика одиночных молекул. Нанобиотехнологии .....	236
ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ АСТН (7-10) .....	237
ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ ЭКЗОРФИНА В4 .....	238
СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И ИК СПЕКТР ТРИФЕНИЛФОСФИТА .....	239
МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, СТРУКТУРА И ИК СПЕКТРЫ БЕГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ .....	240
ОПТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЛЕНОК ZnO, ДОПИРОВАННЫХ ДЕТОНАЦИОННЫМИ НАНОАЛМАЗАМИ .....	241
ЭНТЕРОСОРБЦИЯ И ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИГРАФЕНА КАК УГЛЕРОДНОЙ НАНОМАТРИЦЫ В ДО-КЛИНИЧЕСКИХ ТЕСТАХ .....	242
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИГРАФЕНА КАК УГЛЕРОДНОЙ НАНОМАТРИЦЫ ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ И СТЕРИЛИЗАЦИИ ГАЗОВЫХ И ЖИДКИХ СРЕД .....	243
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОНОВ И КЛАСТЕРОВ СЕРЕБРА С АМИНОКИСЛОТАМИ И БЕЛКАМИ .....	244
НАНОКОМПОЗИТ «ЛАНДОМИЦИН А — Фуллерен C <sub>60</sub> » КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ .....	245
МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ: МЕХАНИЗМЫ, ХАРАКТЕРИСТИКИ, ПРИМЕНЕНИЕ .....	246
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА ВАМ-25P .....	247

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИБРИДНОГО КОМПЛЕКСА КВАНТОВАЯ ТОЧКА – ФТАЛОЦИАНИН, МОДИФИЦИРОВАННОГО ТРАНСФЕРРИНОМ .....	248
БЕЗДЕТЕРГЕНТНАЯ СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО КАНАЛА KV10.2 С ЦИСТЕИНОВЫМИ ЗАМЕНАМИ .....	249
ФОТОКОНВЕРСИОННЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ ПОКРЫТИЯ, УСИЛИВАЮЩИЕ ИНТЕНСИВНОСТЬ ВИДИМОГО СВЕТА В СИНЕЙ И КРАСНОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА .....	249
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КОНЬЮГАТОВ НАНОЧАСТИЦ АЛМАЗА С ТЕТРАКАРБОКСИФЕНИЛПОРФИРИНОМ В МАКРОФАГАХ ЛИНИИ ТНР-1 .....	250
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЛИПРОЛИНОВЫХ МОЛЕКУЛ .....	251
МЕТОД РАСЧЕТА ПАРАМЕТРОВ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЭМП .....	252
СИНЕРГИЗМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ЭКСТРАКТА T. POLIUM .....	253
ВЛИЯНИЕ ЗЕЛЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС .....	254
ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИЕ МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ НАНОКЛАСТЕРЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ ДЛЯ БИОИМИДЖИНГА .....	254
ОБРАТИМАЯ КОМПАКТИЗАЦИЯ ДНК В РАСТВОРЕ, ИНДУЦИРОВАННАЯ ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ СО СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ КАТИОННЫМИ ПАВ .....	255
ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ НА СКОРОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ .....	256
ОЦЕНКА СИЛ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ «ЛИПОПОЛИСАХАРИД ИЕРСИНЕЙ - МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА» МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ .....	257
АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТОПОТЕКАНА И ФУЛЛЕРЕНА: КЛЕТОЧНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ И ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯ DOSY .....	258
ФОТОТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ РЕЛАКСАЦИИ ВЫСОКОВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ .....	259
СУПЕРКОМПЬЮТЕРНЫЙ КОДИЗАЙН ПРОГРАММЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ .....	260
ФОРМИРОВАНИЕ НАНОСТРУКТУРНОЙ ФОСФОЛИПИДНОЙ ФАЗЫ В НАТИВНЫХ МАСЛАХ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ .....	261
ИЗМЕНЕНИЕ СОБСТВЕННОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА И ЦИКЛОДЕКСТРИНА .....	262
ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА ЛИЗИНОВОГО ДЕНДРИМЕРА 2-ГО ПОКОЛЕНИЯ С МОЛЕКУЛАМИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ВЕЗУГЕН МЕТОДОМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ...	263
ИЗУЧЕНИЕ ОРИЕНТАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ ЛИЗИНОВОГО ДЕНДРИГРАФТА 2-ГО ПОКОЛЕНИЯ .....	263
РАЗРУШЕНИЕ АМИЛОИДНЫХ ОЛИГОМЕРОВ ЛИЗИНОВЫМИ ДЕНДРИГРАФТАМИ .....	264
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ВКЛАД «ЗЕЛЕННЫХ» НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОБРАЗОВАНИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА .....	265
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ .....	266
ПОВЫШЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ЗА СЧЁТ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ НАНОАЛМАЗАМИ.	267
КОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ НАНОВОЛОКОН ОКСИДА АЛЮМИНИЯ И НАНОАЛМАЗОВ – НОВЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ ИНДИКАЦИИ ФЕНОЛА .....	268

НАНОКОМПОЗИТНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ДЛЯ УПРАВЛЯЕМОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ: ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ И МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ .....	269
ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ПЛЕНОК .....	270
ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ В ИСКРИВЛЁННОМ ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ .....	270
ФУЛЛЕРЕН C <sub>60</sub> МОДУЛИРУЕТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОКСАНТРОНА ..	271
ПЕПТИД-АНТИБИОТИК ХАЛЬЦИПОРИН: ВЛИЯНИЕ НА МОДЕЛЬНУЮ БИОЛОГИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ .....	272
ЛАЗЕРНЫЙ СИНТЕЗ НАНОПОРОШКОВ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ .....	273
МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ПРИРОДНЫМИ БИОПОЛИМЕРАМИ ..	274
ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ КРИОГЕЛЕЙ ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ .....	275
ВИЗУАЛЬНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВНУТРЕННИХ ПОЛОСТЕЙ ДВУХ ХИРАЛЬНЫХ ФОРМ ДИФЕНИЛАЛАНИНОВЫХ НАНОТРУБОК .....	275
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИНУЛИНАЗ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ИМИ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ .....	277
СРАВНЕНИЕ РАЗМЕРОВ И ЛОКАЛЬНОЙ ПОДВИЖНОСТИ ЛИНЕЙНЫХ АЛЬФА- И ЭПСИЛОН-ЛИЗИНОВЫХ ПЕПТИДОВ ОДИНАКОВОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ .....	278
ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ И ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СУХИХ ОСТАТКОВ МИКРОКАПЕЛЬ ЛЁГОЧНОЙ ЖИДКОСТИ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ .....	279
СИГНАЛЫ ЭЛЕКТРОННОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ.....	279
Секция 7. Нейродинамика и нейробиология .....	281
ЗРИТЕЛЬНЫЕ АГНОЗИИ И ДВОЙСТВЕННОСТЬ ЗРИТЕЛЬНОГО ОПОЗНАНИЯ .....	282
ВЛИЯНИЕ ИМУНОФАНА НА СОДЕРЖАНИЕ ГАМК, ГЛУ И АСП В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ЦИКЛОФОСАМИДНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ .....	283
ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ ГЛУТАМАТ- И ГАМК-ОПОСРЕДОВАННОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ В ХОДЕ ЭПИЛЕПТОПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ IN VITRO .....	284
ОКСИДАТИВНО-КОМПЕНСАТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ЭКСТРАКТА ШАФРАНА ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ НЕВРОЗНОГО СОСТОЯНИЯ .....	284
РОЛЬ ИЕРАРХИЧЕСКИХ СЕТЕЙ МОЗГА В РАЗВИТИИ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ .....	286
СОПОСТАВЛЕНИЕ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ, ЗАРЕГИСТРИРОВАННОЙ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ .....	287
ПОИСК ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ В Ca <sup>2+</sup> -АКТИВНОСТИ АСТРОЦИТОВ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ И МОДЕЛИ .....	288
ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ МОНОАСТРОЦИТАРНЫХ КУЛЬТУР КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА В НОРМЕ И ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОКСИИ .....	288
ВЛИЯНИЕ ПРИНУДИТЕЛЬНОЙ ПИЩЕВОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА УРОВЕНЬ ДОФАМИНА В ЦНС КРОЛЬЧАТ .....	289
ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ КОМАНДНЫХ НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ У ОБУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ .....	290
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ЭПР СПЕКТРОСКОПИИ ДИНАМИКИ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ОГРАНИЧЕНИИ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА .....	292

ЭФФЕКТЫ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ОКСИДА АЗОТА НА ВОЗБУДИМОСТЬ КОМАНДНЫХ НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ .....	293
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ПЛАСТИЧНОСТИ.....	294
СОПОСТАВЛЕНИЕ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ НАПРАВЛЕННОЙ СВЯЗАННОСТИ МЕЖДУ СТРУКТУРАМИ МОЗГА КРЫС WAG / RIJ– ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИИ.....	295
РЕГИСТРАЦИЯ И АНАЛИЗ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОННОЙ СЕТИ IN VITRO .....	296
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СВОЙСТВА ГАМК-ЭРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА, СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬЦИЙ-ПРОНИЦАЕМЫЕ КАИНАТНЫЕ ИЛИ АМРА-РЕЦЕПТОРЫ.....	297
ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОГО СЕПСИСА НА КОГНИТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ И НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ У МЫШЕЙ .....	298
МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА «ТЕМНО-СВЕТЛАЯ КАМЕРА» ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ТРЕВОГИ.....	299
ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ У КРЫС .....	301
МЕТОД ЛОКАЛЬНОЙ АППРОКСИМАЦИИ СПЕКТРАЛЬНОЙ МОЩНОСТИ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧИ КЛАССИФИКАЦИИ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ: НЕЙРОСЕТЕВОЙ ПОДХОД .....	302
РОЛЬ КИНАЗ РАК4 И МАРЗК5 В АДАПТАЦИИ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР НЕРВНЫХ КЛЕТОК К ДЕЙСТВИЮ ГЛЮКОЗНОЙ ДЕПРИВАЦИИ IN VITRO .....	303
ПАТОЛОГИЯ СТРУКТУРЫ СВЯЗЕЙ В МОЗГЕ, ВЕДУЩАЯ К РАЗВИТИЮ ПИК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ: МОДЕЛИРОВАНИЕ СЛОЖНЫМИ ИЕРАРХИЧЕСКИ ОРГАНИЗОВАННЫМИ СЕТЯМИ ОСЦИЛЛЯТОРОВ .....	304
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TRKB РЕЦЕПТОРОВ И ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NIF1 В ПОСТГИПОКСИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ НА ФОНЕ ПРЕВЕНТИВНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА BDNF .....	305
РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЙ РЕЦЕПТОРОВ В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ .....	306
ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ГЕТЕРОДИМЕРНОГО РЕЦЕПТОРА К ЭРИТРОПОЭТИНУ НА БИОЭНЕРГЕТИКУ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА В ПОСТИШЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОД У МЫШЕЙ .....	307
РОЛЬ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПОЛИФОСФАТА В НЕЙРОНАХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МЕХАНОРЕЦЕПТОРА РЕЧНОГО РАКА .....	308
ОСОБЕННОСТИ РИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ СУБТАЛАМИЧЕСКОГО ЯДРА У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА .....	308
ПОСТИНСУЛЬТНАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ С АФАЗИЕЙ: ДАННЫЕ ДИФфуЗИОННО-ВЗВЕШЕННОЙ ТРАКТОГРАФИИ.....	309
РС1-34051 ИНГИБИТОР HDAC8 СНИЖАЕТ НЕКРОЗ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ.....	310
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА МНОГОМЕРНОГО ШКАЛИРОВАНИЯ В АНАЛИЗЕ ЭЭГ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ ИСПЫТУЕМЫХ НА БОЛЬНЫХ С ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ .....	311
ВЫЗВАННАЯ РИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ПРОСТЫХ КОГНИТИВНЫХ ЗАДАЧ.....	312
ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РНК-ЗАВИСИМОЙ АДЕНОЗИНДЕАМИНАЗЫ 2 ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИАЛУРОНИДАЗА-ЗАВИСИМОЙ ЭПИЛЕПСИИ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГИППОКАМПА .....	313
МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СОПРЯЖЕНИЯ НАРУШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В МОЗГЕ ПРИ РАЗВИТИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: НОВЫЙ ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ГИБЕЛИ КЛЕТОК.....	314

ТЕМНОВОЕ И СВЕТОИНДУЦИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО РАЗОБЩИТЕЛЯ МИТОФЛУОРЕСЦЕИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА .....	315
НЕЛИНЕЙНЫЕ И ПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ РЕЗОНАНСЫ В ОРГАНАХ ЗРЕНИЯ И СЛУХА ЧЕЛОВЕКА.	315
ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В ШВАННОВСКИХ КЛЕТКАХ В НОРМЕ И ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ КРЫСЫ .....	316
ИССЛЕДОВАНИЕ ОШИБОК СМЕЩЕНИЯ И НАПРАВЛЕНИЯ В ИЛЛЮЗИИ ПЕРЕСЕЧЕНИЯ .....	317
ФРАКТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ У ДЕТЕЙ В БЕССОЗНАТЕЛЬНОМ СОСТОЯНИИ (ПРИ ЭПИЛЕПСИИ И ВЕГЕТАТИВНОМ СОСТОЯНИИ) .....	318
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРОТИВОСУДОРОЖНОГО ДЕЙСТВИЯ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ В 4-АМИНОПИРИДИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ IN VITRO	319
ИЗУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА В ОБЛАСТИ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	320
ОЦЕНКА СВЯЗАННОСТИ МЕЖДУ ОБЛАСТЯМИ МОЗГА МЕТОДОМ РЕКОНСТРУКЦИИ СЕТИ НЕЙРООСЦИЛЛЯТОРОВ ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЗАПИСЯМ ЛОКАЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ	321
ПАТОЛОГИЯ СТРУКТУРЫ СВЯЗЕЙ В МОЗГЕ, ВЕДУЩАЯ К РАЗВИТИЮ ПИК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ: РЕКОНСТРУКЦИЯ ПО ВРЕМЕННЫМ РЯДАМ ЛОКАЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ .....	322
ОСОБЕННОСТИ КОГНИТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОЙ ГИПОМАГНИТНОЙ СРЕДЫ.....	323
ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА – ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 ПРИ НАРУШЕНИИ НЕЙРОТРАНСМИССИИ В НЕЙРОНАХ КОРЫ МОЗГА МЫШЕЙ С МУТАЦИЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА SIP1 .....	324
МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТОВ АЛЬФА2-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ IN VITRO. РОЛЬ АСТРОЦИТОВ И НЕЙРОГЛИАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ .....	325
УЧАСТИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ВЫЖИВАНИИ И СМЕРТИ НЕЙРОНОВ И УДЕЛЕННЫХ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ АКСОТОМИИ РЕЦЕПТОРА РАСТЯЖЕНИЯ РАКА .....	326
ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ОБМЕНА ГАМК В ЦНС КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТОЛУОЛА.....	327
ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ АМПЛИТУДЫ, МОЩНОСТИ И ЧАСТОТЫ ЭЭГ МУЖЧИН И ЖЕНЩИН ОТ 16 К 45 ГОДАМ .....	328
МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОНОВ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЭРИТРОПОЭТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА IN VITRO.....	329
ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МАГНОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ И ПАРВОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ НЕЙРОННЫХ СИСТЕМ В УСЛОВИЯХ МИКРОГРАВИТАЦИИ.....	329
ОБЪЕКТИВИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ ПСИХИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ: МОНИТОРИНГ ХАРАКТЕРА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕХАНИЗМОВ ГЛОБАЛЬНОГО И ЛОКАЛЬНОГО АНАЛИЗА ЗРИТЕЛЬНОЙ ИНФОРМАЦИИ.....	330
АВТОМАТИЧЕСКОЕ ИСПРАВЛЕНИЕ АРТЕФАКТОВ В ВИДЕ СКАЧКА ЭЭГ-СИГНАЛА .....	331
ФОРМАЛИЗОВАННОЕ ОПИСАНИЕ СПОНТАННОГО ОБУЧЕНИЯ НЕСКОЛЬКИМ ЯЗЫКАМ .....	332
Секция 8. Биофизическое образование.....	334
ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОФИЗИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ИНТЕГРАЦИИ .....	335
ПОДГОТОВКА БИОФИЗИКОВ В ВОРОНЕЖСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ: СОСТОЯНИЕ, ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ТРЕНДЫ .....	336
ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ОБУЧЕНИЮ ФИЗИКЕ СТУДЕНТОВ НЕ ФИЗИЧЕСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ.....	337
ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В УНИВЕРСИТЕТСКИХ КУРСАХ «МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ В БИОЛОГИИ» И «БИОФИЗИКА» .....	337

ОСОБЕННОСТИ УЧЕБНОГО КУРСА «МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНОГО ТВОРЧЕСТВА» ДЛЯ МАГИСТРАНТОВ-БИОФИЗИКОВ И БИОХИМИЧЕСКИХ ФИЗИКОВ.....	338
ОБРАЗЫ И МОДЕЛИ В БИОФИЗИКЕ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ.....	339
РАЗВИТИЕ МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫХ СВЯЗЕЙ БИОФИЗИКИ КАК ПУТЬ К ФУНДАМЕНТАЛИЗАЦИИ ВЕТЕРИНАРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ.....	340
БИОФИЗИЧЕСКИЕ НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС.....	341
НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОФИЗИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В СИБИРСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ.....	342
МЕТОДЫ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ В ЗАДАЧАХ МАЛОГО ПРАКТИКУМА ПО КУРСУ “БИОФИЗИКА” НА БИОЛОГИЧЕСКОМ ФАКУЛЬТЕТЕ МГУ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА ...	343
ОБУЧЕНИЕ ФИЗИКЕ В МЕДИЦИНСКОМ ОБРАЗОВАНИИ.....	343
Секция 9. Биоинформатика и системная биология.....	346
ПОИСК ПАТТЕРНОВ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РВМС ЧЕЛОВЕКА ПРИ СТАРЕНИИ.....	347
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ФОТОТРАНСДУКЦИИ В ТКАНЯХ LYMNAEA STAGNALIS.....	348
РОЛЬ ХИРАЛЬНОСТИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ САМООРГАНИЗАЦИИ В СТАНОВЛЕНИИ ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ.....	349
МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ НАДЕЖНОСТИ В ТЕХНИКЕ И НАДЕЖНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ: ИСТОРИЯ ВОПРОСА И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ.....	349
РАЗРАБОТКА КРИТЕРИЕВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ.....	350
ПРИМЕНЕНИЕ ФРАКТАЛЬНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ ОПТИМАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ АРТЕРИАЛЬНОГО ДЕРЕВА МОЗГА КРЫСЫ.....	351
МНОЖЕСТВЕННОЕ ВЫРАВНИВАНИЕ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ.....	352
ПОЛНОГЕНОМНОЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МНОЖЕСТВА "ИСТИННЫХ" ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ЭКЗОГЕННОЙ ДНКАЗЕ I САЙТОВ. БАЗА ДАННЫХ “ИСТИННЫХ” ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ЭКЗОГЕННОЙ ДНКАЗЕ I САЙТОВ В КЛЕТКАХ НЕК293Т ЧЕЛОВЕКА .....	353
МАШИННОЕ ОБУЧЕНИЕ ДЛЯ ПРОГНОЗА ИСХОДА ИНСУЛЬТА ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ.....	354
МЕТОД ПРЕДСКАЗАНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ОСНОВАННЫЙ НА ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ АМИНОКИСЛОТ.....	355
СЕКРЕТИРУЕМЫЕ РНК БАКТЕРИЙ.....	355
КОМПЬЮТЕРНЫЕ СРЕДСТВА АНАЛИЗА КЛАСТЕРОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ РАЙОНОВ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ.....	356
КАК КОДОНЫ ОТБИРАЮТСЯ НЕ ДЛЯ БЕЛКОВ, А ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ РЕГУЛЯТОРОВ С ДНК.....	357
ПРИМЕНЕНИЕ БИНАРНЫХ НЕРОННЫХ СЕТЕЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТИПОВ РАСТИТЕЛЬНОСТИ.....	358
ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕТРИВИАЛЬНОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ДАННЫХ (ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ДОКТОРА) ПРИ АНАЛИЗЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	359
МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ГОМОЛОГИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ ПИЛЕОБРАЗУЮЩИХ БЕЛКОВ БАКТЕРИЙ РОДА AZOSPIRILLUM.....	360
Секция 10. Новые методы в биофизических исследованиях.....	363



ЦИФРОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО КАРТИРОВАНИЯ СТРЕССОВ И СТРЕСС-ФАКТОРОВ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ) .....	364
ОТКРЫТАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	365
РАЗРАБОТКА УСТАНОВКИ ПО ОЦЕНКЕ ДЕФОРМАБИЛЬНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЯВЛЕНИЯ ВРАЩЕНИЯ ПЛОСКОСТИ ПОЛЯРИЗАЦИИ ПЛОСКОПОЛЯРИЗОВАННОГО СВЕТА ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ.....	366
ОСЦИЛЛЯЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ NADH ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНОМ В ВОДНЫХ СРЕДАХ И ОБРАЩЕННЫХ МИКРОЭМУЛЬСИЯХ.....	367
ОТКЛИК СУСПЕНЗИИ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ НА ЗВУКОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ, ИЗМЕРЕННЫЙ ВОЛОКОННЫМ ИНТЕРФЕРОМЕТРОМ ФАБРИ-ПЕРО.....	368
ФЛУКТУАЦИИ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В ЛАБОРАТОРИЯХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ БИОФИЗИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.....	369
ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОВОЛНОВЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА.....	369
ИНТЕРФЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ПРИЖИЗНЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ.....	370
ТКАНЕИМИТИРУЮЩИЕ ФАНТОМЫ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ.....	371
РЕАЛИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ КАРБОНОВЫХ ВОЛОКОН ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗАВИСИМОСТИ «ДЛИНА-СИЛА» ОДИНОЧНОГО КАРДИОМИОЦИТА.....	372
ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА РАСТЕНИЯ МЕТОДОМ РЕГИСТРАЦИИ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА.....	373
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ РОГОВОГО СЛОЯ КОЖИ МЕТОДОМ МИКРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ В IN VIVO ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	374
ПОЛНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА НА ОСНОВЕ МАГНЕТИТА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ.....	375
КОМБИНАЦИЯ АТОМНО-СИЛОВОЙ, ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ И МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОК.....	376
НОВЫЙ МЕТОД КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОНКТЕРАПИИ – ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МИКРОВОЛНОВАЯ ТЕРМОГРАФИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ).....	377
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГАЗОЖИДКОСТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ И ФЛАВОНОИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.....	378
МОДИФИКАЦИЯ MALDI-МИШЕНИ МЕТАЛЛ-АФФИННЫМИ СОРБЕНТАМИ В ПРОЦЕССЕ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ В НОРМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ.....	379
РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКИЕ СТАНЦИИ ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ SAXS/WAXS ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОСИСТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ.....	380
РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОГЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ПУТЕМ ИХ АДСОРБЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА.....	381
РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ ТОПЛИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ НА ОСНОВЕ НЕИНВАЗИВНЫХ ЭЛЕКТРОДНЫХ СИСТЕМ.....	382
ИССЛЕДОВАНИЕ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ БЛИЖНЕПОЛЬНОГО РЕЗОНАНСНОГО СВЧ-ЗОНДИРОВАНИЯ.....	383
ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ДОБАВОК НА РАЗДЕЛИТЕЛЬНУЮ СПОСОБНОСТЬ ВОДНОЙ ДВУХФАЗНОЙ СИСТЕМЫ ПЭГ-НАТРИЕВАЯ СОЛЬ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ-ВОДА.....	385
ТРЕХМЕРНЫЙ АНАЛИЗ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТРИКСОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	385

СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МАГНИТНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ БИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ДИАГНОСТИКЕ.....	386
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ РАЗДЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ОРГАНИЧЕСКИХ ГИДРОПЕРОКСИДОВ .....	387
ТЕРАГЕРЦОВАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ВРЕМЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ В ПРИМЕНЕНИИ К ИССЛЕДОВАНИЮ ГИДРАТНЫХ ОБОЛОЧЕК БЕЛКОВ .....	388
ШИРОКОПОЛОСНАЯ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ .....	389
ОБНАРУЖЕНИЕ МАГНЕТОСОМО-ПОДОБНЫХ СТРУКТУР В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ С ПОМОЩЬЮ ПРОДОЛЬНОГО НЕЛИНЕЙНОГО ОТКЛИКА НА ПЕРЕМЕННОЕ ПОЛЕ .....	390
ПРИМЕНЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССА ДЕНАТУРАЦИИ ЛИЗОЦИМА .....	391
МЕТОДЫ ЦИФРОВОЙ ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ РЕАКЦИИ КЛЕТОК НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ И ХИМИОТЕРАПИЮ .....	392
ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ФОРМИРОВАНИЯ АМИЛОИДОВ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА.....	393
ПОДХОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ .....	394
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАНАЛИРОВАНИЯ КИЛОВОЛЬТНЫХ ЭЛЕКТРОНОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ ЖИДКИХ ОБЪЕКТОВ .....	395
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ В БИ- И ТРИФЕРМЕНТНЫХ ЦЕПЯХ СОПРЯЖЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ С ЛЮЦИФЕРАЗой В УСЛОВИЯХ, ПРИБЛИЖЕННЫХ К ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ .....	396
ОПТИЧЕСКИЙ ПИНЦЕТ КАК ИНСТРУМЕНТ НЕИНВАЗИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕОПЛАЗМЫ ЖИВЫХ ООЦИТОВ МЫШИ .....	397
ЭМИССИОННАЯ ИК-ФУРЬЕ СПЕКТРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ .....	398
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ДИАГРАММ СОСТОЯНИЙ И ГЛОБАЛЬНОЙ ПОДГОНКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАЛЬЦИЙ СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЛИЗОЦИМА ИЗ МОЛОКА СОБАКИ.....	399
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОЛУШИРИНЫ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ В ЛИПИДАХ И БЕЛКАХ, ВЫЗВАННЫХ ПОВЫШЕНИЕМ ДАВЛЕНИЯ .....	400
МЕХАНИЧЕСКИЕ МИКРОВИБРАЦИИ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА .....	401
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КАНАЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ СОСТАВЛЯЮЩИХ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ОКСИДАНТНОГО СТРЕССА .....	402
УСТАНОВКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЗАРЯЖЕННОГО НАНОАЭРОЗОЛЯ НА ЛИПИДНЫЙ МОНОСЛОЙ .....	403
ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ .....	403
Оглавление .....	405
Авторский указатель .....	423

## Авторский указатель

- Abdullayev A.S., 146  
Adil A. Baizhumanov, 145  
Aleksperov O.Z., 43  
Alexandrova N.Sh., 332  
Anna A. Semenova, 145  
Antonets V.A., 332  
Aslanov R.B., 43  
Bakhishova M.J., 50  
Dashdemirova L.M., 43  
Eugene A. Goodilin, 145  
Evelina I. Nikelshparg, 145  
Freiberg. A., 38  
Gasyimov O.K., 43, 44, 50  
Guliyeva A.J., 44  
Hasanova A.E., 146  
Lüttjohann A., 304, 321  
Mammedzade A.M., 44, 50  
Mazat J.P., 232  
Medvedeva T.M., 304  
Musayev N.A., 146  
Nadezda A. Brazhe, 145  
Nuidel I.V., 332  
Olga Eremina, 145  
Olga V. Sosnovtseva, 145  
Pashazade T.C., 178  
Ransac S., 232  
Santer S, 255  
Sergiy N. Novikov, 145  
Shemagina O.V., 332  
Sysoev I.V., 304, 321  
Sysoeva M.V., 304  
Valentin Volkov, 145  
van Luijelaar G., 304, 322  
van Rijn C.M., 295  
Vera G. Grivennikova, 145  
Yakhno V.G., 332  
Абатгурова А.М., 40, 52  
Аббаслы Р.М., 238, 251  
Абдинова А.А., 237, 247  
Абдуллаев Э.Т., 120  
Абрамов А.А., 207  
Агаева Г.А., 41, 55  
Агаева Л.Н., 237, 238  
Агаева С.В., 327  
Агаева У.Т., 55  
Аджубей А.А., 42  
Айбуш А.А., 22  
Айбуш А.В., 397  
Айвазян Н., 265  
Акатов В.С., 136  
Акбашева О.Е., 206  
Акованцева А.А., 376  
Акопян Т.В., 90  
Акуленкова Е.В., 105  
Александрова Н.Ш., 282  
Алексеев А.А., 347  
Алексеев Г.В., 106  
Алиев Р.Э., 45  
Алиев Э.З., 53  
Алиева Н.Н., 283  
Аликина О.В., 355  
Аллахвердиев С.И., 219  
Алова А.В., 4  
Алферова В.В., 309  
Амахин Д.В., 284  
Ананченко Б.А., 257  
Ананьева Ю.Е., 156  
Ананян А.А., 137  
Анашкина А.А., 24, 42, 45, 46, 47  
Андреева А.А., 106, 111  
Андрианов В.В., 138, 152, 290, 292, 293  
Андропова В.Л., 12, 107  
Анисимов В.М., 123  
Антипов С.С., 69, 88, 101, 335  
Антипова Л.В., 88  
Антоненко Ю.Н., 98, 186, 194, 215, 223, 315  
Антонец В.А., 364  
Антонов В.Г., 170, 171  
Антонян А.П., 107, 132  
Аракелян В.Б., 107  
Армеев Г.А., 133  
Артюхов В.Г., 75, 141, 183, 277, 336, 381  
Арутюнян А.М., 218  
Асланиди К.Б., 139  
Асташев М.Е., 365  
Атауллаханов Ф.И., 57, 82  
Аульченко В.М., 380  
Афиногенов Г.Е., 119  
Афиногенова А.Г., 119  
Ахвердиева Г.А., 48  
Ахмедов Н.А., 238, 247, 251  
Ахмедов Н.Ф., 237  
Ахмедова С.Р., 237  
Бабаев А.А., 305, 324  
Бабков Л.М., 239, 240  
Бабодей В.Н., 261  
Багирова А.А., 140  
Баева Е.С., 141  
Бажич В.Б., 20  
Бажулина Н.П., 12, 107  
Базян А.С., 286  
Байжуманов А.А., 175  
Баймлер И.В., 249  
Бакулев В.М., 106, 111, 255  
Балабаев Н.К., 54, 260  
Балабан П.М., 290  
Балашова В.Н., 108  
Балтина Т.В., 292  
Баранова Ю.Г., 85  
Баркина М.Ю., 141  
Бармина Е.В., 249  
Барцев С.И., 358  
Барышев А.В., 111  
Барышев М.Г., 129  
Батяновский А.В., 49  
Бахшалиева А.Я., 284  
Башкиров П.В., 157, 270  
Безродная Т.В., 240  
Безродный В.В., 263, 264, 278  
Бекиш А.В., 194  
Белашов А.В., 392  
Белевич И.Н., 232  
Белевич Н.П., 232  
Белкин А.В., 366  
Белов О.В., 286  
Белова Е.М., 308  
Беловолов М.И., 368  
Беловолов М.М., 368  
Беловолова Л.В., 367, 368  
Белогуров А.А., 174  
Белокопытова К.В., 286  
Белослудцев К.Н., 192, 216, 219  
Белослудцева Н.В., 216  
Белоусов М.В., 393  
Белоусова И.И., 298  
Белошапкина О.О., 143  
Беляева Е.А., 216  
Бениаминов А.Д., 109, 111, 128, 130  
Берг В.Ю., 204  
Бережная Е.В., 308  
Березина Е.В., 166  
Бершицкий С.Ю., 34  
Бехбудова Г.М., 144  
Бибииков Н.Г., 287  
Бинги В.Н., 391  
Бирулина Ю.Г., 179, 206, 210  
Бобылёв А.Г., 51  
Бобылёва Л.Г., 51  
Бовькина Д.В., 364  
Богачёв Ю.В., 375  
Богачева Е.Н., 63  
Богданенко Е.В., 189  
Богданова А.Ю., 24  
Богданова Н.Г., 188  
Богодвид Т.Х., 138, 152, 290, 292, 293  
Боздаганян М.Е., 176, 196  
Бокарев А.Н., 266, 267  
Бондаренко В.А., 369  
Бондаренко В.Г., 369  
Бондарь В.С., 268  
Борисов В.Б., 218  
Бородулин А.В., 174  
Бороновский С.Е., 155, 232, 351  
Борулева Е.А., 241, 262  
Ботин А.С., 242, 243  
Брагина В.А., 386  
Браже А.Р., 288  
Браже Н.А., 40, 147, 175, 190  
Бражников Е.В., 52  
Брандт Н.Н., 79, 403  
Брацун Д.А., 163  
Брилкина А.А., 166  
Брусенцов И.И., 116  
Брусиловский Л.И., 369  
Брусов О.С., 354  
Брюховецкий А.С., 369  
Буглак А.А., 244  
Будаговская О.Н., 370  
Будаговский А.В., 370  
Буданова А.А., 360  
Будкевич Р.О., 97  
Булай П.М., 296  
Бульчев А.А., 4  
Бульчев Н.А., 256  
Буравлев Е.А., 146  
Буравцев В.Н., 242, 243  
Буренков Г., 86  
Бурмистров Д.Е., 288  
Бурханов И.С., 256  
Бутова К.А., 204, 372  
Бучельников А.С., 245, 258, 271  
Бывалов А.А., 257  
Быстров В.С., 65, 275  
Бьонди Б., 272  
Вазина А.А., 380  
Вайнер Б.Г., 5  
Ванин А.Ф., 6

Вардеванян П.О., 107, 132  
 Варижук А.М., 157  
 Василев Ч.Л., 298  
 Васильев А.Л., 385  
 Васильев Д.Г., 7  
 Васильев Н.С., 151  
 Васильева Т.И., 270  
 Васильева-Вашакмадзе Н.С., 205, 206  
 Васютинский О.С., 392  
 Васюченко Е.П., 52  
 Вафина Г.Х., 68  
 Вахрушева А.В., 87  
 Вахтель А.В., 167  
 Вахтель В.М., 167  
 Вашченков В.Э., 62  
 Ведунова М.В., 200, 288, 303, 305  
 Веклич Т.А., 208  
 Веланский П.В., 141  
 Велиева Л.И., 53, 58  
 Великанов Г.А., 177  
 Венцеров Н.В., 371  
 Вергасова Е.О., 121  
 Викстром М., 232  
 Винарская А.Х., 290  
 Виноградов Д.С., 57  
 Вихлянец И.М., 51, 207  
 Владимиров Г.К., 8  
 Владимиров Ю.А., 8  
 Внуков В.В., 137  
 Воденев В.А., 9, 166, 173  
 Воейкова Т.А., 246  
 Войтенко П.А., 366  
 Волжанинов Д.А., 372  
 Волотовский И.Д., 9  
 Волохина И.В., 59  
 Волошин Р.А., 219  
 Волошин С.В., 91, 389  
 Волченко Н.Н., 224, 230  
 Воронцов И.Е., 20  
 Воротынцев М.А., 187  
 Гаврилко Т.А., 240  
 Гавшина А.В., 29  
 Гагаринский Е.Л., 33  
 Гаджиев З.И., 61  
 Гаджиева Э.Т., 289  
 Гайдин С.Г., 297, 325  
 Гайнутдинов Х.Л., 138, 152, 290, 292, 293  
 Галегов Г.А., 12, 107  
 Галзитская О.В., 54  
 Галимзянов Т.Р., 197  
 Галка А.Г., 383  
 Галль Л.Н., 10  
 Галль Н.Р., 382  
 Галушко А.С., 382  
 Гарифуллин А.Д., 91, 389  
 Гармаза Ю.М., 158  
 Гарсиа Д., 123  
 Гвоздев Д.А., 248  
 Геворгян Т., 265  
 Генералов Е.А., 201  
 Гительзон И.И., 11  
 Гладких И.Н., 67  
 Глазунова О.А., 355  
 Глова В.И., 130  
 Глуханюк Е.В., 147  
 Глухов Г.С., 249  
 Глухова К.А., 80  
 Глушков М.В., 367  
 Глушников В.А., 270  
 Глявина М.М., 307  
 Глякина А.В., 54  
 Годжаев Н.М., 55  
 Голованов Е.А., 206, 210  
 Головкин В.А., 148, 167  
 Голубев А.В., 156  
 Гольгина Е.С., 383  
 Гольшев С.А., 174  
 Гольшева Е.А., 149  
 Гонотков М.А., 167  
 Гонсалес Э., 123  
 Гончаров Р.Г., 66  
 Гончарова А.С., 234  
 Горбенко Д.А., 392  
 Гордиенко А.И., 56  
 Горовой Ю.М., 109  
 Горохов В.В., 227  
 Горшков Б.Г., 386  
 Горюнов А.С., 84  
 Горючко В.В., 125  
 Горянова А.М., 210  
 Гостев Ф.Е., 22  
 Гравченко М.А., 299  
 Грачева Е.А., 350  
 Гривенникова В.Г., 175  
 Григорьев П.Н., 150  
 Григорьев Т.Е., 385  
 Григорьев Ю.С., 373  
 Гринкевич Л.Н., 294  
 Грищенко А.А., 295  
 Гроховский С.Л., 12, 107  
 Гудилин Е.А., 1, 175  
 Гудимчук Н.Б., 57, 70, 76, 82, 211  
 Гудков С.В., 249, 391  
 Гудымо А.С., 82, 95  
 Гулехмедов О.Г., 58  
 Гуляев Ю.В., 269  
 Гумматова С.Т., 162  
 Гурия Г.Т., 12  
 Гурова Н.Н., 337  
 Гурский Г.В., 12, 107  
 Гурский Я.Г., 12, 107  
 Гурьев Е.Л., 313  
 Гусакова С.В., 206, 210  
 Гусев Ю.С., 59  
 Гуськова Р.А., 151  
 Давыдова Н.А., 239  
 Дамина А.И., 177  
 Дарвин М.Е., 374  
 де Бреверн А.Г., 2, 46  
 Де Зотти М., 189  
 Дебабов В.Г., 246  
 Девяткин А.А., 226  
 Дегерменджи А.Г., 13  
 Дегтярева А.О., 116  
 Дегтярева О.В., 60  
 Демидов В.Н., 105  
 Демухамедова С.Д., 61  
 Демьяненко С.В., 310  
 Денисов А.А., 296  
 Дергилев А.И., 356  
 Дергоусова Е.А., 24  
 Дериглазов В.В., 375  
 Дерябина А., 123  
 Дерябина И.Б., 152, 290, 293  
 Джафаров А.Н., 153  
 Дзюба С.А., 149, 189, 272  
 Дигуров Р.В., 337  
 Дигурова И.И., 337  
 Диденко В.К., 301  
 Дмитриев А.В., 62  
 Долгачева Л.П., 16  
 Долгих Д.А., 98  
 Долгов А.А., 63  
 Домингес В., 123  
 Досина М.О., 296  
 Дроздов А.В., 14  
 Дубинин М.В., 192, 216, 219, 231  
 Дубова К.М., 86  
 Дубовский П.В., 86  
 Дубровский В.Н., 366  
 Дудина Л.Г., 257  
 Дьяконова А.Н., 64, 96, 337, 343  
 Дюкина А.Р., 233  
 Евстигнеев М.П., 245, 271  
 Евшин И.С., 20  
 Елифанов А.В., 366  
 Елкина Д.А., 218  
 Епифанова Е.А., 305, 324  
 Епишкина А.А., 383  
 Ергина Ю.Л., 284  
 Еремеев А.А., 292  
 Ермаков Ю.А., 154, 197  
 Ермаков Е.А., 64, 74  
 Ерохина М.В., 250  
 Есипова Н.Г., 47, 49  
 Ефимов А.В., 52  
 Ефимов В.Н., 279  
 Ефимова Е.Г., 116  
 Ефимова С.С., 155, 176  
 Ефремов Р.Г., 16, 83, 160, 165, 181  
 Ефремов Ю.М., 376  
 Жаркова М.С., 119  
 Жармухамедов С.К., 219  
 Жестков А.С., 382  
 Жихорева А.А., 392  
 Жуков В.В., 348  
 Жукова Г.В., 234  
 Жулябина О.А., 65  
 Журавлева О.А., 246  
 Забелин А.В., 380  
 Завьялова Е.С., 330  
 Завьялова О.С., 271  
 Заичкина С.И., 233  
 Зайцев А.В., 82, 284, 319  
 Зайцев К.С., 155  
 Зак П.П., 250  
 Закирьянов Ф.К., 108  
 Занин Д.Е., 378  
 Зарайский А.Г., 174  
 Захаров А.А., 266  
 Захаров В.С., 318  
 Захарова А.А., 155, 176  
 Захарова Е.В., 66  
 Захарова О.А., 156  
 Зеленский К.А., 329  
 Зелепуга Е.А., 67  
 Зефилов А.Л., 150  
 Зефилов Т.Л., 292  
 Зиганшин Р.Х., 23, 24  
 Зиновьев С.В., 377  
 Зинченко В.П., 16  
 Зленко Д.В., 349  
 Золотцев В.А., 94  
 Зорина С.В., 125  
 Зуев Ю.Ф., 64, 74  
 Зуйкова А.А., 92  
 Иваницкий Г.Р., 17  
 Иванов И.И., 151, 174

- Иванова А.Г., 382  
Иванова Е.Г., 309  
Иванова Э.А., 68  
Иванова Ю.Д., 358  
Ивлиева-Перетокина И.В., 239  
Ивонцин Л.А., 220  
Ивченков Д.В., 157  
Ильичева И.А., 120  
Ильяш М.Ю., 263, 264, 278  
Илюкина Н.А., 298  
Илюхин А.А., 110  
Исерович П., 187  
Исмаилова Л.И., 238, 251  
Ишемгулов А.Т., 259  
Кабанов А.В., 99  
Каде А.Х., 299, 301  
Казакова Н.А., 179  
Казаринов К.Д., 252  
Казарян Ш.А., 253, 254  
Казмирук Н.В., 157  
Калаев В.Н., 167  
Калмыков Ю.П., 252  
Калужный Д.Н., 109, 111, 128, 130  
Камзолова С.Г., 357  
Камышева А.Л., 315  
Камышинский Р.А., 385  
Канаш Ю.С., 158  
Канев И.Л., 201, 403  
Капелько В.И., 207  
Капитонова М.А., 254  
Капитунова А.И., 69, 101  
Каплиева И.В., 234  
Капцов В.В., 100  
Каралян Н.Ю., 254  
Карандашев В.К., 208  
Карнаухов А.В., 189  
Карнаухов В.Н., 189  
Карнаухова Е.В., 348  
Карнаухова Н.А., 189  
Карпинская В.Ю., 329  
Карузина Н.Е., 80  
Каспаров В.В., 188  
Кастро Р.А., 389  
Касумов Р.Э., 221  
Касумов Э.А., 221  
Касумова И.В., 221  
Касьяненко Н.А., 106, 111, 255, 393  
Касьянов Г.И., 378  
Качер Ю.Г., 249  
Кельдиева О.А., 379  
Кижеватова Е.А., 311  
Ким В.П., 269  
Киракосян Г., 265  
Киреев И.И., 394  
Кирилина И.В., 146  
Кириченко М.Н., 256  
Кирсанов Р.С., 215, 315  
Киселёв И.А., 375  
Кленова Н.А., 270  
Климанова Е.А., 24  
Клюев П.Н., 124  
Князева А.С., 133  
Ковалев И.В., 179, 206  
Коваленко В.В., 92, 115  
Коваленко И.Б., 40, 52, 70, 76, 96, 196  
Кожокару А.Ф., 159, 222  
Козловская Э.П., 67  
Козмин Ю.П., 45  
Козырев С.В., 45  
Колпаков Ф.А., 20  
Колчанов Н.А., 18  
Кольтовер В.К., 208, 209, 349  
Комаров В.М., 112, 126  
Кондакова Е.В., 350  
Кондратьев М.С., 66, 71, 99, 112, 126  
Кононов А.А., 389  
Кононов А.И., 113, 244, 254  
Коншина А.Г., 160  
Коньшев И.В., 257  
Копишинская С.В., 229  
Копылова В.С., 351  
Копылова Г.В., 34, 204  
Корватовский Б.Н., 227  
Коренюк И.И., 323  
Коржиков-Влах В.А., 275  
Корнеев В.Н., 380  
Коробкина Ю.Д., 161  
Королева В.А., 381  
Коротков Е.В., 352  
Короткова М.А., 352  
Коротыш М.А., 229  
Корунова Е.С., 72  
Коршунова Г.А., 186, 215, 315  
Косенков А.М., 297  
Костарев А.В., 82  
Костерин С.О., 208  
Костецкий Э.Я., 141  
Костюков В.В., 245  
Котова Е.А., 98, 194, 215, 223, 315  
Котова С.Л., 376  
Кочарли Н.К., 162  
Кошкаров А.А., 77  
Кривацкая Г.И., 353  
Кривацкий Ю.В., 353  
Кравченко С.В., 299, 301  
Крайнова Е.Ю., 337  
Краснобаева Л.А., 114  
Краснов Н.В., 379  
Краснова С.Ю., 383  
Красновский А.А., 18  
Красняков И.В., 163  
Кратасюк В.А., 342, 396  
Крауклис И.В., 125  
Кривоносов М.И., 288, 350  
Криштоп В.В., 402  
Крупенина Н.А., 4  
Крупянский Ю.Ф., 92, 115  
Крутецкая З.И., 170, 171  
Крутецкая Н.И., 170, 171  
Крутинина Е.А., 357  
Крутитнин Г.Г., 357  
Крутова Н.С., 316  
Кручинин Н.Ю., 73  
Кручинина И.Ю., 382  
Крылов Н.А., 83, 160  
Крючкова О.Е., 373  
Ксенофонтов А.Л., 63  
Кубасова Н.А., 34  
Кувшинов А.Ю., 91, 389  
Кузнецов А.С., 165, 181  
Кузнецова А.В., 354  
Кузнецова Е.А., 127  
Кузнецова И.М., 87, 102  
Кузьмин П.И., 157  
Кузьмина Д.М., 298  
Кулаковский И.В., 20  
Кулешова Т.Э., 382  
Кулигин В.С., 246  
Кульчицкий В.А., 296  
Курбанов Р.Х., 74  
Кучеренко А.С., 320  
Кучеренко М.Г., 73  
Лабынцева О.М., 156  
Лабынцева Р.Д., 208  
Лавриненко И.А., 75  
Лавров И.А., 292  
Ладейнова М.М., 166, 173  
Ладемманн Ю., 374  
Лазукин А.А., 224, 230  
Лазуренко Д.М., 302  
Лакомкин В.Л., 207  
Лакунина В.А., 24  
Ланина Н.Ф., 380  
Ланкин В.З., 387  
Лантушенко А.О., 258, 271  
Лапшин Р.Д., 298  
Ларина А.В., 167  
Ларионов И.И., 390  
Ларюшкин Д.П., 233  
Латышева А.С., 94  
Лауринавичюс К.С., 100  
Лахно В.Д., 19  
Лебедев Ю.А., 401  
Лебедева Е.А., 148, 167  
Леберфарб Е.Ю., 116  
Левин Г.Я., 199  
Левицкий Д.И., 34  
Лепехина С.Ю., 12, 107  
Легута С.Н., 259  
Легута У.Г., 194  
Лизунова И.А., 189  
Лисица А.Е., 89  
Лихачев И.В., 260  
Лиходеева М.Н., 111  
Лобышев В.И., 19  
Ловягина Е.Р., 225  
Логинов П.А., 307  
Логинова М.М., 303  
Лойко Н.Г., 92  
Локтюшкин А.В., 151, 225  
Лопанская Ю.Н., 76  
Лопина О.Д., 24  
Лоскутова А.Ю., 226  
Лужков В.Б., 186  
Лузин А.Н., 356  
Лукошкова Е.В., 207  
Лунева О.Г., 23, 190  
Луппа А.А., 301  
Лушников С.Г., 62, 76  
Любарцев А.П., 183  
Ляховецкий В.А., 329  
Магомедов А.М., 378  
Мазиллов С.И., 59  
Майорова Л.А., 309  
Макаров А.А., 24  
Макеев В.Ю., 20  
МакИнтош Д.Р., 57  
Максимов Г.В., 21, 23, 175, 190  
Максимов Е.Г., 248  
Макшакова О.Н., 77  
Малахова Е.А., 403  
Малев В.В., 155, 176  
Малкин В.М., 117, 125  
Мальшко Е.В., 78, 81  
Мамедов М.Д., 22  
Мамиствалов Г.З., 255  
Мамонтова В.В., 118  
Манькова А.А., 79

- Маркелов Д.А., 263, 278  
 Маркина И.С., 369  
 Мартусевич А.К., 383  
 Мартынова А.О., 105  
 Марченко В.Ю., 82, 95  
 Марченко Я.Ю., 375  
 Масимов Э.А., 385  
 Маслакова К.Ю., 366  
 Масленникова О.М., 395, 402  
 Масютин А.Г., 250  
 Матвеева А.Г., 189, 272  
 Матвеева Т.А., 391  
 Матвейко Н.П., 261  
 Матора Л.Ю., 360  
 Матюшенко А.М., 34  
 Махмудова Ш.С., 168  
 Машковцева Е.В., 220  
 Медведев А.М., 378  
 Медведев Л.Н., 338  
 Медведев М.А., 206  
 Медведева Т.М., 295, 322  
 Медведева Ю.А., 20  
 Медвинский А.Б., 21  
 Мелехова О.П., 169  
 Мельдер Н.О., 348  
 Мельник Б.С., 80  
 Мельник Т.Н., 80  
 Мельникова Г.Б., 261  
 Мельницкая А.В., 170  
 Меркулова Т.И., 116  
 Миктанюк С.Е., 263  
 Миленина Л.С., 171  
 Мильчевский Ю.В., 355  
 Милютин Н.П., 137  
 Минасбекян Л.А., 172  
 Миронова А.Г., 191  
 Митрошина Е.В., 288, 303, 305  
 Митькевич В.А., 24  
 Михаловский И.С., 261  
 Михеев А.Ю., 279  
 Михеева И.Б., 216, 227  
 Михлина Е.В., 268  
 Михтанюк С.Е., 264, 278  
 Михуткин А.А., 385  
 Мищенко Т.А., 200, 288, 303, 305  
 Моисеева Е.Д., 12, 107  
 Моисеенко А.В., 115  
 Мойсенович М.М., 248  
 Молотковский Р.Ю., 197  
 Молочков Н.В., 51  
 Молчанов М.В., 100  
 Монастырская М.М., 67  
 Монахова М.В., 218  
 Морозов В.Н., 201, 279, 403  
 Морошкина Е.Б., 119, 121  
 Мудрилов М.А., 173  
 Мультхофф Г., 390  
 Мурадымов М.З., 379  
 Муранова Л.Н., 152, 290, 293  
 Мурзина Г.Б., 306  
 Муртазина А.Р., 81, 201  
 Мусаев Н.А., 168  
 Мустяца В.В., 82  
 Мухина И.В., 200, 229, 307, 313, 329  
 Мысин И.Е., 314  
 Мякишев М.В., 125  
 Мячина Т.А., 204, 372  
 Набиев С.Р., 34  
 Нагибина Г.С., 80  
 Наговицын И.А., 241, 262  
 Надточенко В.А., 22  
 Надточенко В.Н., 397  
 Назаров П.А., 215  
 Наквасина М.А., 336  
 Намиот В.А., 22, 49  
 Нарциссов Я.Р., 155, 157, 220, 227, 232, 351  
 Наумов А.А., 266  
 Негинская М.А., 308  
 Неелов И.М., 263, 264, 278  
 Незвинский А.А., 308  
 Некрасов А.Н., 45, 46  
 Немцева Е.В., 80, 89  
 Нескубина И.В., 234  
 Несмеянова Е.С., 309  
 Нестеренко А.М., 174, 197  
 Нестеров С.В., 72, 227, 235  
 Нечипуренко Ю.Д., 120, 339  
 Никельшпарг Э.И., 147, 175  
 Никитин А.М., 12, 107, 355  
 Никитин М.П., 386  
 Никитин П.И., 386  
 Никиян А.Н., 259  
 Николаев Б.П., 375  
 Николаева Т.И., 100  
 Никул В.В., 310  
 Новаковская Ю.В., 72  
 Ноговицына К.В., 348  
 Нокс П.П., 227  
 Нольде Д.Е., 83  
 Носарев А.В., 206  
 Оганесян А.А., 253, 254, 265  
 Оджагвердиева С.Я., 385  
 Озолин О.Н., 69, 101, 355  
 Округина А.В., 366  
 Олешкевич А.А., 340  
 Ольшанникова С.С., 381  
 Омельченко В.П., 311  
 Онищенко Г.Е., 250  
 Онхонова Г.С., 82, 95  
 Орехов Ф.С., 70, 176, 196  
 Орлов А.В., 386  
 Орлов Д.С., 119  
 Орлов Е.Е., 174  
 Орлов С.Н., 23, 206  
 Орлов Ю.Л., 356  
 Орлова Н.Г., 356  
 Осепян А.Ш., 209  
 Осинникова Д.Н., 119, 121  
 Осипов А.А., 314, 357  
 Осипов А.Н., 146  
 Островский М.А., 22  
 Остроумова О.С., 155, 176  
 Осыченко А.А., 397  
 Павич А., 250  
 Павлик Л.Л., 227  
 Павлова С.И., 231  
 Павловская М.А., 312  
 Пальмина Н.П., 188  
 Панарин Е.Ф., 111  
 Панина И.С., 83  
 Панова Г.Г., 382  
 Пантелеева А.А., 227  
 Панферова А.А., 387  
 Панфилова О.Ф., 143  
 Панченко Л.А., 120  
 Парин С.Б., 364  
 Парсаданян М.А., 107, 132  
 Паршина Е.А., 174  
 Паршина Е.Ю., 190  
 Пастон С.В., 90, 105, 121, 122  
 Пахарькова Н.В., 373  
 Пахомова В.М., 177  
 Пашкевич С.Г., 296  
 Пашкевич С.Н., 259  
 Пашенко В.З., 227, 248  
 Пензар Д., 20  
 Пеньер С., 67  
 Пеньков Н.В., 51, 388, 391  
 Першин В.И., 313, 329  
 Першукевич П.П., 250  
 Петренко В.И., 320  
 Петрова И.В., 179  
 Петросян М., 265  
 Петросян М.С., 254  
 Петрушанко И.Ю., 24  
 Петрушевский А.Г., 309  
 Пикалов В.А., 233  
 Пиняев С.И., 180, 198  
 Писмен Л.М., 163  
 Питлик Т.Н., 296  
 Пластун В.О., 266  
 Пластун И.Л., 266, 267  
 Плащина И.Г., 188  
 Плотников А.А., 137  
 Плотникова Л.В., 91, 389  
 Плутахин Г.А., 341  
 Плюснина Т.Ю., 337, 343  
 Погосян С.И., 25  
 Подольская Е.П., 379  
 Подопригора Г.И., 227  
 Покровский В.И., 181  
 Полевая С.А., 364  
 Полетаев А.И., 243  
 Полозов Р.В., 99, 120  
 Полтев В.И., 123  
 Полуэктов Ю.М., 24  
 Поляничко А.М., 85, 91, 121, 122, 130, 131, 389  
 Помазенкова Л.А., 141  
 Попов А., 115  
 Попов В.А., 308  
 Попова И.Ю., 314, 357  
 Попова Л.Б., 315  
 Попова М.А., 393  
 Попова Т.С., 242  
 Поройков В.В., 26  
 Посохина Е.Д., 268  
 Поспелова Ю., 133  
 Постникова Г.Б., 182  
 Постникова Т.Ю., 284  
 Постнов Д.Э., 27, 288  
 Потапенков К.В., 269  
 Потехин С.А., 400  
 Потлов А.Ю., 371  
 Преображенская Е.В., 69, 101  
 Прилуцкий Ю.И., 245  
 Припатинская Е.А., 401  
 Проданец Н.Н., 313  
 Прокопьев В.Е., 228, 315  
 Пронин А.С., 316  
 Пуртов Ю.А., 101  
 Путинцева О.В., 183  
 Пчелин П.В., 229, 307  
 Пчельникова А.В., 261  
 Рабинович А.Л., 183, 184  
 Раков И.И., 249  
 Ракчеева Т.А., 317  
 Рамазанов Р.Р., 121, 124

- Рамонова А.А., 248  
 Рапопорт В.Л., 125  
 Ревергук З.В., 254  
 Ревин В.В., 180, 193, 226, 316  
 Ревина Э.С., 198  
 Решетова К.И., 125  
 Ривас Ф., 123  
 Ризниченко Г.Ю., 28, 40, 64, 96, 337  
 Рожков С.П., 84  
 Розанова О.М., 233  
 Рокицкая Т.И., 186, 215, 315  
 Ролич В.И., 393  
 Романов Н.М., 85  
 Романов С.А., 270  
 Ронжин Н.О., 268  
 Рохмистрова Е.Г., 156  
 Рубашкин А.А., 187  
 Рубин А.Б., 4, 40, 64, 96  
 Рудковский М.В., 326  
 Рузавина Е.Н., 316  
 Румынский Е.И., 20  
 Рштуни Л.Р., 253, 254  
 Рыбакова О.Г., 299  
 Рыбченко А.А., 401  
 Рыдченко В.С., 179, 206, 210  
 Рыжиков А.Б., 82, 95  
 Рыжков И.И., 268  
 Рыжов В.А., 375, 390  
 Рябова И., 129  
 Савельев И.В., 125  
 Савицкий А.П., 29  
 Савченко Е.В., 245  
 Сажина Н.Н., 188  
 Сало В.А., 258, 271  
 Салтыков М.Ю., 358  
 Сальников В.В., 279  
 Сальникова Ж.А., 389  
 Самарцев В.Н., 192, 231  
 Самков А.А., 224, 230  
 Самченко А.А., 112, 126  
 Самыгина В.Р., 86  
 Санина Н.М., 141  
 Санникова Н.Э., 189  
 Сапелкин Е., 274  
 Саранцева М.Ю., 211  
 Саримов Р.М., 391  
 Сафаргалеева Е.А., 125  
 Свешникова А.Н., 161  
 Святченко С.В., 82, 95  
 Седов А.С., 308  
 Семенов А.Ю., 22  
 Семенова А.А., 175, 231  
 Семенова И.В., 392  
 Семенова М.Г., 188  
 Семёнова Н.Ю., 318  
 Семин Б.К., 225  
 Семин Ф.А., 209, 212  
 Семьянов А.С., 288  
 Сенько О.В., 354  
 Сергеев А.И., 297  
 Сергиевич Л.А., 189  
 Сергиенко Р.А., 330  
 Серебрянская Т.В., 106  
 Серов Д.А., 365  
 Серова Т.А., 359  
 Сибирев А.Л., 395, 402  
 Сивожелозов В.С., 182, 275  
 Сидоренко С.В., 23  
 Силантьева Д.И., 138, 290, 293  
 Силецкий С.А., 218, 232  
 Силонов С.А., 87, 102  
 Симакин А.В., 249  
 Симоненко Е.Ю., 161, 191  
 Симунин М.М., 268  
 Синецкая Е.С., 275  
 Сирота Н.П., 127  
 Скуратовская И.В., 258  
 Слатинская О.В., 190  
 Слонимский Ю.Б., 248  
 Смаглий Л.В., 206, 210  
 Смирнов А.П., 389  
 Смирнов О.П., 375  
 Смирнова Е.Н., 233  
 Смирнова Е.Ю., 319  
 Смитиенко О.А., 22  
 Смоленцева Д.А., 191  
 Сморгина А.С., 272  
 Снытников В.Н., 273, 274  
 Соболев А.С., 29  
 Соболева Е.Б., 284  
 Созарукова М.М., 387  
 Соколов П.А., 393  
 Соколов Р.А., 313, 329  
 Соколова О.С., 87, 115, 249  
 Солдатова А.А., 130  
 Соловьев И.Д., 29  
 Соловьева М.Е., 136  
 Сопова Ю.В., 254  
 Сорокин И.И., 394  
 Сорокина Л.Е., 320  
 Сорокина С.С., 233  
 Соснина И.С., 329  
 Спиридонова А.А., 119  
 Станишневна-Коновалова Т.Б., 87  
 Старинец В.С., 216, 219  
 Старкина О.В., 298  
 Старкова Т.Ю., 131  
 Степанов Г.О., 146  
 Степанова А.Е., 192  
 Степович М.А., 395, 402  
 Стовбун С.В., 349  
 Сторублевцев С.А., 88  
 Стравинскене Е.С., 373  
 Страховская М.Г., 196  
 Стрелкова О.С., 394  
 Суворова Ю.М., 352  
 Суковатая И.Е., 342, 396  
 Суковатый Л.А., 89  
 Сулейман Т., 232  
 Суровая А.Н., 12, 107  
 Сутормин О.С., 396  
 Сухов В.С., 173  
 Сыбачин А.В., 191, 269  
 Сырочева А.О., 355  
 Сырчина М.С., 397  
 Сырямина В.Н., 189, 272  
 Сысоев И.В., 295, 322  
 Сысоева М.В., 295  
 Сысоева М.В. Г., 322  
 Сыч Т.С., 244  
 Сюсин И.В., 193  
 Таланов Е.Ю., 216  
 Талис А.Л., 184  
 Тамашевский А.В., 158  
 Танковская С.А., 90  
 Тарабыкин В.С., 324  
 Таранов И.В., 269  
 Ташлицкий В.Н., 186  
 Твердислов В.А., 30, 65, 78, 81  
 Тевонян Л.Л., 128  
 Текуцкая Е.Е., 129, 273, 274  
 Тельная Е.А., 91  
 Тенникова Т.Б., 275  
 Тенчурин Т.Х., 385  
 Теньков К.С., 219  
 Теплов И.Ю., 16  
 Терентьев В.В., 71  
 Терешкин Э.В., 92, 115  
 Терешкина К.Б., 92, 115  
 Терпугов Е.Л., 60, 398  
 Тимашев П.С., 376  
 Тимофеев В.И., 8  
 Тимофеев В.П., 93  
 Тимошенко Д.В., 110  
 Тимченко А.А., 51  
 Тимченко М.А., 51  
 Титгат Я., 67  
 Титов С.В., 252  
 Титова В.Ю., 232  
 Тихазе А.К., 387  
 Тихонова Т.А., 194  
 Ткачев Я.В., 42, 93, 94  
 Томский А.А., 308  
 Тониоло К., 189  
 Торжкова П.Ю., 82, 95  
 Торшин И.Ю., 47  
 Тропынина Т.С., 68  
 Трофимов А.В., 250  
 Трофимова Н., 250  
 Тулеуханов С.Т., 16, 297  
 Тулина Т.А., 117  
 Тумаян В.Г., 47, 49, 355  
 Тумаянц К.Н., 323  
 Туроверов К.К., 87, 102  
 Туровская М.В., 324, 325  
 Туровский Е.А., 324, 325  
 Тхор Е.С., 190  
 Тымченко Е.Е., 130  
 Тымчук Т.М., 371  
 Тюнина О.И., 141  
 Удалова О.Р., 382  
 Удут В.В., 228  
 Узденский А.Б., 31, 326  
 Уланова А.Д., 207  
 Ульянов Е.В., 57  
 Унксов И.Н., 255  
 Урошлев Л.А., 47, 120  
 Усенко А.В., 305  
 Уткин Ю.Н., 86  
 Фадеев Р.С., 136  
 Фараджев А.Н., 327  
 Фатуллаев Е.И., 263  
 Фатуллаев Э.И., 263, 264  
 Федоров В.А., 40, 52, 64, 70, 76, 96  
 Федорова А.Д., 20  
 Федорцов Н.М., 97  
 Федосеев А.И., 62  
 Федосеева Д.М., 353  
 Федотова Е.А., 275  
 Фельдман Т.Б., 22  
 Феофанова Т.В., 359  
 Фесенко Е.Е., 32  
 Фесенко Е.Е. (мл.), 33  
 Филиппов С.В., 275  
 Фирсов А.М., 98, 194, 223  
 Фирсунин С.Н., 240  
 Фомин Л.Б., 195  
 Фомич М.А., 194  
 Фонин А.В., 87, 102

Формаджио Ф., 189, 272  
 Франк-Каменецкий М.Д., 34  
 Франциянц Е.М., 234  
 Фролов С.В., 371  
 Фролова А.А., 376  
 Фролова М.С., 355  
 Фурсова П.В., 343  
 Фурсова П.Ю., 337  
 Хабибуллина А.Р., 212  
 Хайлова Л.С., 215, 223  
 Хайруллина И.А., 241, 262  
 Хайтин А.М., 326  
 Халилов С.И., 320  
 Хамицаев А.К., 99  
 Хечинашвили Н.Н., 99  
 Химич Н.В., 56  
 Хисамиева Г.А., 150  
 Ходыков М.В., 120  
 Холина Е.Г., 70, 76, 196  
 Холявка М.Г., 75, 277, 381  
 Хомич Д.А., 197  
 Хомутов Г.Б., 269  
 Хорольская К.Д., 323  
 Хохлова А.Д., 204, 372  
 Хохлова Т.И., 399  
 Хренова А.А., 270  
 Хрущев С.С., 64, 96, 337  
 Худокормов А.А., 224, 230  
 Хундерякова Н.В., 233  
 Хундерякова С.А., 233  
 Хусаинов Д.Р., 323  
 Хусаинова Р.С., 400  
 Цаплев Ю. Б., 250  
 Цатуриян А.К., 34, 209, 212  
 Цуканов А.В., 356  
 Цыганков А.А., 35  
 Чадова И.Н., 328  
 Чайков Л.Л., 256  
 Чащина Г.В., 111, 130  
 Чвалун С.Н., 385  
 Черенкевич С.Н., 296  
 Черепанов Д.А., 22  
 Черепенин В.А., 269  
 Черненко Ю.П., 375  
 Черткова Р.В., 98  
 Четкин В.Р., 353  
 Чибисов Е.Е., 206, 210  
 Чижов А.В., 284, 319  
 Чикишев А.Ю., 79, 403  
 Чихиржина Е.В., 130, 131  
 Чопенко Н.С., 141  
 Чугунов А.О., 83  
 Чудайкина Е.В., 198  
 Чудинова Г.К., 241, 262  
 Чуличков А.Л., 92  
 Чулков Е.Г., 155  
 Чумаков М.И., 59  
 Чупахин Е.Г., 88  
 Чуриков Н.А., 353  
 Шабанов Г.А., 401  
 Шавкунов К.С., 355  
 Шавыкин О.В., 263, 278  
 Шагинян М.А., 107, 132  
 Шадже Е.А., 299, 301  
 Шайтан А.К., 133  
 Шайтан К.В., 36, 176  
 Шалабодов А.Д., 366  
 Шамова О.В., 119  
 Шарапов М.Г., 66  
 Шарипов Р.Н., 20  
 Шарко О.Л., 194  
 Шарова Т.В., 270  
 Шаталин Ю.В., 136  
 Шафеев Г.А., 249  
 Шахбазова Г.М., 385  
 Шахматова В.И., 323  
 Шахов А.М., 397  
 Шевцов М.А., 390  
 Шеина И.Ю., 382  
 Шелаев И.В., 22  
 Шереметьев Ю.А., 199  
 Шерматов Д.С., 343  
 Шеховцов П.В., 100  
 Шеховцова Е.А., 182  
 Шешукова А.А., 69, 101  
 Шипко М.Н., 395, 402  
 Широков В.А., 394  
 Широкова О.М., 200, 329  
 Шихлярова А.И., 234  
 Шишова Н.В., 33  
 Шкловский В.М., 309  
 Шлектарёв В.А., 380  
 Шлойзенер И., 374  
 Шляпников Ю.М., 201, 279, 403  
 Шляпкина Е.А., 201, 403  
 Шманай В.В., 194  
 Шошина И.И., 329, 330  
 Шошина О.О., 136  
 Шпаченко И.Г., 403  
 Шпиринов О.Г., 87, 102  
 Шувалов В.А., 22  
 Шуленина О.В., 122  
 Шумейко С.А., 51  
 Щагина Л.В., 155, 176  
 Щеголев С.Ю., 360  
 Щелкина А.К., 111, 128  
 Щелчкова Н.А., 307  
 Щепинов М.С., 194  
 Щепкин Д.В., 34, 204  
 Щербина Д.Н., 331  
 Юртаева С.В., 279  
 Юсипович А.И., 190  
 Ягужинский Л.С., 72, 227, 235  
 Яковенко Л.В., 201  
 Яковенко С.А., 191  
 Яковлева Л.Ю., 375  
 Якупова Э.И., 51  
 Якушевич Л.В., 108, 114, 134  
 Ярославов А.А., 269  
 Яубасарова И.Р., 215  
 Яфарова Г.Г., 292  
 Яхно В.Г., 37  
 Ячкула Т.В., 233





Первый в мире умный браслет, определяющий **приход калорий, водный баланс, стресс** и другие показатели организма 100% **автоматически\***

\* Не требует ручного ввода данных!



## ИЗМЕРЯЕТ:



Потребление калорий



Водный баланс



Уровень стресса



Энергетический баланс



Расход калорий



Пульс



Сон



Эмоциональное состояние



Изменение веса



## КАК ИЗМЕРЯЕТ:



Пьезодатчик



Биоимпеданс сенсор



Гальванический датчик



9-осевой акселерометр



Гироскоп и магнитометр



Компания-производитель HEALBE имеет более **60** международных патентов и подтверждение **90%** точности измерений двумя независимыми исследованиями



ПОБЕДИТЕЛЬ В НОМИНАЦИИ  
**"INNOVATION AWARDS"**  
CES 2019 (ЛАС-ВЕГАС, США)

## Конфокальный микроскоп Nikon A1R HD25

В биомедицинских исследованиях наблюдается рост спроса на изучение крупных образцов, таких как ткани и даже целые организмы, и динамических событий, происходящих внутри них.

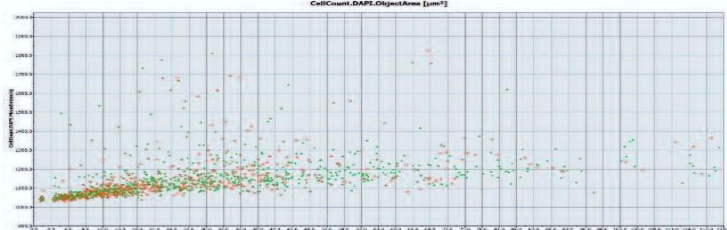
В ответ на этот запрос компания Nikon разработала конфокальный микроскоп A1 HD 25/ A1R HD 25 с самым большим полем зрения на рынке лазерных сканирующих конфокальных систем. Представляя больше данных в одном кадре, новая конфокальная система Nikon позволяет увеличить поле зрения, не принося в жертву разрешение или увеличение. В сочетании с новой моделью высокоскоростного резонансного сканера, новая конфокальная система позволяет с высокой скоростью и производительностью получать изображения цельных живых организмов, таких как дрозофила или данио.



		A1 HD25	A1R HD25
Размер изображения		25 мм (квадрат, вписанный в круг диаметром 25мм)	
Размер изображения в пикселях	Сканер на основе гальванозеркал	Мах. 4096 x 4096 пикселей	
	Резонансный сканер	-	Мах. 1024 x 1024 пикселей
Скорость сканирования, кадров в секунду (fps)	Сканер на основе гальванозеркал	10 fps (512 x 512 пикселей, bi-directional) 200 fps (512 x 16 пикселей, bi-directional)	
	Резонансный сканер	-	30 fps (512 x 512 пикселей) 720 fps (512 x 16 пикселей)

### Удвоенная производительность

С удвоенной площадью одного сканированного изображения, A1 HD 25/ A1R HD 25 значительно снижает время на захват для высокопроизводительного скрининга и экономит на сшивке, не принося в жертву разрешение или увеличение. Более того, новый точный резонансный сканер (1К, 1024x1024 пикселей) дает возможность высококачественной съемки в большом разрешении даже на малых увеличениях, позволяя наблюдать тонкие структуры в образце.



Тепловая карта подсчета клеток (справа) и график анализа клеточных ядер, показывающий зависимость средней интенсивности окраски от размера (слева)

Nikon Instruments – мировой лидер в разработке и производстве оптических и цифровых технологий для биомедицинских приложений. Мы поставляем оптические системы «под ключ» - отточенные до мелочей, мощные и производительные. Наши главные продукты – микроскопы и стереомикроскопы, цифровые камеры и программное обеспечение. Nikon предлагает линейку решений для конфокальной микроскопии и системы сверхвысокого разрешения, комплексные мультифотонные системы.

Сервис и поддержка от производителя на территории России

## Роботизированная система LIPSИ для скрининговых исследований живых клеток

Совместима с различными методами микроскопии (конфокальная, FRAP, две камеры) – сразу при установке или после апгрейда

Простая в применении

До 20 планшетов

Полная инкубация, в том числе во время съёмки

Нет стресса из-за переноса, так как транспортировка в контролируемых температурных условиях

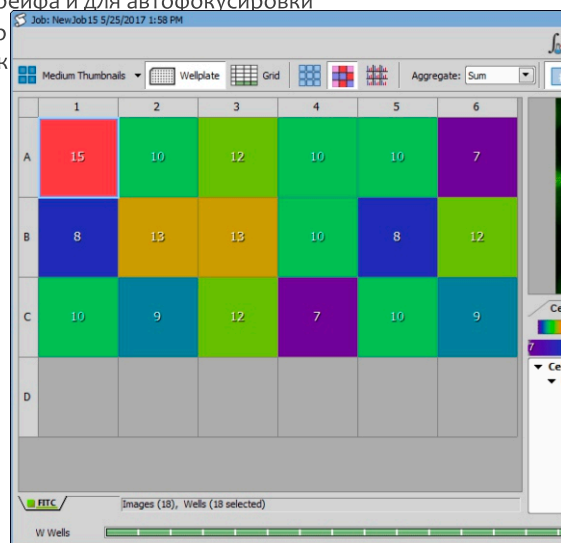
Совместима с планшетами со стеклянным или пластиковым дном, предметными стёклами и чашками Петри

Непрозрачный корпус позволяет размещать систему LIPSИ в помещении с внешним освещением

Компактный дизайн (1200 x 710 x 730 мм)

Система удержания фокуса Nikon Perfect Focus System для компенсации дрейфа и для автофокусировки

Широкий выбор стеклянным, так



Система LIPSИ разработана совместно с Prior Scientific и Life Imaging Services



Компания «Техноинфо» предлагает широкий спектр уникального оборудования для решения задач во многих областях науки. Будучи официальным представителем ведущих мировых производителей, «Техноинфо» также обеспечивает гарантийное и постгарантийное обслуживание установленных систем, обучение персонала и методическую поддержку пользователей.

Все сотрудники компании имеют профильное образование в своей области, поэтому мы подбираем наиболее подходящее решение в зависимости от потребностей пользователя. Большинство систем производится по индивидуальному заказу с учётом пожеланий клиента.

К нашим ключевым партнёрам относятся компании: Thermo Fisher, Rigaku Oxford Diffraction, PicoQuant, Applied Photophysics, Molecular Devices, IonTOF, Kratos, Xenocs, и другие.



AppliedPhotophysics

MOTEMPER

ThermoFisher  
SCIENTIFIC

Xenocs  
CRYSTAL SOLUTIONS

Rigaku  
oxford diffraction

PICOQUANT

**Контакты:**

sales@technoinfo.ru

www.technoinfo.ru

+7 (499) 243 66 26



**ОРТИКА®**  
I T A L Y

**УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ • КАЧЕСТВО • ЦЕНА**

Итальянская компания ОРТИКА – одна из ведущих компаний по производству учебного и лабораторного оборудования с 45-летним опытом НИОКР. Пользователи всего мира полагаются на продукты и решения ОРТИКА для повседневной работы в школе, университете и ЛПУ, а так же для проведения разнообразных научно-исследовательских экспериментов.



**Stormoff®**

Компания Stormoff является официальным дистрибьютором компании Optika в России. Департамент Лабораторного оборудования.

143401, Московская область, г. Красногорск, б-р Строителей, д. 4, к. 1.

+7 (495) 780-07-95 • lab@stormoff.com • www.stormoff.ru

# Аппараты ТРАНСАИР

Идеально подходят для применения в больницах, санаториях, нарко-диспансерах и других ЛПУ.

Доказанная эффективность при различных патологиях:

- купирование болевых симптомов
- нормализация женского здоровья
- лечение гипертонии и гипотонии
- гастроэнтерологические проблемы
- неврологические заболевания, а также депрессии и стрессы
- существенное сокращение сроков реабилитации, после травм и других серьезных нарушений



## Трансаир - 03

Двухпрограммный портативный аппарат с сетевым питанием.

Свободно помещается в портфеле, сумке и легко переносится к пациенту на дом.

Габариты: 200x110x65 мм  
Масса: 0,5 кг

## Трансаир - 04

Трехпрограммный стационарный аппарат.

Основной для работы в больницах, поликлиниках, санаториях.

Габариты: 290x200x120 мм  
Масса: 1,5 кг

## Трансаир - 05

Полипрограммный аппарат, обладающий широкими клиническими и сервисными возможностями.

Габариты: 290x200x155 мм  
Масса: 2 кг

## Трансаир - 07

Специализированный сурдологический аппарат. Предназначен прежде всего для лечения нейросенсорной тугоухости и субъективного ушного шума методом ТЭС в сочетании с акустической нагрузкой, определяемой на этом же аппарате.

Габариты: 290x200x155 мм  
Масса: 3 кг

За разработку метода ТЭС-терапии группа ученых во главе с д.м.н., проф. В.П. Лебедевым удостоена премии Правительства РФ в области науки и техники (2004 г.).



Т  
Э  
С

ООО «ЦЕНТР ТЭС»  
Россия, 191186, Санкт-Петербург,  
Невский пр., д. 30, офис 6.8  
тел.: 8-800-333-30-35  
+7 (812) 402-42-04  
www.tes.spb.ru